

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI,
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Morfologie a funkční charakteristiky lidských gamet – možnosti klinického uplatnění

**Morphology and Functional Characteristics
of Human Gametes –
the Potential Clinical Application**



Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Plzeň 2014

Abstrakt

Snížená plodnost je rostoucím problémem celé populace fertilního věku. V současné době postihuje 10 – 15% párů, asi 10% z nich nedokážeme zatím pomoci žádnou z metod asistované reprodukce. Na významu tak získává snaha o identifikaci nových prognostických markerů, které by napomohly ke zvýšení efektivity léčby neplodnosti.

První část práce je zaměřena na studium hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině u žen trpících neplodností v porovnání se zdravými a plodnými dárkyněmi oocytů. Stanovována byla hladina prolaktinu, volného T3 a T4 hormonu, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity. Navazující část práce je věnována rozdílu těchto parametrů u žen s normálním body mass indexem (BMI) s ženami trpícími nadváhou.

Druhá polovina práce je zaměřena na mužský faktor neplodnosti a věnuje se stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí a možnostmi jejího ovlivnění pomocí propolisu. Respirační aktivitu spermií jsme měřili na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros.

Výsledky analýz prokázaly statisticky signifikantně vyšší hladiny prolaktinu a volného T4 hormonu ve folikulární tekutině u žen s poruchou plodnosti oproti skupině zdravých plodných dárkyň oocytů. U homocysteinu tomu bylo naopak, studie prokázala statisticky signifikantně vyšší hladiny ve folikulární tekutině u zdravých plodných žen. Nalezena byla signifikantně nižší hladina glutathionperoxidázy u skupiny žen s nadváhou. V úspěšnosti dosažení těhotenství se ženy s normálním BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily.

Ve studiích věnovaným lidským spermiím byla nalezena v asthenozoospermatických vzorcích signifikantně snížená aktivita komplexu I.

Ve vzorcích ošetřených propolisem došlo ke zmírnění poklesu progresivní motility v čase. U těchto vzorků byla pozorována i signifikantně vyšší spotřeba kyslíku v přítomnosti ADP a substrátů komplexů I a II.

Naše studie potvrzuje, že folikulární tekutina a látky v ní obsažené hrají klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Další studium dárkyň oocytů a jejich podrobnější srovnání s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch

plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost.

Výsledky další studie naznačují, že na snížené pohyblivosti spermií by se mohl podílet i zvýšený únik protonů z mitochondriální matrix, který vede ke snížené aktivitě fosforylačního procesu. Lepší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých či s postiženou motilitou, nám pomůže lépe pochopit proces fyziologického oplodnění a napomůže i ve výběru té nejvíce životaschopné spermie pro léčbu neplodnosti metodami asistované reprodukce.

Abstract

Reduced fertility is a growing problem through the population in fertile age. It currently affects 10-15% of couples; any method of assisted reproduction cannot help 10% of them. The effort to identify new prognostic markers that would help to improve the effectiveness of treatments of infertility assumes increasing significance.

The first part of this publication is focused on the study of levels of selected hormones and markers of oxidative stress in follicular fluid of women with diagnosis of infertility compared to healthy and fertile donors of oocytes. Levels of prolactin, free T3 and T4 hormone, homocysteine, malonydiladehyd, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity and were analyzed.

Next part is devoted to the difference between these parameters in women with normal body mass index (BMI) compared to women suffering from overweight.

The second half of this work is focused on the male factor of infertility. The aim of our study was to determine comprehensively mitochondrial respiratory activity of sperm with normal and reduced motility and to evaluate the impact of propolis on human sperm motility. Respiratory activity of sperm was measured using oxygraph Oroboros.

The results showed significantly higher levels of prolactin and free T4 hormone in follicular fluid of infertile women in comparison to the group of healthy fertile oocyte donors. On the contrary, the study showed significantly higher homocysteine level in the follicular fluid of healthy fertile women. We observed significantly lower levels of glutathione peroxidase in the group of overweight women. The pregnancy success rate with women with normal BMI and overweight women did not differ significantly from each other.

In studies dealing with determination of oxygen consumption by human sperm, asthenozoospermatic samples displayed significantly reduced activity of complex I.

In samples treated with propolis, progressive motility was preserved in time. In these samples, oxygen consumption in the presence of adenosine diphosphate and substrates of the Complex I and Complex II were significantly increased.

Our study confirms that follicular fluid and its substances play a key role in the regulation of reproductive processes. Further study of oocyte donors and their detailed comparison with infertile patients with various gynecological causes of infertility will be beneficial further to clarify the pathophysiological mechanisms regulating fertility.

The results of the study formed on human spermatozoa suggest that increased leakage of protons from the mitochondrial matrix, which leads to reduced efficiency of phosphorylating process, could participate in the reduced sperm motility. Better characterization of male germ cells, either completely healthy or with affected motility, will help us to understand better the physiological process of fertilization and also to choose the most viable sperm for infertility treatment by methods of assisted reproduction.

Předmluva

Tato práce vznikla na Ústavu histologie a embryologie a Ústavu fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Vzorke pochází z Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Zentren Prof. Zech-Pilsen.

Ráda bych poděkovala svým školitelkám doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D. a doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za jejich odborné vedení a dohled na práci.

MUDr. Miroslava Čedíková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a veškeré převzaté údaje řádně citovala. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V textové části byly použity části předchozích článků autora, jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce.

V Plzni, dne 1. 7. 2014

MUDr. Miroslava Čedíková

Obsah

1 Úvod	12
1.1 Lidské gamety a markery užívané ke sledování jejich kvality	12
1.1.1 Oocyt a jeho vývoj	12
1.1.2 Biochemické markery folikulární tekutiny užívané ke sledování kvality oocytů.	15
1.1.3 Spermie a jejich vývoj.....	25
1.1.4 Markery užívané ke sledování kvality spermií	33
2 Cíle práce	36
3 Materiál a metodika	37
3.1 Použité metody pro cíl 1 a 2	37
3.1.1 Studovaný soubor vztahující se k cíli 1.....	37
3.1.2 Studovaný soubor vztahující se k cíli 2.....	37
3.1.3 Stanovení studovaných biochemických markerů ve folikulární tekutině	38
3.2 Použité metody pro cíl 3 a 4	40
3.2.1 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 3.....	40
3.2.2 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 4.....	40
3.2.3 Separace spermií metodou hustotního gradientu	40
3.2.4 Vysokoučinná respirometrie	41
3.2.5 Příprava ethanolového extraktu propolisu.....	44
3.2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	44
3.2.7 Permeabilizace buněčné membrány spermie	45
3.2.8 Průtoková cytometrie	45
3.2.9 Aktivita citrátsyntázy	46
3.2.10 Analýza dat a statistika.....	46
4 Souhrn výsledků a jejich diskuze	47
4.1 Výsledky vztahující se k cíli 1	47
4.2 Výsledky vztahující se k cíli 2	56
4.3 Výsledky vztahující se k cíli 3	60
4.4 Výsledky vztahující se k cíli 4.....	66
5 Závěry	78
5.1 Závěry vztahující se k cíli 1 a 2	78

5.2	Závěry vztahující se k cíli 3	79
5.3	Závěry vztahující se k cíli 4	79
5.4	Závěry pro praxi a výhled do budoucna	80
6	Literatura	81
7	Přílohy	103
8	Poděkování	192

Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
AMH	anti-mülleriánský hormon
AmA	antimycin A
AOK	celková antioxidační kapacita
ART	techniky asistované reprodukce
ATP	adenosintrifosfát
bFGF	basic fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů
BMI	body mass index
c	cytochrom c
CEA	karcinoembryonální antigen
SCF	stem cell factor
D	ADP, adenosindifosfát
Dig	digitonin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EEP	ethanolový extrakt propolisu
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	Enzyme-Linked immunoSorbent Assay
ETF	electron-transporting flavoprotein, flavoprotein přenášející elektrony
FADH₂	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon
FGF	růstový faktor fibroblastů
FSH	folikuly stimulující hormon
FT	folikulární tekutina
ft3	volný T3 hormon
ft4	volný T4 hormon
G	glutamát
GH	růstový hormon
GpDH	glukosa-6-fosfát dehydrogenáza
GPx	glutathionperoxidáza

GST	glutathiontransferáza
HCy	homocystein
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonová kyselina
ICSI	intracytoplazmatické injekce spermie
IGF-I	insulin-like growth factor I, insulinu podobný růstový faktor I
IGF-II	insulin-like growth factor II, insulinu podobný růstový faktor II
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KAT	kataláza
LIF	leukaemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
LH	luteinizační hormon
M	malát
MDA	malonyldialdehyd
MTHFR	methylenetetrahydrofolát reduktáza
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
Omy	oligomycin
OXPHOS	oxidativní fosforylace
P	pyruvát
PBS	fosfátový pufr
Pcar	palmitoylcarnitin
PGC	primordial germ cells, primordiální zárodečné buňky
Rot	rotenon
S	sukcinát
SCSA	Sperm chromatin structure assay
SHBG	sex hormon-binding globulin, pohlavní hormony vázající globulin
SOD	superoxiddismutáza
TBG	tyroxin vázající protein
TGFβ	transforming growth factor β
TMPD	N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid
TNFα	tumour necrosis factor α
WHO	World Health Organization, světová zdravotnická organizace

1 Úvod

1.1 Lidské gamety a markery užívané ke sledování jejich kvality

1.1.1 Oocyt a jeho vývoj

Jak vznikne nový jedinec? To je otázka, která provázela lidstvo již od nepaměti. Hippokrates (460 – 370 let před n. l.) se domníval, že muž i žena přispějí ke vzniku nového jedince stejně - svým semenem, po jejichž smísení v děloze se začne vyvíjet embryo. Naopak Aristoteles (384 – 322 před n. l.) upřednostňoval teorii, že žena je pouze „živnou půdou“ pro mužské semeno. Tyto teorie přetrvávaly až do 17. století, kdy byla dokázána existence samičího oocytu. K jeho objevení přispěli William Harvey, Jan van Horne, Jan Swammerdam, Neils Stensen, Reinier de Graaf, Francesco Redi a Karl Ernst von Baer.

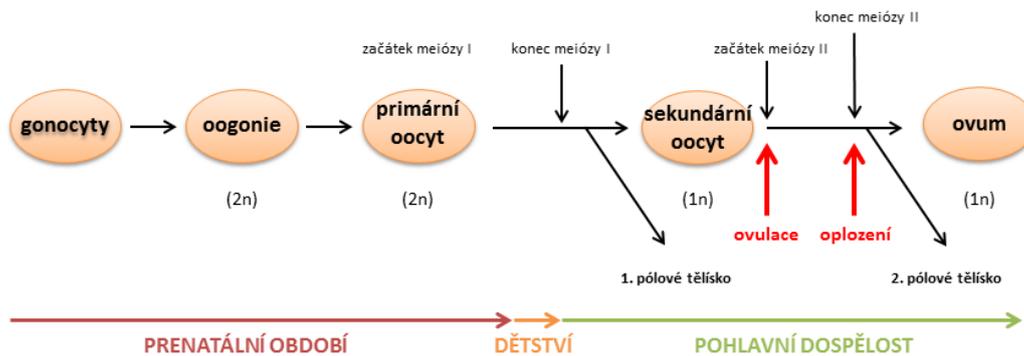
V roce 1651 William Harvey publikoval své životní dílo *De Generatione Animalium*, průkopnickou knihu o embryologii, kde rozporuje mnoho z Aristotelových teorií a kde prohlásil „*ex ovo omnia*“ (vše pochází z vejce). Na titulní straně této knihy je vyobrazen řecký vládce bohů, Zeus, sedící na svém trůnu a v ruku držící dvě poloviny vejce. Toto vejce opouští vše živé - rostliny, hmyz, ryby, obojživelníci, plazi, ptáci a savci, včetně člověka.

Dánský geolog a anatom Niels Stensen jako první diskutoval roli ovarií a v nich přítomných oocytů v reprodukci savců. Ale byl to až Reinier de Graaf, který upoutal pozornost vědců a roku 1672 publikoval knihu *De Mulierum Organis Generationi Inservientibus*, ve které popisuje a detailně ilustruje ženský reprodukční systém. Stejně jako Stensen i on mylně považoval ovariální folikuly za oocyty a domníval se, že k jejich oplodnění dochází ještě před tím, než opustí ovarium. De Graaf však nedostal šanci své dílo dokončit, tragicky zemřel rok po publikaci své knihy a nedožil se tak toho, kdy o pět let později jeho kolega žijící ve stejném městě, Anthony van Leeuwenhoek, vynalezl mikroskop. Kdyby nezemřel tak brzy, pravděpodobně by společně s van Leeuwenhoekem a jeho mikroskopem objevili skutečný oocyt uvnitř folikulu. To se ale nestalo, a na jeho objevení se čekalo dalších 155 let (do roku 1827), kdy Karl Ernst von Baer z Lipska popsal oocyt uvnitř Graafova folikulu.

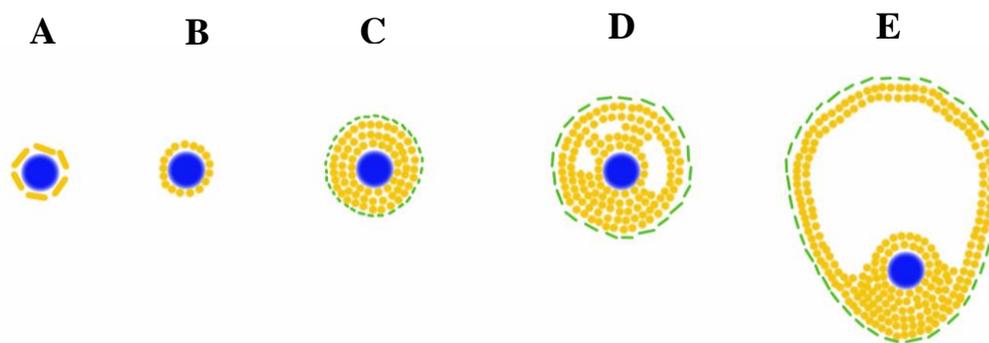
Oocyt je ženská pohlavní buňka, jejíž vývoj začíná již ve fetálním období. Pochází z primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells, PGC), které proliferují a migrují z endodermy stěny žloutkového vaku do vznikajících ovaríí, zde začíná jejich diferenciace v oogonie [McLaughlin a McIver, 2009; Wylie et al., 1986]. Regulační mechanismy ovlivňující vlastní vývoj, migraci a proliferaci PGC nejsou ještě zcela objasněny, nicméně některé z účastníků se genů a růstových faktorů již identifikovány byly. Proliferace PGC je například stimulována bFGF (basic fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů), TNF α (tumour necrosis factor α , tumor nekrotizující faktor α) a LIF (leukaemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor) [Dolci et al., 1993; Kawase et al., 1994; Matsui et al., 1992]. Naopak pro formování PGC jsou zásadní proteiny *BMP4* a *BMP8b* (bone morphogenetic protein 4 a bone morphogenetic protein 8b), jedná se o členy superrodiny TGF β (transforming growth factor β , transformující růstový faktor β) [Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000]. Mezi další nezbytné účastníky fyziologického vývoje PGC řadíme konnexin 43, který se podílí na formování buněčných spojení [Juneja et al., 1999], kyselinu retinovou s její anti-apoptotickou a proliferativní aktivitou [Koshimizu et al., 1995] a SCF (stem cell factor) [Hummitzsch et al., 2013].

Oogonie procházejí řadou mitotických dělení a společně se somatickými buňkami tvoří tzv. klastry radiálně orientované směrem k povrchu ovaria. Oogonie se zvětšují a dávají vzniknout primárním oocytům, naopak ze somatických buněk vznikají folikulární epitelální buňky granulosa [Hummitzsch et al., 2013]. Regulační procesy těchto dějů již byly podrobně popsány [Ewen a Koopman, 2010], výjimku tvoří zatím stále diskutovaný původ somatických buněk.

V průběhu postnatálního života oocyty pokračují v růstu a maturaci. Primární oocyty, jejichž dělení je zastaveno v profázi prvního meiotického dělení, jsou obklopeny plochými epitelovými buňkami, což tvoří primordiální folikuly. Ty buď kontinuálně podléhají atresii nebo jsou naopak stimulovány k růstu [McLaughlin a McIver, 2009], kdy se z nich stávají folikuly primární. Ty jsou charakterizovány již přítomností kubických buněk granulosa [Picton, 2001]. Postupně dochází k další proliferaci těchto buněk a vzniku thekální vrstvy, čímž se stává folikul nezávislý na krevním zásobení [Young a McNeilly, 2010] a skrze další vývojová stádia (sekundární a antrální Graafův folikul), dochází k jeho finální maturaci a ovulaci [Binelli a Murphy, 2010]. Oogeneze a folikulogeneze jsou znázorněny na obrázcích 1 a 2.



Obrázek 1 – Oogeneze (n = počet chromosomových sad)



Obrázek 2 – Folikulogeneze; A = primordiální folikul, B, C, D = rostoucí folikul se zmnoženými buňkami granulózy a vznikajícími dutinkami vyplněnými folikulární tekutinou, E = Graafův folikul

Graafův folikul představuje poslední vývojové stádium folikulu před ovulací. V centru tohoto folikulu je umístěn plně dorostlý oocyt obklopený buňkami cumulus oophorus a dutinou (antrem) vyplněnou folikulární tekutinou. Stěna folikulu je tvořena desítkami tisíc buněk granulózy rozmístěných do několika vrstev a na samé periferii vrstvami buněk theca interna a theca externa.

Během folikulárního vývoje zvětší oocyt svůj objem 100 až 300 krát, ve stejné době dochází k finálnímu formování antrální dutiny a k velkému přírůstku folikulárních buněk [Griffin et al., 2006]. Uvnitř rostoucího oocytu dochází k akumulaci glykogenu, lipidů,

proteinů a mRNA, zároveň přibývá buněčných organel potřebných k zvýšení syntetické aktivity oocyty. Řadíme k nim endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex, ribosomy [Fair et al., 1997; Picton et al., 1998] i mitochondrie, jejichž počet vzrůstá od přibližně 200 v oogonii, přes 6000 v oocyty ve stádiu primordiálního folikulu, až po 300 000 až 400 000 u maturovaného oocyty [Jansen a de Boer, 1998].

1.1.2 Biochemické markery folikulární tekutiny užívané ke sledování kvality oocytů

Hledání nových spolehlivých a neinvazivních markerů vhodných ke sledování kvality oocyty je jedním z klíčových témat výzkumu věnujícího se lidské i zvířecí asistované reprodukci.

Standardně užívaným způsobem je studium morfologie oocytů, které je relativně rychlé a jednoduché, nicméně tento způsob hodnocení nemá zcela uspokojivé výsledky a vede spíše k predikci negativních vývojových faktorů, než k těm pozitivním [Balaban a Urman, 2006]. Morfologické varianty oocytů mohou ovlivňovat jak faktory vnitřní, kam řadíme věk ženy či genetickou dispozici, tak i faktory vnější, mezi které patří kultivační podmínky, výživa oocyty nebo stimulační protokol [Balaban a Urman, 2006].

Další možností sledování kvality oocytů je analýza exprese genů granulárních buněk nebo oocyty samotného [Patrizio et al., 2007] a analýza pólového tělíska, které se využívá k zjištění chromozomálních vad vzniklých v průběhu druhého meiotického dělení [Dawson et al., 2006]. Některé studie však poukazují na skutečnost, že ani přítomnost pólového tělíska nemusí dokazovat zralý oocyt [Rienzi et al., 2005], který potvrzuje až přítomnost dělicího vřeténka [Petersen et al., 2009].

Většina těchto metod je však bohužel náročná a to nejen časově pro laboratorní personál, ale i z hlediska technického vybavení laboratoře.

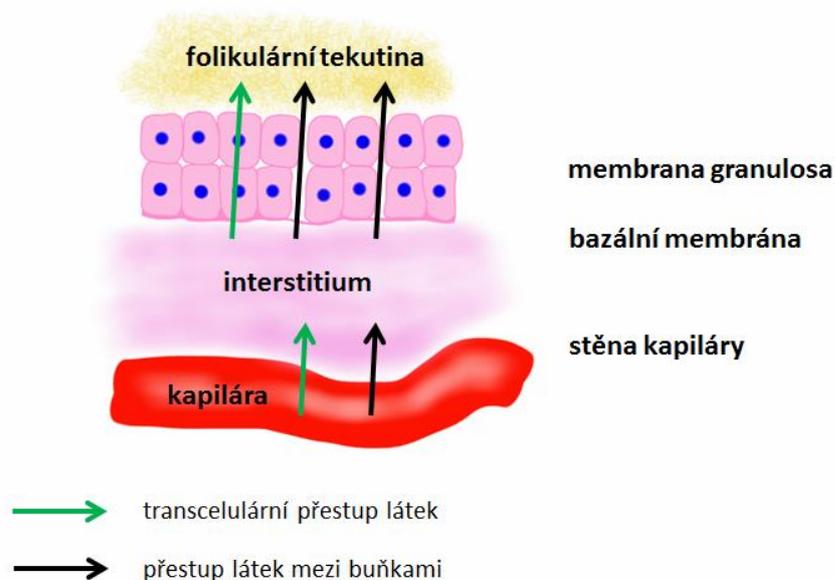
Mezi možné indikátory kvality oocyty byly v minulosti zařazeny parametry jako např. charakter mitochondrií oocyty či aktivita glukóza-6-fosfátdehydrogenázy v cytoplazmě, dále např. hladina antimülleriánského hormonu, inhibinu B v séru a folikulární tekutině atd. [Anifandis et al., 2005; Asimakopoulos et al., 2005, 2008, 2009; Forges et al., 2007; Fried et al., 2003; Lédée et al., 2008; Lewicka et al., 2003; Salmassi et al., 2005, 2008; Wakim et al., 1993].

Některé studie jsou zaměřeny na biochemickou analýzu folikulární tekutiny, která se získává během odběru oocytů pro fertilizaci *in vitro* [Blondin a Sirard, 1995].

Folikulární tekutina

Folikulární tekutina (FT) zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, ve kterém dochází k vývoji oocyty. Na jejím vzniku se podílí jednak přestup složek krevní plazmy přes folikulární bariéru a zároveň sekreční aktivita buněk théky a granulózy (obrázek 3) [Fortune, 1994]. Biochemické složení folikulární tekutiny hraje zásadní roli pro kvalitu oocyty, zvláště pro jeho schopnost fertilizace a následný vývoj embrya.

Složky nacházející se ve folikulární tekutině můžeme rozdělit do několika kategorií: a) hormony, b) růstové faktory ze superrodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), c) ostatní růstové faktory a interleukiny, d) reaktivní kyslíkové radikály, e) anti-apoptické faktory, f) proteiny, peptidy a aminokyseliny, g) sacharidy, h) prostanoidy [Revelli et al., 2009].



Obrázek 3 - Schématické znázornění vzniku folikulární tekutiny

A) Hormony

Štítná žláza

V ose hypotalamus – hypofýza – gonády / štítná žláza probíhají vzájemné interakce před i v průběhu těhotenství – jednak přímým působením tyroidních hormonů na ovaria a dále nepřímo prostřednictvím vlivu na pohlavní hormony vázající protein (SHBP), prolaktin a gonadotropiny uvolňující hormon.

Trijodtyronin je jedním z hormonů štítné žlázy přítomných v séru. Hlavní část celkového trijodtyroninu je vázána na transportní proteiny (tyroxin vázající protein (TBG), prealbumin, albumin) a aktivní formou je pak volný trijodtyronin (fT3). Hormon štítné žlázy tetrajodtyronin (tyroxin, T4) je fyziologickou částí regulační smyčky štítné žlázy s vlivem na celý metabolismus. Při hypofunkci štítné žlázy dochází k ovlivnění ovariální funkce snížením hladiny SHBG a naopak zvýšením sekrece prolaktinu. U neplodných žen je signifikantně vyšší prevalence výskytu autoimunitních onemocnění štítné žlázy v porovnání se stejně starými ženami [Abalovich et al., 2007], a to zvláště u žen s endometriózou, ovariální dysfunkcí (např. polycystická ovaria), idiopatickou infertilitou a opakovaným selháním *in vitro* fertilizace (IVF) [Bellver et al., 2008]. Přítomnost autoimunitní tyreoditidy sice nezasahuje do normálního průběhu implantace embrya, ale zvyšuje pravděpodobnost časného potratu [Poppe et al., 2007].

Sérové hladiny tyreoidálních hormonů prokazatelně ovlivňují ovariální funkce, nicméně v literatuře není zatím popsáno, jak souvisí hladiny těchto hormonů ve folikulární tekutině s ovariální činností či dokonce plodností ženy. Obě formy, volný trijodtyronin i tetrajodtyronin byly ve folikulární tekutině detekovány [Wakim et al., 1993], ale jejich význam pro vývoj a kvalitu oocyty nebyl zatím objasněn.

Prolaktin

Prolaktin je hormon syntetizovaný adenohypofýzou a k jeho vylučování do oběhu dochází intermitentně. Cílovým orgánem pro jeho působení je mléčná žláza. Je tvořen 198 aminokyselinami, jeho molekulová hmotnost je přibližně 22–23kDa a v séru se vyskytuje ve třech různých formách. Biologicky a imunologicky aktivní monomerická forma převažuje (cca 80%), 5–20% tvoří biologicky neaktivní forma dimeru a 0,5–5% je

přítomno jako tetramer, který má slabou biologickou aktivitu. Zvýšené hladiny prolaktinu mají inhibiční účinky na steroidogenezi ovarií a rovněž na produkci a sekreci hypofyzálních gonadotropinů. Během těhotenství narůstá koncentrace prolaktinu pod vlivem zvyšující se produkce estrogenu a progesteronu.

Hyperprolaktinémie může být příčinou poruch fertility u mužů i žen. Stanovení hladiny prolaktinu je užíváno při diagnostice anovulačního cyklu, hyperprolaktinemické amenorey a galaktorey, gynekomastie a azoospermie. Koncentrace prolaktinu je také stanovována při podezření na karcinom prsu a podvěsku mozkového.

Koncentrace prolaktinu v séru také ovlivňuje funkci ovarií, ale souvislost hladiny tohoto hormonu ve folikulární tekutině s plodností ženy není známa [Mendoza et al., 2002].

Gonadotropiny

Intrafolikulární koncentrace folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) do značné míry závisí na jejich hladině v krevním oběhu. U vysokých hladin FSH, LH a lidského choriogonadotropinu bylo prokázáno, že mají pozitivní efekt na maturaci oocyty a jsou asociovány s vyšší pravděpodobností úspěšné fertilizace [Cha et al., 1986; Ellsworth et al., 1984; Suchanek et al., 1988]. Zdá se, že gonadotropiny hrají důležitou roli při zrání a vývoji oocytů např. díky jejich schopnosti ovlivňovat sekreci kyseliny hyaluronové buňkami granulózy, která je potřebná pro normální průběh ovulace [Eppig, 1979; Mendoza et al., 2002].

Estrogen, progesteron, androgeny

Je známo, že estrogeně pozitivní intrafolikulární mikroprostředí souvisí s kvalitním oocytárním vývojem a má i anti-atretický efekt. Některé studie prokazují, že zvýšená hladina estrogenů a vyšší poměr estrogenů/progesteronu souvisí s kvalitnějším oocytárním růstem a maturací a vede k vyšší šanci na úspěšné otěhotnění [Botero-Ruiz et al., 1984; Lee et al., 1987; Messinis a Templeton, 1987; Tarlatzis et al., 1985; Teissier et al., 2000]. Naopak výsledky jiných studií tyto nálezy nepotvrzují [Costa et al., 2004; Messinis a Templeton, 1987; Rosenbusch et al., 1992; Suchanek et al., 1988]. Tesarik a Mendoza ve své práci demonstrují přímý efekt 17β - estradiolu na maturaci lidského

oocyty, kdy pomocí jeho působení na povrch buňky dochází k zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. Dochází ke zkvalitnění oplodnění *in vitro* a následné časné embryogeneze [Tesarik a Mendoza, 1995]. U oocytů, u nichž byla nalezena vyšší hladina intrafolikulárního progesteronu, byl pozorován častější výskyt poruch zygoty a časné embryogeneze [Ben-Rafael et al., 1987].

Při výskytu elevované hladiny androgenů v séru docházelo k snížení kvality oocytů a i k častějším poruchám rýhování [Uehara et al., 1985].

Ostatní hormony (růstový hormon, kortikosteroidy)

Ačkoliv byl růstový hormon (GH) ve folikulární tekutině identifikován, jeho přesný vztah k vývoji oocyty a těhotenství zatím objasněn nebyl. Tarlatzis a spol. ve své práci popisují nižší hladiny GH ve folikulární tekutině žen, u kterých došlo po IVF k otěhotnění, než u těch, u kterých se tak nestalo [Tarlatzis et al., 1993]. Naproti tomu Mendoza a spol. pozorovali pravý opak, vyšší hladiny GH se vyskytovaly u žen po úspěšném IVF pokusu [Mendoza et al., 2002].

U kortikosteroidů bylo pozorováno, že jejich přítomnost ve folikulární tekutině je spojována s finální maturací oocyty a mají také pozitivní vliv na úspěšné otěhotnění [Keay et al., 2002; Lewicka et al., 2003].

B) Růstové faktory ze superrodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β)

Do této rodiny řadíme inhibin, aktivin a antimüllerianský hormon (AMH). Inhibiny jsou produkovány buňkami granulózy a jejich hladina odpovídá aktivitě těchto buněk. V průběhu folikulární fáze dochází ke zvýšení aktivity inhibinu A a naopak k jejímu snížení u inhibinu B [Jeppesen et al., 2012; Lau et al., 1999; Wen et al., 2006]. V některých studiích byla asociována elevovaná hladina inhibinu B s vyšší kvalitou oocyty [Ulcova-Gallova et al., 2014] nebo i s predikcí vyšší kvality embrya [Chang et al., 2002; Ocal et al., 2004]. Jako použitelný marker kvality ovariální odpovědi se ukazuje poměr aktivinu A vůči inhibinu B, který koreluje s počtem získaných oocytů [Cupisti et al., 2007]. Lau a spol. našli asociaci mezi hladinou aktivinu A a kvalitou maturace oocyty [Lau et al., 1999].

Údaje o množství AMH vzhledem ke kvalitě oocyty jsou stále protichůdné. Cupisti a spol. zjistili, že hladina AMH u jednotlivých folikulů byla nepřímo úměrná se stupni maturace a vývojového potenciálu oocyty [Cupisti et al., 2007]. Naopak Takahashi a spol. ve své práci pozorovali, že vyšší hladina AMH byla asociována s vyšší fertilizační schopností oocyty [Takahashi et al., 2008].

C) Ostatní růstové faktory a interleukiny

V této početné skupině se nachází např. insulinu podobný růstový faktor I a II (IGF-I, IGF-II), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor fibroblastů (FGF), z interleukinů pak například IL-2, IL-10 a IL-12.

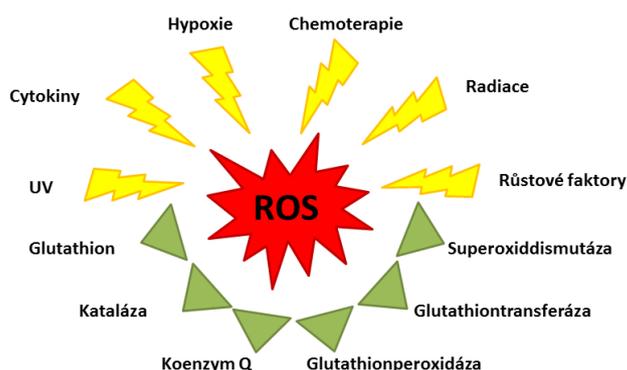
U intrafolikulární hladiny IGF-II bylo zjištěno, že signifikantně koreluje s fertilizační schopností oocyty, kvalitou rýhování i s časnou embryogenezí [Wang et al., 2006]. Pozitivní vliv na vývoj oocyty byl prokázán i u IGF-I [Jimena et al., 1992; Oosterhuis et al., 1998], zároveň ale některé studie ukazují na jeho negativní efekt v případě vývoje embrya [Asimakopoulos et al., 2008]. Stejně negativní vliv na embryogenezi byl prokázán i pro další růstové faktory získané z folikulární tekutiny jednotlivých folikulů (TNF- α , EGF, FGF) [Asimakopoulos et al., 2008].

U interleukinu IL-2 a IL-10 nebyla prokázána žádná asociace s výsledkem IVF léčby [Barak et al., 1992; Bili et al., 1998; Cerkiene et al., 2008]. U hladiny IL-12 byla nalezena korelace s vyšší fragmentací embrya [Lédée et al., 2008].

D) Reaktivní kyslíkové radikály

Oxidační stres je definován jako nárůst koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku, kdy dojde k převaze těchto volných radikálů nad účinkem endogenních antioxidantů. Jejich patologický efekt vyplývá z poškozování lipidů v buněčné membráně, nukleových kyselin, proteinů a dalších buněčných materiálů [Halliwell a Gutteridge, 1985]. *In vivo* je poškozujícímu efektu volných radikálů předcházeno nebo je limitován pomocí endogenních antioxidantů, které se podle biologické funkce dělí na enzymové, jako je např. superoxidodismutáza (SOD), glutathionperoxidáza (GPx), glutathiontransferáza (GST) nebo kataláza (KAT) a nízkomolekulární, rozpustné ve vodě nebo v tucích, jako je kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion,

kyselina lipoová, koenzym Q, bilirubin a kyselina močová (obrázek 4) [Knapen et al., 1999]. Na možnost, že by kyslíkové radikály mohly být spojovány s lidskou reprodukcí, bylo poprvé poukázáno před sedmdesáti lety [MacLeod J, 1943]. Roli volných radikálů a antioxidantů ve vztahu k ženským reprodukčním funkcím je, na rozdíl od mužských, věnována menší pozornost, ačkoliv byl prokázán jejich fyziologický, tak patologický efekt [Guérin et al., 2001].



Obrázek 4 - Schématické znázornění vybraných aktivátorů a inhibitorů reaktivních kyslíkových radikálů (žlutá barva - aktivátory, zelená barva - inhibitory).

Homocystein

S oxidačním stresem úzce souvisí hladina homocysteinu (HCy). Jeho vliv na homeostázu byl nejprve studován v souvislosti s chorobami kardiovaskulárního systému, nyní je však známo jeho široké působení i mimo srdečně-cévní systém, např. na ženský reprodukční systém [Forges et al., 2007].

Zvýšená hladina HCy (hyperhomocysteinémie) působí škodlivě více směry. Volné radikály pocházející z oxidace HCy jsou toxické pro cévní endotel, narušuje se koagulační kaskáda a endotel, který má za normálních okolností převážně antitrombotické vlastnosti, se stává tromboticky aktivnější [Raijmakers et al., 2001]. Dalším negativním vlivem HCy na cévní endotel je snížení syntézy oxidu dusnatého (NO) a jeho biologické dostupnosti. NO se podílí téměř na všech fázích ženské reprodukce, jako je ovulace, implantace embrya nebo kontrakce dělohy. Důležité je, aby fyziologické koncentrace NO byly v úzkém pásmu, protože jak nadbytek, tak nedostatek vyvolává nežádoucí účinky při reprodukci [Maul et al., 2003].

Hladina HCy koreluje s hladinou estrogenu [Mijatovic a van der Mooren, 2001] a mění se tedy nejen v závislosti na fázi menstruačního cyklu, ale i v průběhu těhotenství, kdy dochází k jejímu snížení, a to zvláště ve druhém trimestru [Eskes, 2001; Holmes et al., 2005; Tallova et al., 1999; Walker et al., 1999]. Snížení hladiny homocysteinu v průběhu těhotenství souvisí s nárůstem glomerulární filtrace, zvýšením objemu krevní plazmy a příspěvkem metabolismu plodu [Hague, 2003]. Také koreluje s úbytkem albuminu a je ovlivněna hladinou kyseliny listové [Walker et al., 1999].

Hyperhomocysteinémie je známým rizikovým faktorem těhotenských komplikací [Bakker a Brandjes, 1997; Goddijn-Wessel et al., 1996; Owen et al., 1997; Tamura a Picciano, 2006]. Při folikulogenezi může zvýšená hladina HCy aktivovat apoptózu vedoucí k folikulární atresii [Forges et al., 2007]. Byla prokázána negativní korelace mezi hladinou HCy ve folikulární tekutině se stupněm zralosti získaných oocytů a kvalitou embrya ve třetím dni kultivace *in vitro* [Ebisch et al., 2006]. Naopak pozitivní korelace byla popsána mezi hladinou folikulárního HCy a průměrem folikulu [Boxmeer et al., 2008]. Hyperhomocysteinémie ovlivňuje výsledek fertilizace *in vitro* - u žen se zvýšenou hladinou HCy byla prokázána nižší úspěšnost v dosažení těhotenství [Pacchiarotti et al., 2007].

E) Anti-apoptotické faktory

Apoptotické změny ve folikulárním mikroprostředí mohou významnou měrou ovlivnit výsledek IVF. Bylo prokázáno, že vyšší množství apoptotických buněk granulózy je spřaženo s nižší kvalitou oocytu a naopak jejich nižší množství koresponduje s viabilitou embrya [Høst et al., 2000]. Tento vyšší podíl apoptotických buněk se častěji vyskytuje u starších žen [Mercé et al., 2006].

Aktivace specifických buněčných cest, jako jsou ty zahrnující tumor nekrotizující faktor (TNF) a Fas-ligand (Fas-L) jsou rozhodující pro spuštění apoptózy uvnitř folikulu [Naz et al., 1997; Watanabe-Fukunaga et al., 1992].

F) Proteiny, peptidy a aminokyseliny

Folikulární tekutina obsahuje bohaté množství proteinů pocházejících z krve, i vznikajících sekreční aktivitou granulárních a thékálních buněk [Nandedkar et al., 1992].

Řadíme sem například α -fetoprotein, karcinoembryonální antigen (CEA), CA-125, antigen CD44, leptin, laktoferin, α 1-antitrypsin, inhibitor maturace oocyty, endotelin 2 a angiotensin II.

U α -fetoproteinu, CEA i CA-125 nebyla zjištěna signifikantně rozdílná hladina ve folikulární tekutině, která obklopovala oocyty oplodnění schopné a neschopné [Jimena et al., 1993].

CD44 je membránový protein, který se může vyskytovat i v rozpustné formě v některých tělních tekutinách včetně folikulární. Nižší koncentrace této solubilní varianty byla nalezena ve folikulech, které obsahovaly oocyt s vyšším potenciálem k úspěšnému oplodnění a vzniku kvalitního embrya [Ohta et al., 2001]. Ke stejným závěrům se došlo i u snížené hladiny α 1-antitrypsinu a inhibitoru maturace oocyty [Channing et al., 1983; Imoedemhe a Shaw, 1986; Nagy et al., 1989]. Naopak vyšší hladiny laktoferinu a endotelinu 2 měly pozitivní efekt na vývoj a zrání oocyty i embrya [Sudik et al., 1996; Yanaihara et al., 2007].

K aminokyselinám, u kterých byl zjištěn pozitivní prediktivní vliv na výsledek IVF, patří například alanin, glycin a D-asparagová kyselina [D'Aniello et al., 2007; Sinclair et al., 2008].

G) Sacharidy

K markerům oocytární kvality z této skupiny řadíme hyaluronan a myoinositol. Vyšší koncentrace hyaluronanu byla prokázána ve folikulech, ve kterých docházelo ve větší míře k apoptóze granulárních buněk a obsahovaly oocyty se zhoršenou fertilizační schopností [Saito et al., 2000]. Naopak vyšší hladina přítomného myoinositolu byla asociována s vyšší kvalitou oocyty [Chiu et al., 2002].

H) Prostanoidy

Vyšší hladina prostaglandinů se ukazuje jako pozitivní marker kvality oocyty [Jeremy et al., 1987; Suchanek et al., 1988; Webster et al., 1988]. Vyšší hladina prostaglandinu F2 α , produkovaného buňkami granulózy, byla nalezena ve folikulární tekutině obklopující oocyt, který byl následně úspěšně fertilizován [Suchanek et al., 1988]. Naproti tomu byla ale zvýšená hladina prostaglandinu E2 identifikována ve folikulární

tekunině žen trpících endometriózou. V důsledku této elevované hladiny dochází k narušení rovnováhy hladiny steroidních hormonů a vzniku neplodnosti asociované s endometriózou [Wang et al., 2012].

Prostaglandiny však mají velice rychlý poločas rozpadu, a je tedy těžké jejich hladinu přesně naměřit, z toho důvodu je jejich potenciál pro využití v diagnostice značně omezen.

1.1.3 Spermie a jejich vývoj

Je tomu už více než tři sta let, když v 17. století Antoni van Leeuwenhoek pohlédl do svého mikroskopu a jako první pozoroval lidskou spermii. Roku 1677 poslal dopis Britské královské společnosti, ve kterém informoval o svém objevu. V dopise napsal:

What I investigate is only what, without sinfully defiling myself, remains as a residue after conjugal coitus. And if your Lordship should consider that these observations may disgust or scandalise the learned, I earnestly beg your Lordship to regard them as private and to publish or destroy them as your Lordship sees fit.

[Leeuwenhoek, 1678]

Královské společnosti trvalo další dva roky, než jeho objev zveřejnila.

Objevením spermií vyvstala otázka, kdo je zodpovědný za samotné oplození, jsou-li to spermie nebo seminální tekutina. Většina přírodovědců té doby se domnívala, že spermie nemají v reprodukci žádnou roli. Patřili k nim například Vassisneri, Maupertuis nebo Buffon. Někteří byli zase přesvědčení, že úkolem spermií je udržet semeno v tekutém stavu. Dokonce se uvažovalo i o tom, že se jedná o samostatný organismus, který by měl být zařazen do klasifikace k ostatním zvířatům.

Spory o tom, zda tím samotným oplodňujícím faktorem jsou spermie nebo seminální tekutina, ukončili až roku 1824 Jean-Louis Prévost a Jean Baptiste Dumas, kterým k tomu dopomohly pokusy na žábách.

Byla to dlouhá cesta, kterou musely spermie i lidské poznání urazit, aby o nich bylo známo to, co víme dnes. Ale ani v dnešní době nevíme vše a je stále spousta otázek, které čekají na své odpovědi.

Stavba spermií

Spermie jsou mužskými pohlavními buňkami nesoucí genetickou informaci a sloužící k oplodnění oocyty. Jsou tvořeny hlavičkou a bičíkem a jejich velikost se pohybuje mezi 50 až 60 μm , z toho na bičík připadá 40 až 50 μm .

Bičik je nejdelší částí celé spermie a jeho ultrastruktura je důležitá pro správný pohyb této buňky. Rozdělujeme ho na čtyři části - spojovací oddíl, střední oddíl, hlavní a koncovou část [Turner, 2006]. Všemi částmi prochází axonema. Jedná se o cytoskeletální strukturu složenou z kruhu devíti dvojic mikrotubulů okolo centrálního páru. Z každé této vnější dvojice odstupují vnitřní a vnější dyneinová raménka a radiální paprsek. Tyto paprsky směřují k centrálnímu mikrotubulárnímu páru [Clermont et al., 1990; Fawcett, 1975].

Spojovací oddíl je krátký proximální úsek bičíku, který se upíná k jádru. Po něm následuje střední oddíl, který zabírá jednu čtvrtinu až jednu třetinu délky bičíku. Je pro něj charakteristická přítomnost devíti vnějších densních vláken, která jsou uložena vně od vnějších devíti párů mikrotubulů [Turner, 2006]. Vně těchto vláken se nachází mitochondriální pochva.

Mitochondrie jsou zde uloženy v helikálně uspořádaných dvojicích, v celkovém počtu 72 až 80 mitochondrií v jedné spermii [Ankel-Simons a Cummins, 1996; St John et al., 2000a]. Umístění mitochondrií je znázorněno na obrázku 5.

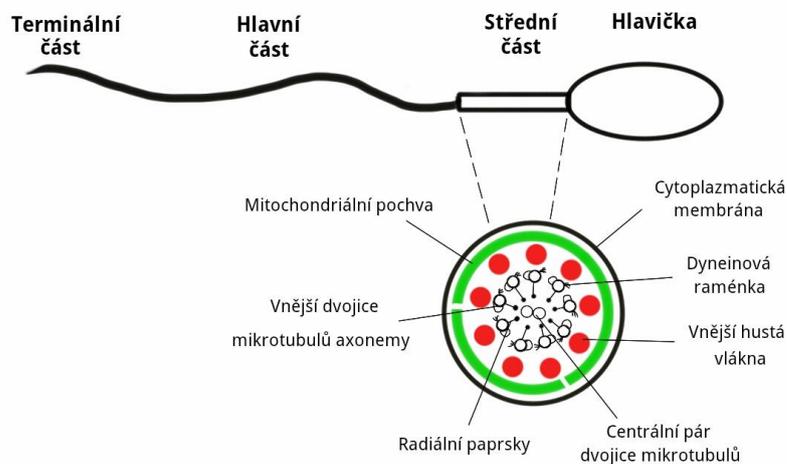
Mitochondrie je konstantní membránová organela téměř všech živočišných buněk. Její počet a velikost souvisí s typem buňky a intenzitou funkcí, které v buňce vykonává - mitochondrie tak mohou zaujímat až 20% objemu buňky. Jejich původ není dosud zcela jednoznačně objasněn [Friedman a Nunnari, 2014]. Převažuje názor, že fyziologicky vznikaly samostatně a jsou v symbiose s ostatními částmi eukaryotické buňky, protože obsahují malé množství vlastní kruhové DNA a vykazují rysy podobné bakteriím [Gray, 2012; Margulis, 1975]. Přestože je tvar a velikost mitochondrií značně různorodý, jejich vnitřní struktura je konstantní. Je tvořena čtyřmi kompartmenty - vnější membránou, mezimembránovým prostorem, vnitřní membránou a matrix [Benard a Rossignol, 2008]. V somatických buňkách hrají mitochondrie ústřední roli v metabolických procesech a stanovení jejich aktivity je klíčové pro analýzu, diagnózu a případnou léčbu četných patologických stavů, které mitochondriální dysfunkce provází (např. neurodegenerativní, metabolická a zánětlivá onemocnění).

Ve spermii byla mitochondrie dlouho opomíjenou organelou, nyní je však doloženo, že má klíčovou roli v mnohých fyziologických a patologických procesech [Peña et al., 2009; Piomboni et al., 2012; Rajender et al., 2010]. Přehled strukturálních a funkčních abnormalit mitochondrií u spermií je uveden v tabulce 1. Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba energie pro správný pohyb [Peña et al., 2009]. Kromě produkce

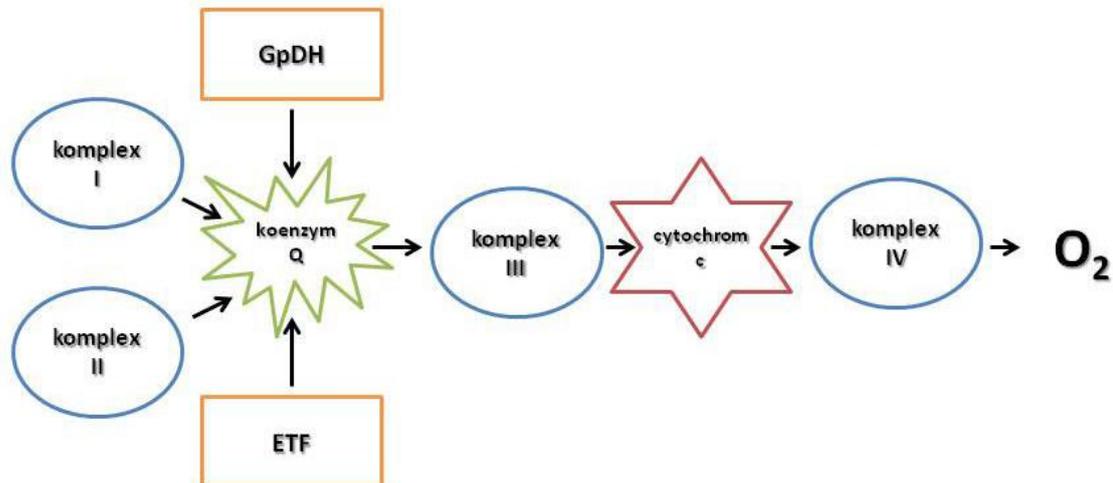
ATP (adenosintrifosfát) nutného pro zajištění pohyblivosti spermií hrají mitochondrie významnou úlohu v regulaci zrání a životnosti spermií a regulaci osmotické a vápníkové homeostázy [Peña et al., 2009].

Mitochondriální dýchací řetězec přenáší elektrony systémem proteinových komplexů (CI – CIV) umístěných na vnitřní mitochondriální membráně z NADH a FADH₂ na O₂ (oxidace). V modernějším pojetí jde o konvergentní systém přenašečů elektronů, kde uzlovým bodem je koenzym Q (obrázek 6) [Pesta a Gnaiger, 2012]. Činností některých komplexů dochází k pumpování protonů z mitochondriální matrix do intermembránového prostoru. Protonový gradient je pak využit k syntéze ATP (fosforylace) a tvorbě energie.

Střední oddíl je zakončen tzv. anulem, od něhož začíná hlavní část. Zde už nepokračuje mitochondriální pochva a dvě vnější densní vlákna jsou nahrazena podélnými sloupci (tzv. fibrous sheath). Tato část bičíku zabírá jeho dvě třetiny. Zbýlý krátký koncový úsek bičíku obsahuje pouze axonemu obalenou plazmatickou membránou [Turner, 2006]



Obrázek 5 - Schéma spermie se zdůrazněním střední části bičíku, kde se nachází mitochondrie



Obrázek 6 - Současná představa elektrontransportního konvergentního systému na vnitřní mitochondriální membráně. GpDH = glukosa-6-fosfát dehydrogenáza; komplex I = NADH-Q reduktáza; komplex II = sukcinát-Q reduktáza; komplex III = cytochrom reduktáza; komplex IV = cytochrom oxidáza; ETF = Electron-transporting flavoprotein

Tabulka 1 – Abnormality mitochondrií u spermií

<i>Strukturální abnormality mitochondrií u spermií</i>			
	<i>Reference</i>	<i>Postižení</i>	<i>Klinický projev</i>
<i>Genotypické alterace</i>	Rawe et al., 2001, 2002; Sutovsky et al., 2001	malý počet mitochondrií a jejich dezorganizace	Asthenozoospermie, imotilní spermie
	Ross et al., 1971	prodloužený střední oddíl bičíku	Asthenozoospermie
	Baccetti et al., 2004	defektní mitochondriální helix	Asthenozoospermie
<i>Fenotypické alterace</i>	Wilton et al., 1992	malý počet mitochondrií	Asthenozoospermie
	Mundy et al., 1995	malý počet mitochondriálních krist	Asthenozoospermie
	Gopalkrishnan et al., 1995	abnormální mitochondrie	Těžká asthenozoospermie
	Piasecka a Kawiak, 2003	dezorganizace mitochondriální pochvy	Asthenozoospermie
<i>Funkční abnormality mitochondrií u spermie</i>			
<i>Funkční alterace</i>	Botero-Ruiz et al., 1984; Ferramosca et al., 2008a, 2012a	defekt v dýchacím řetězci mitochondrie	Asthenozoospermie
	Evenson et al., 1982; Marchetti et al., 2002, 2012	redukovaný mitochondriální membránový potenciál	Asthenozoospermie
	Ruiz-Pesini et al., 2000	redukovaná aktivita komplexu II	Oligozoospermie

Pohyb spermií

Spermie vykazují dva druhy fyziologického pohybu - aktivovanou a hyperaktivovanou motilitu. Oba tyto pohyby jsou podstatné pro průběh normálního oplodnění [Overstreet et al., 1980; Suárez a Osman, 1987]. Aktivovaná motilita se vyskytuje v čerstvém ejakulátu, naopak hyperaktivovaná motilita je patrná až u spermií, které se dostaly do vejcovodu a proběhla u nich kapacitace (biochemické a biofyzikální změny povrchu spermie, po kterých je spermie připravená k akrozomální exocytóze a tedy ke spojení se zona pellucida oocyty). Bičík spermie při aktivované motilitě generuje symetrický pohyb s nízkou amplitudou vln, spermie si udržuje při pohybu relativně přímý směr. Naproti tomu, po kapacitaci nabývají spermie motilitu hyperaktivovanou. Ta se projevuje asymetrickým pohybem bičíku s vyšší amplitudou, který opisuje cirkulární trajektorii nebo tvar osmičky [Ishijima et al., 2002].

Pomocí aktivované motility se spermie dostávají skrze ženský reprodukční trakt až k vejcovodu. Naopak cílem hyperaktivované motility je pomoci spermiím držet se dále od epitelu vejcovodu, dostat se na místo oplodnění a projít skrze zona pellucida vajíčka [Turner, 2003, 2006].

Oba druhy motility jsou zásadní pro normální průběh oplodnění. U narušené aktivované motility nejsou spermie schopné dosáhnout uterotubární junkce, jak bylo demonstrováno na potkaním modelu [Gaddum-Rosse, 1981]. Defektní aktivovaná motilita způsobuje nejen u lidí, ale i dalších živočišných druhů sníženou plodnost. Hyperaktivovaná motilita zvyšuje schopnost spermií oplodnit vajíčko, a to nejen v podmínkách *in vivo*, ale jak bylo prokázáno u hlodavců, také v podmínkách *in vitro* [Boatman a Robbins, 1991a, 1991b; Fraser a Quinn, 1981]. U lidí toto nebylo studováno.

Energii pro pohyb získávají lidské spermie dvojitým způsobem, prvním z nich je již výše zmiňovaná tvorba ATP pomocí oxidativní fosforylace, probíhající na vnitřní mitochondriální membráně. Druhou cestou je glykolýza, probíhající v cytoplazmě. Studie na myších prokázaly, že i při defektní oxidativní fosforylaci nedochází k plné inhibici motility [Escalier, 2006]. To potvrzují i nedávné výzkumy na kančích spermiích, které ukázaly, že se pouze malé množství laktátu dostává do Krebsova cyklu [Marin et al., 2003]. Teorii existence dvojího zdroje energie pro motilitu spermií podporuje i identifikace glykolytických enzymů v bičíku (hexokináza, laktátdehydrogenáza, glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza) [Nagdas et al., 2005, 2006; Perl et al., 2006]. Na druhé straně, pohyb

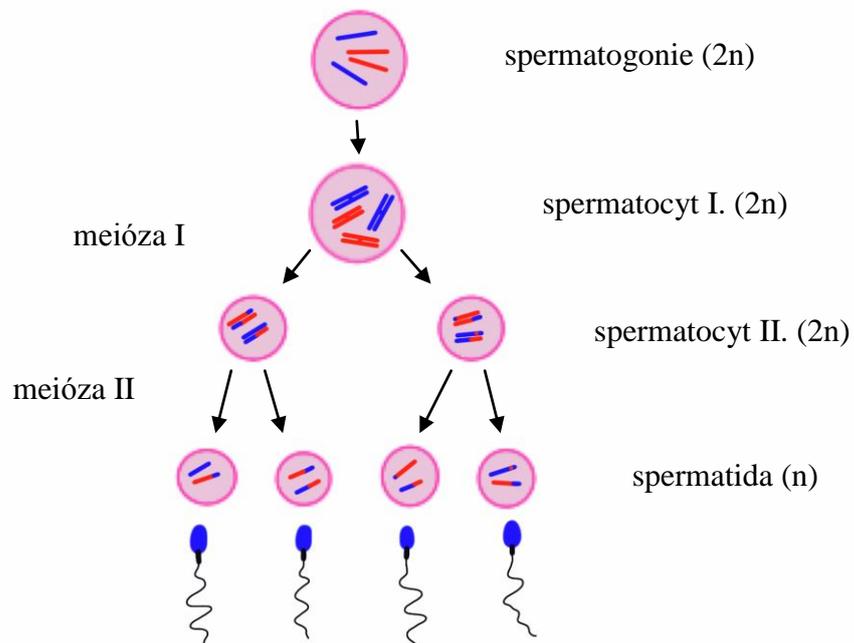
býčích spermií je zcela závislý na energii z Krebsova cyklu [Aitken et al., 2004a; Mukai a Okuno, 2004]. Stále tedy přetrvává názorová nejednotnost, co je tím hlavním zdrojem energie pro motilitu spermie.

Spermatogeneze

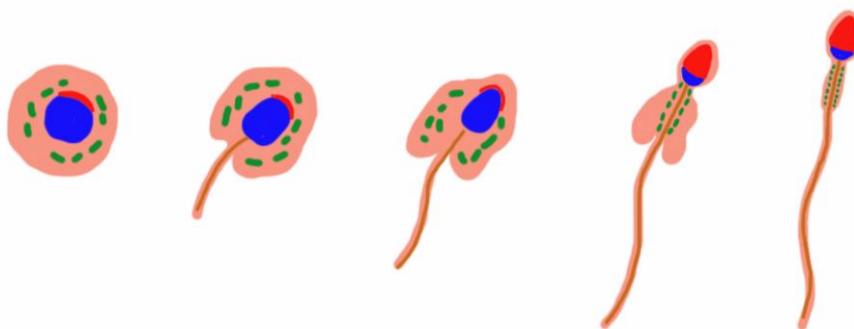
Spermatogeneze je komplexní proces, ve kterém dochází k formování spermií ze spermatogoniálních kmenových buněk.

Vývoj spermií se odehrává ve stočených semenotvorných kanálcích varlete (tubuli seminiferi contorti). Neprobíhá rovnoměrně, ale ve vlnách v jednotlivých kanálcích. Vývoj zralých spermií je tvořen čtyřmi cykly, z nichž každý trvá přibližně 16 dní. Celkový vývoj trvá 64 až 74 dní, začíná v pubertě a denně je vytvořeno u zdravého plodného muže přibližně 300 miliónů spermií.

Proces spermatogeneze můžeme rozdělit do tří fází – mitotické, meiotické a postmeiotické fáze, která je také nazývána spermioenezí. V mitotické (proliferativní) fázi prochází spermatogonie procesem sebeobnovy nebo dochází k jejich další diferenciaci [Eddy, 2002]. Lokalizována je v bazálním kompartmentu epitelu semenotvorných kanálek, naopak meiotická a postmeiotická fáze se odehrává v kompartmentu luminálním. V meiotické fázi dochází k rekombinaci genetického materiálu a k jeho rozdělení do spermatocytů a finálně vznikajících spermatid (obrázek 7). V post-meiotické fázi tyto buňky (spermatidy) procházejí řadou morfologických a strukturálních změn, zahrnující výměnu histonů za protaminy, vedoucí ke kondenzaci chromatinu a redukci jaderné velikosti [Brewer et al., 2002; Heidarán a Kistler, 1987]. Dále dochází k redukci objemu cytoplazmy, formaci akrozómu a bičíku [Roosen-Runge, 1962], což vede k vzniku zralých spermií (obrázek 8). V této fázi jsou spermie morfologicky maturované, ale funkčně ještě inkompetentní. K funkčnímu dozrání dochází v nadvarleti, kde spermie získávají schopnost progresivní motility směrem vpřed a schopnost pronikat skrze zona pellucida oocyty [Baker et al., 2012; Cooper, 2011; Jones et al., 2007]. Svou plnou funkčnost získávají spermie až po změnách odehrávajících se ve vejcovodu při procesu kapacitace. Jedná se o proces charakterizovaný biochemickými a biofyzikálními změnami povrchu spermie [Evans a Florman, 2002]. Dochází ke změně intracelulárního pH a ke stimulaci signálních drah. Klíčové je zvýšení fosforylace tyrosinu, dochází k ztrátě cholesterolu a vstupu bikarbonátových iontů.



Obrázek 7 – Spermatogeneze lidských spermií



Obrázek 8 – Post-meiotická fáze spermatogeneze lidských spermií, kdy dochází k redukci buněčné membrány, formaci akrozómu, mitochondriální pochvy a bičičku (modrá barva = jádro, červená barva = akrozóm, zelená barva = mitochondrie)

Finální fází je destabilizace plazmatické membrány, která se stává více fúzogenní, připravená k akrozomální exocytóze a tedy schopná spojení se zona pellucida [Gadella, 2012; Hunter a Gadea, 2014; Ickowicz et al., 2012].

Proces spermatogeneze je řízen mimo jiné hypothalamo-hypofýzo-gonadální osou [Steinberger, 1971]. Zásadní roli zde má folikulo-stimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), oba produkované hypofýzou [Kendall et al., 1995]. V reakci na hormonální regulaci spustí testikulární buňky kaskádu dějů vedoucí ke změnám buněčného metabolismu a genové exprese [Griswold, 1998; Jégou et al., 1995].

Funkcí luteinizačního hormonu je stimulace Leydigových buněk k produkci testosteronu, který skrze androgenní receptory prezentované na peritubulárních myoidních buňkách a na Sertoliho buňkách reguluje androgen-dependentní genovou expresi [Johnston et al., 2001; Zhou et al., 2002]. Deficit v produkci testosteronu nebo defekt androgenového receptoru vede k zastavení spermatogeneze uprostřed meiózy, což naznačuje jeho nepostradatelnost pro správný vývoj spermií [Holdcraft a Braun, 2004].

FSH působí přímo na FSH receptory na povrchu Sertoliho buněk, čímž ovlivňuje jejich proliferaci v prepubertálním vývoji [Heckert a Griswold, 2002], není ale esenciální pro samotnou spermatogenezi, jak bylo prokázáno na pokusech s myším modelem s mutací ve FSH receptoru nebo jeho β podjednotky, kdy plodnost myši zůstala zachována navzdory zmenšení velikosti varlat a počtu spermií [Dierich et al., 1998; Kumar et al., 1997]. V kombinaci přítomnosti FSH a testosteronu dochází u Sertoliho buněk k sekreci peptidů a dalších faktorů, které působí na diferenciaci zárodečných buněk [Griswold, 1998]. Všechny tyto signály podporují jedinečné prostředí zajišťující jejich správný vývoj.

1.1.4 Markery užívané ke sledování kvality spermií

V současné době trpí neplodností 10-15% párů v reprodukčním věku. Androgenní faktor je zodpovědný přibližně za 50% případů infertility [St John et al., 2000b], z 25% jsou příčiny androgenně dané neplodnosti stále neznámé. Ačkoliv se metody léčby neustále zdokonalují, přibližně 10% neplodných párů nepomůže k otěhotnění ani opakovaná léčba pomocí asistované reprodukce.

Zlatým standardem pro počáteční zjištění příčiny mužské neplodnosti stále zůstává konvenční spermioqram [World Health Organization, 2010]. Mezi běžně vyšetřované parametry řadíme: objem ejakulátu, rychlost zkapalnění, viskozitu, hodnotu pH, počet

spermií v celém ejakulátu a počet spermií v 1 ml, motilitu spermií, výskyt patologických forem, přítomnost kulatých buněk a případně aglutinaci spermií.

Tato rutinní analýza ejakulátu poskytuje dostatečné informace o kvalitě produkce spermií, jejich viabilitě a motilitě, dá se z ní uvažovat o průchodnosti mužských reprodukčních cest a kvalitě ejakulace. Jsou to tedy informace postačující pro iniciální zhodnocení kvality plodnosti muže, ale nejsou již vypovídající o funkčních vlastnostech spermií a jejich potenciálu oplodnit vajíčko [Guzick et al., 2001; van der Merwe et al., 2005; Smith et al., 1977]. Můžeme se setkat s nečekaným selháním při oplodnění *in vitro* u muže s normálními parametry spermogramu, ale nerozpoznaným funkčním defektem spermií. Z toho důvodu je přínosné toto základní vyšetření doplňovat i o další, zaměřená na funkční parametry a schopnost oplození [Funaro a Paduch, 2014; Pizzol et al., 2014].

Ideální funkční test by měl nalézt odpovědi na tyto problémy: a) diagnóza specifické dysfunkce u spermie; b) výběr nejlepší vhodné terapie pro konkrétní příčinu mužské neplodnosti, c) event. predikce úspěšnosti oplodnění.

Mezi funkční testy řadíme testy zaměřené hlavně na stav a kvalitu DNA. Mezi běžně používané metody patří Sperm chromatin structure assay (SCSA), sloužící k vyšetření instability chromatinu spermií [Evenson a Jost, 1994]. Mezi testy zaměřené na stupeň fragmentace DNA řadíme Halosperm [Fernández et al., 2003], TUNEL assay (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) [Gorczyca et al., 1993] nebo COMET assay (single cell gel electrophoresis) [Hughes et al., 1997]. Výsledky vědeckých studií ukazují, že u neplodných mužů jsou nalézány spermie s normální morfologií, ale s přítomnou nadměrnou fragmentací DNA [Avendaño et al., 2010; French et al., 2010]. Tyto morfologicky vhodné, ale dysfunkční spermie tak mohou být chybně použity při umělém oplodnění oocyty pomocí metody intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) [Avendaño a Oehninger, 2011] a mohou být příčinou nižší kvality embryí a neúspěšného otěhotnění.

Další z funkčních testů jsou vyšetření akrozomální reakce a interakce spermie se zona pellucida (vazebný test spermie-zona pellucida). Ty poskytují důležité informace o schopnosti interakce spermie a oocyty a tedy vypovídají o pravděpodobnosti oplodnění [Liu a Baker, 1988, 1992; Liu et al., 2007; Menkveld et al., 1991, 1996]. Tyto testy jsou zvláště důležité pro páry podstupující léčbu pomocí konvenčních technik asistované reprodukce.

K odhalení dysfunkce buněčné membrány, která hraje důležitou roli při procesu oplodnění, slouží HOS test (hypo-osmotic swelling) [Ramu a Jeyendran, 2013]. Tento test

je užíván jako jeden z přídatných indikátorů viability spermií, zvláště v případech těžké asthenozoospermie.

Všechny tyto testy nám napomáhají zvýšit naše povědomí o příčinách mužské neplodnosti, stále ale neumíme odpovědět na mnohé otázky a je nutné hledat další testy a biomarkery, které nás posunou v poznání příčin mužské neplodnosti a následně v možnostech její přesnější diagnostiky a léčby zase o kousek dále.

2 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl přispět k identifikaci nových markerů a funkčních testů v oblasti reprodukční medicíny, a tím přispět k lepší charakterizaci zárodečných buněk, což nám může pomoci k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění a ke zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti.

Cíle práce jsou:

1. Studium biochemického složení folikulární tekutiny u neplodných pacientek ve srovnání s plodnými dárkyněmi oocytů s cílem identifikace potenciálních biomarkerů kvality oocytu.
2. Porovnání výsledků léčby neplodnosti u skupiny neplodných žen podstupujících metody asistované reprodukce v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině.
3. Analýza mitochondriální respirace celých permeabilizovaných lidských spermií vysokoúčinnou oxygrafií u mužů s normozoospermii a asthenozoospermii.
4. Sledování efektu ethanolového extraktu propolisu na motilitu lidských spermií, jejich mitochondriální respirační aktivitu a membránový potenciál.

3 Materiál a metodika

3.1 Použité metody pro cíl 1 a 2

3.1.1 Studovaný soubor vztahující se k cíli 1

Studovaný soubor tvořilo 146 žen, z toho bylo 74 pacientek (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Kontrolní skupinu tvořilo 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk byl 26 let, SD = 4,44). Studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

V našem souboru bylo 13 neplodných žen a 26 plodných dárkyň oocytů, které kouřily 2 - 15 cigaret za den, ostatní byly nekuřačky. Po detailním seznámení s problematikou a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebírána folikulární tekutina v době odběru oocytů v průběhu jejich léčby neplodnosti. Vyšetřovány byly její tzv. pooly, tedy směs tekutin ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve folikulární tekutině byly stanoveny hladiny prolaktinu, hormonů štítné žlázy (volný T3 a T4), homocysteinu, glutathionperoxidázy, malonyldialdehydu a celkové antioxidační kapacity.

3.1.2 Studovaný soubor vztahující se k cíli 2

Studovaný soubor tvořilo 44 žen (průměrný věk 31,9 let, SD = 4,35) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centrum Prof. Zecha v Plzni. Příčiny neplodnosti byly následující: u 13,64 % žen ovariální faktor, ve 22,73 % tubární faktor, endometrióza se vyskytovala u 11,37 % žen, andrologický faktor u 27,27 % žen a u 25 % žen nebyla popsána příčina neplodnosti, jednalo se o tzv. idiopatickou infertilitu. Studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas. Všechny sledované ženy měly normální hladiny prolaktinu i hormonů štítné žlázy v krvi. Neplodné ženy byly rozděleny do 2 skupin podle hodnoty BMI (37 žen mělo normální BMI, u 7 žen byla přítomna nadváha). Po detailním seznámení s problematikou studie, vyplnění dotazníku a po podpisu informovaného

souhlasu byla ženám odebírána folikulární tekutina v době odběru oocytů v rámci jejich léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce. Vyšetřovány byly její tzv. pooly, tedy směs ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve folikulární tekutině byly stanoveny hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity. Tyto parametry byly korelovány s hodnotou BMI žen. Sledována byla úspěšnost fertilizace u neplodných žen v závislosti na BMI.

3.1.3 Stanovení studovaných biochemických markerů ve folikulární tekutině

Prolaktin a hormony štítné žlázy

Metoda stanovení hormonů prolaktinu a volného T3 a T4 byla založena na sendvičovém principu elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA) s využitím kitů Prolactine II, kitem FT3 a FT4 (ROCHE Diagnostics, ČR) na přístroji Cobas e411. Stanovení Elecsys Prolactin II využívá dvě monoklonální protilátky, speciálně směřované proti lidskému prolaktinu a metoda stanovení volného T3 i volného T4 využívající testu Elecsys FT3 a FT4 je založena na využití specifických protilátek proti T3 a T4, které jsou obě značené rutheniovým komplexem.

Homocystein

Hladina HCy byla stanovena enzymaticky kitem Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent (Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK) na přístroji Olympus AU400. Vázaný HCy nebo ve formě diméru (oxidovaná forma) se redukuje na volný HCy prostřednictvím tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP). Takto vzniklý volný HCy poté reaguje se serinem za katalýzy cystathionin beta-syntázou za vzniku cystathioninu. Cystathionin je postupně rozkládán na HCy cystathionin betalyázou, kdy při tomto procesu vzniká i pyruvát a amoniak. Pyruvát se poté konvertuje pomocí laktát-dehydrogenázy (LDH) na laktát s nikotinamid adenin dinukleotidem (NADH) jakožto koenzymem. Rychlost konverze NADH na NAD⁺ je sledována spektrofotometricky při 340 nm a je přímo úměrná koncentraci HCy.

Malonyldialdehyd

Malonyldialdehyd (MDA) a jiné degradační produkty peroxidace lipidů reagují s dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové v kyselém prostředí na barevný produkt, který se po extrakci n-butanolem měří při 532 nm použitím Elisa-readeru. MDA se stanovuje jako součást sloučenin reagujících s thiobarbiturovou kyselinou, tzv. TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances).

Glutathionperoxidáza

Glutathionperoxidáza (GPx) katalyzuje oxidaci glutathionu kumenhydroperoxidem. V přítomnosti glutathionreduktázy a NADPH se oxidovaný glutathion ihned redukuje, přičemž NADPH se oxiduje na NADP. Pokles absorbance se stanovuje na analyzátoru OLYMPUS AU 400 optickým testem při 340nm. Aktivita GPx byla stanovena kitem RANSEL (Randox Laboratories Ltd., UK).

Celková antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita (AOK) je definována jako schopnost vzorku redukovat volné radikály. Její stanovení je založeno na vlastnostech sloučeniny ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová) kyselina), která po inkubaci s peroxidázou a peroxidem vodíku tvoří radikál ABTS+. Ten je relativně stabilní a je možné ho měřit spektrofotometricky při 600 nm. Antioxidanty folikulární tekutiny potlačují vznik tohoto radikálu. AOK je vyjadřována jako ekvivalent standardu Troloxu (6 Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je syntetický analog vitamínu E. Měření bylo prováděno na analyzátoru Olympus AU 400. AOK byla stanovena kitem TAS (Randox Laboratories Ltd., UK).

Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova neparametrického testu (nepárová varianta) a dále analýzou rozptylu (ANOVA, post hoc analýza pomocí Tukeyovy metody mnohonásobného porovnávání). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

3.2 Použité metody pro cíl 3 a 4

3.2.1 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 3

Ejakuláty byly získány od 14 mužů z IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Dle klasifikace World Health Organization byli rozděleni do skupiny normozoospermatiků (n = 7, průměrný věk 33,1 let) a asthenozoospermatiků (n = 7, průměrný věk 36,7 let).

3.2.2 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 4

Ejakuláty byly získány od deseti dobrovolníků (průměrný věk 24,2 let, SEM \pm 2,8) po třídenní abstinenci v IVF Centru Prof. Zecha v Plzni. Po zkapalnění byly vyhodnoceny dle kritérií Světové zdravotnické organizace (WHO) 2010 [World Health Organization, 2010].

3.2.3 Separace spermií metodou hustotního gradientu

Vzorek byl vždy odebírán přímo v IVF centru, aby bylo pokud možno zcela eliminováno znehodnocení vzorku skladováním a transportem. Po zkapalnění (30 minut) byl stanoven nativní spermioqram (dle kritérií WHO 2010). Zjišťován byl objem vzorku, koncentrace spermií, jejich motilita a přítomné morfologické patologie. K vyhodnocení byl použit světelný mikroskop s fázovým kontrastem (zvětšení okulár 10x, objektiv 20x) a Maklerova komůrka. Motilita spermií byla dle WHO kritérií rozdělena do tří kategorií - progresivní motilita, neprogresivní motilita a imotilní spermie [World Health Organization, 2010].

Spermie byly separovány a vyčištěny s využitím gradientového média SpermGrad (SGm, Vitrolife, Švédsko) a SpermRinse média (SRm, Vitrolife, Švédsko). Byla připravena média o koncentraci 90% (0,15 ml SGm: 1,35 ml SRm), 70% (0,09 ml SGm: 0,21 ml SRm) a 50% (0,15 ml SGm: 0,15 ml SRm) a napipetována do konické zkumavky v poměru 1,5 ml 90%, 0,3 ml 70% a 0,3 ml 50% média. Po navrstvení plného ejakulátu byly spermie centrifugovány po dobu 20 minut (300g). Po odstranění supernatantu byl vzorek promíchán s 8 ml SRm a opět centrifugován (8 min, 300g). Po slití supernatantu byla ve vzorku stanovena koncentrace a motilita spermií.

3.2.4 Vysokoúčinná respirometrie

Mitochondriální respirace je klíčovým elementem v buněčné fyziologii. Vysokoúčinná respirometrie je unikátní velmi citlivá oxygrafická metoda (oxygraf Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko)), která umožňuje posoudit funkční stav mitochondrií dynamickým měřením metabolismu celých mitochondrií, ať už izolovaných nebo nacházejících se v intaktních nebo permeabilizovaných buňkách. V porovnání se statickými determinantami, jakými jsou hladiny metabolitů, aktivity enzymů, redoxní stavy, membránový potenciál, koncentrace signálních molekul nebo hladiny DNA a RNA, umožňuje zaznamenání dynamiky metabolických drah měřením aktivity celého mitochondriálního respiračního systému a nemonitoruje jen izolovanou aktivitu jednotlivých komplexů. Měření respiračního toku za různých metabolických stavů je nutné pro správné vyhodnocení efektivity oxidativní fosforylace při změnách membránového potenciálu nebo aktivity jednotlivých enzymů.

Vysokoúčinná respirometrie je vhodným nástrojem pro diagnostiku i malých změn v aktivitě enzymů, jelikož umožňuje kvalitní měření také ve vzorcích, kde je limitováno množství buněk nebo tkáně. Kromě měření spotřeby kyslíku na celých buňkách a bioptických vzorcích tkáně, umožňuje také respirometrickou analýzu izolovaných mitochondrií [Gnaiger, 2001, 2009; Gnaiger et al., 1995, 2000]. Díky vysoké citlivosti přístroje lze pro analýzu použít relativně malé množství biologického materiálu a měřit spotřebu kyslíku po dlouhou dobu za různých metabolických (respiračních) stavů, do kterých je vzorek uváděn postupnou titrací substrátů, aktivátorů a inhibitorů jednotlivých komplexů.

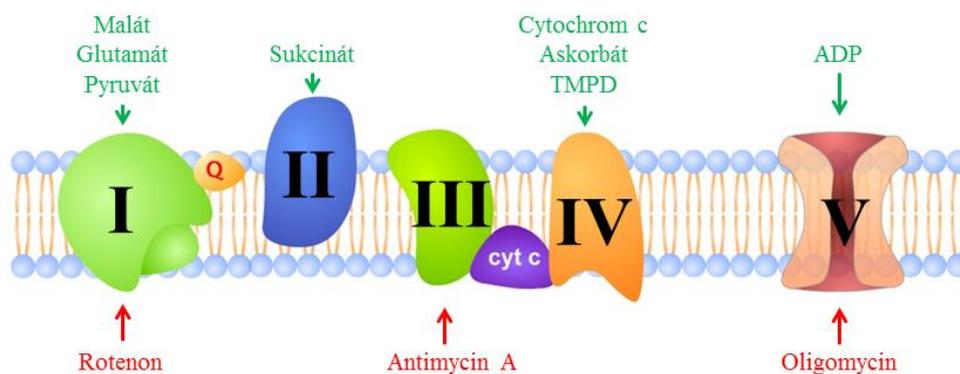
V našich experimentech jsme měřili respirační aktivitu spermií na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko), který zaznamenává koncentrace kyslíku v inkubačním médiu v čase a zároveň vyhodnocuje spotřebu kyslíku biologickým vzorkem, a to kontinuálně v průběhu celého experimentu.

Měření probíhalo v uzavřených komůrkách o objemu 2 ml a při teplotě 36°C. Po 40-50minutové ekvilibraci odpovídala koncentrace kyslíku v respiračním médiu jeho aktuální koncentraci v atmosférickém vzduchu a rozpustnosti v respiračním médiu (0,92), které mělo následující složení: EGTA 0,5 mmol/l; MgCl₂.6H₂O 3 mmol/l; laktobionát draselný 60 mmol/l; taurin 20 mmol/l; KH₂PO₄ 10 mmol/l; HEPES 20 mmol/l; sacharóza 110 mmol/l, hovězí albumin 1 g/l. Následně byly komůrky uzavřeny a dávkovací

stříkačkou Hamilton do nich byl aplikován vzorek spermií. Nejprve byla buněčná membrána spermií permeabilizována digitoninem a změřena respirace vzorku před přidáním substrátů a ADP. Sekvenční titrační protokol aplikace substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního systému byl zvolen následovně: a) rychlost respirace za klidových podmínek (stav S2 nebo LEAK) byla stanovena pomocí substrátů komplexu I glutamátu (10 mmol/l), malátu (2 mmol/l); b) aktivní respirace (stav S3 nebo OXPHOS) byla stimulována ADP (2,5 mmol/l); c) měření spotřeby kyslíku s přidáním pyruvátu (5 mmol/l) a substrátu flavoproteinu přenášejícího elektrony (electron-transporting flavoprotein, ETF) palmitoyl karnitinu (20 μ mol/l); d) integrita vnitřní mitochondriální membrány byla ověřena pomocí cytochromu c (10 μ mol/l); e) spotřeba kyslíku byla dále zvýšena aplikací sukcinátu (10 mmol/l), substrátu komplexu II; f) inhibitor ATP-syntázy oligomycin (2 μ g/ml) opět navodil stav LEAK nutný k udržení mitochondriálního membránového potenciálu; g) pomocí rozpřahovače oxidace a fosforylace karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazonu (FCCP; 0,05 – 0,25 μ mol/l) jsme indukovali stav S3u nebo ETS charakterizující maximální kapacitu elektrontransportního systému; h) stav OXPHOS při stimulaci komplexu II byl navozen inhibitorem komplexu I rotenonem (0,5 μ mol/l); i) inhibitorem komplexu III antimycinem A (2,5 μ mol/l) jsme navodili stav reziduální spotřeby kyslíku (ROX), tj. spotřebu kyslíku způsobenou převážně nemitochondriální oxidací; j) použitím N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dihydrochloridu (TMPD; 0,5 mmol/l) spolu s askorbátem (2 mmol/l) jsme dospěli ke stanovení respirační aktivity komplexu IV cytochrom c oxidázy.

Přehledné zobrazení substrátů, inhibitorů a rozpřahovače je znázorněno na obrázku 9 a v tabulce 2.

V úvodní sérii experimentů jsme testovali dávku digitoninu (5 μ g/ml) nutnou pro permeabilizaci buněčné membrány spermií: K vzorku spermií byl přidán sukcinát, rotenon a ADP a postupně byl aplikován digitonin tak dlouho, dokud se respirace zvyšovala. Vyšší dávka digitoninu vedla k poškození mitochondriální membrány a úniku cytochromu c.



Obrázek 9 – Schématické znázornění protokolu oxygrafie (zelená barva = substráty; červená barva = inhibitory komplexů)

Tabulka 2 – Souhrn substrátů, inhibitorů a rozpřahovače, jejich cíl působení a použitá koncentrace

	Název	Cíl působení	Finální koncentrace v komůrce
Substrát	Malát	komplex I	2 mM
	Glutamát	komplex I	10 mM
	Pyruvát	komplex I	5 mM
	Sukcinát	komplex II	10 mM
	ADP	komplex V, ANT	1-5 mM
	Cytochrom c	komplex IV	10 μ M
	Askorbát	komplex IV	2 mM
	TMPD	komplex IV	0,5 mM
Inhibitor	Rotenon	komplex I	0,5 μ M
	Oligomycin	komplex V	2 μ g/ml
	Antimycin A	komplex III	2,5 μ M
Rozpřahovač	FCCP	$\Delta\mu_{H^+}$	0,05 μ M

* ANT = adeninnukleotid translokáza

Při studiu efektu propolisu na mitochondriální funkce spermií byl do jedné z komůrek, snímaných paralelně, přidán EEP (ethanolový extrakt propolisu) o koncentraci 0,01 mg/ml, druhá komůrka byla snímána bez intervence. Vzorky byly dále inkubovány ve 36°C po dobu 20 minut. Vztah závislosti na dávce EEP byl testován v další sérii experimentů s využitím koncentrací propolisu 0,001; 0,005 a 0,01 mg/ml. Vyšší koncentrace propolisu testovány nebyly z důvodu jejich toxického působení v paralelních experimentech s myšími embryonálními kmenovými buňkami, na něž působil propolis v kultivačním médiu (0,03 a 0,05 mg/ml). U buněk docházelo k redukci jejich růstu a viability.

3.2.5 Příprava ethanolového extraktu propolisu

Propolis byl získán v průběhu měsíce září 2012 v západních Čechách (město Horní Slavkov - 50°8'17.268"N, 12°48'48.992"E). K jeho sběru byly využity plastové sítky. Propolis byl zmražen na -20 °C a rozdrcen. K takto vzniklému prášku byl přidán 70% ethanol (100 ml) a po 24 hodinách stálého míchání byl výsledný produkt přefiltrován. Filtrát byl doplněn do 100 ml 70% ethanolom [Bonvehí a Gutiérrez, 2012]. Vzorek byl udržován ve tmě a chladu až do analýzy. EEP byl ředěn, aby výsledná koncentrace ethanolu nebyla pro buňky toxická (pod 1%) [Barbariá et al., 2011]. Finální koncentrace propolisu užívaná v experimentech byla 0,01 mg/ml v příslušném médiu.

3.2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kvalitativní a kvantitativní analýza fenolových látek obsažených v propolisu byla provedena chromatografickým přístrojem vybaveným binární pumpou [Waters 1525], Waters 717 s autosamplerm a duálním UV/VIS detektorem 2487. Separace byla provedena na koloně Symmetry C18 s využitím mobilní fáze 0,08% kyseliny octové v methanolu (A) a 0,1% kyseliny octové a 10% methanolu ve vodě (B). Gradient byl 10 – 47% A (25 min), 47% A (25 – 40 min), 47 – 70% A (40 – 70 min), 70 – 100% A (70 – 80 min) při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Injikovaný objem byl 10 µl, a teplota 30°C. Spektrofotometrická detekce byla provedena při vlnové délce 280 nm a 330 nm. Identifikace polyfenolových látek byla provedena porovnáním retenčních časů s časy látek komerčně dostupnými. Všechny standardy byly rozpuštěny na konečnou koncentraci

10 mmol/l v dimethyl sulfoxidu (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA). Kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním standardních roztoků v ethanolu.

Jako standardy byly použity: apigenin, chrysin, genistein, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, galangin, kyselina kávová, felurová, skořicová, gallová, kumarová a benzoová (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA). Vanilin byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Kalibrační křivky vykazovaly lineární odpověď $R^2 > 0.97$ při koncentračním rozmezí 5 – 100 $\mu\text{mol/l}$. EEP byl před chromatografickou analýzou přefiltrován skrze teflonový mikrofiltr SeparonTM 0.45 μm a zředěn 100x.

3.2.7 Permeabilizace buněčné membrány spermie

Pro kontrolu úspěšné permeabilizace buněčné membrány spermie pro substráty a inhibitory po použití digitoninu byly spermie obarveny fluorescenční látkou jodidem propidia, který intaktní buněčnou membránou neprochází. Konečná koncentrace jodidu propidia byla 1 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.8 Průtoková cytometrie

Mitochondriální membránový potenciál byl sledován pomocí MitoProbeTM JC-1 Assay Kit (Life Technologies). Spermie byly resuspendovány ve vlažném (37°C) fosfátovém pufru (PBS) na přibližně 1×10^6 buněk/ml. Ke vzorku (100 μl) byl přidán propolis (1 μl) do konečné koncentrace 0,01 mg/ml. Vzorky byly inkubovány v propolisu po 60 minut a poté byly promyty PBS. Následovalo přidání JC-1 (10 μl z 200 $\mu\text{mol/l}$) a 20minutová inkubace při 37°C a 5% CO_2 . Po oplachu PBS a centrifugaci (5 min, 1500 rpm) byly vzorky resuspendovány v 500 μl PBS a změřeny v průtokovém cytometru BD FACS CANTO II (BD Biosciences, New Jersey, USA). Analýza byla provedena softwarem BD FACS Diva při excitaci 488 nm s využitím filtrů užívaných pro Alexa Fluor 488 a R-phycoerythrin.

3.2.9 Aktivita citrátsyntázy

Ke zjištění množství mitochondrií v testovaném biologickém materiálu a standardizaci oxygrafických měření se v experimentální praxi nejčastěji využívá stanovení aktivity citrátsyntázy nebo měření koncentrace mitochondriální DNA [Kuznetsov et al., 2002]. V našich experimentech jsme spotřebu kyslíku v permeabilizovaných spermích vyjadřovali buď v $\text{pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ buněk})$, nebo v $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{IU})$. Aktivitu citrátsyntázy jsme stanovili v obsahu komůrek oxygrafu spektrofotometrickou metodou [Kuznetsov et al., 2002; Larsen et al., 2012]. Složení média bylo následující: 0,1 mmol/l 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina, 0,25% Triton-X, 0,5 mmol/l oxalacetát, 0,31 mmol/l acetylkoenzym A, 5 $\mu\text{mol/l}$ EDTA, 5 mmol/l triethanolamin hydrochlorid a 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 8,1 [Kuznetsov et al., 2002]. Homogenizovaný obsah komůrek (200 μl) byl přidán k 800 μl média, následovalo spektrofotometrické měření při 412 nm, 30°C a 200 s, které bylo vyjádřeno v mIU na 10^7 buněk.

3.2.10 Analýza dat a statistika

Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii byla vypočtena on-line pomocí softwaru DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) jako záporně vzatá časová derivace poklesu koncentrace kyslíku v komůrce a vyjádřená v $\text{pmol O}_2/(\text{s} \cdot 10^6)$ buněk nebo v $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{IU})$. Ke statistickému porovnání jednotlivých hodnot spotřeby kyslíku v obou skupinách jsme použili Mann-Whitneyova pořadového testu pomocí programu STATISTICA Cz, (StatSoft CR, Praha, Česká republika). Po otestování normality distribuce a homogenity rozptylů bylo provedeno srovnání Studentovým t-testem, Wilcoxonovým testem a analýzou rozptylu (ANOVA) s post hoc testy korigovanými pro mnohočetná porovnání Bonferroniho metodou. Za signifikantně významné byly považovány výsledky $p < 0,05$.

4 Souhrn výsledků a jejich diskuze

4.1 Výsledky vztahující se k cíli 1

Studium vybraných složek folikulární tekutiny jako markerů pro sledování kvality lidských oocytů

Porovnávány byly hladiny prolaktinu, volného T3 a T4, Hcy, MDA, GPx a AOK ve skupinách žen léčených pro neplodnost a kontrolních plodných dárkyň oocytů. Z tabulky 3 a grafů 1, 2 a 3 je zřejmé, že u neplodných žen byly naměřeny signifikantně vyšší hladiny prolaktinu ($p = 0,0006$) i volného T4 hormonu ($p = 0,0246$), avšak koncentrace volného T3 se mezi skupinami významně nelišily. Ze stejné tabulky a grafu 4 je také zřejmé, že u kontrolní skupiny žen byla naměřena signifikantně vyšší hladina homocysteinu ($p < 0,0001$).

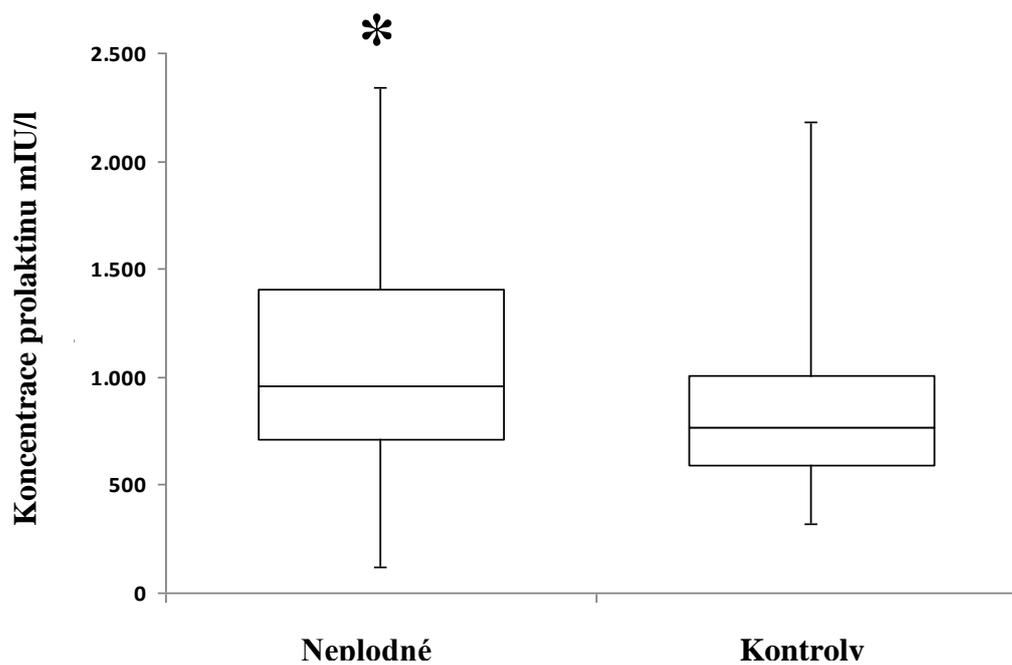
Vzhledem k tomu, že plodnost žen je silně ovlivněna věkem a naše skupiny plodných a neplodných se liší věkovým složením, porovnali jsme hladiny hormonů mezi plodnými a neplodnými ve stejných věkových obdobích. Mezi skupinami plodných a neplodných žen ve věkovém rozmezí 20 až 29 let je statisticky signifikantní rozdíl v hladinách prolaktinu ($p = 0,026$), Hcy ($p = 0,0002$) a MDA ($p = 0,0374$), další signifikantně významný rozdíl byl nalezen ve skupině ve věkovém rozmezí 30 až 39 let také v hladinách prolaktinu ($p = 0,0256$), volného T4 ($p = 0,0175$), Hcy ($p < 0,0001$) i AOK ($p = 0,0458$). Úplný přehled mediánů naměřených hodnot společně se statistickou významností a interkvartilovým rozpětím shrnuje tabulka 4.

Dále jsme porovnali hladiny hormonů uvnitř obou skupin v závislosti na věku. Prokázali jsme zde statisticky významný rozdíl v hodnotách AOK u kontrolní skupiny zdravých dárkyň. Jak vyplývá z tabulky č. 3, nejvyšší hladina AOK je u žen mezi 20 až 29 rokem, u žen mladších a starších se tato hladina významně snižuje ($p = 0,0450$). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 5 a 6.

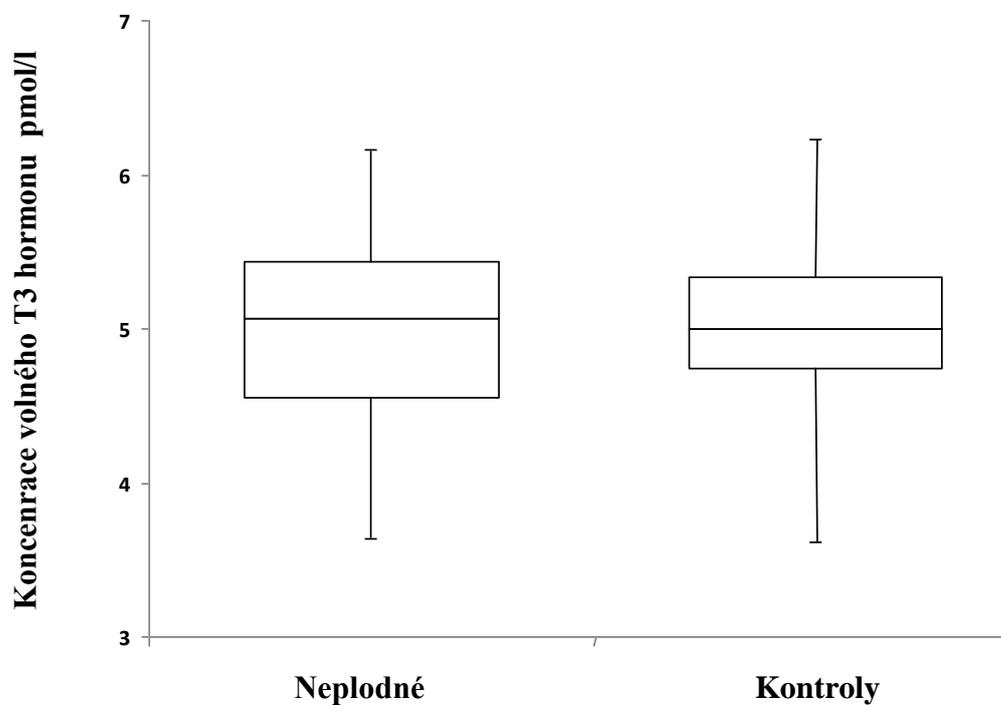
Tabulka 3 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné (n = 74)	Kontroly (n = 72)	p value
Prolaktin (mIU/l)	958 [711 – 1408]	768 [590 – 1009]	0,0006
fT3 (pmol/l)	5,07 [4,56 – 5,43]	5,00 [4,75 – 5,34]	0,3833
fT4 (pmol/l)	14,75 [13,80 – 15,80]	14,05 [13,33 – 15,78]	0,0246
HCy (μmol/l)	6,00 [4,97 – 7,00]	8,65 [6,82 – 10,88]	<0,0001
MDA (μmol/l)	1,600 [1,360 – 2,033]	1,710 [1,480 – 2,133]	0,1421
GPx (U/l)	621,0 [528,0 – 699,8]	598,5 [524,3 – 668,3]	0,4864
AOK (mmol/l)	1,390 [1,350 – 1,483]	1,385 [1,310 – 1,470]	0,3491

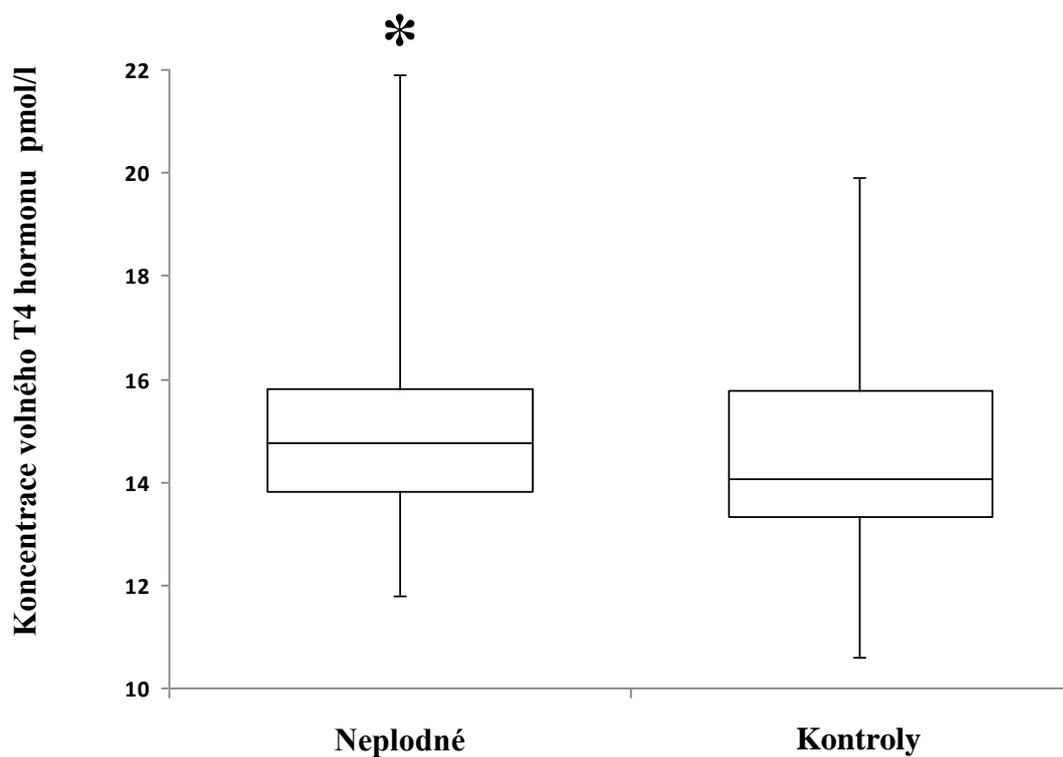
**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*



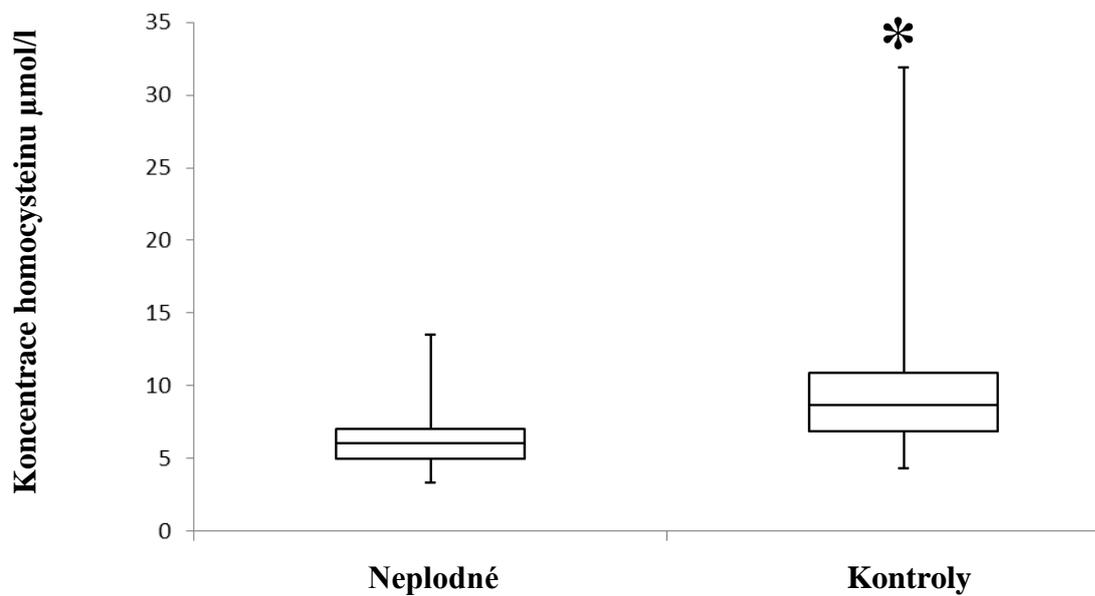
Graf 1 - Porovnání koncentrací prolaktinu ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (* p = 0,0006)



Graf 2 - Porovnání koncentrací volného T3 hormonu ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů



Graf 3 - Porovnání koncentrací volného T4 hormonu ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (* p = 0,0246)



Graf 4 - Porovnání koncentrací HCy ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (* p < 0,0001)

Tabulka 4 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné 20 – 29 let (n = 27)	Kontroly 20 – 29 let (n = 46)	p value	Neplodné 30 – 39 let (n = 43)	Kontroly 30 – 39 let (n = 23)	p value
Prolaktin (mIU/l)	937 [759 - 1207]	771 [568 – 964]	0,0260	954 [694 – 1494]	680 [588 – 1124]	0,0256
fT3 (pmol/l)	5,10 [4,41 – 5,47]	5,06 [4,77 – 5,41]	0,3074	4,98 [4,66 – 5,35]	4,88 [4,60 – 5,19]	0,5929
fT4 (pmol/l)	14,50 [13,80 – 15,80]	14,35 [13,38 – 16,20]	0,6185	15,20 [13,90 – 16,00]	13,70 [12,70 – 14,60]	0,0175
HCy (μmol/l)	6,00 [4,80 – 7,20]	8,55 [7,02 – 11,05]	0,0002	5,70 [5,00 – 6,80]	9,00 [6,60 – 11,10]	<0,0001
MDA (μmol/l)	1,400 [1,280 – 2,040]	1,730 [1,480 – 2,240]	0,0374	1,710 [1,480 – 2,030]	1,630 [1,390 – 2,080]	0,9594
GPx (U/l)	570,0 [501,0 – 723,0]	594,0 [521,3 – 654,8]	0,9688	645,0 [531,0 – 699,0]	639,0 [552,0 – 693,0]	0,8728
AOK (mmol/l)	1,380 [1,310 – 1,460]	1,415 [1,338 – 1,493]	0,6674	1,430 [1,350 – 1,500]	1,360 [1,300 – 1,420]	0,0458

**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*

Tabulka 5 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné 20 – 29 let (n = 27)	Neplodné 30 – 39 let (n = 43)	Neplodné 40 let a více (n = 4)	p value
Prolaktin (mIU/l)	937 [759 – 1207]	954 [694 – 1494]	1471 [846 – 1689]	0,4049
fT3 (pmol/l)	5,10 [4,41 – 5,47]	4,98 [4,66 – 5,35]	5,26 [4,41 – 5,63]	0,8833
fT4 (pmol/l)	14,50 [13,80 – 15,80]	15,20 [13,90 – 16,00]	15,15 [13,85 – 16,60]	0,6599
HCy (μmol/l)	6,00 [4,80 – 7,20]	5,70 [5,00 – 6,80]	7,00 [6,62 – 8,12]	0,9594
MDA (μmol/l)	1,400 [1,280 – 7,200]	1,710 [1,480 – 2,030]	1,500 [1,310 – 2,590]	0,3251
GPx (U/l)	570,0 [501,0 – 723,0]	645,0 [531,0 – 699,0]	688,5 [622,5 – 725,3]	0,2579
AOK (mmol/l)	1,380 [1,310 – 1,460]	1,430 [1,350 – 1,500]	1,365 [1,353 – 1,393]	0,6980

**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*

Tabulka 6 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Kontroly 20 let a níže (n = 27)	Kontroly 20 – 29 let (n = 46)	Kontroly 30 – 39 let (n = 23)	p value
Prolaktin (mIU/l)	1052 [900 – 1701]	771 [568 – 964]	680 [588 - 1124]	0,1404
fT3 (pmol/l)	5,78 [4,97 – 6,03]	5,06 [4,77 – 5,41]	4,88 [4,60 – 5,19]	0,0878
fT4 (pmol/l)	14,30 [13,50 – 14,40]	14,35 [13,38 – 16,20]	13,70 [12,70 – 14,60]	0,4203
HCy (μmol/l)	9,00 [6,30 – 10,20]	8,55 [7,02 – 11,05]	9,00 [6,60 – 11,10]	0,9143
MDA (μmol/l)	1,680 [1,560 – 2,100]	1,730 [1,480 – 2,240]	1,630 [1,390 – 2,080]	0,8041
GPx (U/l)	540,0 [480,0 – 714,0]	594,0 [521,3 – 654,8]	639,0 [552,0 – 693,0]	0,4063
AOK (mmol/l)	1,220 [1,190 – 1,310]	1,415 [1,338 – 1,493]	1,360 [1,300 – 1,420]	0,0450

**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*

Role prolaktinu ve folikulární tekutině nebyla dosud plně vysvětlena a odborná literatura neuvádí dostatek údajů ani o vztahu mezi koncentracemi prolaktinu v séru a ve folikulární tekutině [Kamel et al., 1994; Lebedeva IYu et al., 1998]. Skutečnost, že zdravé plodné dárek mají signifikantně nižší hladiny prolaktinu ve folikulární tekutině nehlédě na věkovou skupinu, v níž hladiny sledujeme, naznačuje, že prolaktin bude pravděpodobně významným regulačním faktorem pro vývojový potenciál oocytu. Poznání patofyziologického mechanismu, kterým prolaktin k regulaci přispívá, může vést k vyšší individualizaci léčebného plánu snížené plodnosti.

V našich podmínkách je screening tyreoidálních dysfunkcí doporučován široké škále pacientek léčených pro neplodnost – všem s anamnézou hyper- či hypothyreoidální poruchy, ženám s diabetem typu 1 či s jakoukoliv jinou autoimunitní poruchou, ženám po

lčbě maligního onemocnění, po prodělané radioterapii v oblasti hlavy či krku atd. Onemocnění štítné žlázy před otěhotněním i v průběhu těhotenství vyžaduje speciální management s ohledem na změny tyreoidálních funkcí v těhotenství [Poppe et al., 2007]. Ačkoliv se v současné době endokrinology doporučený postup pravděpodobně velmi blíží optimálnímu nastavení substituční terapie, další poznání toho, jak se hladiny volného T4 hormonu promítají ze séra do folikulární tekutiny a jak pak tyto hladiny ovlivňují vývojový potenciál oocyty, jistě může přispět k ještě citlivějšímu a více personalizovanému způsobu léčby.

U zdravých žen je lidský folikul během svého zrání dostatečně chráněn proti toxickému poškození v důsledku oxidačního stresu [Angelucci et al., 2006]. Stoupající aktivita kyslíkových radikálů může být jedním z důvodů neplodnosti i poklesu úspěšnosti IVF u žen se vzrůstajícím věkem, kdy dochází k progresivnímu poklesu kvality a kvantity oocytů [Broekmans et al., 2006; Wiener-Megnazi et al., 2004]. Toto vše může být ještě umocněno životosprávou ženy a jejím aktivním nikotinismem [Paszkowski et al., 2002]. Na hladinu HCy má velký vliv plazmatická koncentrace folátu (kyselina listová – vitamin B₉), který po své modifikaci na tetrahydrofolát působí jako kofaktor enzymu methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) v remethylační cestě přeměny HCy na aminokyselinu methionin. Nikotin, dehtové metabolity a sekundární kouř mají vliv na hladinu folátu, jehož nízká koncentrace je spojena právě s hyperhomocysteinemií. Kuřáci mají také tendenci k menší konzumaci ovoce a zeleniny bohatých na kyselinu listovou. Je však třeba poznamenat, že tento vztah mezi kouřením a hladinou folátu není jednoznačný a některé studie prokazují jejich nezávislost [Okumura a Tsukamoto, 2011]. Tento fakt je jistě závislý také na intenzitě kouření. V naší studii jsme prokázali, že neexistuje signifikantní spojitost mezi neplodnými ženami kuřačkami a nekuřačkami ani zdravými dárkyněmi oocytů kuřačkami a nekuřačkami v žádném sledovaném parametru.

Foláty snižují hladinu HCy jak v krvi, tak ve folikulární tekutině [Forges et al., 2007], což významně koreluje jak s kvalitou oocyty, tak s vývojovým potenciálem embrya [Boxmeer et al., 2009; Ocal et al., 2012]. I když stále probíhá diskuze [Appasamy et al., 2008; Oyawoye et al., 2009; Ozkaya a Nazırođlu, 2010] o spojitosti mezi AOK folikulární tekutiny a etiologií infertility, je jisté, že vliv volných radikálů je zapojen do patofyziologických mechanismů mnoha chorob souvisejících s neplodností, kde je zapotřebí léčby IVF. Pacientky s endometriózou mají ve srovnání s pacientkami s jinými diagnózami signifikantně zvýšené hladiny HCy [Ebisch et al., 2006].

Naše výsledky jsou ve zdánlivém rozporu z důvodu vyšší hladiny Hcy u kontrolní skupiny. Hladina Hcy však může být ovlivněna nejen suplementací folátů, ale i ovariální hyperstimulací [Benkhalifa et al., 2010; Boxmeer et al., 2008], a protože schopnost metylace souvisí s riziky metod asistované reprodukce [Menezo et al., 2010], je další výzkum v této oblasti se zapojením zkoumání zdravých plodných dárek přínosem.

Vztahy sérových hormonálních hladin a hladin hormonů ve folikulární tekutině jsou komplexní a jejich regulace i role nejsou dosud zcela jasné [Baka a Malamitsi-Puchner, 2006; Gürbüz et al., 2005; Park a Yang, 2011]. Další podrobnější srovnání folikulárních tekutin dárek oocytů s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost a také ovlivňujících úspěšnost při léčbě neplodnosti.

4.2 Výsledky vztahující se k cíli 2

Vliv nadváhy na úspěšnost technik asistované reprodukce

Porovnávány byly hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity v závislosti na hodnotě BMI. Jak je zřejmé z tabulky 7, hladiny sledovaných parametrů se mezi sebou výrazně nelišily. Pozorována byla jen signifikantně nižší hladina GPx u skupiny žen s nadváhou ($p = 0,0044$). V úspěšnosti dosažení těhotenství se ženy s normálním BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily ($p = 0,4430$).

Hladiny sledovaných markerů a úspěšnost otěhotnění však mohla být ovlivněna skupinou žen, u kterých byl příčinou neplodnosti andrologický faktor. V naší skupině bylo těchto žen 27,27% ($n = 12$). Po vyřazení těchto žen a opětovné analýze výsledků bylo zjištěno, že u žen trpících nadváhou můžeme pozorovat signifikantně vyšší hodnotu volného T3 ($p = 0,0134$) a nižší hladinu GPx ($p = 0,0466$) ve folikulární tekutině. Tyto výsledky dokumentuje tabulka 8. V úspěšnosti dosažení těhotenství se však ani tyto dvě skupiny významně nelišily ($p = 0,6290$).

Obezita a nadváha se šíří světem jako epidemie. Obezita, tedy $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ovlivňuje fyziologické funkce mnoha tkání a orgánů. V důsledku toho mají obézní ženy problémy s přirozeným otěhotněním a obrací se na centra specializující se na léčbu neplodnosti. Tento jev je zvýšeně sledován v průběhu posledních dvaceti let, a to zvláště ve vyspělých zemích.

O mechanismu, jakým přítomnost obezity negativně ovlivňuje reprodukční schopnosti ženy, není zatím příliš známo. Předpokládá se souvislost s poruchou metabolismu steroidů, sekrecí a působením inzulínu či adipokinů. Tyto změny mohou ovlivňovat růst folikulů, vývoj embrya i jeho implantaci, a to jak za přirozených podmínek tak po ART (assisted reproduction techniques, techniky asistované reprodukce) [Bellver et al., 2010; Budak et al., 2006; Mitchell et al., 2005]. Důležitým faktorem je také výskyt obezity již v adolescentním věku ženy. Právě změny ve váze a tělesné konstituci v tomto kritickém životním období mohou ovlivnit endokrinní regulaci puberty a tím i správný vývoj reprodukčního systému [Farooqi et al., 1999; Pelusi a Pasquali, 2003].

Tabulka 7 - Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou (BMI ≥ 25 kg/m²) (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

*Sledované parametry	Normální BMI (n = 37)	Nadváha (n = 7)	p value
Prolaktin (mIU/l)	939,6 ± 468,22	881,8 ± 635,96	0,9749
fT3 (pmol/l)	4,9 ± 0,54	5,3 ± 0,58	0,6374
fT4 (pmol/l)	14,5 ± 2,11	13,8 ± 1,87	0,4307
HCy (μmol/l)	5,6 ± 1,98	6,8 ± 1,69	0,0893
MDA (μmol/l)	1,5 ± 0,45	1,4 ± 0,40	0,4688
GPx (U/l)	669,0 ± 100,92	558,0 ± 54,40	0,0044
AOK (mmol/l)	1,3 ± 0,12	1,46 ± 0,19	0,5291

**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*

Většina prací zabývajících se obezitou a neplodností zdůrazňuje negativní efekt vyššího BMI na implantaci a kvalitu embrya, na úspěšnost fertilizace a dosažení těhotenství, incidenci potratů a průběh těhotenství [Bellver et al., 2010; Ferlitsch et al., 2004; Kuchenbecker et al., 2006; Moragianni et al., 2012; Rittenberg et al., 2011; Shah et al., 2011; van der Steeg et al., 2008].

Tabulka 8 - Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) po vyřazení žen s andrologickou příčinou neplodnosti (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

*Sledované parametry	Normální BMI (n = 28)	Nadváha (n = 4)	p value
Prolaktin (mIU/l)	980,7 ± 488,82	1370,5 ± 545,41	0,2537
fT3 (pmol/l)	4,9 ± 0,57	5,3 ± 0,20	0,0134
fT4 (pmol/l)	14,5 ± 2,31	14,0 ± 1,73	0,6016
HCy (μmol/l)	5,6 ± 2,13	6,1 ± 0,90	0,7626
MDA (μmol/l)	1,5 ± 0,45	1,4 ± 0,43	0,4236
GPx (U/l)	666,0 ± 101,82	546,0 ± 37,43	0,0466
AOK (mmol/l)	1,3 ± 0,12	1,5 ± 0,26	0,2786

**fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita*

Výsledky naší studie podporují hypotézu, že negativní efekt vyššího BMI začíná až u BMI nad 30 kg/m^2 [Bellver et al., 2010; Dechaud et al., 2006; Lashen et al., 1999; Matalliotakis et al., 2008; Moragianni et al., 2012; Pasquali et al., 2007; Styne-Gross et al., 2005; Winter et al., 2002].

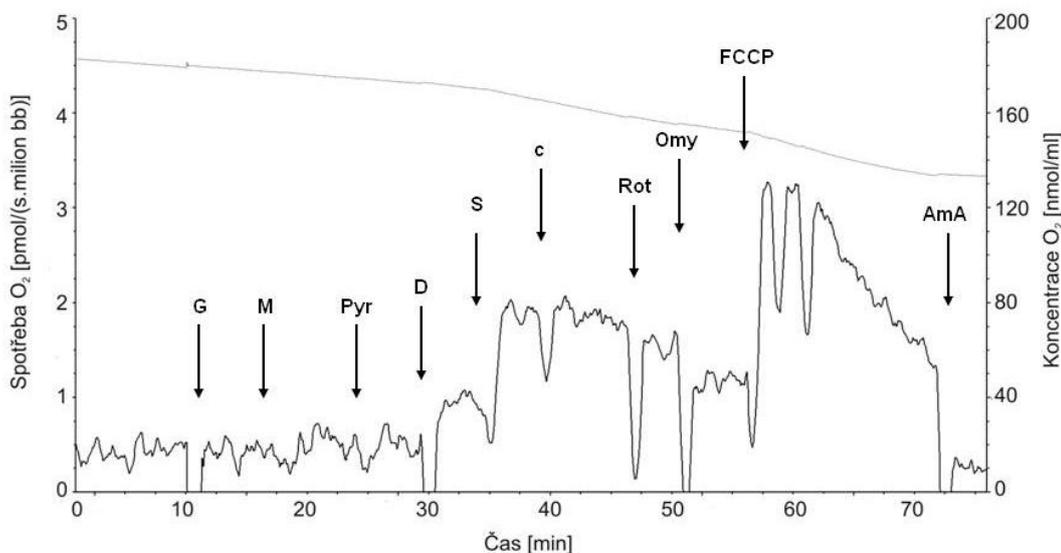
V naší skupině jsme zaznamenali nižší hladiny GPx u žen s vyšším BMI. Nižší hladiny cytoprotektivních enzymů jsou pozorovány nejen u žen s vyššími hodnotami BMI [Agarwal et al., 2005; Alpay et al., 2006; Lee et al., 2008] a u pacientek s diabetem mellitem [Goyal et al., 2011], ale například i v seminální plazmě některých neplodných mužů, kde nižší hladina tohoto protektivního enzymu způsobuje vyšší peroxidaci lipidů a tím ztrátu motility spermií [Alvarez a Storey, 1989; Giannattasio et al., 2002]. K úpravě snížené hladiny GPx u žen s nadváhou dochází po dosažení normálních hodnot BMI [Bougoulia et al., 2006].

Zvýšenou hladinu volného T3 hormonu nacházíme častěji u žen trpících nadváhou a obezitou [Reinehr, 2010]. Stejně výsledky ukazuje i naše práce, kde hladina volného T3 hormonu byla signifikantně vyšší u žen s BMI nad 25 kg/m². Oproti ostatním pracím, kde byl volný T3 stanoven ze séra, jsme tuto rozdílnou hladinu prokázali ve folikulární tekutině. Mechanismus vzrůstu hladiny hormonu není prozatím znám, ví se však, že jeho hladina se normalizuje při snížení váhy a nejspíše souvisí s metabolismem leptinu [Reinehr, 2010; Reinehr a Andler, 2002; Reinehr et al., 2008].

4.3 Výsledky vztahující se k cíli 3

Vysokoúčinná respirometrie

Typická křivka spotřeby kyslíku permeabilizovanými spermii je na obrázku 10. Minimální počet spermií nutný pro detekci spotřeby kyslíku byl 5×10^6 buněk v 1 ml média. Po aplikaci glutamátu, malátu a pyruvátu, substrátů pro komplex I, byla spotřeba kyslíku srovnatelná se stavem bez substrátů, což ukazuje na dobrou permeabilizaci buněčné membrány, která vedla k úniku ADP z buňky. Po přidání ADP došlo ke stimulaci respirace a indukci stavu S3, tj. maximální spotřebě kyslíku při fosforylaci ADP na ATP (OXPHOS_I). U asthenozoospermie byla aktivita komplexu I signifikantně nižší než u kontrol (tabulka 9, graf 5). Ilustrativní záznam průběhu respirometrické analýzy u normozoospermie a asthenozoospermie je patrný z obrázku 11.

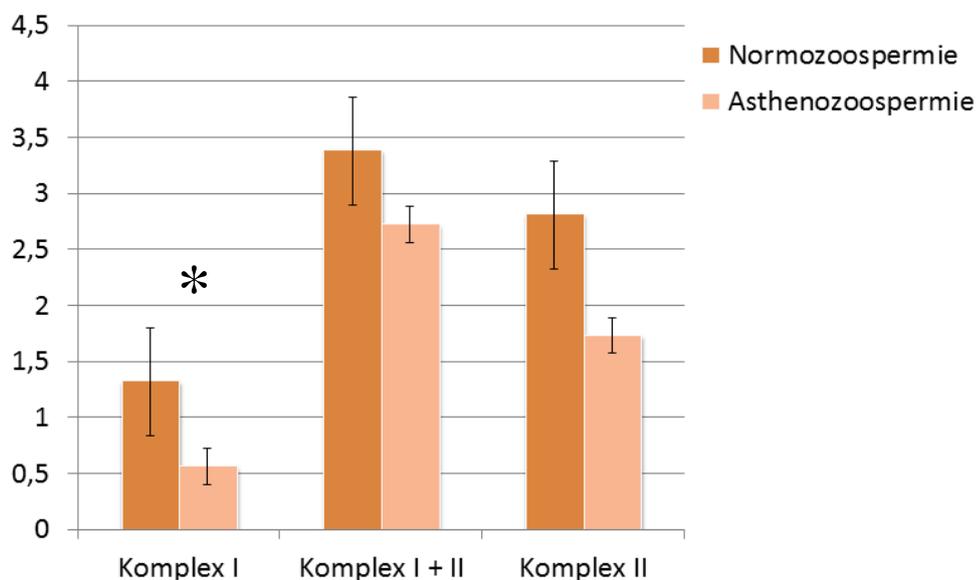


Obrázek 10 - Typická křivka spotřeby kyslíku permeabilizovanými spermii. Plná čára znázorňuje spotřebu kyslíku, tečkovaná koncentraci kyslíku v komůrce. Šipky ukazují aplikaci jednotlivých chemikálií: G = glutamát; M = malát; Pyr = pyruvát; D = ADP; S = sukcinát; c = cytochrom c; Rot = rotenon; Omy = oligomycin; FCCP = karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon; Ama = antimycin A

Tabulka 9 - Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii

*Stav	Titrační protokol	Normozoospermie pmol/(s.10 ⁶ bb) (n = 7)	Asthenozoospermie pmol/(s.10 ⁶ bb) (n = 7)	p value
S2	GMP _L	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,10	n.s.
S3 _I	GMP _P	1,32 ± 0,16	0,56 ± 0,16*	0,007
S3 _{I+II}	GMPS _P	3,38 ± 0,52	2,72 ± 0,79	n.s.
S3 _{I+IIc}	GMPS _{cP}	3,37 ± 0,56	2,77 ± 0,89	n.s.
S3 _{II}	S(Rot) _P	2,81 ± 0,48	1,73 ± 0,57	0,07
S4	S(Rot) _L	0,67 ± 0,16	1,72 ± 0,59	0,046
S3 _{uII}	S(Rot) _E	3,18 ± 0,67	4,10 ± 1,39	n.s.

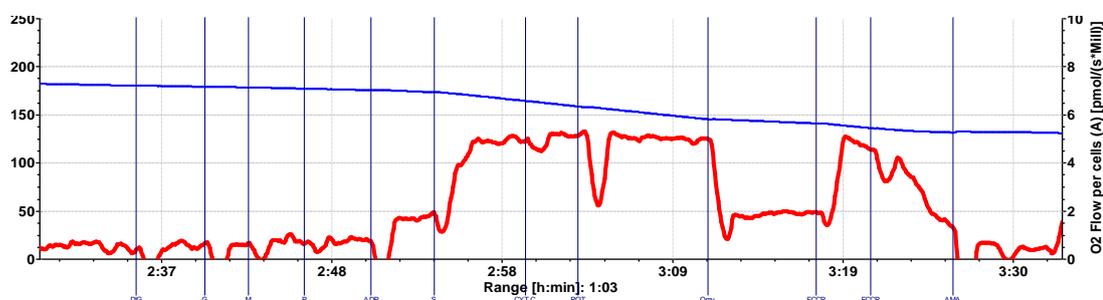
* G = glutamát, M = malát, P = pyruvát, D = ADP, S = sukcinát, c = cytochrom c, Rot = rotenon, Omy = oligomycin, F = FCCP; L = LEAK, P = OXPHOS, E = ETS; I a II = komplexy I a II



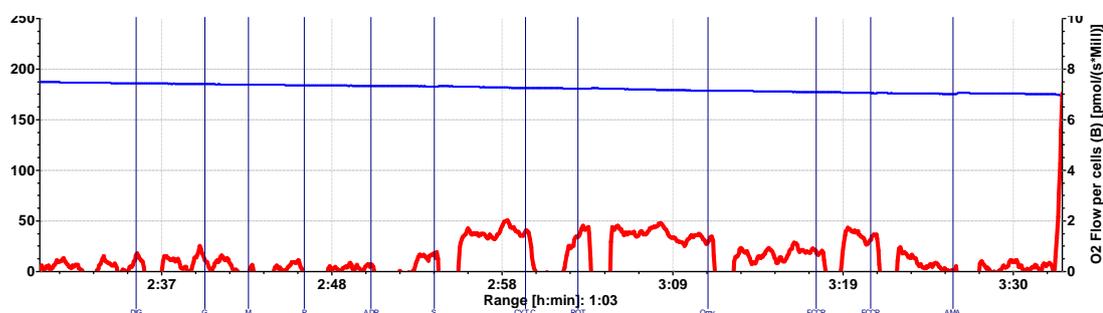
Graf 5 – Rozdíl v aktivitě komplexu I a komplexu II u normozoospermie a asthenozoospermie (* p = 0,007)

Aplikací sukcinátu dodávajícího do systému elektrony prostřednictvím komplexu II došlo k dalšímu zvýšení spotřeby kyslíku (OXPHOS_{I+II}), která se mezi oběma skupinami významně nelišila. Následná inhibice komplexu I rotenonem ukázala, že příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace byl i u zdravých spermíí relativně nižší než je tomu typicky v somatických buňkách, např. jaterních nebo svalových [El-Mir et al., 2000; Scheibye-Knudsen a Quistorff, 2009]. Inhibice ATP-syntázy oligomycinem snížila spotřebu kyslíku na úroveň nutnou především pro pumpování protonů do intermembránového prostoru. Tato hodnota byla signifikantně vyšší u asthenozoospermatických vzorků. Rozpřažení fosforylace a oxidace pomocí FCCP ukázalo, že ve zdravých i asthenozoospermatických vzorcích je kapacita elektrontransportního systému přenášet elektrony vyšší než maximální spotřeba kyslíku při zachovalé fosforylaci. Reziduální spotřeba kyslíku, na kterou byly ostatní respirační parametry korigovány, byla u zdravých spermíí $0,14 \pm 0,05$ pmol O₂/(s.10⁶buněk) a u spermíí s poruchou pohyblivosti $0,15 \pm 0,05$ pmol O₂/(s.10⁶ buněk).

A



B



Obrázek 11 – Ilustrativní průběh respirometrické analýzy normozoospermatického (A) a asthenozoospermatického (B) ejakulátu

Literární údaje o respirační aktivitě mitochondrií ve spermiích jsou relativně chudé, nicméně již první studie ukazují, že poruchy mitochondrií mají vliv na motilitu spermií [Ferramosca et al., 2012b]. Důvodem je zejména malé množství mitochondrií obsažených v jednotlivých zárodečných buňkách a jejich obtížná izolace [Piomboni et al., 2012]. Proto je nutné stanovit mitochondriální respiraci na celých buňkách, ideálně tak, aby buněčná membrána byla permeabilizována a umožnila přestup substrátů Krebsova cyklu a adenosindifosfátu k mitochondriím. Dosud používaná metoda byla založena na inkubaci spermií v hypotonickém roztoku, která vedla k narušení buněčné membrány bez poškození membrány mitochondrií [Piasecka a Kawiak, 2003]. V somatických buňkách však inkubace v hypotonických médiích způsobuje stimulaci mnoha membránových iontových kanálů a receptorů, což vede ke změnám ve složení intracelulární tekutiny a aktivaci intracelulárních procesů včetně uvolňování řady biologicky účinných látek a apoptózy [Blum et al., 2010; Okada a Maeno, 2001]. Proto jsme v naší studii využili permeabilizace membrány spermií digitoninem, detergentem často využívaným ve výzkumu mitochondriální funkce na celých buňkách [Pesta a Gnaiger, 2012]. V naší práci jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermií permeabilizovaných digitoninem vysokoúčinnou oxygrafií, která umožňuje stanovení spotřeby kyslíku z nejmenšího možného množství zárodečných buněk.

Oxidativní fosforylaci jakožto zdroji energie pro pohyb spermií byla dávána nezastupitelná role, proto se také předpokládalo, že poruchy mitochondriální morfologie a funkce jsou hlavním faktorem odpovídajícím za sníženou motilitu spermií [Turner, 2006]. Studie na myších ale ukázaly, že při poškozené oxidativní fosforylaci nedochází k zániku motility spermií [Escalier, 2006] a zdrojem ATP je zejména přeměna glukózy na pyruvát [Marin et al., 2003]; také spermie králíků pravděpodobně využívají jako hlavní zdroj energie glykolýzu [Storey a Kayne, 1980]. Spermie některých živočišných druhů dokonce dokáží vytvářet glykogen [Ford, 2006]. Samčí zárodečné buňky dalších živočišných druhů (beran, býk, kanec, primáti) včetně člověka však pro pohyb využívají ve významné míře ATP získaný v mitochondriích oxidativní fosforylací [Aitken et al., 2004b; Mukai a Okuno, 2004; Piomboni et al., 2012]. Otázka primárního zdroje energie pro pohyb spermií ještě není zcela zodpovězená ani u člověka; všeobecně uznávaným pohledem je jejich všestrannost v možnosti získávání ATP, která je ovlivněná přítomností a dostupností substrátů v ženském reprodukčním traktu [Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008].

Některé mitochondriální parametry, např. mitochondriální membránový potenciál měřený pomocí průtokové cytometrie přímo koreluje s počtem oplodněných oocytů a ovlivňuje tak výsledky léčby neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce [Marchetti et al., 2012]. Další výzkum a detailnější studium této problematiky tak slibují přínos pro další pokrok v diagnostice i terapii neplodnosti.

Naše studie potvrzuje nález snížené aktivity komplexu I v mitochondriálním respiračním systému asthenozoospermatických vzorků. Aktivita komplexu II však nebyla asthenozoospermii narušena a celková kapacita transportu elektronů při stimulaci komplexů I a II a zachovalé fosforylaci (stav $S_{3_{I+II}}$) se mezi oběma skupinami nelišila. Zajímavým nálezem je také pravděpodobná zpětná kontrola přenosu elektronů fosforylací ADP u asthenozoospermie, jak ukazuje poměr E/P, který byl u méně pohyblivých spermií signifikantně vyšší (tabulka 10). Důvodem pro snížení aktivity komplexu I tedy patrně není jeho snížená exprese. U asthenozoospermatických vzorků byl také prokázán signifikantně zvýšený stav LEAK (S4), který vyjadřuje stupeň mitochondriální oxidace nutné zejména pro kompenzaci úniku protonů z mitochondriální matrix, ale podílí se na něm i obrat kationtů přes vnitřní mitochondriální membránu [Pesta a Gnaiger, 2012]. Známým příkladem rozpřažení respirace a fosforylace ADP je rozpřahovací protein hnědé tukové tkáně (UCP1), který je zodpovědný za tvorbu tepla v mitochondriích [Rousset et al., 2004]. V lidských spermiích byla prokázána mRNA pro další rozpřahovací protein - UCP2, jehož role by mohla spočívat v ochraně před kyslíkovými radikály [Zhang et al., 2007], ale jehož vztah k mitochondriální respiraci spermií nebyl dosud zkoumán.

Tabulka 10 - Respirační kontrolní indexy spermií

*Stav	Normozoospermie (n = 7)	Asthenozoospermie (n = 7)	p value
L/E	0,22 ± 0,03	0,54 ± 0,09	0,008
P_{I+II}/P_I	2,62 ± 0,30	4,89 ± 1,00	0,026
P_I/L	5,88 ± 0,77	3,77 ± 0,68	0,046
E/P	1,18 ± 0,23	2,45 ± 0,46	0,020

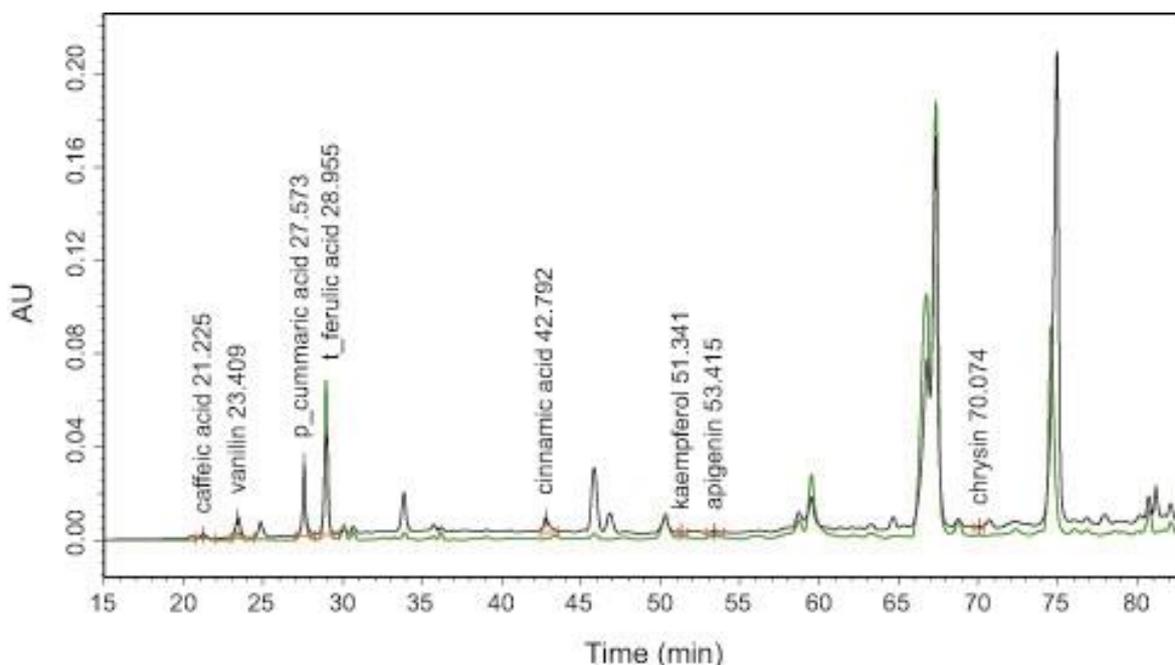
**L/E = LEAK/ETS, poměr ukazující stupeň rozpřažení oxidace a fosforylace; P_{I+II}/P_I = OXPHOS při stimulaci komplexů I a II/OXPHOS při stimulaci komplexu I; P_I/L = OXPHOS/LEAK, vzestup respirace po aplikaci substrátů komplexu I (glutamátu, malátu a pyruvátu) a ADP, E/P = poměr rovnováhy mezi kapacitou elektrontransportního systému a oxidační fosforylací, hodnoty výrazně vyšší než 1 ukazují na kontrolu respirace fosforylací*

4.4 Výsledky vztahující se k cíli 4

Efekt českého propolisu na mitochondriální funkce lidských spermií

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografickou analýzou propolisu byly identifikovány následující složky: kyselina ferulová, kumarová, kávová, skořicová, vanillin, kaempferol, apigenin a chrysin. Naopak látky jako kyselina gallová, benzoová, quercetin, naringenin, luteolin, genistein, pinocembrin, galangin a fenylethylester kyseliny kávové nebyly ve vzorku propolisu nalezeny. Obrázek 12 ukazuje chromatogram ethanolového extraktu českého propolisu a detailní výsledky spolu s koncentracemi sledovaných substancí jsou shrnuty v tabulce 11



Obrázek 12 - Chromatogram českého propolisu s identifikovanými sloučeninami a jejich retenčními časy ($\lambda = 280$ nm - černá linka a $\lambda = 330$ nm - zelená linka)

Tabulka 11 - Chromatografická analýza českého propolisu

Sloučenina	R _t [min]	Koncentrace [mg/l of EEP]
gallová kyselina	6.0	n.d
káвовá kyselina	21.1	65 ± 11
vanillin	23.3	65 ± 11
p-kumarová kyselina	27.5	231 ± 10
t-ferulová kyselina	28.9	514 ± 15
benzoová kyselina	33.6	n.d
quercetin	42.3	n.d
skořicová kyselina	42.7	29 ± 1
naringenin	43.2	n.d.
luteolin	44.7	n.d
genistein	45.6	n.d
kaempferol	51.3	101 ± 45
apigenin	53.4	73 ± 8
chrysin	70.1	36 ± 5
pinocembrin	65.1	n.d.
galangin	73.1	n.d.
CAPE	71.4	n.d.

* *n.d.* = neidentifikováno, *CAPE* = fenylethyl ester kyseliny kávové

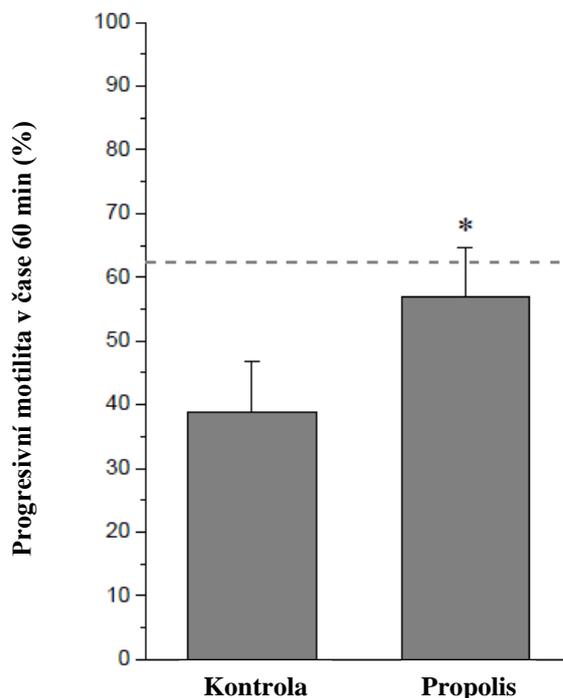
Efekt propolisu na motilitu spermií v čerstvém ejakulátu

Do této studie bylo zařazeno deset zdravých mužů průměrného věku 24,2 let. Základní charakteristika spermiogramů je uvedena v tabulce 12. K čerstvému ejakulátu (0,1 ml) byl přidán extrakt propolisu nebo 70% ethanol (1 µl) (konečná koncentrace propolisu byla 0,01 mg/ml). Po 60 minutách byla opět odečítána motilita spermií. Efekt propolisu na motilitu lidských spermií po 60 minut trvající inkubaci ukazuje graf 6. Propolis zpomalil pokles progresivní motility spermií v nativním ejakulátu. Procento

progresivně pohyblivých spermií inkubovaných s propolisem bylo po 60 minutách téměř stejné jako v čerstvém vzorku, spermie neošetřené propolisem s časem progresivní motility ztrácely ($p = 0,028$). Samotný ethanol neměl žádný negativní efekt na motilitu spermií.

Tabulka 12 - Hlavní parametry ejakulátů normozoospermatických mužů (\pm SEM)

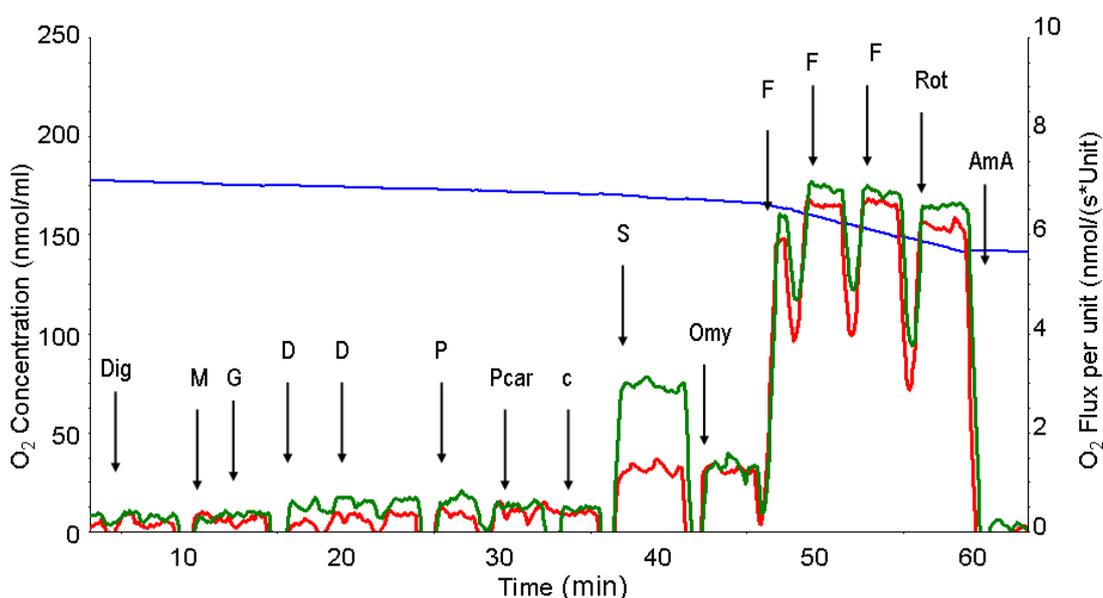
Parametry	Normozoospermie (n = 10)
Objem (ml)	3.18 \pm 0.26
Koncentrace ($\times 10^6$ /ml)	81.22 \pm 13.97
Progresivní motilita (%)	75.33 \pm 3.00
Patologická morfologie (%)	42.00 \pm 2.26
Koncentrace po gradientu ($\times 10^6$ /ml)	158.44 \pm 18.09
Progresivní motilita po gradientu (%)	86.43 \pm 2.10



Graf 6 - Efekt českého propolisu na motilitu spermií. Sloupce reprezentují hodnoty progresivní motility lidských spermií v nativním ejakulátu po 60 minutové inkubaci s ethanolovým propolisovým extraktem (průměr \pm SEM). Přerušovaná čára = progresivní motilita v čase 0. * $p < 0,05$, porovnáváno s hodnotami kontrol

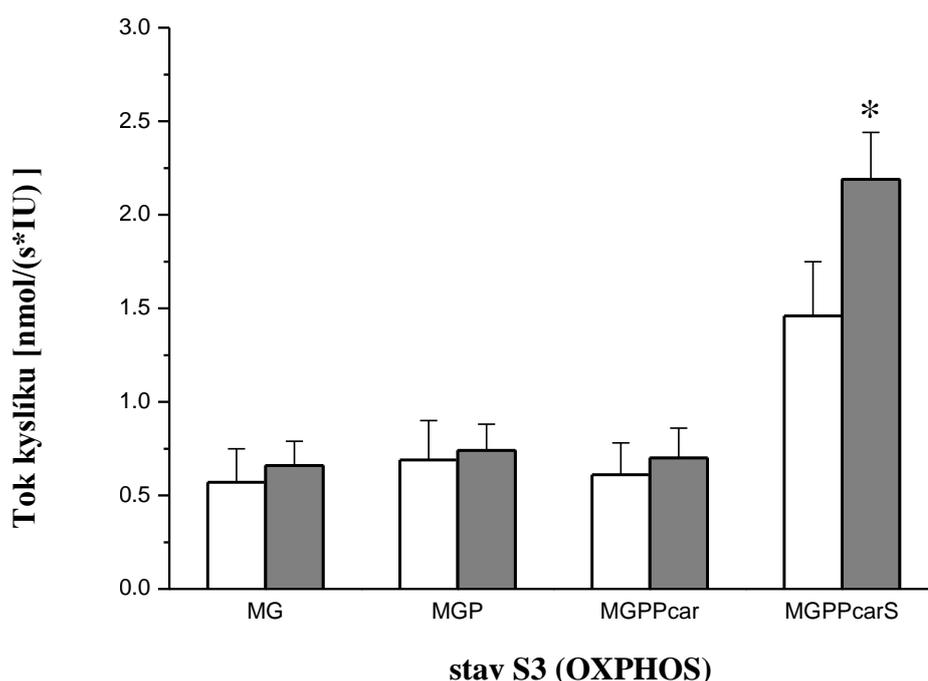
Vysokoučinná respirometrie

Typickou křivku spotřeby kyslíku v permeabilizovaných spermích po aplikaci propolisu (0,01 mg/ml) a bez něj ukazuje obrázek 13. Spotřeba kyslíku neovlivněných spermíí ($0,13 \pm 0,01$ nmol/(s.IU)) byla propolisem statisticky významně zvýšena ($0,27 \pm 0,03$ nmol/(s.IU)); $p = 0,006$). Po permeabilizaci digitoninem byl v kontrolních vzorcích stav S2, tj. respirace po přidání substrátů komplexu I malátu a glutamátu, signifikantně nižší ($0,19 \pm 0,04$ nmol/(s.IU)) než ve vzorcích ovlivněných propolisem ($0,29 \pm 0,05$ nmol/(s.IU)); $p = 0,014$).



Obrázek 13 - Typická křivka spotřeby kyslíku v permeabilizovaných spermích po aplikaci propolisu (zelená čára) a bez něj (červená čára). Znázornění protokolu s jednotlivými substráty komplexu I, komplexu II a elektron-transportního flavoproteinů užívaného pro lidské spermie. Červená linka = tok kyslíku korigovaný na IU aktivity citrátsyntázy v kontrolních vzorcích, zelená linka = tok kyslíku korigovaný na IU aktivity citrátsyntázy ve vzorcích ovlivněných propolisem 0,01 mg/ml, modrá linka = koncentrace kyslíku v komůrce oxygrafu. Dig = digitonin, M = malát, G = glutamát, D = ADP, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, c = cytochrom c, S = sukcinát, Omy = oligomycin, F = FCCP, Rot = rotenon, AmA = antimycin A

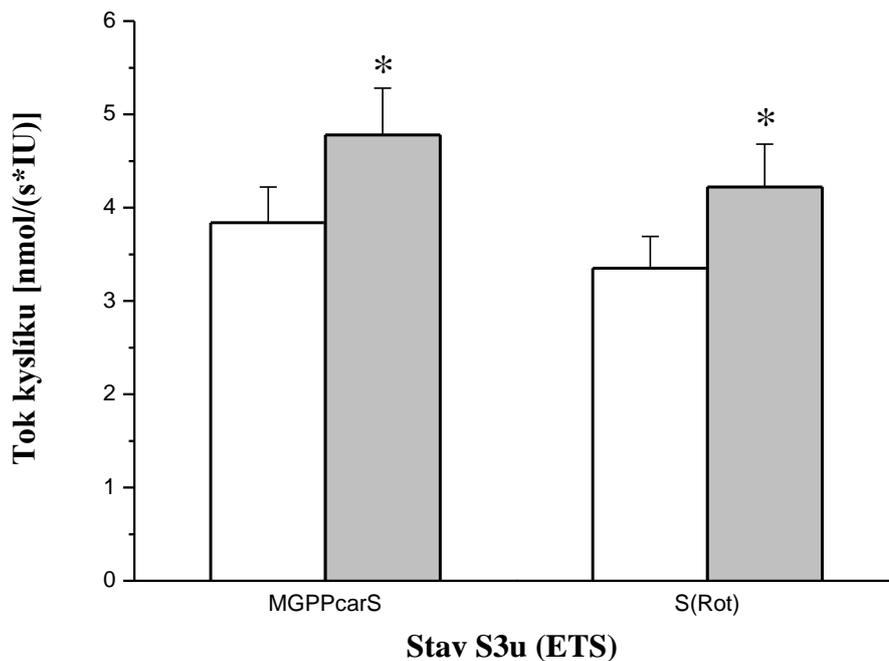
Stav S3, tedy spotřeba kyslíku při oxidativní fosforylaci, určený přidáním ADP a substrátů komplexu I, ETF a komplexu II, je znázorněn v grafu 7. Propolis významně zvýšil (o ~50%) $S3_{I+II}$ ($p = 0,003$), což naznačuje zvýšenou aktivitu komplexu II. Nedošlo k ovlivnění stavu S4 indukovaného oligomycinem, ten dosáhl $0,81 \pm 0,07$ a $0,94 \pm 0,09$ nmol/(s.IU) u kontrolního vzorku respektive vzorku ovlivněného propolisem



Graf 7 - Spotřeba kyslíku při stavu S3 (OXPHOS) u kontrol a při ošetření propolisem. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity citrátsyntázy * $p < 0.05$, v porovnání s hodnotami kontrol. Bílé sloupce = kontrola, šedé sloupce = propolis, M = malát, G = glutamát, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, S = sukcinát

Stav S3u udávající kapacitu elektrontransportního systému při rozpřažení oxidace a fosforylace a kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu byl po přidání propolisu signifikantně vyšší v přítomnosti všech substrátů (tj. malátu, glutamátu, pyruvátu, palmitoylcarnitinu a sukcinátu i po inhibici komplexu I rotenonem (graf 8). Při měření spotřeby kyslíku po aplikaci TMPD + askorbátu byla respirační aktivita

komplexu IV v kontrolních vzorcích $12,16 \pm 2,58$ nmol $O_2/(s.IU)$, s propolisem byla signifikantně zvýšena na $15,4 \pm 3,19$ nmol $O_2/(s.IU)$. Samotný ethanol (médiu pro propolis, oligomycin, antimycin A, FCCP a rotenon) v objemu do 10 μ l neovlivňoval respirometrické parametry měřené se substráty komplexu I a II a ETF v přítomnosti ADP.

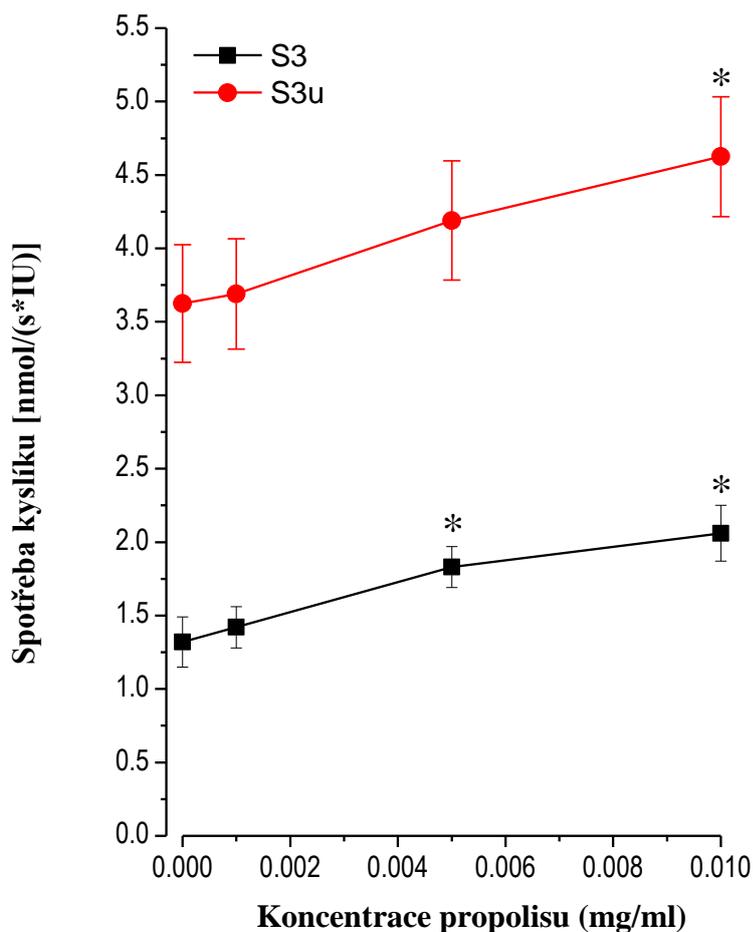


Graf 8 - Spotřeba kyslíku při stavu S3u (ETS) u permeabilizovaných spermií bez propolisu a po jeho aplikaci. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity citrát syntázy. * $p < 0,05$, v porovnání s hodnotami kontrol. Bílé sloupce = kontrola, šedé sloupce = propolis, M = malát, G = glutamát, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, S = sukcinát a inhibitor komplexu I rotenon (Rot)

Respirační kontrolní koeficienty byly vypočítány pro odhad relativní efektivity individuálních intervencí a stavu spřažení oxidace a fosforylace v mitochondriích spermií. Poměr $OXPHOS_{I+II}/OXPHOS_I$ byl signifikantně vyšší ve vzorku ovlivněném propolisem ($3,53 \pm 0,42$) ve srovnání s kontrolou ($2,8 \pm 0,28$), což naznačuje zvýšenou efektivitu spřažené respirace při stimulaci komplexu II sukcinátem. Kontrolní poměr LEAK (poměr respirace LEAK a kapacity elektron-transportního systému) dosahoval $0,25 \pm 0,02$

v kontrolních vzorcích a byl významně snížen po aplikaci propolisu na hodnoty $0,21 \pm 0,02$ ($p = 0,024$).

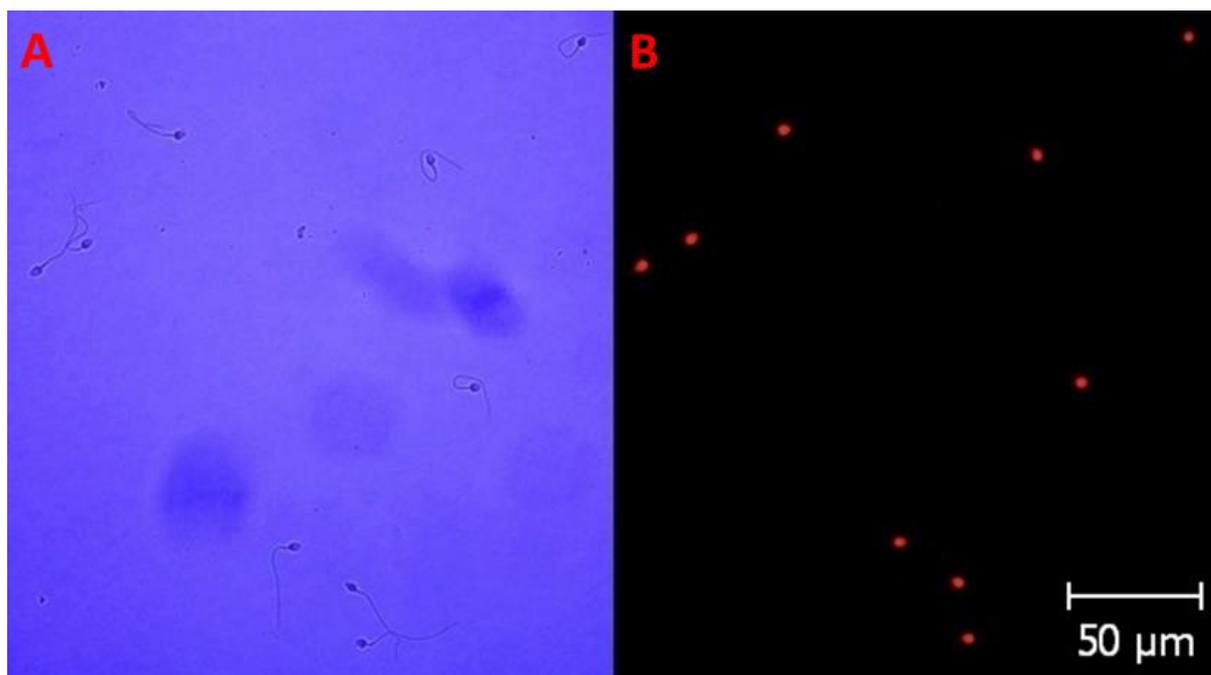
Vztah mezi koncentrací propolisu a jeho účinkem na spotřebu kyslíku je znázorněn v grafu 9. Propolis v závislosti na dávce zvyšoval spotřebu kyslíku. Propolis byl účinnější, ve stavu S3 než S3u.



Graf 9 – Vztah mezi konečnou koncentrací propolisu a spotřebou kyslíku. Stav S3 (OXPHOS) = spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii v přítomnosti malátu, glutamátu, pyruvátu, sukcinátu a ADP. Stav S3u = spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii, měřeno po přidání malátu, glutamátu, ADP, pyruvátu, sukcinátu a FCCP. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity citrát syntázy. * $p < 0,05$, v porovnání s hodnotami bez propolisu.

Permeabilizace buněčné membrány spermie

Přidání 5 $\mu\text{g/ml}$ digitoninu umožnilo dostatečnou prostupnost buněčné membrány pro jodid propidia, a tudíž i pro substráty a inhibitory potřebné pro oxygrafickou analýzu (obrázek 14).

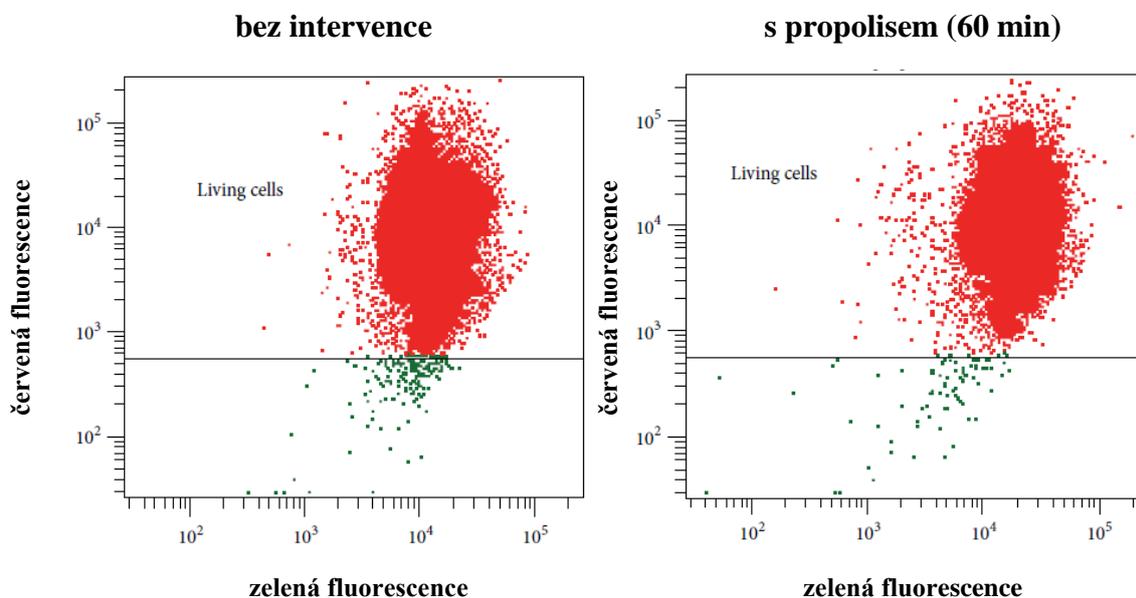


Obrázek 14 - Permeabilita buněčné membrány spermie po použití digitoninu. (A) Mikrofotografie lidských spermií a (B) fluorescenční mikrofotografie stejného zorného pole po použití nepermeabilního jaderného barviva – jodid propidia

Průtoková cytometrie

Depolarizace mitochondriální membrány je citlivým indikátorem mitochondriálního poškození. JC-1 je fluorescenční sonda prostupující membránou mitochondrie, která agreguje v mitochondriální matrix a emituje červené světlo, pokud je $\Delta\Psi_m$ vysoké. V případě, že je mitochondriální membrána depolarizovaná, není monomerní forma JC-1 schopná se v mitochondriální matrix akumulovat a zůstává v cytoplazmě, kde produkuje zelenou fluorescenci. Ztráta $\Delta\Psi_m$ u spermií může sloužit jako časný marker buněčné apoptózy a tím i případné dysfunkce [Barroso et al., 2006].

Inkubace vzorků spermií s propolisem (60 min) neměla v našich experimentech na $\Delta\Psi_m$ signifikantní vliv (obrázek 15). V kontrolních vzorcích bylo procento buněk s vysokým $\Delta\Psi_m$ $98,43 \pm 1,07\%$, u spermií ovlivněných propolisem dokonce mírně vzrostlo $99,33 \pm 0,25\%$.



Obrázek 15 - Typický graf z průtokového cytometru po použití barviva JC-1. Mitochondriální membránový potenciál byl detekován za použití MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies). R-phycoerythrin = červená fluorescence, zdravé buňky; Alexa Fluor 488 dye = zelená fluorescence, redukováný mitochondriální membránový potenciál

Aktivita citrátsyntázy

V kontrolních vzorcích byla aktivita citrátsyntázy $6,58 \pm 0,84$ mIU/ 10^7 buněk a nebyla výrazně ovlivněna propolisem ($6,08 \pm 0,84$ mIU/ 10^7 buněk) ani dalšími substancemi (substráty, inhibitory, médii) přidávanými při respirometrických měřeních, jak bylo testováno v oddělených kontrolách.

Jedná se o první studii, která ukazuje chemické složení českého propolisu a jeho vliv na lidské spermie. Propolis má velmi komplexní chemické složení, které může být ovlivněno různorodostí rostlin, ze kterých včely sbírají materiál pro propolis a geografickou oblastí, kde k tomu dochází. Oblast sběru testovaného vzorku leží v severním mírném pásmu, kde je typickým produktem včelí propolis topolového typu

[Bankova et al., 2002]. V lokalitě, kde byl použitý propolis sbírán, se nachází následující zastoupení stromů: 90% jehličnaté stromy, bříza (6%), olše (2%), buk (1%) a dub (1%) [Lesy ČR, 2014]. V testovaném vzorku byl detekován chrysin, který je typický v tomto typu propolisu přítomný, dále pak fenolové kyseliny a flavonoidy, které se často nacházejí v propolisu z podobných oblastí, a které jsou pravděpodobně zodpovědné za některé z pozitivních vlastností propolisu [Wojtyczka et al., 2013]. Mimo výše zmíněné látky byly v českém propolisu nalezeny také vysoké koncentrace kyseliny ferulové, kumarové a kaempferolu. Naopak látky v topolovém typu propolisu často popisované (fenylethyl ester kyseliny kávové, naringenin a quercetin) [Bankova, 2005; Bankova et al., 2002] a známé pro své protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné účinky [Ozturk et al., 2012] nebyly v českém propolisu nalezeny.

Mezi faktory, které mohly přispět k výše zmíněným rozdílům ve složení propolisu, patří nejen rozmanitost rostlin vyskytujících se v okolí úlu, ale také roční období, ve kterém docházelo ke sběru, osvětlení, nadmořská výška, typ sběru a dostupnost potravy [Toreti et al., 2013]. Je nutné si uvědomit, že hledání konkrétních látek zodpovědných za pozitivní efekt propolisu doposud nebylo úspěšné. Vědecké studie dokazují, že biologické účinky propolisu jsou téměř totožné (antimikrobiální, antitumorózní, antioxidační, protizánětlivé, atd.) ve vzorcích z různých klimatických zón, navzdory tomu, že mají rozdílné chemické složení [Bankova, 2005]. S největší pravděpodobností je pro biologickou aktivitu propolisu nejdůležitější specifická kombinace jeho složek [Kujumgiev et al., 1999].

Studie popisuje vliv propolisu na motilitu spermií, mitochondriální membránový potenciál a mitochondriální respirační aktivitu stanovenou vysokoúčinnou respiometrií. Ta dovoluje stanovení jednotlivých respiračních stavů při postupném ovlivňování vzorku, což umožňuje komplexní posouzení mitochondriálních funkcí. Vysoká citlivost metody navíc umožňuje stanovit respirační aktivitu jednotlivých komplexů při použití relativně malého množství vzorku [Pesta a Gnaiger, 2012]. V našem experimentu byly použity pročištěné spermie, které byly podrobeny permeabilizaci membrány digitoninem (mírný neionizovaný detergent), jehož dávka byla pečlivě vytitrována tak, aby došlo k permeabilizaci buněčné membrány bez poškození mitochondriální membrány. Dosud byla ve většině případů spotřeba kyslíku lidských mitochondrií ve spermích stanovována tradiční oxygrafií po úpravě vzorku v hypotonickém prostředí [Ferramosca et al., 2008b; Piasecka a Kawiak, 2003; Piasecka et al., 2003; Stendardi et al., 2011]. Ve spermích

mnoha savců může však podobné hypotonické prostředí podstatně ovlivnit aktivitu různých proteinkináz (PK), včetně proteinkinázy A (PKA), proteinkinázy C (PKC) a tyrosinkinázy, a to přes osmosenzitivní K^+ a Cl^- kanály [Petrunkina et al., 2007].

Cenným poznatkem pramenícím z této studie je, že propolis *in vitro* zvyšuje aktivitu mitochondriálních respiračních komplexů II a IV bez ovlivnění spřažení elektronového transportu a syntézy ATP a mitochondriálního membránového potenciálu v permeabilizovaných lidských spermích. Propolis zvyšoval spolu se substráty komplexu I a komplexu II spotřebu kyslíku o ~50%. Toto zvýšení bylo připsáno komplexu II, protože komplex I sám o sobě propolisem ovlivněn nebyl. Poměr P_{I+II}/P_I byl signifikantně vyšší ve vzorcích ošetřených propolisem. Podobně také v rozpřaženém stavu (S3u, E) byla spotřeba kyslíku významně vyšší po přidání propolisu (o ~25%). V obou případech za přítomnosti substrátů komplexu I a II a po inhibici rotenonem. Aktivita komplexu IV byla také zvýšena (~27%).

Dostupná data o vlivu propolisu a jeho hlavních součástí na respiraci mitochondrií nebo na aktivitu jednotlivých mitochondriálních enzymů zapojených do elektrontransportního konvergentního systému jsou vzácná. Nejčastějším poznatkem je, že je jeho efekt v normálních somatických buňkách (kardiomyocyty, neurony, hepatocyty) zanedbatelný, ale podstatným se stává až v případě, kdy jsou buňky vystaveny působení toxinů a je ohrožena oxidativní fosforylace [Barros Silva et al., 2013; Kumaran a Prince, 2010; Lagoa et al., 2011]. Naproti tomu, u nádorových buněk propolisový extrakt nebo jeho součásti inhibují oxidativní fosforylaci, dochází k uvolnění cytochromu c a aktivaci apoptózy [Chen et al., 2012; Yeh et al., 2011]. S přihlédnutím k těmto skutečnostem je vliv propolisu na buněčnou respiraci těžce předvídatelný a závislý na buněčném typu.

Některé studie naznačují, že propolis nebo jeho součásti mohou ovlivňovat membránový potenciál mitochondrií cestou zvýšené permeability vnitřní mitochondriální membrány [Das et al., 2012]. Z toho důvodu byl proveden experiment s MitoProbe™ JC-1 Assay Kitem, který ukázal, že mitochondriální membránový potenciál v lidských spermích není propolisem ovlivněn. Nedošlo k ovlivnění ani oligomycinem navozeného respiračního stavu (LEAK), který reflektuje kompenzaci protonového úniku, protonového skluzu, elektronového skluzu a kationtového obratu [Pesta a Gnaiger, 2012]. Snížení kontrolního poměru LEAK po přidání propolisu bylo pravděpodobně dáno zvýšenou efektivitou elektronového transportu přes komplex II při stavu S3u. Možný výklad molekulárního mechanismu vedoucího k aktivaci komplexu II byl podán ve studii Cimen

a spol., kde byla prokázána zvýšená deacetylase a aktivace sukcinát dehydrogenázy v přítomnosti jedné ze složek propolisu – kaempferolu [Cimen et al., 2010].

Vliv propolisu a jeho součástí na spermie byl doposud zkoumán jen velmi vzácně. Celý propolisový extrakt byl použit ve studiích Yousefa a spolupracovníků, kde byl propolis podáván po 10 až 12 týdnů králíkům a potkanům [Yousef a Salama, 2009; Yousef et al., 2010]. Podání propolisu způsobilo zvýšení počtu spermií i jejich motility, dále došlo ke zvýšení hladiny testosteronu v plazmě a snížení počtu mrtvých a deformovaných spermií. Další studie dokumentovala pozitivní efekt chrysinu na motilitu spermií, jejich koncentraci a hladinu testosteronu v séru [Ciftci et al., 2012]. Ke zvýšení viability a motility spermií došlo i při použití kyseliny ferulové [Zheng a Zhang, 1997]. Všechny tyto nálezy byly vysvětleny antioxidační aktivitou propolisu a žádná ze studií se nezabývala vlivem propolisu nebo jeho součástí na produkci energie mitochondriemi.

Výsledky našich experimentů naznačují, že v lidských spermiích hraje oxidativní fosforylace významnou roli v získávání energie pro pohyb spermií. Ukazuje se také, že asthenozoospermie může být spojena s narušenou funkcí mitochondrií [Ferramosca et al., 2012a]. Vysokoučinná respirometrie může vnést do hledání nových látek pozitivně ovlivňujících motilitu spermií a jejich fertilizační schopnost nové možnosti. Detailní analýza respirační efektivity jednotlivých mitochondriálních enzymatických komplexů může přinést také nové poznatky umožňující lepší pochopení funkčních poruch spermií.

5 Závěry

5.1 Závěry vztahující se k cíli 1 a 2

Studium vybraných složek folikulární tekutiny jako markerů pro sledování kvality lidských oocytů a vliv nadváhy na úspěšnost technik asistované reprodukce

Folikulární tekutina zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, které ovlivňuje vývoj oocyty. Biochemické složení folikulární tekutiny má zásadní vliv na vývojový potenciál vajíčka. Cílem našich experimentů bylo porovnání hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině žen s poruchou plodnosti a zdravých plodných dárek oocytů. Dále jsme porovnávali výsledky léčby neplodnosti u skupiny neplodných žen podstupujících ART v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině.

Výsledky této části práce potvrzují přítomnost prolaktinu, hormonů štítné žlázy, HCy a dalších parametrů oxidačního stresu ve folikulární tekutině a naznačují jejich klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Dále byla prokázána vyšší hladinu volného T3 hormonu a nižší hladina cytoprotektivního enzymu GPx ve folikulární tekutině u žen s vyšším BMI oproti ženám s nižším BMI. Nepotvrdil se však negativní efekt nadváhy na úspěšnost otěhotnění u neplodných žen. Závěry z naší studie jsou limitovány relativně malým počtem pacientek ve skupině s nadváhou.

Hormonální i antioxidační složka folikulární tekutiny hraje významnou úlohu ve vývoji oocyty, a proto bude kompletní znalost jejího biochemického složení spolu s poznáním role jednotlivých složek hrát v budoucnu roli v identifikaci zatím nejasných patofyziologických mechanismů neplodnosti i faktorů, jež ovlivňují úspěšnost její léčby.

5.2 Závěry vztahující se k cíli 3

Funkce mitochondrií ve spermii u mužů s normozoospermii a asthenozoospermii

Jednou z příčin mužské neplodnosti je snížená motilita spermií. Ukazuje se, že ve vývoji této poruchy může hrát roli snížená efektivita respirační aktivity mitochondrií.

V této části práce jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermií s normální a sníženou pohyblivostí. Použili jsme spermie permeabilizované digitoninem a spotřebu kyslíku jsme měřili vysokoúčinnou oxygrafií, která umožňuje stanovení mitochondriální respirační aktivity v nejmenším možném počtu zárodečných buněk. Výsledky studie potvrzují sníženou aktivitu komplexu I u asthenozoospermatiků a naznačují, že na snížené pohyblivosti spermií by se mohl podílet i zvýšený únik protonů z mitochondriální matrix, který vede ke snížené efektivitě fosforylačního procesu.

Dokonalejší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých či s postíženou motilitou přispějí k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění. Nové poznatky z této oblasti mohou přispět i k rozšíření a upřesnění parametrů výběru té nejživotaschopnější spermie pro léčbu neplodnosti metodami asistované reprodukce.

5.3 Závěry vztahující se k cíli 4

Efekt českého propolisu na mitochondriální funkce lidských spermií

Jedná se o první studii studující vliv propolisu na mitochondriální funkce spermií. Doposud byl jeho efekt sledován pouze u somatických buněk.

Vzorky ejakulátu od 10 dobrovolníků byly zpracovány a vyhodnoceny dle kritérií Světové zdravotnické organizace z roku 2010. Účinek propolisu byl sledován jak na nativním vzorku, tak po jeho laboratorním zpracování.

Ve vzorcích ošetřených propolisem došlo ke zmírnění poklesu progresivní motility v čase. U těchto vzorků byla pozorována i signifikantně vyšší spotřeba kyslíku v přítomnosti ADP a substrátů komplexů I a II (stav OXPHOS I+II). Po přidání propolisu došlo také k signifikantnímu zvýšení aktivity komplexu IV a po přidání rotenonu i stavu ETS II. Naopak stav LEAK navozený přítomností oligomycinu ovlivněn nebyl, stejně jako mitochondriální membránový potenciál.

Tato studie jako první ukazuje, že ethanolový extrakt propolisu zvyšuje aktivitu mitochondriálních respiračních komplexů II a IV bez ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu. Získaná data naznačují, že propolis zlepšuje celkovou respirační efektivitu lidských spermií in vitro, a tedy má potenciál pro zlepšení motility spermií.

5.4 Závěry pro praxi a výhled do budoucna

Hledání nových biomarkerů a funkčních testů je rychle se rozšiřující oblast reprodukční medicíny. Jejich nalezení může napomoci k zpřesnění diagnostiky příčin lidské neplodnosti, zkvalitnit prognostický potenciál léčby pomocí metod asistované reprodukce, pomoci s výběrem té nejvhodnější metody a mít tak pozitivní vliv nejen na psychiku neplodného páru, ale i na celkové ekonomické zatížení spojené s léčbou.

Dokonalejší charakterizace ženských i mužských gamet, jejich vývoje a možnosti jejich ovlivnění, mohou napomoci k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění a vývoje nového jedince.

Podarilo se nám identifikovat rozdílné hladiny hormonů a markerů oxidačního stresu u žen trpících neplodností v porovnání se zdravými dárkyněmi oocytů. V navazující práci bychom se chtěli zaměřit na zpřesnění těchto rozdílů, a to již ne v poolované folikulární tekutině, ale ve folikulární tekutině odebrané z jednotlivých folikulů individuálně.

Prokázali jsme možnost využití metody vysokoúčinné respirometrie na spermatické vzorky. Tato metoda může napomoci k identifikaci porušeného mitochondriálního dýchání u spermií a má tedy potenciál zkvalitnit diagnostiku příčin asthenozoospermie. Dále ji je možné využít k identifikaci látek podporujících nebo naopak negativně ovlivňujících mitochondrie ve spermiích a tedy produkci energie pro jejich správnou motilitu.

6 Literatura

Abalovich, M., Mitelberg, L., Allami, C., Gutierrez, S., Alcaraz, G., Otero, P., and Levalle, O. (2007). Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* *23*, 279–283.

Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reprod. Biomed. Online* *11*, 641–650.

Aitken, R.J., Ryan, A.L., Baker, M.A., and McLaughlin, E.A. (2004a). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* *36*, 994–1010.

Aitken, R.J., Ryan, A.L., Baker, M.A., and McLaughlin, E.A. (2004b). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* *36*, 994–1010.

Alpay, Z., Saed, G.M., and Diamond, M.P. (2006). Female Infertility and Free Radicals: Potential Role in Adhesions and Endometriosis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* *13*, 390–398.

Alvarez, J.G., and Storey, B.T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* *23*, 77–90.

Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G.M., Giampietro, F., Palumbo, P., and Di Ilio, C. (2006). Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta* *1764*, 1775–1785.

Anifandis, G., Koutselini, E., Stefanidis, I., Liakopoulos, V., Leivaditis, C., Mantzavinos, T., and Vamvakopoulos, N. (2005). Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reprod. Camb. Engl.* *130*, 917–921.

Ankel-Simons, F., and Cummins, J.M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13859–13863.

Appasamy, M., Jauniaux, E., Serhal, P., Al-Qahtani, A., Groome, N.P., and Muttukrishna, S. (2008). Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil. Steril.* *89*, 912–921.

Asimakopoulos, B., Nikolettos, N., Papachristou, D.N., Simopoulou, M., Al-Hasani, S., and Diedrich, K. (2005). Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* *54*, 263–270.

Asimakopoulos, B., Abu-Hassan, D., Metzen, E., Al-Hasani, S., Diedrich, K., and Nikolettos, N. (2008). The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* *90*, 60–64.

Asimakopoulos, B., Koster, F., Felberbaum, R., Tripsiannis, G., Caglar, G.S., Nikolettos, N., Al-Hasani, S., and Diedrich, K. (2009). Intrafollicular and circulating concentrations of leptin do not predict the outcome in IVF-ICSI cycles. *Reprod. Sci.* Thousand Oaks Calif *16*, 113–119.

Avendaño, C., and Oehninger, S. (2011). DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J. Androl.* *32*, 356–363.

Avendaño, C., Franchi, A., Duran, H., and Oehninger, S. (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil. Steril.* *94*, 549–557.

Baccetti, B., Bruni, E., Gambera, L., Moretti, E., and Piomboni, P. (2004). An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. *Fertil. Steril.* *82*, 463–468.

Baka, S., and Malamitsi-Puchner, A. (2006). Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod. Biomed. Online* *12*, 500–506.

Baker, M.A., Nixon, B., Naumovski, N., and Aitken, R.J. (2012). Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* *58*, 211–217.

Bakker, R.C., and Brandjes, D.P. (1997). Hyperhomocysteinaemia and associated disease. *Pharm. World Sci. PWS* *19*, 126–132.

Balaban, B., and Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod. Biomed. Online* *12*, 608–615.

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* *100*, 114–117.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., and Sabatini, A.-G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* *57*, 530–533.

Barak, Y., Amit, A., Lessing, J.B., Paz, G., Homonnai, Z.T., and Yogev, L. (1992). Improved fertilization rate in an in vitro fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertil. Steril.* *58*, 197–198.

Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M.B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Z., and Medić-Šarić, M. (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.* *135*, 772–778.

Barros Silva, R., Santos, N.A.G., Martins, N.M., Ferreira, D.A.S., Barbosa, F., Jr, Oliveira Souza, V.C., Kinoshita, A., Baffa, O., Del-Bel, E., and Santos, A.C. (2013). Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience* *233*, 86–94.

Barroso, G., Taylor, S., Morshedi, M., Manzur, F., Gaviño, F., and Oehninger, S. (2006). Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of

phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil. Steril.* *85*, 149–154.

Bellver, J., Garrido, N., Remohí, J., Pellicer, A., and Meseguer, M. (2008). Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod. Biomed. Online* *17*, 595–604.

Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohí, J., and Meseguer, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil. Steril.* *93*, 447–454.

Benard, G., and Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid. Redox Signal.* *10*, 1313–1342.

Benkhalifa, M., Montjean, D., Cohen-Bacrie, P., and Ménézo, Y. (2010). Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil. Steril.* *93*, 1585–1590.

Bili, H., Tarlatzis, B.C., Daniilidis, M., Fleva, A., Bontis, J., Tourkantonis, A., and Mantalenakis, S. (1998). Cytokines in the human ovary: presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *J. Assist. Reprod. Genet.* *15*, 93–98.

Binelli, M., and Murphy, B.D. (2010). Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod. Fertil. Dev.* *22*, 1–12.

Blondin, P., and Sirard, M.A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* *41*, 54–62.

Blum, A.E., Walsh, B.C., and Dubyak, G.R. (2010). Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptor-dependent ATP release from 1321N1 astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C386–396.

Boatman, D.E., and Robbins, R.S. (1991a). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* *44*, 806–813.

Boatman, D.E., and Robbins, R.S. (1991b). Detection of a soluble acrosome reaction-inducing factor, different from serum albumin, associated with the ovulated egg-cumulus complex. *Mol. Reprod. Dev.* *30*, 396–401.

Bonvehí, J.S., and Gutiérrez, A.L. (2012). The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 1351–1358.

Botero-Ruiz, W., Laufer, N., DeCherney, A.H., Polan, M.L., Haseltine, F.P., and Behrman, H.R. (1984). The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil. Steril.* *41*, 820–826.

Bougoulia, M., Triantos, A., and Koliakos, G. (2006). Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Horm. Athens Greece* *5*, 192–199.

- Boxmeer, J.C., Steegers-Theunissen, R.P.M., Lindemans, J., Wildhagen, M.F., Martini, E., Steegers, E.A.P., and Macklon, N.S. (2008). Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *23*, 2570–2576.
- Boxmeer, J.C., Macklon, N.S., Lindemans, J., Beckers, N.G.M., Eijkemans, M.J.C., Laven, J.S.E., Steegers, E.A.P., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2009). IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 1059–1066.
- Brewer, L., Corzett, M., and Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 38895–38900.
- Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W., and Lambalk, C.B. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update* *12*, 685–718.
- Budak, E., Fernández Sánchez, M., Bellver, J., Cerveró, A., Simón, C., and Pellicer, A. (2006). Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil. Steril.* *85*, 1563–1581.
- Cerkiene, Z., Eidukaite, A., and Usoniene, A. (2008). Follicular fluid levels of interleukin-10 and interferon-gamma do not predict outcome of assisted reproductive technologies. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *59*, 118–126.
- Cha, K.Y., Barnes, R.B., Marrs, R.P., and Lobo, R.A. (1986). Correlation of the bioactivity of luteinizing hormone in follicular fluid with oocyte maturity in the spontaneous cycle. *Fertil. Steril.* *45*, 338–341.
- Chang, C.-L., Wang, T.-H., Horng, S.-G., Wu, H.-M., Wang, H.-S., and Soong, Y.-K. (2002). The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 1724–1728.
- Channing, C.P., Liu, C.Q., Jones, G.S., and Jones, H. (1983). Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 4184–4188.
- Chen, V., Staub, R.E., Baggett, S., Chimmani, R., Tagliaferri, M., Cohen, I., and Shtivelman, E. (2012). Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract Bezielle. *PloS One* *7*, e30107.
- Chiu, T.T.Y., Rogers, M.S., Law, E.L.K., Briton-Jones, C.M., Cheung, L.P., and Haines, C.J. (2002). Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 1591–1596.
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., and Beytur, A. (2012). Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* *44*, 181–186.

- Cimen, H., Han, M.-J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., and Koc, E.C. (2010). Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 304–311.
- Clermont, Y., Oko, R., and Hermo, L. (1990). Immunocytochemical localization of proteins utilized in the formation of outer dense fibers and fibrous sheath in rat spermatids: an electron microscope study. *Anat. Rec.* 227, 447–457.
- Cooper, T.G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J. Androl.* 13, 130–138.
- Costa, L.O.B., Mendes, M.C., Ferriani, R.A., Moura, M.D., Reis, R.M., and Silva de Sá, M.F. (2004). Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 37, 1747–1755.
- Cupisti, S., Dittrich, R., Mueller, A., Strick, R., Stiegler, E., Binder, H., Beckmann, M.W., and Strissel, P. (2007). Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur. J. Med. Res.* 12, 604–608.
- D’Aniello, G., Grieco, N., Di Filippo, M.A., Cappiello, F., Topo, E., D’Aniello, E., and Ronsini, S. (2007). Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 3178–3183.
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N., and Khuda-Bukhsh, A.R. (2012). Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* 237, 1433–1448.
- Dawson, A., Griesinger, G., and Diedrich, K. (2006). Screening oocytes by polar body biopsy. *Reprod. Biomed. Online* 13, 104–109.
- Dechaud, H., Anahory, T., Reyftmann, L., Loup, V., Hamamah, S., and Hedon, B. (2006). Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 127, 88–93.
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13612–13617.
- Dolci, S., Pesce, M., and De Felici, M. (1993). Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 134–139.
- Ebisch, I.M.W., Peters, W.H.M., Thomas, C.M.G., Wetzels, A.M.M., Peer, P.G.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2006). Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21, 1725–1733.
- Eddy, E.M. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 103–128.

- Ellsworth, L.R., Balmaceda, J.P., Schenken, R.S., Silverman, A.Y., Prihoda, T.J., and Asch, R.H. (1984). Human chorionic gonadotropin and steroid concentrations in human follicular fluid in relation to follicle size and oocyte maturity in stimulated ovarian cycles. *Acta Eur. Fertil.* *15*, 343–346.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* *275*, 223–228.
- Eppig, J.J. (1979). FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte–cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* *281*, 483–484.
- Escalier, D. (2006). Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum. Reprod. Update* *12*, 449–461.
- Eskes, T.K. (2001). Clotting disorders and placental abruption: homocysteine--a new risk factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *95*, 206–212.
- Evans, J.P., and Florman, H.M. (2002). The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat. Cell Biol.* *4 Suppl*, s57–63.
- Evenson, D., and Jost, L. (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol.* *42 Pt B*, 159–176.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., and Melamed, M.R. (1982). Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *30*, 279–280.
- Ewen, K.A., and Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell. Endocrinol.* *323*, 76–93.
- Fair, T., Hulshof, S.C., Hyttel, P., Greve, T., and Boland, M. (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat. Embryol. (Berl.)* *195*, 327–336.
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., and O’Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* *341*, 879–884.
- Fawcett, D.W. (1975). The anatomy of the spermatozoon after 300 years. *Kaibogaku Zasshi* *50*, 326–327.
- Ferlitsch, K., Sator, M.O., Gruber, D.M., Rücklinger, E., Gruber, C.J., and Huber, J.C. (2004). Body mass index, follicle-stimulating hormone and their predictive value in in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* *21*, 431–436.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., and Alvarez, J.G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* *24*, 59–66.

- Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Coppola, L., and Zara, V. (2008a). Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int. J. Androl.* *31*, 337–345.
- Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Coppola, L., and Zara, V. (2008b). Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int. J. Androl.* *31*, 337–345.
- Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., and Zara, V. (2012a). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* *79*, 809–814.
- Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., and Zara, V. (2012b). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* *79*, 809–814.
- Ford, W.C.L. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update* *12*, 269–274.
- Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J.M., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L., and Guéant, J.L. (2007). Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum. Reprod. Update* *13*, 225–238.
- Fortune, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* *50*, 225–232.
- Fraser, L.R., and Quinn, P.J. (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* *61*, 25–35.
- French, D.B., Sabanegh, E.S., Goldfarb, J., and Desai, N. (2010). Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil. Steril.* *93*, 1097–1103.
- Fried, G., Remaeus, K., Harlin, J., Krog, E., Csemiczky, G., Aanesen, A., and Tally, M. (2003). Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* *20*, 167–176.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* *505*, 335–343.
- Funaro, M., and Paduch, D.A. (2014). Novel markers of male infertility. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1154*, 233–250.
- Gaddum-Rosse, P. (1981). Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *Am. J. Anat.* *160*, 333–341.
- Gadella, B.M. (2012). Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* *25*, 26–37.

- Giannattasio, A., De Rosa, M., Smeraglia, R., Zarrilli, S., Cimmino, A., Di Rosario, B., Ruggiero, R., Colao, A., and Lombardi, G. (2002). Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J. Endocrinol. Invest.* 25, 983–986.
- Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir. Physiol.* 128, 277–297.
- Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1837–1845.
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., and Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 583–596.
- Gnaiger, E., Méndez, G., and Hand, S.C. (2000). High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11080–11085.
- Goddijn-Wessel, T.A., Wouters, M.G., van de Molen, E.F., Spuijbroek, M.D., Steegers-Theunissen, R.P., Blom, H.J., Boers, G.H., and Eskes, T.K. (1996). Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 66, 23–29.
- Gopalkrishnan, K., Padwal, V., D'Souza, S., and Shah, R. (1995). Severe asthenozoospermia: a structural and functional study. *Int. J. Androl.* 18 Suppl 1, 67–74.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., and Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 207, 202–205.
- Goyal, R., Singhai, M., and Faizy, A.F. (2011). Glutathione peroxidase activity in obese and nonobese diabetic patients and role of hyperglycemia in oxidative stress. *J. -Life Health* 2, 72–76.
- Gray, M.W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011403.
- Griffin, J., Emery, B.R., Huang, I., Peterson, C.M., and Carrell, D.T. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 3, 2.
- Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 411–416.
- Guérin, P., El Mouatassim, S., and Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175–189.

- Gürbüz, B., Yalti, S., Ficicioglu, C., and Taşdemir, S. (2005). The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *118*, 214–218.
- Guzick, D.S., Overstreet, J.W., Factor-Litvak, P., Brazil, C.K., Nakajima, S.T., Coutifaris, C., Carson, S.A., Cisneros, P., Steinkampf, M.P., Hill, J.A., et al. (2001). Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *N. Engl. J. Med.* *345*, 1388–1393.
- Hague, W.M. (2003). Homocysteine and pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *17*, 459–469.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free radicals in biology and medicine* (Clarendon Press).
- Heckert, L.L., and Griswold, M.D. (2002). The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* *57*, 129–148.
- Heidaran, M.A., and Kistler, W.S. (1987). Transcriptional and translational control of the message for transition protein 1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J. Biol. Chem.* *262*, 13309–13315.
- Holdcraft, R.W., and Braun, R.E. (2004). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 459–467.
- Holmes, V.A., Wallace, J.M.W., Alexander, H.D., Gilmore, W.S., Bradbury, I., Ward, M., Scott, J.M., McFaul, P., and McNulty, H. (2005). Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin. Chem.* *51*, 629–634.
- Høst, E., Mikkelsen, A.L., Lindenberg, S., and Smidt-Jensen, S. (2000). Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* *79*, 936–940.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., and Thompson, W. (1997). Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* *374*, 261–268.
- Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H.F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D.P., Sado, Y., Ninomiya, Y., Wilhelm, D., and Rodgers, R.J. (2013). A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PloS One* *8*, e55578.
- Hunter, R.H.F., and Gadea, J. (2014). Cross-talk between free and bound spermatozoa to modulate initial sperm:egg ratios at the site of fertilization in the mammalian oviduct. *Theriogenology* *82*, 367–372.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., and Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J. Androl.* *14*, 816–821.

- Imoedemhe, D., and Shaw, R.W. (1986). Follicular fluid alpha 1-antitrypsin--correlation with fertilizing capacity of oocytes. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *93*, 863–868.
- Ishijima, S., Iwamoto, T., Nozawa, S., and Matsushita, K. (2002). Motor apparatus in human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Mol. Reprod. Dev.* *63*, 459–463.
- Jansen, R.P., and de Boer, K. (1998). The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol. Cell. Endocrinol.* *145*, 81–88.
- Jégou, B., Cudicini, C., Gomez, E., and Stéphan, J.P. (1995). Interleukin-1, interleukin-6 and the germ cell-Sertoli cell cross-talk. *Reprod. Fertil. Dev.* *7*, 723–730.
- Jeppesen, J.V., Nielsen, M.E., Kristensen, S.G., and Yding Andersen, C. (2012). Concentration of activin A and follistatin in follicular fluid from human small antral follicles associated to gene expression of the corresponding granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *356*, 48–54.
- Jeremy, J.Y., Okonofua, F.E., Thomas, M., Wojdyla, J., Smith, W., Craft, I.L., and Dandona, P. (1987). Oocyte maturity and human follicular fluid prostanoids, gonadotropins, and prolactin after administration of clomiphene and pergonal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *65*, 402–406.
- Jimena, P., Castilla, J.A., Peran, F., Molina, R., Ramirez, J.P., Acebal, M., Vergara, F., and Herruzo, A. (1992). Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* *96*, 641–647.
- Jimena, P., Castilla, J.A., Ramirez, J.P., Gil, T., Acebal, M., Molina, R., and Herruzo, A.J. (1993). Follicular fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, and CA-125 levels in relation to in vitro fertilization and gonadotropin and steroid hormone concentrations. *Fertil. Steril.* *59*, 1257–1260.
- Johnston, D.S., Russell, L.D., Friel, P.J., and Griswold, M.D. (2001). Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology* *142*, 2405–2408.
- Jones, R.C., Dacheux, J.-L., Nixon, B., and Ecroyd, H.W. (2007). Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J. Androl.* *9*, 493–499.
- Juneja, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C., and Kidder, G.M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* *60*, 1263–1270.
- Kamel, M.A., Zabel, G., Bernart, W., Neulen, J., and Breckwoldt, M. (1994). Comparison between prolactin, gonadotrophins and steroid hormones in serum and follicular fluid after stimulation with gonadotrophin-releasing hormone agonists and human menopausal gonadotrophin for an in-vitro fertilization programme. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *9*, 1803–1806.
- Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K., and Nakatsuji, N. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev. Biol.* *161*, 91–95.

- Keay, S.D., Harlow, C.R., Wood, P.J., Jenkins, J.M., and Cahill, D.J. (2002). Higher cortisol:cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 2410–2414.
- Kendall, S.K., Samuelson, L.C., Saunders, T.L., Wood, R.I., and Camper, S.A. (1995). Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev.* *9*, 2007–2019.
- Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., and Steegers, E.A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *82*, 171–184.
- Koshimizu, U., Watanabe, M., and Nakatsuji, N. (1995). Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. *Dev. Biol.* *168*, 683–685.
- Kuchenbecker, W.K.H., Ruifrok, A.E., Bolster, J.H.T., Heineman, M.J., and Hoek, A. (2006). [Subfertility in overweight women]. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* *150*, 2479–2483.
- Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., and Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* *64*, 235–240.
- Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* *15*, 201–204.
- Kumaran, K.S., and Prince, P.S.M. (2010). Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. *Cell Stress Chaperones* *15*, 791–806.
- Kuznetsov, A.V., Strobl, D., Ruttman, E., Königsrainer, A., Margreiter, R., and Gnaiger, E. (2002). Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal. Biochem.* *305*, 186–194.
- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., and Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1562–1572.
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., et al. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* *590*, 3349–3360.
- Lashen, H., Ledger, W., Bernal, A.L., and Barlow, D. (1999). Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 712–715.
- Lau, C.P., Ledger, W.L., Groome, N.P., Barlow, D.H., and Muttukrishna, S. (1999). Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 2525–2530.

Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 13, 424–436.

Lebedeva IYu, Denisenko YYu, Lebedev, V.A., and Kuzmina, T.I. (1998). Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress. *Theriogenology* 49, 509–519.

Lédée, N., Lombroso, R., Lombardelli, L., Selva, J., Dubanchet, S., Chaouat, G., Frankenne, F., Foidart, J.M., Maggi, E., Romagnani, S., et al. (2008). Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23, 2001–2009.

Lee, M.S., Ben-Rafael, Z., Meloni, F., Mastroianni, L., Jr, and Flickinger, G.L. (1987). Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *J. Vitro Fertil. Embryo Transf.* IVF 4, 168–172.

Lee, Y.S., Kim, A.Y., Choi, J.W., Kim, M., Yasue, S., Son, H.J., Masuzaki, H., Park, K.S., and Kim, J.B. (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 2176–2189.

Leeuwenhoek, A. (1678). Observationes D. Anthonii Leeuwenhoeck, de Natis e semine genitali Animalculis. *Philosophical Transactions.* 12, 1040 – 1043.

Charakteristika lesní správy [online] Lesy ČR, s. p. [vid. 30.06.14]. Dostupné z: <http://www.lesy.cz/ls229/charakteristika-lesni-spravy/Stranky/default.aspx>

Lewicka, S., von Hagens, C., Hettinger, U., Grunwald, K., Vecsei, P., Runnebaum, B., and Rabe, T. (2003). Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 1613–1617.

Liu, D.Y., and Baker, H.W. (1988). The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 50, 288–293.

Liu, D.Y., and Baker, H.W. (1992). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58, 465–483.

Liu, D.Y., Liu, M.L., Garrett, C., and Baker, H.W.G. (2007). Comparison of the frequency of defective sperm-zona pellucida (ZP) binding and the ZP-induced acrosome reaction between subfertile men with normal and abnormal semen. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 1878–1884.

MacLeod J (1943). The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 138, 512–518.

Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., and Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 1257–1265.

- Marchetti, P., Ballot, C., Jouy, N., Thomas, P., and Marchetti, C. (2012). Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. *Andrologia* *44*, 136–141.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 21–38.
- Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.-N.P., Boros, L.G., Fernández-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodriguez-Gil, J.E., and Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett.* *554*, 342–346.
- Matalliotakis, I., Cakmak, H., Sakkas, D., Mahutte, N., Koumantakis, G., and Arici, A. (2008). Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study. *Reprod. Biomed. Online* *16*, 778–783.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* *70*, 841–847.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G.R., and Garfield, R.E. (2003). Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 359–380.
- McLaughlin, E.A., and McIver, S.C. (2009). Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reprod. Camb. Engl.* *137*, 1–11.
- Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E., and Tesarik, J. (2002). Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 1017–1022.
- Menezo, Y., Elder, K., Benkhalifa, M., and Dale, B. (2010). DNA methylation and gene expression in IVF. *Reprod. Biomed. Online* *20*, 709–710.
- Menkveld, R., Franken, D.R., Kruger, T.F., Oehninger, S., and Hodgen, G.D. (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* *30*, 346–352.
- Menkveld, R., Rhemrev, J.P., Franken, D.R., Vermeiden, J.P., and Kruger, T.F. (1996). Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* *65*, 637–644.
- Mercé, L.T., Bau, S., Barco, M.J., Troyano, J., Gay, R., Sotos, F., and Villa, A. (2006). Assessment of the ovarian volume, number and volume of follicles and ovarian vascularity by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography on the HCG day to predict the outcome in IVF/ICSI cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *21*, 1218–1226.
- Van der Merwe, F.H., Kruger, T.F., Oehninger, S.C., and Lombard, C.J. (2005). The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecol. Obstet. Invest.* *59*, 86–91.

- Messinis, I.E., and Templeton, A.A. (1987). Relationship between intrafollicular levels of prolactin and sex steroids and in-vitro fertilization of human oocytes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 2, 607–609.
- Mijatovic, V., and van der Mooren, M.J. (2001). Homocysteine in postmenopausal women and the importance of hormone replacement therapy. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 39, 764–767.
- Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., and Norman, R.J. (2005). Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reprod. Camb. Engl.* 130, 583–597.
- Moragianni, V.A., Jones, S.-M.L., and Ryley, D.A. (2012). The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 98, 102–108.
- Mukai, C., and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* 71, 540–547.
- Mundy, A.J., Ryder, T.A., and Edmonds, D.K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 10, 116–119.
- Nagdas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2005). Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 72, 164–171.
- Nagdas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2006). Identification of a hamster sperm 26-kilodalton dehydrogenase/reductase that is exclusively localized to the mitochondria of the flagellum. *Biol. Reprod.* 75, 197–202.
- Nagy, B., Pulay, T., Szarka, G., and Csömör, S. (1989). The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol. Hung.* 73, 71–75.
- Nandedkar, T.D., Shahid, J.K., Mehta, R., Moodbidri, S.B., Hegde, U.C., and Hinduja, I.N. (1992). Localization and detection of ovarian follicular fluid protein in follicles of human ovaries. *Indian J. Exp. Biol.* 30, 271–275.
- Naz, R.K., Zhu, X., and Menge, A.C. (1997). Expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors type I and type II in human oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 47, 127–133.
- Ocal, P., Aydin, S., Cepni, I., Idil, S., Idil, M., Uzun, H., and Benian, A. (2004). Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115, 194–199.
- Ocal, P., Ersoylu, B., Cepni, I., Guralp, O., Atakul, N., Irez, T., and Idil, M. (2012). The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 299–304.

- Ohta, N., Saito, H., Kaneko, T., Yoshida, M., Takahashi, T., Saito, T., Nakahara, K., and Hiroi, M. (2001). Soluble CD44 in human ovarian follicular fluid. *J. Assist. Reprod. Genet.* *18*, 21–25.
- Okada, Y., and Maeno, E. (2001). Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *130*, 377–383.
- Okumura, K., and Tsukamoto, H. (2011). Folate in smokers. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *412*, 521–526.
- Oosterhuis, G.J., Vermes, I., Lambalk, C.B., Michgelsen, H.W., and Schoemaker, J. (1998). Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *13*, 285–289.
- Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K., and Hanson, F.W. (1980). Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* *33*, 534–542.
- Owen, E.P., Human, L., Carolissen, A.A., Harley, E.H., and Odendaal, H.J. (1997). Hyperhomocysteinemia--a risk factor for abruptio placentae. *J. Inherit. Metab. Dis.* *20*, 359–362.
- Oyawoye, O.A., Abdel-Gadir, A., Garner, A., Leonard, A.J., Perrett, C., and Hardiman, P. (2009). The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* *14*, 205–213.
- Ozkaya, M.O., and Nazıroğlu, M. (2010). Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *94*, 2465–2466.
- Ozturk, G., Ginis, Z., Akyol, S., Erden, G., Gurel, A., and Akyol, O. (2012). The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *16*, 2064–2068.
- Pacchiarotti, A., Mohamed, M.A., Micara, G., Linari, A., Tranquilli, D., Espinola, S.B., and Aragona, C. (2007). The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.* *24*, 459–462.
- Park, D.-W., and Yang, K.-M. (2011). Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin. Exp. Reprod. Med.* *38*, 179–185.
- Pasquali, R., Patton, L., and Gambineri, A. (2007). Obesity and infertility. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *14*, 482–487.
- Paszkowski, T., Clarke, R.N., and Hornstein, M.D. (2002). Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 921–925.
- Patrizio, P., Fragouli, E., Bianchi, V., Borini, A., and Wells, D. (2007). Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod. Biomed. Online* *15*, 346–353.

- Pelusi, C., and Pasquali, R. (2003). Polycystic ovary syndrome in adolescents: pathophysiology and treatment implications. *Treat. Endocrinol.* 2, 215–230.
- Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., and Macías García, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 44, 345–349.
- Perl, A., Qian, Y., Chohan, K.R., Shirley, C.R., Amidon, W., Banerjee, S., Middleton, F.A., Conkrite, K.L., Barcza, M., Gonchoroff, N., et al. (2006). Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14813–14818.
- Pesta, D., and Gnaiger, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 810, 25–58.
- Petersen, C.G., Oliveira, J.B.A., Mauri, A.L., Massaro, F.C., Baruffi, R.L.R., Pontes, A., and Franco, J.G. (2009). Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 18, 235–243.
- Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., Tsoleva, M., Jebe, E., and Töpfer-Petersen, E. (2007). Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. *Reprod. Camb. Engl.* 133, 61–73.
- Piasecka, M., and Kawiak, J. (2003). Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* 41, 125–139.
- Piasecka, M., Laszczyńska, M., and Gaczarzewicz, D. (2003). Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenoteratozoospermia. *Folia Morphol.* 62, 479–481.
- Picton, H.M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55, 1193–1210.
- Picton, H., Briggs, D., and Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 27–37.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., and Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.* 35, 109–124.
- Pizzol, D., Ferlin, A., Garolla, A., Lenzi, A., Bertoldo, A., and Foresta, C. (2014). Genetic and molecular diagnostics of male infertility in the clinical practice. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 19, 291–303.
- Poppe, K., Velkeniers, B., and Glinde, D. (2007). Thyroid disease and female reproduction. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 66, 309–321.
- Ben-Rafael, Z., Meloni, F., Strauss, J.F., 3rd, Blasco, L., Mastroianni, L., Jr, and Flickinger, G.L. (1987). Relationships between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin-treated women. *Fertil. Steril.* 47, 284–288.

- Raijmakers, M.T., Steegers, E.A., and Peters, W.H. (2001). Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 2445–2450.
- Rajender, S., Rahul, P., and Mahdi, A.A. (2010). Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* *10*, 419–428.
- Ramu, S., and Jeyendran, R.S. (2013). The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *927*, 21–25.
- Rawe, V.Y., Galaverna, G.D., Acosta, A.A., Olmedo, S.B., and Chemes, H.E. (2001). Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 879–886.
- Rawe, V.Y., Olmedo, S.B., Benmusa, A., Shiigi, S.M., Chemes, H.E., and Sutovsky, P. (2002). Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 2119–2127.
- Reinehr, T. (2010). Obesity and thyroid function. *Mol. Cell. Endocrinol.* *316*, 165–171.
- Reinehr, T., and Andler, W. (2002). Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch. Dis. Child.* *87*, 320–323.
- Reinehr, T., Isa, A., de Sousa, G., Dieffenbach, R., and Andler, W. (2008). Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm. Res.* *70*, 51–57.
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., and Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *7*, 40.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Romano, S., and Greco, E. (2005). Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* *10*, 192–198.
- Rittenberg, V., Sobaleva, S., Ahmad, A., Oteng-Ntim, E., Bolton, V., Khalaf, Y., Braude, P., and El-Toukhy, T. (2011). Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* *26*, 2642–2650.
- Roosen-Runge, E.C. (1962). The process of spermatogenesis in mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *37*, 343–377.
- Rosenbusch, B., Djalali, M., and Sterzik, K. (1992). Is there any correlation between follicular fluid hormone concentrations, fertilizability, and cytogenetic analysis of human oocytes recovered for in vitro fertilization? *Fertil. Steril.* *57*, 1358–1360.
- Ross, A., Christie, S., and Kerr, M.G. (1971). An electron microscope study of a tail abnormality in spermatozoa from a subfertile man. *J. Reprod. Fertil.* *24*, 99–103.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* *53 Suppl 1*, S130–135.

- Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.C., Díez, C., Alvarez, E., Enríquez, J.A., and López-Pérez, M.J. (2000). Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *300*, 97–105.
- Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J., and Enríquez, J.A. (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr. Top. Dev. Biol.* *77*, 3–19.
- Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., Saito, T., and Hiroi, M. (2000). Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil. Steril.* *74*, 1148–1152.
- Salmassi, A., Schmutzler, A.G., Schaefer, S., Koch, K., Hedderich, J., Jonat, W., and Mettler, L. (2005). Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *20*, 2434–2440.
- Salmassi, A., Acil, Y., Schmutzler, A.G., Koch, K., Jonat, W., and Mettler, L. (2008). Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil. Steril.* *89*, 1578–1584.
- Scheibye-Knudsen, M., and Quistorff, B. (2009). Regulation of mitochondrial respiration by inorganic phosphate; comparing permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria prepared from type-1 and type-2 rat skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* *105*, 279–287.
- Shah, D.K., Missmer, S.A., Berry, K.F., Racowsky, C., and Ginsburg, E.S. (2011). Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet. Gynecol.* *118*, 63–70.
- Sinclair, K.D., Lunn, L.A., Kwong, W.Y., Wonnacott, K., Linforth, R.S.T., and Craigon, J. (2008). Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reprod. Biomed. Online* *16*, 859–868.
- Smith, K.D., Rodriguez-Rigau, L.J., and Steinberger, E. (1977). Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertil. Steril.* *28*, 1314–1319.
- St John, J.C., Sakkas, D., and Barratt, C.L. (2000a). A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl.* *21*, 189–199.
- St John, J.C., Sakkas, D., and Barratt, C.L. (2000b). A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl.* *21*, 189–199.
- Van der Steeg, J.W., Steures, P., Eijkemans, M.J.C., Habbema, J.D.F., Hompes, P.G.A., Burggraaff, J.M., Oosterhuis, G.J.E., Bossuyt, P.M.M., van der Veen, F., and Mol, B.W.J. (2008). Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *23*, 324–328.
- Steinberger, E. (1971). Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* *51*, 1–22.
- Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., and Zara, V. (2011). Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* *34*, 247–255.

- Storey, B.T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* *52*, 427–437.
- Storey, B.T., and Kayne, F.J. (1980). Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. *J. Exp. Zool.* *211*, 361–367.
- Styne-Gross, A., Elkind-Hirsch, K., and Scott, R.T., Jr (2005). Obesity does not impact implantation rates or pregnancy outcome in women attempting conception through oocyte donation. *Fertil. Steril.* *83*, 1629–1634.
- Suárez, S.S., and Osman, R.A. (1987). Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol. Reprod.* *36*, 1191–1198.
- Suchanek, E., Simunic, V., Macas, E., Kopjar, B., and Grizelj, V. (1988). Prostaglandin F2 alpha, progesterone and estradiol concentrations in human follicular fluid and their relation to success of in vitro fertilization. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *28*, 331–339.
- Sudik, R., Chari, S., Pascher, E., and Sturm, G. (1996). Human follicular fluid levels of endothelins in relation to oocyte maturity status. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* *104*, 78–84.
- Sutovsky, P., Terada, Y., and Schatten, G. (2001). Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 250–258.
- Takahashi, C., Fujito, A., Kazuka, M., Sugiyama, R., Ito, H., and Isaka, K. (2008). Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *89*, 586–591.
- Tallosa, J., Tomandl, J., Bicikova, M., and Hill, M. (1999). Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *Eur. J. Clin. Invest.* *29*, 1041–1044.
- Tamura, T., and Picciano, M.F. (2006). Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* *83*, 993–1016.
- Tarlatzis, B.C., Laufer, N., DeCherney, A.H., Polan, M.L., Haseltine, F.P., and Behrman, H.R. (1985). Adenosine 3',5'-monophosphate levels in human follicular fluid: relationship to oocyte maturation and achievement of pregnancy after in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *60*, 1111–1115.
- Tarlatzis, B.C., Pazaitou, K., Bili, H., Bontis, J., Papadimas, J., Lagos, S., Spanos, E., and Mantalenakis, S. (1993). Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *8*, 1612–1616.
- Teissier, M.P., Chable, H., Paulhac, S., and Aubard, Y. (2000). Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *15*, 2471–2477.

- Tesarik, J., and Mendoza, C. (1995). Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *80*, 1438–1443.
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., and Park, Y.K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2013*, 697390.
- Turner, R.M. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J. Androl.* *24*, 790–803.
- Turner, R.M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* *18*, 25–38.
- Uehara, S., Naganuma, T., Tsuiki, A., Kyono, K., Hoshiai, H., and Suzuki, M. (1985). Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization. *Obstet. Gynecol.* *66*, 19–23.
- Ulcova-Gallova, Z., Babcova, K., Micanova, Z., Bibkova, K., and Rumpik, D. (2014). Hyperstimulation syndrome: the levels of inhibin A and B in sera and follicular fluids. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* *30*, 298–301.
- Wakim, A.N., Polizotto, S.L., Buffo, M.J., Marrero, M.A., and Burholt, D.R. (1993). Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* *59*, 1187–1190.
- Walker, M.C., Smith, G.N., Perkins, S.L., Keely, E.J., and Garner, P.R. (1999). Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *180*, 660–664.
- Wang, J., Shen, X., Huang, X., and Zhao, Z. (2012). Follicular fluid levels of prostaglandin E2 and the effect of prostaglandin E2 on steroidogenesis in granulosa-lutein cells in women with moderate and severe endometriosis undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Chin. Med. J. (Engl.)* *125*, 3985–3990.
- Wang, T.-H., Chang, C.-L., Wu, H.-M., Chiu, Y.-M., Chen, C.-K., and Wang, H.-S. (2006). Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil. Steril.* *86*, 1392–1401.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *148*, 1274–1279.
- Webster, B.W., Diamond, M.P., Osteen, K.G., and Wentz, A.C. (1988). Endocrine profile of follicles containing oocytes with subsequent polyploid fertilization. *Fertil. Steril.* *50*, 727–731.
- Wen, X., Tozer, A.J., Butler, S.A., Bell, C.M., Docherty, S.M., and Iles, R.K. (2006). Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil. Steril.* *85*, 1723–1729.

- Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., Shnizer, S., Reznick, A.Z., Ishai, D., Lahav-Baratz, S., Shiloh, H., Koifman, M., and Dirnfeld, M. (2004). Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *82 Suppl 3*, 1171–1176.
- Wilton, L.J., Temple-Smith, P.D., and de Kretser, D.M. (1992). Quantitative ultrastructural analysis of sperm tails reveals flagellar defects associated with persistent asthenozoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *7*, 510–516.
- Winter, E., Wang, J., Davies, M.J., and Norman, R. (2002). Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 3220–3223.
- Wojtyczka, R.D., Dziedzic, A., Idzik, D., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Smoleń-Dzirba, J., Stojko, J., Sajewicz, M., and Wąsik, T.J. (2013). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Mol. Basel Switz.* *18*, 9623–9640.
- World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (Geneva: World Health Organization).
- Wylie, C.C., Stott, D., and Donovan, P.J. (1986). Primordial germ cell migration. *Dev. Biol. N. Y. N* *1985 2*, 433–448.
- Yanaihara, A., Mitsukawa, K., Iwasaki, S., Otsuki, K., Kawamura, T., and Okai, T. (2007). High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* *87*, 279–282.
- Yeh, R.-D., Chen, J.-C., Lai, T.-Y., Yang, J.-S., Yu, C.-S., Chiang, J.-H., Lu, C.-C., Yang, S.-T., Yu, C.-C., Chang, S.-J., et al. (2011). Gallic acid induces G₀/G₁ phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res.* *31*, 2821–2832.
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., and Zhao, G.Q. (2000). Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 1053–1063.
- Young, J.M., and McNeilly, A.S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reprod. Camb. Engl.* *140*, 489–504.
- Yousef, M.I., and Salama, A.F. (2009). Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *47*, 1168–1175.
- Yousef, M.I., Kamel, K.I., Hassan, M.S., and El-Morsy, A.M.A. (2010). Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *48*, 1846–1852.
- Zhang, K., Shang, Y., Liao, S., Zhang, W., Nian, H., Liu, Y., Chen, Q., and Han, C. (2007). Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *360*, 327–332.

Zheng, R.L., and Zhang, H. (1997). Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 581–586.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S., and Hess, R.A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl.* 23, 870–881.

7 Přílohy

PŮVODNÍ PRÁCE

Příloha I:

ČEDÍKOVÁ, M., V. BABUŠKA, D. RAJDL, N. ZECH., V. KALIŠ and M. KRÁLÍČKOVÁ. Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors. *Ceska Gynekol.* 2012, Vol. 77, No. 5, pp. 471-476. ISSN 1210-7832.

Příloha II:

BABUŠKA, V., M. ČEDÍKOVÁ, D. RAJDL, J. RACEK, N. H. ZECH, Z. NOVOTNÝ and M. KRÁLÍČKOVÁ M. Comparison of selective oxidative stress parameters in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors. *Ceska Gynekol.* 2012, Vol. 77, No. 6, pp. 543-548. ISSN 1210-7832.

Příloha III:

ČEDÍKOVÁ, M., V. BABUŠKA, P. LHOTSKÁ, P. LOŠAN, N. H. ZECH, M. KRÁLÍČKOVÁ and Z. NOVOTNÝ. Effect of overweight on the outcome of assisted reproductive technology in infertile women. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79, No. 1, pp. 16-21. ISSN 1210-7832.

Příloha IV:

ČEDÍKOVÁ, M., M. MIKLÍKOVÁ, M. GRUNDMANOVÁ, N. H. ZECH, M. KRÁLÍČKOVÁ and J. KUNCOVÁ. Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79, No. 1, pp. 22-28. ISSN 1210-7832.

Příloha V:

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, Michaela MIKLÍKOVÁ, Lenka STACHOVÁ, Martina GRUNDMANOVÁ, Zdeněk TŮMA, Václav VĚTVIČKA, Nicolas ZECH, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Jitka KUNCOVÁ. Effects of Czech propolis on sperm mitochondrial

function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, Vol. 2014, 10 pages. ISSN 1741-4288. Dostupné z doi: 10.1155/2014/248768. **IF₂₀₁₃ = 2,175**

Příloha VI:

ČEDÍKOVÁ, M., Z. ULČOVÁ-GALLOVÁ, K. BIBKOVÁ and Z. MIČANOVÁ. The incidence of latent asymptomatic celiac disease in women with decreased fertility. *Ceska Gynekol.* 2013, Vol. 78, No. 3, pp. 247-51. ISSN 1210-7832.

Příloha VII:

LHOTSKÁ, P., P. MARTÍNEK, M. ČEDÍKOVÁ, P. LOŠAN, M. KRÁLÍČKOVÁ, V. KALIŠ and Z. NOVOTNÝ. Analysis of point mutations in interleukin-11 gene in the population of infertile patients and fertile control women. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79, No.1, pp. 48-52. ISSN 1210-7832.

Příloha VIII:

ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka, Alena MOCKOVÁ and Miroslava ČEDÍKOVÁ. Screening tests of reproductive immunology in systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2012; Vol. 1, No. 1, 6 pages. ISSN 2090-0422. Dostupné z doi: 10.1155/2012/812138.

Příloha IX:

GONCALVES FERREIRA, N., L. ČERNÁ, M. ČEDÍKOVÁ, K. BIBKOVÁ, Z. MIČANOVÁ and Z. ULČOVÁ-GALLOVÁ. Some immunological properties of female saliva and its effect on sperm motility. *Cas Lek Cesk.* 2014, Vol. 153, No. 2, pp. 86-90. ISSN 0008-7335.

KAPITOLA V KNIZE

Příloha X:

KRÁLÍČKOVÁ, M., M. ČEDÍKOVÁ, P. PITULE, P. ŠÍMA and V. VĚTVIČKA. The Impact of Follicular Fluid Components and Embryo-Endometrial Cross-Talk on the Oocyte Quality or Embryo Viability: Search for New Biomarkers . – In: Renato NASCIMENTO, and Henrique Vilas BOAS, eds. *Infertility: Genetic Factors, Treatment*

Risks and Benefits, Social and Psychological Consequences. New York: Nova Science Publishers, January 2013, pp. 59-76, ISBN: 978-1-62257-909-9.

Příloha XI:

SEZBAM PUBLIKACÍ MIMO HLAVNÍ TÉMA DIZERTAČNÍ PRÁCE:

DVOŘÁKOVÁ, J., M. KRIPNEROVÁ, M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA, V. KULDA, M. PEŠTA, M. KRÁLÍČKOVÁ and D. MÜLLEROVÁ. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vliv metabolického syndromu. *Chemické listy*, 2014. [Article in press]. ISSN 0009-2770. **IF₂₀₁₂ = 0,453**

PITULE, Pavel, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Ondřej DAUM, Jan VOJTÍŠEK, Ondřej VYČÍTAL, Petr HOŠEK, Vladimír TŘEŠKA, Ondřej HES, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Václav Liška. Immunohistochemical detection of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in metastatic colorectal cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014 Vol. 2014, 7 pages. Dostupné z doi: 10.1155/2014/432139. ISSN 2314-6133. **IF₂₀₁₃ = 2,706**

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, Zbyněk HOUDEK, Václav BABUŠKA, Vlastimil KULDA, František VOŽEH, Nicolas ZECH, Lenka ČERNÁ, Kristýna KRAKOROVÁ, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Jan CENDELÍN. Fate of two types of cerebellar graft in wild type and cerebellar mutant mice. *J Appl Biomed*. 2014, Vol. 12, No. 1, pp. 17 - 23. ISSN 1214-021X. **IF₂₀₁₂ = 1,775**.

PITULE, Pavel, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Vladislav TŘEŠKA, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Václav LIŠKA. Assessing colorectal cancer heterogeneity: one step closer to tailored medicine. *J Appl Biomed*. 2013, Vol. 11, No. 3, pp. 115-129. ISSN 1214-021X. **IF₂₀₁₃ = 1,775**.

Příloha I

ČEDÍKOVÁ, M., V. BABUŠKA, D. RAJDL, N. ZECH., V. KALIŠ and M.

KRÁLÍČKOVÁ. Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors. *Ceska Gynekol.* 2012, Vol. 77, No. 5, pp. 471-476. ISSN 1210-7832.

riálním karcinomem dostává v rámci chemoterapie první linie karboplatinu a paklitaxel. Jeden typ chemoterapie pro všechny pacientky. Zavedení bevacizumabu ke stávající primární chemoterapii nepovede k individualizaci léčby. Jde o přidání dalšího léku bez ohledu na rozdílnost jednotlivých ovariálních karcinomů. Pro rozhodování o následné pooperační primární léčbě je nutné respektování různorodosti jednotlivých ovariálních karcinomů. Biologická odlišnost jednotlivých nádorů a jednotlivých nositelů je tak pestrá, že jeden léčebný režim, maximálně s mírou obměnou, nemůže být ten nejlepší pro všechny pacientky. Skutečnou individualizací léčby by bylo nasazení primární léčby cíleně na základě předchozího přesnějšího zhodnocení molekulárně-biologických charakteristik jednotlivých ovariálních karcinomů. Podrobnější poznání nádorové biologie by pak mělo umožnit predikci pacientek vhodných pro určitý typ cílené léčby, zejména pro efektivní využití biologické léčby u pacientek s karcinomem ovaria.

2. **Burger, RA., Brady, MF., Bookman, MA., et al.** Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or Fallopian tube cancer (FTC): a gynecologic oncology group study. Oral presentation at the 46th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, June 4-8, 2010, Chicago, IL, USA, 2010.
3. **Eskander, RN., Randall, LM.** Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Biologics*, 2011, 5, p. 1-5.
4. **Hamburg, MA.** Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Decision of the Commissioner. Proposal to withdraw approval for the breast cancer indication for Avastin (Bevacizumab). Docket No. FDA-2010-N-0621.
5. **Muggia, FM., Braly, PS., Brady, MF., et al.** Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*, 2000, 18, p. 106-115.
6. **Pollack, A.** F.D.A. revokes approval of Avastin for use as breast cancer drug. *The New York Times*, 2011, November 19, p. B1.
7. **Sedláková, I., Tošner, J., Řezáč, A., a kol.** Rezistence/senzitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. *Ces Gynek*, 2010, 3, s. 182-187.

LITERATURA

1. **Bast, RC, Jr.** Biomarkers for ovarian cancer: New technologies and targets to address persistently unmet needs. *Cancer Biomarkers*, 2011, 8, p. 161-166.

MUDr. Iva Sedláková, Ph.D.
Porodnická a gynekologická klinika
LF UK a FN
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: sedlaktva@seznam.cz

Srovnání hladin prolaktinu, fT3 a fT4 ve folikulární tekutině žen s poruchou plodnosti a zdravých plodných dárkyň oocytů

Ces. Gynek.
2012, 77, č. 5
s. 471-476

Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors

Čedíková M.^{1,2}, Babuška V.³, Rajdl D.⁴, Zech N. H.⁵, Kališ V.⁶, Králíčková M.^{1,2,6}

¹Ústav histologie a embryologie, LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

²Biomedicínské centrum, LF UK, Plzeň, vědecký ředitel doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

³Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UK, Plzeň, přednostka prof. MUDr. J. Racek, DrSc.

⁴Ústav klinické biochemie a hematologie, LF UK a FN, Plzeň, přednostka prof. MUDr. J. Racek, DrSc.

⁵Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centra Prof. Zech, Plzeň, přednostka univ. prof. dr. med. N. H. Zech

⁶Gynekologicko-porodnická klinika, LF UK a FN, Plzeň, přednostka doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

ABSTRACT

Objective: Follicular fluid (FF) provides an important microenvironment for the development of oocytes. The biochemical composition of the FF plays critical role in the oocyte competence. The aim of our study was to compare the levels of selected hormones in FF of infertile women and healthy fertile oocyte donors.

Design: Retrospective comparative study.

Setting: Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague; Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University and University Hospital in Pilsen; Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology, IVF Centers Prof. Zech, Plzeň.

Methods: Levels of prolactin, free T3 and free T4 hormones in the FF of 146 women were analyzed. We have analysed FF of 74 infertile patients (mean age 31 years, SD = 4.65) and 72 healthy fertile oocyte

donors (mean age 26 years, SD = 4.44). Only blood free samples were studied after pooling of all FF samples each patient. Levels of hormones were determined using ECLIA method (Electro-Chemiluminescent Immunoassay) on the Cobas e411.

Results: Results showed statistically significantly higher levels of prolactin ($p=0.0006$) and free T4 hormone ($p=0.0246$) in FF of infertile women in comparison to the group of healthy fertile oocyte donors.

Conclusion: Our study confirms the presence of prolactin and thyroid hormones in FF and it can be suggested that they play a key role in the regulation of reproductive processes. The study of FF from donors and their detailed comparison with infertile patients with various gynaecological causes of infertility has great value for better understanding of regulatory mechanisms of fertility.

Key words: follicular fluid, prolactin, free T4, infertility, donor oocytes.

SOUHRN

Cíl studie: Folikulární tekutina (FT) zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, které ovlivňuje vývoj oocyty. Biochemické složení FT má zásadní vliv na vývojový potenciál vajíčka. Cílem naší práce bylo srovnání hladin vybraných hormonů v FT žen s poruchou plodnosti a zdravých plodných dárkyň oocytů.

Typ studie: Retrospektivní komparativní studie.

Název a sídlo pracoviště: Ústav histologie a embryologie, LF UK a FN v Plzni; Gynekologicko-porodnická klinika FN a LF UK v Plzni; Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centra Prof. Zech, Plzeň.

Metodika: Hladiny prolaktinu, volného T3 (fT3) a volného T4 (fT4) hormonu byly analyzovány v FT u obou sledovaných skupin. Celkem jsme vyšetřili 146 žen – 74 pacientek léčených pro neplodnost (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) a 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk 26 let, SD = 4,44). U každé ženy byly použity vzorky FT bez příměsí krve a ze všech folikulů dohromady, tedy ze společného poolu. Hladiny hormonů byly stanoveny pomocí metodiky ECLIA (elektrochemiluminiscenční imunoanalýza) na přístroji Cobas e411.

Výsledky: Výsledky analýz prokázaly statisticky signifikantně vyšší hladiny prolaktinu ($p = 0,0006$) a volného T4 hormonu ($p=0,0246$) u žen s poruchou plodnosti oproti skupině zdravých plodných dárkyň oocytů.

Závěr: Naše studie potvrzuje přítomnost prolaktinu a tyroideálních hormonů ve FT a naznačuje jejich klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Další studium dárkyň oocytů a jejich podrobnější srovnání s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost.

Klíčová slova: folikulární tekutina, prolaktin, volný T4, neplodnost, dárkyň oocytů.

ÚVOD

V současné době trpí neplodností 10–15 % párů v reprodukčním věku. Ačkoli se metody léčby neustále zdokonalují, přibližně 10 % párů nepomůže k otěhotnění žádná z metod asistované reprodukce. Dokonalejší pochopení regulačních procesů reprodukce umožní v budoucnu zvyšování úspěšnosti léčby neplodnosti, a to nejen metodami asistované reprodukce. Z toho důvodu je jednou z cest snaha o lepší pochopení a identifikaci faktorů, jež regulují vývojový potenciál oocyty.

Folikulární tekutina (FT) zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, ve kterém dochází k vývoji oocyty. Na jejím vzniku se podílí jednak přestup složek krevní plazmy přes folikulární bariéru a zároveň sekreční aktivita buněk téky a granulózy [7]. Biochemické složení FT hraje zásadní roli pro kvalitu oocyty, zvláště pro jeho schopnost fertilizace a následný vývoj embrya.

Ačkoliv hodnocení kvality oocyty při léčbě neplodnosti metodami asistované reprodukce dnes nejčastěji

probíhá metodami založenými na morfoloické klasifikaci folikulu, komplexu cumulus – oocyt, polárního tělíska nebo dělicího vřeténka [19], experimentálně (a také mnohými retrospektivními studiemi) bylo prokázáno, že pro stanovení vývojového potenciálu bude možno využívat nejrůznější biochemické a molekulárně biologické markery. Mezi vhodné indikátory kvality oocyty byly v literatuře v minulosti zařazeny některé tzv. vnitřní markery – charakter mitochondrií oocyty či aktivita glukóza-6-fosfátdehydrogenázy I v cytoplasmě, ale také faktory zevní (apoptóza folikulárních buněk či hodnoty některých působků v séru – např. rodiny TGF β , anti-müllerianského hormonu, inhibinu B atd.) [1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 18, 20, 21].

V ose hypotalamus-hypofýza-gonády / štítná žláza probíhají vzájemné interakce před otěhotněním i v průběhu těhotenství – jednak přímým působením tyroideálních hormonů na ovaria a dále nepřímo skrze vliv na sex hormon-binding globulin (SHBG), prolaktin a gonadotropin-releasing hormon.

Prolaktin je hormon syntetizovaný adenohipofýzou a k jeho vylučování do oběhu dochází intermitentně.

Cílovým orgánem pro jeho působení je mléčná žláza. Je tvořen 198 aminokyselinami, jeho molekulová hmotnost je přibližně 22–23 kDa a v séru se vyskytuje ve třech různých formách. Biologicky a imunologicky aktivní monomerní forma převažuje (asi 80 %), 5–20 % tvoří biologicky neaktivní forma dimeru a 0,5–5 % je přítomno jako tetramer, který má slabou biologickou aktivitu. Zvýšené hladiny prolaktinu mají inhibiční účinky na steroidogenezi ovarií a rovněž na produkci a sekreci hypofyzálních gonadotropinů. Během těhotenství narůstá koncentrace prolaktinu pod vlivem zvyšující se produkce estrogenu a progesteronu.

Hyperprolaktinémie může být příčinou poruch fertility u mužů i žen. Stanovení prolaktinu je užíváno při diagnostice anovulárního cyklu, hyperprolaktinemické amenorey a galaktorey, gynekomastie a azoospermie. Prolaktin je také stanovován při podezření na karcinom prsu a podvěšku mozkového.

Trijodtyronin je jedním z hormonů štítné žlázy přítomným v séru. Hlavní část celkového trijodtyroninu je vázána na transportní proteiny (tyroxin vázající protein, TBG), prealbumin, albumin) a aktivní formou je pak volný trijodtyronin (FT3). Hormon štítné žlázy tetrajodtyronin (tyroxin, T4) je fyziologickou částí regulační smyčky štítné žlázy s vlivem na celý metabolismus.

Sérové hladiny prolaktinu i hormonů tyroideálních prokazatelně ovlivňují ovariální funkce, nicméně v literatuře není zatím popsáno, jak souvisí hladiny těchto hormonů v FT s ovariální činností, či dokonce plodností ženy.

Obě formy, volný trijodtyronin i tetrajodtyronin, byly detekovány ve FT [21], ale jejich význam pro vývoj a kvalitu oocytu nebyl zatím objasněn.

SOUBOR ŽEN A METODIKA

Studovaný soubor tvořilo 146 žen, z toho bylo 74 pacientek (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centra Prof. Zech. Kontrolní skupinu tvořilo 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk byl 26 let, SD = 4,44). Všechny sledované ženy měly normální hladiny prolaktinu i hormonů štítné žlázy v krvi. Po detailním seznámení s problematikou a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebírána FT v době odběru oocytů v průběhu jejich léčby neplodností metodami asistované reprodukce. Vyšetřovány byly tzv. pooly FT, tedy

směs ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve FT byly stanoveny hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4. Metoda stanovení hormonů prolaktinu a volného T3 a T4 byla založena na sendvičovém principu elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA) s využitím kitů Prolactine II, kitem FT3 a FT4 (ROCHE Diagnostics, ČR) na přístroji Cobas e411.

Stanovení Elecsys Prolactin II využívá dvě monoklonální protilátky, speciálně směřované proti lidskému prolaktinu a metoda stanovení volného T3 i volného T4 využívající testu Elecsys FT3 a FT4 je založena na využití specifické protilátky proti T3 a T4, které jsou obě značené ruteniovým komplexem.

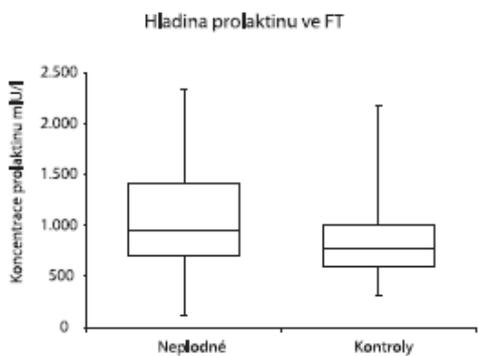
Tato studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

Statistické hodnocení

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova neparametrického testu (nepárová varianta) a dále analýzou rozptylu (ANOVA, post hoc analýza pomocí Tukeyovy metody mnohonásobného porovnávání). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

VÝSLEDKY

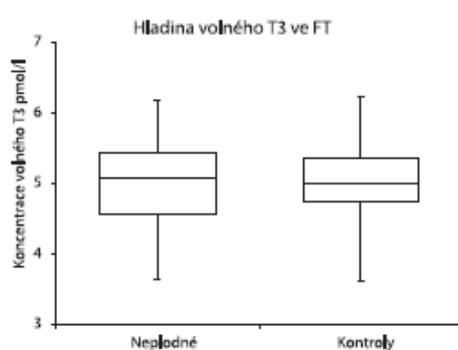
Porovnávány byly hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4 ve skupinách žen léčených pro neplodnost a kontrolních plodných dárkyň oocytů. Z tabulky 1 a gra-



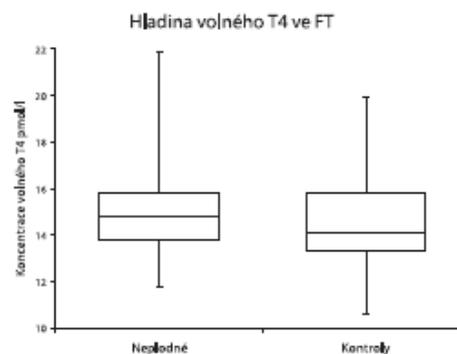
Graf 1. Srovnání hladin prolaktinu u skupiny neplodných a kontrol

Tab. 1. Hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4 ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

Skupiny	Prolaktin mIU/l	Volný T3 pmol/l	Volný T4 pmol/l
Neplodné (n = 74)	958 [711–1408]	5,07 [4,56–5,43]	14,75 [13,80–15,80]
Kontroly (n = 72)	768 [590–1009]	5,00 [4,75–5,34]	14,05 [13,33–15,78]
p value	0,0006***	0,3833	0,0246*



Graf 2. Srovnání hladin volného T3 hormonu u skupiny neplodných a kontrol



Graf 3. Srovnání hladin volného T4 hormonu u skupiny neplodných a kontrol

Tab. 2. Hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4 ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

Skupiny	Prolaktin mIU/l	Volný T3 pmol/l	Volný T4 pmol/l
Neplodné 20–29 let (n = 27)	937 [759–1207]	5,10 [4,41–5,47]	14,50 [13,80–15,80]
Kontroly 20–29 let (n = 46)	771 [568–964]	5,06 [4,77–5,41]	14,35 [13,38–16,20]
p value	0,0260*	0,3074	0,6185
Neplodné 30–39 let (n = 43)	954 [694–1494]	4,98 [4,66–5,35]	15,20 [13,90–16,00]
Kontroly 30–39 let (n = 23)	680 [588–1124]	4,88 [4,60–5,19]	13,70 [12,70–14,60]
p value	0,0256*	0,5929	0,0175*

Tab. 3. Hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4 ve folikulární tekutině neplodných žen v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

Skupiny	Prolaktin mIU/l	Volný T3 pmol/l	Volný T4 pmol/l
Neplodné 20–29 let (n = 27)	937 [759–1207]	5,10 [4,41–5,47]	14,50 [13,80–15,80]
Neplodné 30–39 let (n = 43)	954 [694–1494]	4,98 [4,66–5,35]	15,20 [13,90–16,00]
Neplodné 40 let a výše (n = 4)	1471 [846–1689]	5,26 [4,41–5,63]	15,15 [13,85–16,60]
p value	0,4049	0,8833	0,6599

Tab. 4. Hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4 ve folikulární tekutině kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí).

Skupiny	Prolaktin mIU/l	Volný T3 pmol/l	Volný T4 pmol/l
Kontroly 20 a níže (n = 3)	1052 [900–1701]	5,78 [4,97–6,03]	14,30 [13,50–14,40]
Kontroly 20–29 let (n = 46)	771 [568–964]	5,06 [4,77–5,41]	14,35 [13,38–16,20]
Kontroly 30–39 let (n = 23)	680 [588–1124]	4,88 [4,60–5,19]	13,70 [12,70–14,60]
p value	0,1404	0,0878	0,4203

fů 1 a 3 je zřejmé, že u neplodných žen byly naměřeny signifikantně vyšší hladiny prolaktinu ($p = 0,0006$) i fT4 hormonu ($p = 0,0246$), avšak koncentrace fT3 se mezi skupinami významně nelišily (graf 2).

Protože plodnost žen je silně ovlivněna věkem a protože naše skupiny plodných a neplodných se liší věkovým složením, porovnali jsme hladiny hormonů mezi plodnými a neplodnými ženami ve stejných věkových obdobích. Mezi skupinami plodných a neplodných žen

ve věkovém rozmezí 20 až 29 let je statisticky signifikantní rozdíl v hladinách prolaktinu v FT ($p = 0,026*$) a mezi skupinami ve věkovém rozmezí 30–39 let je statisticky signifikantní rozdíl v hladinách prolaktinu ($p = 0,0256$) i fT4 ($p = 0,0175$). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Dále jsme porovnali hladiny hormonů uvnitř obou skupin v závislosti na věku, ty se však již signifikantně neliší – výsledky jsou shrnuty v tabulkách 3 a 4.

DISKUSE

Role prolaktinu v FT nebyla plně vysvětlena a v literatuře neexistují ani dostatečná data o vztahu k hladinám prolaktinu v séru [10, 11]. Skutečnost, že zdravé plodné dárkyně mají signifikantně nižší hladiny prolaktinu v FT, nehledě na věkovou skupinu, v níž hladiny sledujeme, naznačuje, že prolaktin bude pravděpodobně významným regulačním faktorem pro vývojový potenciál oocyty. Poznání patofyziologického mechanismu, kterým prolaktin k regulaci přispívá, opět může vést ke zvýšení individualizace léčby neplodnosti.

Náš překvapivý nález statisticky signifikantně vyšších hladin FT4 hormonu u neplodných žen se podle našeho mínění odvíjí od faktu, že mnoho našich pacientek, jež byly léčeny pro neplodnost a analyzovány v této studii, mělo podle anamnestických údajů diagnostikovanou subklinickou hypotyreózu a užívalo substituční terapii. V našich podmínkách je screening tyroideálních dysfunkcí doporučován široké škále pacientek léčených pro neplodnost – všem s anamnézou hyper- či hypotyreoidální poruchy, ženám s diabetem typu 1 či s jakoukoliv jinou autoimunitní poruchou, ženám po léčbě maligního onemocnění s prodělanou radioterapií v oblasti hlavy či krku atd. Tyroideální onemocnění před otěhotněním i v průběhu těhotenství vyžaduje speciální management s ohledem na změny tyroideálních funkcí v těhotenství [16]. Ačkoliv se v současné době endokrinology doporučený postup pravděpodobně velmi blíží optimálnímu nastavení substituční terapie, další poznání toho, jak se hladiny FT4 promítají ze séra do FT a jak pak tyto hladiny ovlivňují vývojový potenciál oocyty, jistě může přispět k ještě citlivějšímu a více personalizovanému způsobu léčby.

Vztahy sérových hormonálních hladin a hladin hormonů v FT jsou komplexní a jejich regulace i role jsou doposud ne zcela jasné [5, 9, 14]. Další studium dárkyň oocytů a jejich podrobnější srovnání s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost a také ovlivňujících úspěšnost při léčbě neplodnosti.

ZÁVĚR

Naše studie potvrzuje přítomnost prolaktinu a tyroideálních hormonů v FT a naznačuje jejich klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Neplodné ženy mají statisticky významně vyšší hladiny PRL v FT. Hormonální složka FT hraje významnou úlohu ve vývoji oocyty, a proto kompletní znalost biochemického složení FT a poznání role jednotlivých složek bude v budoucnu hrát roli v poznání zatím nejasných patofyziologických mechanismů neplodnosti i faktorů, jež ovlivňují úspěšnost její léčby.

Naše předložené výsledky jsou založeny na analýzách poolů FT, hodláme je ale dále zpřesnit sledováním hladin

prolaktinu v monofolikulárních vzorcích. Hladiny prolaktinu budeme dále kolerovat s dosaženými pregnancy rate, čímž by se prolaktin ve FT mohl stát jedním z prognostických markerů.

Tato studie je podporována projektem OP VaVpI PO 2 Biomedicínské centrum CZ.1.05/2.1.00/03.0076, grantem GA UK 696212 a projekty specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 264 808 a 264 804).

LITERATURA

1. Anifandis, G., Koutselini, E., Stefanidis, I., et al. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction*, 2005, 130, 6, p. 917–921.
2. Asimakopoulos, B., Koster, F., Felberbaum, R., et al. Intrafollicular and circulating concentrations of leptin do not predict the outcome in IVF-ICSI cycles. *Reprod Sci*, 2009, 16, 1, p. 113–119.
3. Asimakopoulos, B., Abu-Hassan, D., Metzner, E., et al. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2008, 90, 1, p. 60–64.
4. Asimakopoulos, B., Nikolettos, N., Papachristou, DN., et al. Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Physiol Res*, 2005, 54, 3, p. 263–270.
5. Baka, S., Malamitsi-Puchner, A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online*, 2006, 12, 4, p. 500–506.
6. Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, JM., et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, 2007, 13, 3, p. 225–238.
7. Fortune, JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 1994, 50, 2, p. 225–232.
8. Fried, G., Remaues, K., Harlin, J., et al. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-1/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 2003, 20, 5, p. 167–176.
9. Gürbüz, B., Yalıt, S., Fikcioglu, C., Taşdemir, S. The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*, 2005, 118, 2, p. 214–218.
10. Kamel, MA., Zabel, G., Bernart, W., et al. Comparison between prolactin, gonadotrophins and steroid hormones in serum and follicular fluid after stimulation with gonadotrophin-releasing hormone agonists and human menopausal gonadotrophin for an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod*, 1994, 9, 10, p. 1803–1806.
11. Lebedeva, IV., Denisenko, YY., Lebedev, VA., Kuzmina, TI. Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress. *Theriogenology*, 1998, 49, 3, p. 509–519.
12. Lédée, N., Lombroso, R., Lombardelli, L., et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod*, 2008, 23, 9, p. 2001–2009.
13. Lewicka, S., von Hagens, C., Hettinger, U., et al. Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum Reprod*, 2003, 18, 8, p. 1613–1617.
14. Park, DW., Yang, KM. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med*, 2011, 38, 4, p. 179–185.
15. Patel, SS., Bamigboye, V. Hyperprolactinaemia. *J Obstet Gynaecol*, 2007, 27, 5, p. 455–459.
16. Poppe, K., Velkeniers, B., Gilnoer, D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4, 7, p. 394–405.

17. Salmassi, A., Acli, Y., Schmutzler, A.G., et al. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril*, 2008, 89, 5, Suppl, p. 1578–1584.
18. Salmassi, A., Schmutzler, A.G., Schaefer, S., et al. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod*, 2005, 20, 9, p. 2434–2440.
19. Wang, Q., Sun, QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19, 1, p. 1–12.
20. Wunder, D.M., Guilbourdenche, J., Birkhäuser, M.H., Bersinger, N.A. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 2008, 90, 6, p. 2203–2210.
21. Wakim, A.N., Pollzotto, S.L., Buffo, M.J., et al. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril*, 1993, 59, 6, p. 1187–1190.

MUDr. Miroslava Čedíková
 Ústav histologie a embryologie LF UK
 Karlovarská 48
 301 00 Plzeň
 e-mail: miroslava.cedikova@lfp.cuni.cz

Výskyt *Chlamydia trachomatis* při léčbě neplodnosti

Ces. Gynek.
 2012, 77, č. 5
 s. 476–479

Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in patients treated for infertility

Sobek A. Jr., Hladíková B., Koutná O., Kučerová L., Dostálová Z., Sobek A.
 Fertimed, Olomouc/Polanka nad Odrou, vedoucí doc. MUDr. A. Sobek, CSc.

ABSTRACT

Aim of the study: To determine the prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in patients treated for infertility.

Study type: A retrospective analysis.

Setting: Fertimed, infertility treatment center, Olomouc.

Method: At Fertimed, we used DNA detection of *Chlamydia trachomatis* by the PCR method of the company GeneProof to examine, between 2009–2011, 785 women undergoing one of the infertility treatment methods and their 113 partners. In the second group, we examined 121 oocyte donors and 30 men before sperm donation. We appraised the frequency of *Chlamydia trachomatis* detection in the specific groups and the clinical impact of the infection on the female reproductive organs.

Results: In the group of women treated for infertility, we detected 20 (2.5%) women with an active infection. After treatment, 9 of them underwent an examination of Fallopian tube patency using the UTHL (ultrasonographically guided transvaginal hydrolaparoscopy) method. In 7 cases, we indicated a bilateral salpingectomy due to a sactosalpinx and in one case severe pelvic adhesions were found (88.9%), and in one patient, the result was normal. In the control group of 43 PCR-negative women who were examined for Fallopian tube patency, 9.3% rate of tubal pathology was found ($p < 0.001$).

In the oocyte donor group, we detected the presence of *Chlamydia trachomatis* in 12 (9.9%) women, and in the sperm donor group, in 7.6% men. Treatment with 500 mg of Sumamed (azithromycin), given in 3 doses, was successful in all of the positive patients.

Conclusion: We found that *Chlamydia trachomatis* detection was lower in the women treated for infertility than in the female donor group. Women with a confirmed infection had a high prevalence of inflammatory changes in the Fallopian tubes compared with women devoid of a confirmed infection. The treatment with azithromycin is effective.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, infertility, adhesions, azithromycin, real time PCR.

SOUHRN

Cíl studie: Zjistit výskyt infekce *Chlamydia trachomatis* u pacientů léčených pro neplodnost.

Typ studie: Retrospektivní analýza.

Název a sídlo pracoviště: Fertimed, centrum pro léčbu neplodnosti, Olomouc.

Metodika: Přímou detekcí DNA *Chlamydia trachomatis* (Real Time PCR) jsme v období 2009–2012 vyšetřili na pracovišti Fertimed 785 žen podstupujících některou z metod léčby neplodnosti a současně 113 jejich partnerů. Dále jsme vyšetřili 121 dárkyň oocytů a 30 mužů před darováním spermí. Vyhodnotili jsme četnost záchytu *Chlamydia trachomatis* v jednotlivých skupinách a klinický dopad infekce na ženské reprodukční orgány a úspěšnost léčby azithromycinem.

Příloha II

BABUŠKA, V., M. ČEDÍKOVÁ, D. RAJDL, J. RACEK, N. H. ZECH, Z. NOVOTNÝ
and M. KRÁLÍČKOVÁ M. Comparison of selective oxidative stress parameters in the
follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors. *Ceska Gynekol.* 2012,
Vol. 77, No. 6, pp. 543-548. ISSN 1210-7832.

Srovnání vybraných parametrů oxidačního stresu ve folikulární tekutině u žen s poruchou plodnosti a u zdravých fertilních dárkyň oocytů

Čes. Gynék.
2012, 77, č. 6
s. 543–548

Comparison of selective oxidative stress parameters in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors

Babuška V.¹, Čedíková M.^{2,3}, Rajdl D.⁴, Racek J.^{1,4}, Zech N. H.⁵, Trefil L.¹, Mocková A.⁷, Ulčová-Gallová Z.⁶, Novotný Z.⁶, Králíčková M.^{2,3,6}

¹Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UK, Plzeň, přednosta prof. MUDr. J. Racek, DrSc.

²Ústav histologie a embryologie, LF UK, Plzeň, přednosta doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

³Biomedicínské centrum, LF UK, Plzeň, vědecký ředitel doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

⁴Ústav klinické biochemie a hematologie, LF UK a FN, Plzeň, přednosta prof. MUDr. J. Racek, DrSc.

⁵Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centra Prof. Zech, Plzeň,

přednosta Univ. Doz. Dr. med. N. H. Zech

⁶Gynekologicko-porodnická klinika, LF UK a FN, Plzeň, přednosta doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

⁷Neonatologické oddělení, LF UK a FN, Plzeň, vedoucí doc. MUDr. J. Dort, Ph.D.

ABSTRACT

Objective: Follicular fluid (FF) affects oocyte development and disruption of its homeostasis has a crucial effect on egg developmental potential. The aim of this study was to compare the levels of selected oxidative stress markers in the FF of women with impaired fertility and healthy fertile oocytes donors.

Design: A retrospective comparative study.

Setting: Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague; Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology, IVF Center Prof. Zech, Pilsen.

Methods: Levels of homocysteine (Hcy), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), total antioxidant capacity (AOK) and total protein (CB) were analyzed in the FF. We have analysed FF of 146 women – 74 infertile patients (mean age 31 years, SD = 4.65) and 72 healthy fertile oocyte donors (mean age 26 years, SD = 4.44). Only blood free samples were studied after pooling of all FF samples each patient.

Results: The study showed a statistically significantly higher Hcy levels ($p < 0.0001$) in the FF of healthy fertile women compared with impaired fertility group both – comparing the two groups regardless the age and in groups of the same age range (for the age group between 20 to 29 years is $p = 0.0002$, for the age group between 30 to 39 years is $p < 0.0001$). When divided into above age ranges we found statistically significantly higher levels of MDA in the control group aged 20 to 29 years compared to same age infertile patients ($p = 0.0374$) and statistically significantly higher AOK in infertile women between 30 to 39 years of age compared to same age control group ($p = 0.0458$).

Conclusion: The presence or on the contrary the absence of prooxidant parameters in the FF has an important role in the ability of conception and subsequent embryo development.

Key words: follicular fluid, homocysteine, oxidative stress, infertility, oocyte donor.

SOUHRN

Cíl studie: Vývoj oocytu je ovlivňován prostředím, zvláště folikulární tekutinou (FT). Narušení její homeostázy má zásadní vliv na vývojový potenciál vajíčka. Cílem této studie bylo srovnání hladin vybraných markerů oxidačního stresu ve FT žen s poruchou plodnosti a zdravých plodných dárkyň oocytů.

Typ studie: Retrospektivní komparativní studie.

Název a sídlo pracoviště: Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze; Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centra Prof. Zech, Plzeň.

Metodika: Ve FT byly analyzovány hladiny homocysteinu (HCy), malondialdehydu (MDA), glutathionperoxidázy (GPx), celkové antioxidační kapacity (AOK) a celkové bílkoviny (CB). Celkem bylo vyšetřeno 146 žen – 74 pacientek léčených pro neplodnost (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) a 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk 26 let, SD = 4,44). U každé ženy byly použity vzorky FT ze všech folikulů dohromady, tedy ve společném poolu. Ze studie byly vyloučeny vzorky, ve kterých se vyskytla příměs krve.

Výsledky: Studie prokázala statisticky signifikantně vyšší hladiny HCy ($p < 0,0001$) ve FT u zdravých plodných žen oproti skupině s poruchou plodnosti, a to jak bez ohledu na věk, tak ve skupinách neplodných kontrol ve stejném věkovém rozmezí (u věkové skupiny mezi 20 až 29 lety je $p = 0,0002$, ve věku 30 až 39 let je $p < 0,0001$). Při rozdělení souborů do výše popsaných věkových pásem jsme prokázali statisticky signifikantně vyšší hladinu MDA u kontrolní skupiny ve věku 20 až 29 let oproti stejné starým ženám léčeným pro neplodnost ($p = 0,0374$) a statisticky signifikantně vyšší hodnotu AOK u neplodných žen mezi 30. až 39. rokem života oproti zdravým plodným dárkyním oocytů ($p = 0,0458$).

Závěr: Přítomnost, či naopak nepřítomnost prooxidačních parametrů ve FT má důležitou úlohu ve schopnosti koncepce a následném vývoji embrya.

Klíčová slova: folikulární tekutina, homocystein, oxidační stres, neplodnost, dárkyně oocytů.

ÚVOD

Folikulární tekutina (FT) zajišťuje charakteristické mikroprostředí pro vývoj oocytu. Biochemické složení FT hraje zásadní roli pro kvalitu oocytu, zvláště pro jeho schopnost fertilizace a následný vývoj embrya. FT ovlivňuje maturaci oocytu a viabilitu embrya svým hormonálním složením, interleukiny, ale i hladinou oxidačního stresu [5, 8, 12]. Bylo prokázáno [2], že pro zdárný vývoj by lidský folikul měl být v průběhu svého zrání dostatečně chráněn vůči kyslíkovým a dusíkovým radikálům, což znamená, že by volné radikály a antioxidanty měly být v rovnováze [1]. Je známo [30], že nezastupitelnou ochrannou roli plní např. buňky cumulus oophorus.

Oxidační stres je definován jako nárůst koncentrace reaktivních forem kyslíku a dusíku, kdy dojde k převaze těchto volných radikálů nad účinkem endogenních antioxidantů. Jejich patologický efekt vyplývá z poškození lipidů v buněčné membráně, nukleových kyselin, proteinů a dalších buněčných materiálů [14]. In vivo se poškozujícímu efektu volných radikálů předchází nebo je efekt limitován pomocí endogenních antioxidantů, které se podle biologické funkce dělí na enzymové, jako je např. superoxiddismutáza (SOD), glutathionperoxidáza (GPx), glutathiontransferáza (GST) nebo kataláza (KAT), a nízkomolekulární, rozpustné ve vodě nebo v tucích, jako je kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, kyselina lipová, koenzym Q, bilirubin a kyselina močová [16]. Na možnost, že by kyslíkové radikály mohly být spojovány s lidskou reprodukcí, bylo poprvé ukázáno před sedmdesáti lety [17]. Roli volných radikálů a antioxidantů ve vztahu k ženským reprodukčním funkcím je, na rozdíl od mužských, věnována malá pozornost, ačkoliv je prokázán jak fyziologický, tak patologický efekt [13].

S oxidačním stresem úzce souvisí hladina homocysteinu (HCy). Jeho vliv na homeostázu byl nejprve studován v souvislosti s kardiovaskulárním systémem, nyní je však známo jeho široké působení i mimo tento systém, např. na ženský reprodukční systém [11].

Zvýšená hladina HCy (hyperhomocysteinémie) působí škodlivě více směry. Volné radikály pocházející z oxidace HCy jsou toxické pro cévní endotel, narušuje se koagulační kaskáda a endotel, který má za normálních okolností převážně antitrombotické vlastnosti, se stává více tromboticky aktivní [27]. Dalším negativním vlivem

HCy na cévní endotel je snížení syntézy oxidu dusnatého (NO) a jeho biologická dostupnost. NO se podílí téměř na všech fázích ženské reprodukce, jako je ovulace, implantace embrya, regulace arteriálního tlaku nebo kontrakce dělohy. Důležité je, aby fyziologické koncentrace NO byly v úzkém pásmu, protože jak nadbytek, tak nedostatek vyvolávají nežádoucí účinky při reprodukci [18].

Hladina HCy koreluje s hladinou estrogenu [20], a mění se tedy nejen v závislosti na fázi menstruačního cyklu, ale i v průběhu těhotenství, kdy dochází k jejímu snížení [10, 15, 28].

Hyperhomocysteinémie je známým rizikovým faktorem těhotenských komplikací [29]. Při folikulogenezi může zvýšená hladina HCy aktivovat apoptózu vedoucí k folikulární atézii [11]. Byla prokázána [9] negativní korelace mezi hladinou HCy ve FT a stupněm zralosti získaných oocytů a kvalitou embrya ve třetím dni in vitro kultivace. Naopak pozitivní korelace byla popsána mezi hladinou folikulárního HCy a průměrem folikulu [6]. Hyperhomocysteinémie ovlivňuje výsledek in vitro fertilizace – u žen se zvýšenou hladinou HCy byla prokázána nižší úspěšnost v dosažení těhotenství [25].

SOUBOR ŽEN A METODIKA

Studovaný soubor tvořilo 146 žen, z toho bylo 74 pacientek (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Center Prof. Zech. Kontrolní skupinu tvořilo 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk byl 26 let, SD = 4,44). V našem souboru pacientek bylo 13 žen, které kouřily 2–10 cigaret za den, ostatní byly nekuřačky. Podobně v souboru plodných dárkyň bylo 26 žen, které kouřily 5–15 cigaret za den, ostatní byly nekuřačky. Po detailním seznámení s problematikou a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebrána FT v době odběru oocytů v průběhu jejich léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce. Vyšetřovány byly pooly FT, tedy směs ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve FT byly stanoveny hladiny homocysteinu, glutathionperoxidázy, malondialdehydu, celkové oxidační kapacity a celkové bílkoviny.

Hladina HCy byla stanovena enzymaticky kitem Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent (Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK) na přístroji Olympus AU400. Vázaný HCy nebo ve formě dimeru (oxidovaná forma) se redukuje na volný HCy prostřednictvím tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP). Takto vzniklý volný HCy poté reaguje se serinem za katalýzy cystathionin beta-syntázou (CBS) za vzniku cystathioninu. Cystathionin je postupně rozkládán na HCy cystathionin betalyázou (CBL), kdy při tomto procesu vzniká i pyruvát a amoniak. Pyruvát se poté konvertuje pomocí laktát-dehydrogenázy (LDH) na laktát s nikotinamid adenin dimukleotidem (NADH) jakožto koenzymem. Rychlost konverze NADH na NAD⁺ je sledována spektrofotometricky při 340 nm a je přímo úměrná koncentraci HCy.

Malondialdehyd (MDA) a jiné degradační produkty peroxidace lipidů reagují s dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové (TBA) v kyselém prostředí na barevný produkt, který se po extrakci n-butanolem měří při 532 nm použitím Elisa-readeru. MDA se stanovuje jako součást sloučenin reagujících s thiobarbiturovou kyselinou, tzv. TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Glutathionperoxidáza (GPx) katalyzuje oxidaci glutathionu kumen hydroperoxidem. V přítomnosti glutathionreduktázy a NADPH se oxidovaný glutathion ihned redukuje, přičemž NADPH se oxiduje na NADP. Pokles absorbance se stanovuje na analyzátoru OLYMPUS AU 400 optickým testem při 340nm. GPx byla stanovena kitem RANSEL (Randox Laboratories Ltd., UK). Celková antioxidační kapacita (AOK) je definována jako schopnost vzorku zhaset volné radikály. Její stanovení je založeno na vlastnostech sloučeniny ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová) kyselina), která po inkubaci s peroxidázou a peroxidem vodíku tvoří radikál ABTS⁺. Ten je relativně stabilní a je možné ho měřit spektrofotometricky při 600 nm. Antioxidanty FT potlačují vznik tohoto radikálu. AOK je vyjadřována jako ekvivalent standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je syntetický analog vitamínu E. Měření bylo prováděno na analyzátoru Olympus AU 400. AOK byla stanovena kitem TAS (Randox Laboratories Ltd., UK). Celková bílkovina (CB)

a peptidy poskytují s biuretovým činidlem fialový komplex vhodný k fotometrickému stanovení. Absorbance byla stanovena při 546 nm na analyzátoru Olympus AU 2700 soupravou TP 300 (Lachema, CZ).

Tato studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty UK v Plzni.

Statistické hodnocení

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova neparametrického testu (nepárová varianta) a dále analýzou rozptylu (ANOVA, post hoc analýza pomocí Tukeyovy metody mnohonásobného porovnávání). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

VÝSLEDKY

Hladiny HCy, MDA, GPx, AOK a CB jsme porovnali ve skupinách žen léčených pro neplodnost a kontrolních plodných dárkyň oocytů. Z tabulky 1 a obrázku 1 je zřejmé, že u kontrolní skupiny žen byla naměřena signifikantně vyšší hladina homocysteinu ($p < 0,0001$). Tuto vyšší hodnotu jsme prokázali i při rozdělení pacientek a kontrol do jednotlivých věkových skupin – u věkové skupiny mezi 20 až 29 lety je $p = 0,0002$ a ve věku 30 až 39 let $p < 0,0001$.

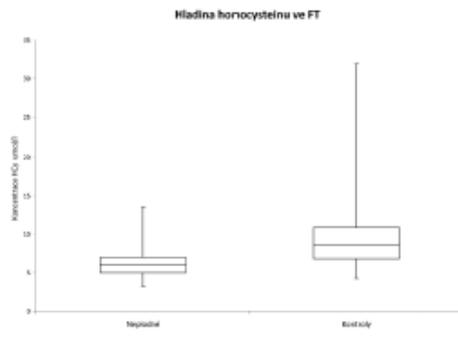
Při tomto rozdělení našeho souboru jsme prokázali rovněž vyšší hladinu MDA u kontrolní skupiny ve věku 20 až 29 let ($p = 0,0374$) oproti neplodným ženám stejného věku a AOK u neplodných žen mezi 30. až 39. rokem života ($p = 0,0458$) oproti věkově stejné skupině zdravých plodných dárkyň. Úplný přehled mediánů naměřených hodnot společně se statistickou významností a interkvartilovým rozpětím shrnuje tabulka 2.

Protože plodnost žen je silně ovlivněna věkem a protože naše skupiny plodných a neplodných se liší věkovým složením, porovnali jsme ještě také hladiny mezi plodnými a neplodnými ženami stejné věkové skupiny – výsledky jsou shrnuty v tabulkách 3 a 4. Prokázali

Tab. 1. Hladiny HCy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné (n = 74)	Kontroly (n = 72)	p value
HCy (μmol/l)	6,00 [4,97 – 7,00]	8,65 [6,82 – 10,88]	<0,0001
MDA (μmol/l)	1,600 [1,360 – 2,033]	1,710 [1,480 – 2,133]	0,1421
GPx (U/l)	621,0 [528,0 – 699,8]	598,5 [524,3 – 668,3]	0,4864
AOK (mmol/l)	1,390 [1,350 – 1,483]	1,385 [1,310 – 1,470]	0,3491
CB (g/l)	58,60 [55,58 – 61,65]	58,25 [55,23 – 64,18]	0,5829

*HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celová antioxidační kapacita, CB – celková bílkovina



Obr. 1. Porovnání koncentrací HCy ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů

jsme zde statisticky významný rozdíl v hodnotách AOK u kontrolní skupiny zdravých dárek. Jak vyplývá z tabulky 4, nejvyšší hladina AOK je u žen mezi 20. až 29. rokem, u žen mladších a starších se tato hladina významně snižuje ($p = 0,0450$).

DISKUSE

U zdravých žen je lidský folikul během svého zrání dostatečně chráněn proti toxickému poškození v důsledku oxidačního stresu [2]. Stoupající aktivita kyslíkových radikálů může být jedním z důvodů neplodnosti i poklesu úspěšnosti IVF u žen se vzrůstajícím věkem, kdy dochází k progresivnímu poklesu kvality a kvantity oocytů [7, 31]. Toto vše může být ještě umocněno životostí ženy a jejím aktivním nikotinismem [26]. Na hladině HCy má velký vliv plazmatická koncentrace folátu (kyselina listová – vitamin B₉), který po své modifikaci na tetrahydrofolát působí jako kofaktor enzymu methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) v remetylační cestě přeměny HCy

Tab. 2. Hladiny HCy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné 20 – 29 let (n = 27)	Kontroly 20 – 29 let (n = 46)	p value	Neplodné 30 – 39 let (n = 43)	Kontroly 30 – 39 let (n = 23)	p value
HCy (μmol/l)	6,00 [4,80 – 7,20]	8,55 [7,02 – 11,05]	0,0002	5,70 [5,00 – 6,80]	9,00 [6,60 – 11,10]	< 0,0001
MDA (μmol/l)	1,400 [1,280 – 2,040]	1,730 [1,480 – 2,240]	0,0374	1,710 [1,480 – 2,030]	1,630 [1,390 – 2,080]	0,9594
GPx (U/l)	570,0 [501,0 – 723,0]	594,0 [521,3 – 654,8]	0,9688	645,0 [531,0 – 699,0]	639,0 [552,0 – 693,0]	0,8728
AOK (mmol/l)	1,380 [1,310 – 1,460]	1,415 [1,338 – 1,493]	0,6674	1,430 [1,350 – 1,500]	1,360 [1,300 – 1,420]	0,0458
CB (g/l)	57,70 [54,70 – 60,20]	59,00 [55,88 – 65,13]	0,2182	58,70 [55,50 – 62,70]	56,10 [53,30 – 64,10]	0,4815

*HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celová antioxidační kapacita, CB – celková bílkovina.

Tab. 3. Hladiny HCy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině neplodných žen v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné 20 – 29 let (n = 27)	Neplodné 30 – 39 let (n = 43)	Neplodné 40 let a více (n = 4)	p value
HCy (μmol/l)	6,00 [4,80 – 7,20]	5,70 [5,00 – 6,80]	7,00 [6,62 – 8,12]	0,9594
MDA (μmol/l)	1,400 [1,280 – 2,000]	1,710 [1,480 – 2,030]	1,500 [1,310 – 2,590]	0,3251
GPx (U/l)	570,0 [501,0 – 723,0]	645,0 [531,0 – 699,0]	688,5 [622,5 – 725,3]	0,2579
AOK (mmol/l)	1,380 [1,310 – 1,460]	1,430 [1,350 – 1,500]	1,365 [1,353 – 1,393]	0,6980
CB (g/l)	57,70 [54,70 – 60,20]	58,70 [55,50 – 62,70]	60,55 [58,45 – 63,33]	0,7496

*HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celová antioxidační kapacita, CB – celková bílkovina

Tab. 4. Hladiny HCy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině kontrolní skupiny zdravých dárek oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Kontroly 20 let a níže (n = 27)	Kontroly 20 – 29 let (n = 40)	Kontroly 30 – 39 let (n = 23)	p value
HCy (μmol/l)	9,00 [6,30 – 10,20]	8,55 [7,02 – 11,05]	9,00 [6,60 – 11,10]	0,9143
MDA (μmol/l)	1,680 [1,560 – 2,100]	1,730 [1,480 – 2,240]	1,630 [1,390 – 2,080]	0,8041
GPx (U/l)	540,0 [480,0 – 714,0]	594,0 [521,3 – 654,8]	639,0 [552,0 – 693,0]	0,4063
AOK (mmol/l)	1,220 [1,190 – 1,310]	1,415 [1,338 – 1,493]	1,360 [1,300 – 1,420]	0,0450
CB (g/l)	60,90 [56,40 – 61,10]	59,00 [55,88 – 65,13]	56,10 [53,30 – 64,10]	0,4512

*HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celová antioxidační kapacita, CB – celková bílkovina

na aminokyselinu methionin. Nikotin a pravděpodobně i sekundární kouř mají vliv na hladinu folátu, jehož nízká koncentrace je spojena právě s hyperhomocysteinémií. Kuřáci mají také tendenci k menší konzumaci na folát bohatého ovoce a zeleniny. Je však třeba poznamenat, že vztah mezi kouřením a hladinou folátu není jednoznačný a některé studie prokazují jejich nezávislost [22]. Tento fakt je jistě závislý také na intenzitě kouření. V naší studii jsme prokázali, že neexistuje signifikantní spojitost mezi neplodnými ženami kuřáčkami a nekuřáčkami ani zdravými dárcynými oocytů kuřáčkami a nekuřáčkami v žádném sledovaném parametru.

Foláty snižují hladinu HCy jak v krvi, tak ve folikulární tekutině [11], což významně koreluje jak s kvalitou oocytu, tak s vývojovým potenciálem embrya [5, 21]. I když stále probíhá diskuse [3, 23, 24] o spojitosti mezi AOK FT a etiologií infertility, je jisté, že vliv volných radikálů je zapojen do patofyziologických mechanismů mnoha chorob souvisejících s neplodností, kde je zapotřebí léčby IVF. Pacientky s endometriózou mají ve srovnání s pacientkami s jinými diagnózami statisticky signifikantně zvýšené hladiny HCy [9].

Protože hladiny HCy jsou ovlivňovány ovariální hyperstimulací [4, 6] a protože schopnost metylace souvisí s riziky metod asistované reprodukce [19], je další výzkum v této oblasti se zapojením zkoumání zdravých plodných dárek přínosem.

ZÁVĚR

Naše studie potvrzuje roli HCy a dalších parametrů oxidačního stresu v ženské reprodukci. Přítomnost či naopak nepřítomnost prooxidačních vlivů ve FT má důležitou úlohu ve schopnosti koncepcí a následném vývoji embrya.

Tato studie je podporována projektem OPV a v PIPO 2 Biomedicinské centrum CZ.1.05/2.1.00/03.0076, grantem GA UK 696212 a projekty specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 264 808 a 264 804).

LITERATURA

1. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 14, 3, p. 28.
2. Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764, 11, p. 1775–1785.
3. Appasamy, M., Jauniaux, E., Serhal, P., et al. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril*, 2008, 89, 4, p. 912–921.
4. Benkhalifa, M., Montjean, D., Cohen-Bacrie, P., Ménézo, Y. Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil Steril*, 2010, 15, 93, 5, p. 1585–1590.
5. Boxmeer, JC., MacLoud, NS., Lindemans, J., et al. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum Reprod*, 2009, 24, 5, p. 1059–1066.
6. Boxmeer, JC., Steegers-Theunissen, RP., Lindemans, J., et al. Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod*, 2008, 23, 11, p. 2570–2576.
7. Broekmans, FJ., Kwee, J., Hendriks, DJ., et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006, 12, 6, p. 685–718.
8. Das, S., Chattopadhyay, R., Ghosh, S., et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod*, 2006, 21, p. 2403–2407.
9. Ebisch, IM., Peters, WH., Thomas, CM., et al. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub) fertile couple. *Hum Reprod*, 2006, 21, 7, p. 1725–1733.
10. Eskes, TK. Clotting disorders and placental abruption: homocysteine – a new risk factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 95, 2, p. 206–212.
11. Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, JM., et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, 2007, 13, 3, p. 225–238.
12. Fortune, JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 1994, 50, 2, p. 225–232.
13. Guérin, P., El Moutassim, S., Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 2001, 7, 2, p. 175–189.
14. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
15. Holmes, VA., Wallace, JM., Alexander, HD., et al. Homocysteine is lower in the third trimester of pregnancy in women with enhanced folate status from continued folic acid supplementation. *Clin Chem*, 2005, 51, 3, p. 629–634.
16. Knapen, MF., Zusterzeel, PL., Peters, WH., Steegers, EA. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999, 82, 2, p. 171–184.
17. MacLeod, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol*, 1943, 138, p. 512–518.

18. Maul, H., Longo, M., Saade, GR., et al. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des*, 2003, 9, p. 359–380.
19. Menezes, Y., Elder, K., Benkhalifa, M., Dale, B. DNA methylation and gene expression in IVF. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20, 6, p. 709–710.
20. Mijatovic, V., van der Mooren, MJ. Homocysteine in postmenopausal women and the importance of hormone replacement therapy. *Clin Chem Lab Med*, 2001, 39, 8, p. 764–767.
21. Ocal, P., Ersoylu, B., Cepni, I., et al. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29, 4, p. 299–304.
22. Okumura, K., Tsukamoto, H. Folate in smokers. *Clin Chim Acta*, 2011, 412, p. 521–526.
23. Oyawoye, O.A., Abdel-Gadir, A., Garner, A., et al. The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. *Redox Rep*, 2009, 14, 5, p. 205–213.
24. Ozkaya, MO., Nazroglu, M. Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2010, 94, 6, p. 2465–2466.
25. Pacchiarotti, A., Mohamed, MA., Micara G., et al. The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24, 10, p. 459–462.
26. Paszkowski, T., Clarke, RN., Horstein, MD. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum Reprod*, 2002, 17, 4, p. 921–925.
27. Rajmakers, MT., Steegers, EA., Peters, WH. Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues. *Hum Reprod*, 2001, 16, p. 2445–2450.
28. Tallova, J., Tomandl, J., Bicikova, M., Hill, M. Changes of plasma total homocysteine levels during the menstrual cycle. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29, 12, p. 1041–1044.
29. Tamura, T., Picciano, MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83, 5, p. 993–1016.
30. Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, 2000, 63, 3, p. 805–810.
31. Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., et al. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2004, 82, Suppl 3, p. 1171–1176.

Ing. Václav Babuška, Ph.D.
 Ústav lékařské chemie a biochemie
 LF UK Pilsen
 Karlovarská 48
 301 66 Pilsen
 e-mail: vaclav.babuska@jfp.cuni.cz

Konzervativní postup v léčbě placenta accreta – dvě kazuistiky

Čes. Gynék.
2012, 77, č. 6
s. 548–551

Conservative method in treatment of placenta accreta – two case reports

Trýbová L.
 Gynékolgicko-porodnické oddělení Nemocnice, Jihlava,
 přednosta prof. MUDr. A. Roztočil, CSc.

ABSTRACT

Placenta accreta is an obstetric pathology with incidence around 1:2500 deliveries. This incidence is increasing due to increasing number of caesarean sections. Hysterectomy is considered to be a standard solution in this situation. Anyway in some cases we can decide to perform a conservative way which means that uterus is saved. There are two case reports below in which we decided to proceed conservatively. We consulted the patient before doing this and in both cases we were successful in keeping the uterus. In both cases we were able to determine diagnosis of placenta accreta up to some time after delivery. The diagnosis was made according to ultrasonography and clinical examination. We were able to manage conservative way of treatment because there were no situations that could cause an acute operating solution.

Key words: placenta accreta, conservative treatment, hysterectomy.

SOUHRN

Placenta accreta je těhotenskou patologií, jejíž incidence se pohybuje kolem 1:2500 porodů. Stoupá však se vzrůstajícím počtem císařských řezů, a nabývá tedy na významu. Za standardní postup v případě průkazu placenta accreta je považováno operační řešení – hysterektomie. Za určitých podmínek je však možno přistoupit ke konzervativnímu postupu, který umožní zachování dělohy. Niže uvádíme dvě kazuistiky, kdy bylo po konzultaci s pacientkou rozhodnuto o konzervativním postupu, který vedl k úspěšnému zvládnutí této těhotenské patologie. V obou případech byla diagnóza akretní placenty stanovena až s určitým odstupem od porodu, a to na základě ldimického a ultrazvukového nálezu. Rozhodnutí o konzervativním postupu mohlo být učiněno díky tomu, že ani u jedné pacientky nevznikla život ohrožující situace, která by si vyžádala akutní operační řešení.

Klíčová slova: placenta accreta, konzervativní postup léčby, hysterektomie.

Příloha III

ČEDÍKOVÁ, M., V. BABUŠKA, P. LHOTSKÁ, P. LOŠAN, N. H. ZECH, M.

KRÁLÍČKOVÁ and Z. NOVOTNÝ. Effect of overweight on the outcome of assisted reproductive technology in infertile women. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79, No. 1, pp. 16-21. ISSN 1210-7832.

Vliv nadváhy na úspěšnost technik asistované reprodukce u neplodných žen

Effect of overweight on the outcome of assisted reproductive technology in infertile women

Cedíková M.^{1,2}, Babuška V.³, Lhotská P.¹, Lošan P.¹, Zech N. H.⁴, Králíčková M.^{1,2,5}, Novotný Z.⁵

¹Ústav histologie a embryologie LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

²Biomedicínské centrum LF UK, Plzeň, vědecký ředitel doc. MUDr. M. Stengl, Ph.D.

³Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UK, Plzeň, přednostka prof. MUDr. J. Racek, DrSc.

⁴Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF centrum Prof. Zecha, Plzeň,

přednostka Univ. Doz. Dr. med. Nicolas H. Zech

⁵Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, přednostka doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

ABSTRACT

Objective: Obesity and overweight negatively affect the ability of women to conceive naturally, contributes to the increased incidence of obstetric complications during pregnancy and affect the outcome of assisted reproduction techniques (ART). The aim of our study was to compare the results of treatment of infertility in a group of infertile women undergoing ART, depending on the values of BMI and changes in levels of selected hormones and markers of oxidative stress in follicular fluid.

Design: Retrospective comparative study.

Setting: Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague; Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology, IVF Centers – Prof. Zech, Plzeň.

Methods: The studied group consisted of 44 women (mean age of 31.9 years, SD = 4.35) treated for infertility at the Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology – IVF Centers Prof. Zech. Women were divided into 2 groups according to BMI (37 women had

normal BMI, 7 women were overweight). Prolactin, free T3 and T4 hormone, homocysteine, malondialdehyde, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity and total protein were analyzed in the follicular fluid both groups. Only blood free samples were studied after pooling of all FF samples of each patient.

Results: We observed significantly lower levels of glutathione peroxidase in the group of overweight women ($p = 0.0044$). The pregnancy success rate with women with normal BMI and overweight women did not differ significantly from each other ($p = 0.4430$).

Conclusion: Our study did not confirm the negative effect of obesity on the results of treatment of infertility, specifically pregnancy rate in a group of infertile women undergoing treatment with assisted reproduction techniques.

KEYWORDS

follicular fluid – obesity – overweight – infertility

SOUHRN

Cíl studie: Obezita i nadváha negativně ovlivňují schopnost ženy přirozeně otěhotnět, podílí se na zvýšeném výskytu porodnických komplikací v průběhu těhotenství a negativně ovlivňují i výsledek technik asistované reprodukce (ART). Cílem naší práce bylo porovnat výsledky léčby neplodnosti u skupiny neplodných žen podstupujících ART v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině.

Typ studie: Retrospektivní komparativní studie.

Název a sídlo pracoviště: LF UK, Plzeň; Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centrum Prof. Zecha, Plzeň.

Metodika: Studovaný soubor tvořilo 44 žen (průměrný věk 31,9 let, SD = 4,35) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centrum Prof. Zecha. Ženy byly rozděleny do dvou skupin podle hodnoty BMI (37 žen mělo normální BMI, 7 žen mělo nadváhu). Hladiny prolaktinu, volného T3 a T4 hormonu, homocysteinu, malondialdehydu, glutathionperoxidázy (GPx), celkové antioxidační kapacity a celkové bílkoviny byly analyzovány ve folikulární tekutině u obou sledovaných skupin. U každé ženy byly použity vzorky folikulární tekutiny bez příměsí krve a ze všech folikulů dohromady, tedy ze společného poolu.

Výsledky: Pozorována byla jen signifikantně nižší hladina GPx u skupiny žen s nadváhou ($p = 0,0044$). V úspěšnosti pregnancy rate se ženy s normálním

BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily ($p = 0,4430$).

Závěr: Naše studie nepotvrdila negativní efekt nadváhy na výsledky léčby neplodnosti, konkrétně pregnancy rate u skupiny neplodných žen podstupujících léčbu pomocí technik asistované reprodukce.

KLÍČOVÁ SLOVA

folikulární tekutina - obezita - nadváha - neplodnost

Čes. Gynek, 2014, 79, č. 1, s. 16–21

ÚVOD

V současnosti trpí obezitou či nadváhou více než 1,4 miliardy lidí ve věku vyšším než 20 let. Jde o celosvětovou epidemii. Nadváhu a obezitu definujeme jako nadměrné nebo abnormální ukládání tuku, které může negativně ovlivňovat zdraví. Body mass index (BMI) je jednoduchý index, který se běžně užívá ke klasifikaci nadváhy a obezity u dospělých. K výpočtu slouží vzorec, kde čitatelem je tělesná hmotnost v kilogramech [kg] a jmenovatelem druhá mocnina výšky v metrech [m]. Výsledkem je hodnota v jednotkách kg/m^2 . V klinické praxi je doplňován dalšími testy, např. měřením obvodu pasu, bioimpedancí či vyšetřením pomocí kaliperáčnických kleští. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je BMI kategorizován na podváhu ($\text{BMI} < 18,49 \text{ kg}/\text{m}^2$), normální váhu ($\text{BMI} 18,5\text{--}24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$), nadváhu ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$) a obezitu (mírná obezita $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$, střední obezita $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg}/\text{m}^2$ a morbidní obezita $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$) [45]. Obezita i nadváha negativně ovlivňují vznik kardiovaskulárních onemocnění, nádorových onemocnění, diabetu, ale velkou měrou se podílí i na porodnických komplikacích těhotenství [32]. Obézní ženy mají častější komplikace v průběhu těhotenství, zvláště pak ve třetím trimestru. Patří k nim hypertenze [38], preeklampsie [12, 28], gestační diabetes [10, 37], kongenitální abnormality [18, 40, 43], vyšší fetální a novorozenecká úmrtnost [21, 32], makrosomie [11, 38], ale také častější výskyt infekce močových cest, tromboembolických komplikací [10] či komplikací při anestezii a chirurgickém výkonu [19, 31]. Dále se obezita může podílet na selhání technik asistované reprodukce [20, 36], s čímž souvisí i celkové negativní ovlivnění psychiky ženy.

V některých studiích se však negativní efekt vyššího BMI na výsledky léčby neplodnosti metodami ART (techniky asistované reprodukce) neprokázal [5, 9, 23, 25, 42, 44].

Cílem této práce bylo porovnat výsledky léčby neplodnosti, konkrétně pregnancy rate u skupiny neplodných žen podstupujících ART v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybra-

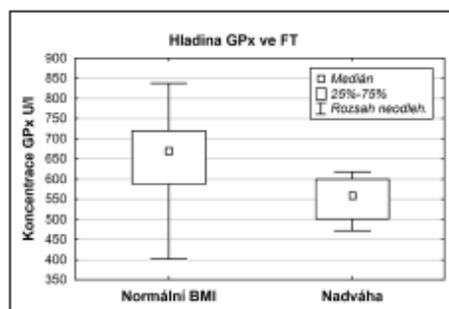
ných hormonů a markerů oxidačního stresu. Ze skupiny hormonů se sledoval prolaktin, hormony štítné žlázy (volný T3 a volný T4), a jako markery oxidačního stresu byly zvoleny homocystein (Hcy), malonyldialdehyd (MDA), glutathionperoxidáza (GPx), celková antioxidační kapacita (AOK) a celková bílkovina (CB). Všechny tyto parametry byly sledovány ve folikulární tekutině (FT), jejíž biochemické složení hraje zásadní roli pro kvalitu oocyty, zvláště pro jeho schopnost fertilizace a následný vývoj embrya (popis současného stavu těchto markerů ve FT jsme podali v předchozích publikacích [4, 8]).

SOUBOR A METODIKA

Studovaný soubor tvořilo 44 žen (průměrný věk 31,9 let, $SD = 4,35$) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centrum Prof. Zecha, Plzeň. Příčiny neplodnosti byly následující: u 13,64 % žen ovariální faktor, ve 22,73 % tubární faktor, endometrióza se vyskytovala u 11,37 % žen, andrologický faktor u 27,27 % žen a u 25 % žen nebyla popsána příčina neplodnosti, šlo o tzv. idiopatickou infertilitu. Všechny sledované ženy měly normální hladiny prolaktinu i hormonů štítné žlázy v krvi. Neplodné ženy byly rozděleny do dvou skupin podle hodnoty BMI (37 žen mělo normální BMI, u 7 žen byla přítomna nadváha). Po detailním seznámení s problematikou studie, vyplnění dotazníku a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebrána FT v době odběru oocytů v rámci jejich léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce. Vyšetřovány byly tzv. pooly FT, tedy směs ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve FT byly stanoveny hladiny prolaktinu, volného T3 (fT3), volného T4 (fT4), homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy, celkové antioxidační kapacity a celkové bílkoviny. Tyto parametry byly korelovány s hodnotou BMI žen. Sledována byla i úspěšnost fertilizace u neplodných žen v závislosti na BMI.

Tab. 1 Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, Hcy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou (BMI ≥ 25 kg/m²) (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

Sledované parametry	Normální BMI (n = 37)	Nadváha (n = 7)	p value
Prolaktin [mIU/l]	939,6 \pm 468,22	881,8 \pm 635,96	0,9749
Volný T3 [pmol/l]	4,9 \pm 0,54	5,3 \pm 0,58	0,6374
Volný T4 [pmol/l]	14,5 \pm 2,11	13,8 \pm 1,87	0,4307
Homocystein [μmol/l]	5,6 \pm 1,98	6,8 \pm 1,69	0,0893
MDA [μmol/l]	1,5 \pm 0,45	1,4 \pm 0,40	0,4688
GPx [U/l]	669,0 \pm 100,92	558,0 \pm 54,40	0,0044
AOK [mmol/l]	1,3 \pm 0,12	1,46 \pm 0,19	0,5291
CB [g/l]	58,1 \pm 5,47	60,3 \pm 5,20	0,6830



Obr. 1 Srovnání hladin GPx u skupiny s normálním BMI a nadváhou

Metoda stanovení hormonů prolaktinu a volného T3 a T4 byla založena na sendvičovém principu elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA) s využitím kitů Prolactine II, FT3 a FT4 (ROCHE Diagnostics, ČR) na přístroji Cobas e411. Hladina Hcy byla stanovena enzymaticky kitem Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent (Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK) na přístroji Olympus AU400. Na stejném přístroji byla měřena i hodnota GPx (kit RANSEL, Randox Laboratories Ltd., UK) a AOK (kit TAS, Randox Laboratories

Ltd., UK). Hladina MDA byla stanovena po reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) v kyselém prostředí za vzniku barevného produktu, který byl po extrakci n-butanolem měřen při 532 nm za použití ELISA-readeru. Celková bílkovina (CB) a peptidy poskytují s biuretovým činidlem fialový komplex vhodný k fotometrickému stanovení. Absorbance byla stanovena při 546 nm na analyzátoru Olympus AU Z700 soupravou TP 300 (Lachema, CZ).

Tato studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

Statistické hodnocení

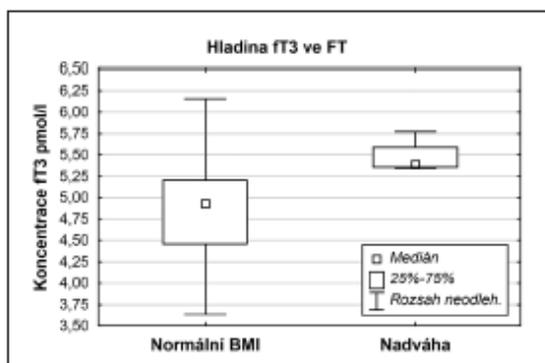
Výsledky se statisticky hodnotily pomocí ne-parametrického Mannova-Whitneyho U testu a Fischerova přesného testu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

VÝSLEDKY

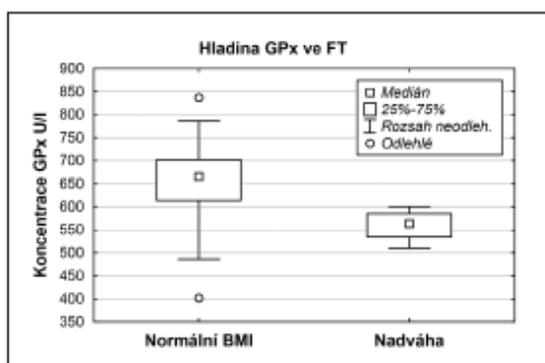
Porovnávaly byly hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy, celkové antioxidační kapacity a celkové bílkoviny v závislosti na hodnotě BMI. Jak je zřejmé z tabulky 1, hladiny sledovaných parametrů se mezi sebou výrazně nelišily. Pozorována byla jen významně nižší hladina

Tab. 2 Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, Hcy, MDA, GPx, AOK a CB ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou (BMI ≥ 25 kg/m²) po vyřazení žen s andrologickou příčinou neplodnosti (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

Sledované parametry	Normální BMI (n = 28)	Nadváha (n = 4)	p value
Prolaktin [mIU/l]	980,7 \pm 488,82	1370,5 \pm 545,41	0,2537
Volný T3 [pmol/l]	4,9 \pm 0,57	5,3 \pm 0,20	0,0134
Volný T4 [pmol/l]	14,5 \pm 2,31	14,0 \pm 1,73	0,6016
Homocystein [μmol/l]	5,6 \pm 2,13	6,1 \pm 0,90	0,7626
MDA [μmol/l]	1,5 \pm 0,45	1,4 \pm 0,43	0,4236
GPx [U/l]	666,0 \pm 101,82	546,0 \pm 37,43	0,0466
AOK [mmol/l]	1,3 \pm 0,12	1,5 \pm 0,26	0,2786
CB [g/l]	58,3 \pm 4,90	60,3 \pm 0,92	0,1349



Obr. 2 Srovnání hladin volného T3 u skupiny žen s normálním BMI a nadváhou po vyřazení pacientek s andrologickou příčinou neplodnosti



Obr. 3 Srovnání hladin GPx u skupiny žen s normálním BMI a nadváhou po vyřazení pacientek s andrologickou příčinou neplodnosti

GPx u skupiny žen s nadváhou ($p = 0,0044$) (obr. 1). V úspěšnosti pregnancy rate se ženy s normálním BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily ($p = 0,4430$).

Hladiny sledovaných markerů a úspěšnost otěhotnění však mohla být ovlivněna skupinou žen, u kterých byl příčinou neplodnosti andrologický faktor. V naší skupině bylo těchto žen 27,27 % ($n = 12$). Po vyřazení těchto žen a opětovné analýze výsledků se zjistilo, že u žen trpících nadváhou můžeme pozorovat signifikantně vyšší hodnotu volného T3 ($p = 0,0134$) a nižší hladinu GPx ($p = 0,0466$) ve FT. Tyto výsledky dokumentuje tabulka 2 a obrázky 2 a 3. V úspěšnosti pregnancy rate se však ani tyto dvě skupiny významně nelišily ($p = 0,6290$).

DISKUSE

Obezita s nadváhou se šíří světem jako epidemie. Obezita, tedy $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$, ovlivňuje fyziologické funkce mnoha tkání a orgánů. V důsledku toho mají obézní ženy problémy s přirozeným otěhotněním a obrací se na centra specializující se na léčbu neplodnosti. Tento jev je zvýšeně sledován v průběhu posledních dvaceti let, a to zvláště ve vyspělých zemích.

O mechanismu, jakým přítomnost obezity negativně ovlivňuje reprodukční schopnosti ženy, není zatím příliš známo. Předpokládá se souvislost s poruchou metabolismu steroidů, sekrecí a působením inzulínu či adipokínů. Tyto změny mohou ovlivňovat růst folikulů, vývoj embrya i jeho implantaci, a to jak za přirozených podmínek, tak po ART [5, 7, 26]. Důležitým faktorem je také výskyt obezity již v adolescentním věku ženy. Právě změny ve váze a tělesné konstituci v tomto kritickém životním období mohou ovlivnit endokrinní regulaci puberty, a tím i správný vývoj reprodukčního systému [13, 30].

Většina prací zabývajících se obezitou a neplodností zdůrazňuje negativní efekt vyššího BMI na implantaci a kvalitu embrya, na úspěšnost fertilizace, incidenci potratů, průběh těhotenství a pregnancy rate [5, 14, 22, 27, 36, 39, 41].

Výsledky naší studie podporují hypotézu, že negativní efekt vyššího BMI začíná až u BMI nad 30 kg/m^2 [5, 9, 23, 25, 27, 29, 42, 44].

V naší skupině jsme zaznamenali nižší hladiny GPx u žen s vyšším BMI. Nižší hladiny cytoprotektivních enzymů jsou pozorovány nejen u žen s vyššími hodnotami BMI [1, 2, 24] a u pacientek s diabetes mellitus [17], ale například i v seminální plazmě některých neplodných mužů, kde nižší hladina tohoto protektivního enzymu způsobuje vyšší peroxidaci lipidů, a tím ztrátu motility spermií [3, 16]. K úpravě snížené hladiny GPx u žen s nadváhou dochází po dosažení normálních hodnot BMI [6].

Zvýšenou hladinu volného T3 hormonu nacházíme častěji u žen trpících nadváhou a obezitou [33]. Stejně výsledky ukazuje i naše práce, kde hladina volného T3 hormonu byla signifikantně vyšší u žen s BMI nad 25 kg/m^2 . Oproti ostatním pracím, kde byl volný T3 stanovován ze séra, jsme však tuto rozdílnou hladinu prokázali ve FT. Mechanismus vzrůstu hladiny hormonu ne-

ní prozatím znám, ví se však, že jeho hladina se normalizuje při snížení váhy a nejspíše souvisí s metabolismem leptinu [33–35].

ZÁVĚR

Naše studie prokázala vyšší hladinu volného T3 hormonu a nižší hladinu cytoprotektivního enzymu GPx ve FT u žen s vyšším BMI oproti ženám s nižším BMI. Nepotvrdil se však negativní efekt nadváhy na pregnancy rate neplodných žen. Limitací závěrů z naší studie je relativně malý počet pacientek ve skupině s nadváhou.

Předložené výsledky jsou založeny na analýzách poolů FT, hodláme je ale dále zpřesnit sledováním hladin hormonů a markerů oxidačního stresu v monofolikulárních vzorcích.

Tato studie je podporována projektem OP VaVpl PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076, programem rozvoje vědních oblastí na Karlově univerzitě (projekt P36), grantem GA UK 696212, projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 266 802 a projektem IGA MZ NT 14330-3/2013.

LITERATURA

1. Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11, 5, p. 641–650.
2. Alpay, Z., Saed, G.M., Diamond, M.P. Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. *J Soc Gynecol Invest*, 2006, 13, 6, p. 390–398.
3. Alvarez, J.G., Storey, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*, 1989, 23, 1, p. 77–90.
4. Babuška, V., Cedíková, M., Rajdl, D., et al. Comparison of selective oxidative stress parameters in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors. *Ces Gynek*, 2012, 77, 6, p. 543–548.
5. Bellver, J., Aylón, Y., Ferrando, M., et al. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril*, 2010, 93, 2, p. 447–454.
6. Bougoula, M., Triantos, A., Kollakos, G. Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Horm Athens Greece*, 2006, 5, 3, p. 192–199.
7. Budak, E., Fernández Sánchez, M., Bellver, J., et al. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril*, 2006, 85, 6, p. 1563–1581.
8. Cedíková, M., Babuška, V., Rajdl, D., et al. Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile

women and healthy fertile oocyte donors. *Ces Gynek*, 2012, 77, 5, p. 471–476.

9. Dechaud, H., Anahory, T., Reyrtmann, L., et al. Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, 127, 1, p. 88–93.

10. Edwards, L.E., Hellerstedt, W.L., Alton, I.R., et al. Pregnancy complications and birth outcomes in obese and normal-weight women: effects of gestational weight change. *Obstet Gynecol*, 1996, 87, 3, p. 389–394.

11. Ehrenberg, H.M., Mercer, B.M., Catalano, P.M. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 191, 3, p. 964–968.

12. Eskenazi, B., Fenster, L., Sidney, S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *J Am Med Assoc*, 1991, 266, 2, p. 237–241.

13. Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*, 1999, 341, 12, p. 879–884.

14. Ferlitsch, K., Sator, M.O., Gruber, D.M., et al. Body mass index, follicle-stimulating hormone and their predictive value in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*, 2004, 21, 12, p. 431–436.

15. Garrouste-Orgeas, M., Troché, G., Azoulay, E., et al. Body mass index. *Intensive Care Med*, 2004, 30, 3, p. 437–443.

16. Giannattasio, A., De Rosa, M., Smeraglia, R., et al. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25, 11, p. 983–986.

17. Goyal, R., Singhal, M., Falzy, A.F. Glutathione peroxidase activity in obese and nonobese diabetic patients and role of hyperglycemia in oxidative stress. *J -Life Heal*, 2011, 2, 2, p. 72–76.

18. Honain, M.A., Moore, C.A., Watkins, M.L. Subfertility and pre-pregnancy overweight/obesity: possible interaction between these risk factors in the etiology of congenital renal anomalies. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2003, 67, 8, p. 572–577.

19. Hood, D.D., Dewan, D.M. Anesthetic and obstetric outcome in morbidly obese parturients. *Anesthesiology*, 1993, 79, 6, p. 1200–1218.

20. Koning, A.M.H., Mutsaerts, M.A., Kuchenbecker, W.K.H., et al. Complications and outcome of assisted reproduction technologies in overweight and obese women. *Hum Reprod*, 2012, 27, 2, p. 457–467.

21. Kristensen, J., Vestergaard, M., Wisborg, K., et al. Pre-pregnancy weight and the risk of stillbirth and neonatal death. *Int J Obstet Gynaecol*, 2005, 112, 4, p. 403–408.

22. Kuchenbecker, W.K.H., Rulifrok, A.E., Bolster, J.H.T., et al. Subfertility in overweight women. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2006, 150, 45, p. 2479–2483.

23. Lashen, H., Ledger, W., Bernal, A.L., Barlow, D. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1999, 14, 3, p. 712–715.

24. Lee, Y.S., Kim, A.Y., Choi, J.W., et al. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol Baltim Md*, 2008, 22, 9, p. 2176–2189.

25. Mataliotakis, I., Cakmak, H., Sakkas, D., et al. Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study. *Reprod Biomed Online*, 2008, 16, 6, p. 778–783.

26. Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., Norman, R.J.

Adipokines: Implications for female fertility and obesity. *Reprod Camb Engl*, 2005, 130, 5, p. 583–597.

27. **MoragIanni, VA., Jones, S-ML., Ryley, DA.** The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*, 2012, 98, 1, p. 102–108.

28. **O'Brien, TE., Ray, JG., Chan, W-S.** Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiol Camb Mass*, 2003, 14, 3, p. 368–374.

29. **Pasquall, R., Patton, L., Gambler, A.** Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007, 14, 6, p. 482–487.

30. **Pelusi, C., Pasquall, R.** Polycystic ovary syndrome in adolescents: pathophysiology and treatment implications. *Treat Endocrinol*, 2003, 2, 4, p. 215–230.

31. **Perlow, JH., Morgan, MA.** Massive maternal obesity and perioperative cesarean morbidity. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170, 2, p. 560–565.

32. **Ramachenderan, J., Bradford, J., McLean, M.** Maternal obesity and pregnancy complications: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2008, 48, 3, p. 228–235.

33. **Reinehr, T.** Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 316, 2, p. 165–171.

34. **Reinehr, T., Andler, W.** Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch Dis Child*, 2002, 87, 4, p. 320–323.

35. **Reinehr, T., Isa, A., de Sousa, G., et al.** Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm Res*, 2008, 70, 1, p. 51–57.

36. **Rittenberg, V., Soboleva, S., Ahmad, A., et al.** Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*, 2011, 26, 10, p. 2642–2650.

37. **Roberts, JM., Lain, KY.** Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 2002, 23, 5, p. 359–372.

38. **Seibre, NJ., Jolly, M., Harris, JP., et al.** Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001, 25, 8, p. 1175–1182.

39. **Shah, DK., Missmer, SA., Berry, KF., et al.** Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gynecol*, 2011, 118, 1, p. 63–70.

40. **Shaw, GM., Velle, EM., Schaffer, D.** Risk of neural tube defect-affected pregnancies among obese women. *J Am Med Assoc*, 1996, 275, 14, p. 1093–1096.

41. **Van der Steeg, JW., Steures, P., Eljkemans, MJC., et al.** Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod*, 2008, 23, 2, p. 324–328.

42. **Styne-Gross, A., Elkind-Hirsch, K., Scott, RT. Jr.** Obesity does not impact implantation rates or pregnancy outcome in women attempting conception through oocyte donation. *Fertil Steril*, 2005, 83, 6, p. 1629–1634.

43. **Watkins, ML., Rasmussen, SA., Honeln, MA., et al.** Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics*, 2003, 111, 5, p. 1152–1158.

44. **Winter, E., Wang, J., Davies, MJ., Norman, R.** Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod*, 2002, 17, 12, p. 3220–3223.

45. **WHO.** Obesity and overweight. In: WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Accessed 1 Jul 2013.

MUDr. Miroslava Čedíková
Ústav histologie a embryologie
LF UK
Karlovarská 48
301 00 Plzeň
e-mail: miroslava.cedikova@lfp.cuni.cz

23rd European Congress
of Obstetrics and Gynaecology
7-10 May 2014
Glasgow, Scotland (UK)

Second Announcement
and Call for Abstracts
www.ebcog2014.org

Příloha IV

ČEDÍKOVÁ, M., M. MIKLÍKOVÁ, M. GRUNDMANOVÁ, N. H. ZECH, M.
KRÁLÍČKOVÁ and J. KUNCOVÁ. Sperm mitochondrial function in men with
normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79, No. 1, pp. 22-
28. ISSN 1210-7832.

Funkce mitochondrií ve spermii u mužů s normozoospermií a asthenozoospermií

Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia

Cedíková M.^{1,2}, Miklíková M.¹, Grundmanová M.³, Zech N. H.⁴, Králíčková M.^{1,2,5}, Kuncová J.^{2,3}

¹Ústav histologie a embryologie LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

²Biomedicínské centrum LF UK, Plzeň, vědecký ředitel doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

³Ústav fyziologie LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

⁴Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centrum Prof. Zecha, Plzeň, přednostka Univ. Doz. Dr. med. Nicolas H. Zech

⁵Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, přednostka doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

ABSTRACT

Objective: One of causes of male infertility is reduced sperm motility. It turns out that the reduced efficiency of the mitochondrial respiratory activity may play a role in the development of this disorder. The aim of our study was to comprehensively determine mitochondrial respiratory activity of sperm with normal and reduced motility.

Design: Prospective study.

Setting: Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague; Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague; Institute of Reproductive Medicine and Endocrinology, IVF Centers Prof. Zech, Plzeň.

Methods: Ejaculates of 14 men were obtained from IVF Center Prof. Zech, Pilsen. According to the World Health Organization classification, samples were divided into normozoospermatic (n = 7) and asthenozoospermatic (n = 7) groups. Respiratory activity of sperm was measured on two-chamber oxygraph Oroboros.

Results: In asthenozoospermatic samples, significantly reduced activity of complex I (p = 0.007) and increased respiration after application of ATP-synthase inhibitor

oligomycin (showing increased uncoupled oxidation and phosphorylation, p = 0.046) were found. Inhibition of complex I by rotenone showed that complex I contribution to the total capacity of oxidative phosphorylation of healthy sperm was relatively lower than it is typical for somatic cells.

Conclusion: In our study, we measured mitochondrial respiratory activity of human sperm, permeabilized by digitonin, by high-resolution oxygraphy, which allows the determination of oxygen consumption from the smallest possible number of germ cells. The study results confirm reduced activity of complex I in asthenozoospermatics and suggest that increased leakage of protons from the mitochondrial matrix, which leads to reduced efficiency of phosphorylating process, could participate in the reduced sperm motility.

Better characterization of male germ cells, either completely healthy or with affected motility, will help us to understand better the physiological process of fertilization and also to choose the most viable sperm for infertility treatment by methods of assisted reproduction.

KEYWORDS

infertility - sperm - respirometry

SOUHRN

Cíl studie: Jednou z příčin mužské neplodnosti je snížená motilita spermií. Ukazuje se, že ve vývoji této poruchy může hrát roli snížená efektivita respirační aktivity mitochondrií. Cílem naší studie bylo komplexní stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí.

Typ studie: Prospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Ústav histologie a embryologie, LF UK, Plzeň; Ústav fyziologie, LF UK, Plzeň; Institut reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Centrum Prof. Zecha, Plzeň.

Metodika: Ejakuláty byly získány od 14 mužů z IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Podle klasifikace World Health Organization byli muži rozděleni do skupiny normozoospermatiků (n = 7) a asthenozoospermatiků (n = 7). Respirační aktivitu spermií jsme měřili na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros.

Výsledky: V asthenozoospermatických vzorcích byla nalezena signifikantně snížená aktivita komplexu I (p = 0,007), zvýšená respirace po aplikaci inhibitoru ATP-syntázy oligomycinu (ukazující na zvýšené rozptáření oxidace a fosforylace; p = 0,046). Inhibice komplexu I rotenonem ukázala, že příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace byl i u zdravých

spermii relativně nižší, než je tomu typicky v somatických buňkách.

Závěr: V naší studii jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermii permeabilizovaných digitoninem vysokoučinnou oxygrafií, která umožňuje stanovení spotřeby kyslíku z nejmenšího možného množství zárodečných buněk. Výsledky studie potvrzují sníženou aktivitu komplexu I u astenozoospermiků a naznačují, že na snížené pohyblivosti spermii by se mohl podílet i zvýšený únik protonů z mitochondriální

matrix, který vede ke snížené efektivitě fosforylačního procesu. Lepší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých, či s postiženou motilitou, nám pomůže lépe pochopit proces fyziologického oplodnění a zároveň pomůže i ve výběru té nejvíce životaschopné spermie pro léčbu neplodnosti metodami asistované reprodukce.

KLÍČOVÁ SLOVA

neplodnost – spermie – respirometrie

Ces. Gynek., 2014, 79, č. 1, s. 22-28

ÚVOD

Snížená plodnost je rostoucím problémem mužské populace ve fertilním věku. Androgenní faktor je zodpovědný přibližně za 50 % případů infertility [32], z 25 % jsou příčiny stále neznámé.

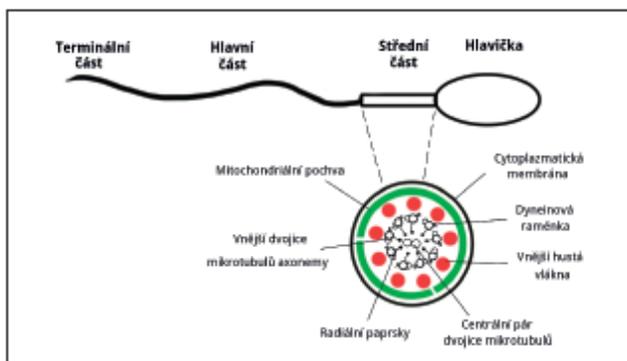
Jednou z častých příčin mužské neplodnosti je snížená motilita spermii – astenozoospermie [13, 14, 30, 32, 38]. Astenozoospermie je podle definice Světové zdravotnické organizace (WHO) definována jako: méně než 40 % spermii s progresivní a neprogresivní motilitou nebo méně než 32 % spermii s progresivní motilitou [39]. U spermie můžeme pozorovat dva druhy fyziologického pohybu – symetrický s nízkou amplitudou, kdy spermie udržuje rovný směr. Tento druh pohybu je viditelný v čerstvém ejakulátu a nazývá se aktivovanou motilitou. Druhým typem je tzv. hyperaktivovaná motilita, kdy se spermie pohybuje asymetricky s vysokou amplitudou a její pohyb je cirkulární [15, 35, 36, 37]. Oba druhy pohybů jsou závislé na dodávce energie ve formě ATP, který je získáván procesem oxidační fosforylace v mitochondriích nebo glykolýzou [9, 32].

Mitochondrie se ve zralé spermii nacházejí po dvojicích helikálně uspořádaných ve spojovacím oddílu, jedné ze tří zřetelných částí bičíku – spojovací (střední) oddíl, hlavní část a terminální konec [12]. Celkový počet mitochondrií v jedné spermii je jen 72 až 80 [2, 32]. Umístění mitochondrií je znázorněno na obrázku 1.

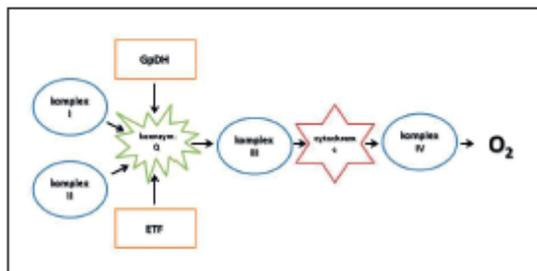
V somatických buňkách hrají mitochondrie ústřední roli v metabolických procesech a stanovení jejich aktivity je klíčové pro analýzu, diagnózu

a případnou léčbu četných patologických stavů, které mitochondriální dysfunkce provázejí (např. neurodegenerativní, metabolická a zánětlivá onemocnění). Mitochondriální dýchací řetězec přenáší elektrony systémem proteínových komplexů (CI – CIV) umístěných na vnitřní mitochondriální membráně z NADH a FADH₂ na O₂ (oxidace). Činností některých komplexů dochází k pumpování protonů z mitochondriální matrix do intermembránového prostoru. Protonový gradient je pak využit k syntéze ATP (fosforylace). V modernějším pojetí jde o konvergentní systém přenašečů elektronů, kde uzlovým bodem je koenzym Q (obr. 2) [22].

Ve spermii byla mitochondrie dlouho opomíjenou organelou, nyní je však doloženo, že má klíčovou roli v mnohých fyziologických a patologických procesech [21, 25, 26]. Kromě produkce ATP nutného pro zajištění pohyblivosti spermie hrají mitochondrie významnou úlohu v regulaci zrání a životnosti spermii a regulaci osmotické a vápníkové homeostázy [21].



Obr. 1 Schéma uložení mitochondrií ve spermii



Obr. 2 Současná představa elektrontransportního konvergentního systému na vnitřní mitochondriální membráně

GpDH – glukóza-6-fosfát dehydrogenáza; komplex I – NADH-Q reduktáza; komplex II – sukcinát-Q reduktáza; komplex III – cytochrom reduktáza; komplex IV – cytochrom oxidáza; ETF – electron-transporting flavoprotein

Mezi možné příčiny astenozoospermie z pohledu mitochondriální problematiky patří jednak jejich strukturální anomálie [19, 23], ale také jejich funkční porucha [6, 7]. Ukazuje se, že určitou roli u astenozoospermatických mužů by mohla hrát právě snížená účinnost respirační aktivity. Publikací na toto téma je zatím velice málo [7, 31], a proto také v současnosti není žádné polarografické vyšetření spotřeby kyslíku rutinně využíváno.

V naší studii jsme měřili mitochondriální respiraci celých permeabilizovaných spermií vysokoucínnou oxygrafií, která umožňuje stanovení aktivity jednotlivých komplexů dýchacího systému postupně na téměř vzorku. Ověřili jsme sníženou aktivitu komplexu I u astenozoospermatických vzorků [8]. Novým nálezem je zvýšená spotřeba kyslíku nutná především pro kompenzaci úniku protonů a udržení mitochondriálního membránového potenciálu, která může být důvodem nižší účinnosti produkce energie v méně pohyblivých spermiích.

METODIKA

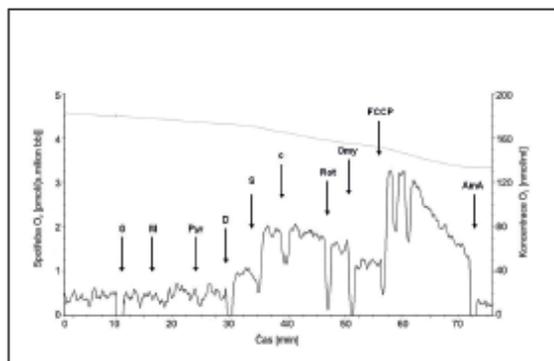
Příprava vzorku

Ejakuláty byly získány od 14 mužů z IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Podle klasifikace World Health Organization byli muži rozděleni do skupiny normozoospermatiků ($n = 7$, průměrný věk 33,1 let) a astenozoospermatiků ($n = 7$, průměrný věk 36,7 let). Vzorek je vždy odebírán přímo v IVF centru, aby bylo pokud možno zcela eliminováno znehodnocení vzorku skladováním a transportem. Po zkapalnění (30 minut) je stanoven nativní spermioqram (podle kritérií WHO 2010). Dalším krokem je kapacitace vzorku pomocí gradientu roztoku médií Sperm Filter Medium (SFM,

CRYOS, Německo) a Quinn's Sperm Washing Medium (QSWM, SAGE, USA). Sperm filter medium je naředěno na 90 % (0,15 ml QSWM: 1,35 ml SFM), 70 % (0,09 ml QSWM: 0,21 ml SFM) a 50 % (0,15 ml QSWM: 0,15 ml SFM). Do kónické zkumavky je na sebe postupně navrstveno 1,5 ml 90%, 0,3 ml 70% a 0,3 ml 50% gradientu médií. Poté je přidán plný ejakulát a vzorek je centrifugován 20 minut při 2000 otáčkách. Po odstranění supernatantu je přidáno 8 ml Quinn's Sperm Washing Media a opět je vzorek centrifugován 8 minut při 2000 otáčkách. Po odstranění supernatantu je vzorek připraven k aplikaci do přístroje Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko).

Oxygrafie

Respirační aktivitu spermií jsme měřili na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Rakousko) při 36 °C v komůrkách o objemu 2 ml. Po 40-50minutové ekvilibraci odpovídala koncentrace kyslíku v respiračním médiu jeho aktuální koncentraci v atmosférickém vzduchu a rozpustnosti v respiračním médiu (0,92), které mělo následující složení: EGTA 0,5 mmol/l; MgCl₂·6H₂O 3 mmol/l; laktobionát draselný 60 mmol/l; taurin 20 mmol/l; KH₂PO₄ 10 mmol/l; HEPES 20 mmol/l; sacharóza 110 mmol/l, hovězí albumin 1 g/l [11]. Následně byly komůrky uzavřeny a dávkovací stříkačkou Hamilton do nich byl aplikován vzorek spermií. Nejprve byla buněčná membrána spermií permeabilizována digitoninem a změněna respirace vzorku před přidáním substrátů a ADP. Sekvenční titrační protokol aplikace substrátů a inhibitorů jednotlivých komplexů respiračního systému byl zvolen následovně: a) rychlost respirace za klidových podmínek (stav S2 nebo LEAK) byla stanovena pomocí substrátů komplexu I glutamátu (10 mmol/l), malátu (2 mmol/l) a pyruvátu (5 mmol/l); b) aktivní respirace (stav S3 nebo OXPHOS) byla stimulována ADP (2,5 mmol/l); c) spotřeba kyslíku byla dále zvýšena aplikací sukcinátu (10 mmol/l), substrátů komplexu II; d) integrita vnitřní mitochondriální membrány byla ověřena pomocí cytochromu c (10 μmol/l); e) stav OXPHOS při stimulaci komplexu II byl navozen inhibitorem komplexu I rotenonem (0,5 μmol/l); f) inhibitor ATP-syntázy oligomycin (2 μg/ml) opět navodil stav LEAK (S4) nutný k udržení mitochondriálního membránového potenciálu; g) pomocí rozpřahovače oxidace a fosforylace karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazonu (FCCP; 0,05-0,25 μmol/l) jsme indukovali stav S3u nebo ETS charakterizující maximální kapacitu elek-



Obr. 3 Typická křivka spotřeby kyslíku permeabilizovanými spermii. Plná čára znázorňuje spotřebu kyslíku, tečkovaná koncentraci kyslíku v komůrce. Šipky ukazují aplikaci jednotlivých chemikálií: G - glutamát; M - malát; Pyr - pyruvát; D - ADP; S - sukcinát; c - cytochrom c; Rot - rotenon; Omy - oligomycin; FCCP - karbonylkyanid-p-trifluorometoxyfenylhydrazol; ApmA - antimycin A.

trontransportního systému; h) inhibitorem komplexu III antimycinem A ($2,5 \mu\text{mol/l}$) jsme navodili stav reziduální spotřeby kyslíku (ROX), tj. spotřebu kyslíku způsobenou převážně nemitochondriální oxidací.

V úvodní sérii experimentů jsme testovali dávku digitoninu ($5 \mu\text{g/ml}$) nutnou pro permeabilizaci buněčné membrány spermii: K vzorku spermii byl přidán sukcinát, rotenon a ADP a postupně byl aplikován digitonin tak dlouho, dokud se respirace zvyšovala. Vyšší dávka digitoninu vedla k poškození mitochondriální membrány a úniku cytochromu c.

Analýza dat a statistika

Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii byla vypočtena on-line pomocí softwaru DatLab (Ororobos Instruments, Innsbruck, Rakousko) jako

záporně vzatá časová derivace poklesu koncentrace kyslíku v komůrce a vyjádřená v $\text{pmol O}_2/(\text{s} \cdot 10^6)$ buněk. Ke statistickému porovnání jednotlivých hodnot spotřeby kyslíku v obou skupinách jsme použili Mannova-Whitneyova pořadového testu pomocí programu STATISTICA Cz, (StatSoft CR, Praha, Česká republika). Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm střední chyby průměru (SEM); hladina pravděpodobnosti $< 0,05$ byla považována za signifikantní.

VÝSLEDKY

Typická křivka spotřeby kyslíku permeabilizovanými spermii je na obrázku 3.

Minimální počet spermii nutný pro detekci spotřeby kyslíku byl 5×10^6 buněk v 1 ml média. Po aplikaci glutamátu, malátu a pyruvátu, substrátů pro komplex I, byla spotřeba kyslíku srovnatelná se stavem bez substrátů, což ukazuje na dobrou permeabilizaci buněčné membrány, která vedla k úniku ADP z buňky. Po přidání ADP došlo ke stimulaci respirace a indukci stavu S3, tj. maximální spotřebě kyslíku při fosforylaci ADP na ATP (OXPHOS_I). U astenozoospermie byla aktivita komplexu I signifikantně nižší než u kontrol (tab. 1). Aplikací sukcinátu dodávajícího do systému elektrony prostřednictvím komplexu II došlo k dalšímu zvýšení spotřeby kyslíku (OXPHOS_{II}), která se mezi oběma skupinami významně nelišila. Následná inhibice komplexu I rotenonem ukázala, že příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace byl i u zdravých spermii relativně nižší, než je tomu typicky v somatických buňkách, např. jaterních nebo svalových [4, 29]. Inhibice ATP-

Tab. 1 Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii

Stav	Titrační protokol	Normozoospermie $\text{pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ bb})$ (n = 7)	Astenozoospermie $\text{pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ bb})$ (n = 7)	p
S2	GMPL	$0,23 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,10$	n.s.
S3I	GMPP	$1,32 \pm 0,16$	$0,56 \pm 0,16^*$	0,007
S3I+II	GMPS	$3,38 \pm 0,52$	$2,72 \pm 0,79$	n.s.
S3I+IIc	GMPScP	$3,37 \pm 0,56$	$2,77 \pm 0,89$	n.s.
S3II	S(Rot)P	$2,81 \pm 0,48$	$1,73 \pm 0,57$	0,07
S4	S(Rot)L	$0,67 \pm 0,16$	$1,72 \pm 0,59$	0,046
S3ull	S(Rot)E	$3,18 \pm 0,67$	$4,10 \pm 1,39$	n.s.

Spotřeba kyslíku v jednotlivých stavech je korigována na ROX. Zkratky: G - glutamát, M - malát, P - pyruvát, D - ADP, S - sukcinát, c - cytochrom c, Rot - rotenon, Omy - oligomycin, F - FCCP, L - LEAK, P - OXPHOS, E - ETS; I a II - komplexy I a II.

Tab. 2 Respirační kontrolní indexy

Respirační kontrolní indexy			
	Normozoospermie (n = 7)	Astenozoospermie (n = 7)	p
L/E	0,22 ± 0,03	0,54 ± 0,09	0,008
PI+II/PI	2,62 ± 0,30	4,89 ± 1,00	0,026
PI/L	5,88 ± 0,77	3,77 ± 0,68	0,046
E/P	1,18 ± 0,23	2,45 ± 0,46	0,020

L/E - LEAK/ETS, poměr ukazující stupeň rozptáčení oxidace a fosforylace; P_{II}/P_I - OXPHOS při stimulaci komplexů I a II/OXPHOS při stimulaci komplexu I; PI/L - OXPHOS/LEAK, vzestup respirace po aplikaci substrátů komplexu I (glutamátu, malátu a pyruvátu) a ADP; E/P - poměr rovnováhy mezi kapacitou elektrontransportního systému a oxidací fosforylací, hodnoty výrazně vyšší než 1 ukazují na kontrolu respirace fosforylací.

syntázy oligomycinem snížila spotřebu kyslíku na úroveň nutnou především pro pumpování protonů do intermembránového prostoru. Tato hodnota byla signifikantně vyšší u astenozoospermatických vzorků. Rozptázení fosforylace a oxidace pomocí FCCP ukázalo, že ve zdravých i astenozoospermatických vzorcích je kapacita elektrontransportního systému přenášet elektrony vyšší než maximální spotřeba kyslíku při zachované fosforylací. Reziduální spotřeba kyslíku, na kterou byly ostatní respirační parametry korigovány, byla u zdravých spermii 0,14 ± 0,05 pmol O₂/(s.10⁶ buněk) a u spermii s poruchou pohyblivosti 0,15 ± 0,05 pmol O₂/(s.10⁶ buněk).

DISKUSE

Literární údaje o respirační aktivitě mitochondrií ve spermii jsou relativně chudé, nicméně již první studie ukazují, že poruchy mitochondrií mají vliv na motilitu spermii [8]. Důvodem je zejména malé množství mitochondrií obsažených v jednotlivých zárodečných buňkách a jejich obtížná izolace [25]. Proto je nutné stanovit mitochondriální respiraci na celých buňkách, ideálně tak, aby buňčná membrána byla permeabilizována a umožnila přestup substrátů Krebsova cyklu a adenosindifosfátu k mitochondriím. Dosud používaná metoda byla založena na inkubaci spermii v hypotonickém roztoku, která vedla k narušení buňčné membrány bez poškození membrány mitochondrií [24]. V somatických buňkách však inkubace v hypotonických médiích způsobuje stimulaci mnoha membránových iontových kanálů a receptorů, což vede ke změnám ve složení intracelulární tekutiny a aktivaci intracelulárních procesů včetně uvolňování řady biologicky účinných látek a apoptózy [3, 20]. Proto jsme v naší studii využili permeabilizace membrány spermii digitoninem, detergentem často využívaným ve výzkumu mitochondriální funkce na celých buňkách [22]. V naší práci jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermii permeabilizovaných digitoninem vyso-

koúčinnou oxygrafií, která umožňuje stanovení spotřeby kyslíku z nejmenšího možného množství zárodečných buněk.

Oxidativní fosforylací jakožto zdroji tvorby energie pro pohyb spermii byla dávana nezaštititelná role, proto se také předpokládalo, že poruchy mitochondriální morfologie a funkce jsou hlavním faktorem odpovídajícím za sníženou motilitu spermii [38]. Studie na myších ale ukázaly, že při poškozené oxidativní fosforylací nedochází k zániku motility u spermii [5] a zdrojem ATP je zejména přeměna glukózy na pyruvát [17]; také spermie králíků pravděpodobně využívají jako hlavní zdroj energie glykolýzu [33]. Spermie některých živočišných druhů dokonce dokážou vytvářet glykogen [10]. Samčí zárodečné buňky dalších živočišných druhů (beran, býk, kanec, primáti) včetně člověka však pro pohyb využívají ve významné míře ATP získané v mitochondriích oxidativní fosforylací [1, 18, 25]. Otázka primárního zdroje energie pro pohyb spermii ještě není zcela zodpovězena ani u člověka; všeobecně uznávaným pohledem je jejich všestrannost v možnosti získávání ATP, která je ovlivněna přítomností a dostupností substrátů v ženském reprodukčním ústrojí [28, 34].

Některé mitochondriální parametry, např. mitochondriální membránový potenciál měřený pomocí průtokové cytometrie, přímo koreluje s výsledky léčby neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce [16]. Další výzkum a detailnější studium této problematiky tak slibuje přínos pro další pokrok v diagnostice i terapii neplodnosti.

Naše studie potvrzuje nález snížené aktivity komplexu I v mitochondriálním respiračním systému astenozoospermatických vzorků. Aktivita komplexu II však nebyla astenozoospermii narušena a celková kapacita transportu elektronů při stimulaci komplexů I a II a zachované fosforylací (stav S3I+II) se mezi oběma skupinami nelišila. Zajímavým nálezem je také pravděpodobná zpětná kontrola přenosu elektronů fosforylací ADP u astenozoospermie, jak ukazuje poměr E/P, který

byl u méně pohyblivých spermií signifikantně vyšší (tab. 2). Důvodem pro snížení aktivity komplexu I tedy patrně není jeho snížená exprese. U asthenozoospermatických vzorků byl také prokázán signifikantně zvýšený stav LEAK (S4), který vyjadřuje stupeň mitochondriální oxidace nutně zejména pro kompenzaci úniku protonů z mitochondriální matrix, ale podílí se na něm i obrat kationtů přes vnitřní mitochondriální membránu [22]. Známým příkladem rozpáření respirace a fosforylace ADP je rozpřahovací protein hnědé tukové tkáně (UCP1), který je zodpovědný za tvorbu tepla v mitochondriích [27]. V lidských spermiích byla prokázána mRNA pro další rozpřahovací protein – UCP2, jehož role by mohla spočívat v ochraně před kyslíkovými radikály [40], ale jehož vztah k mitochondriální respiraci spermií nebyl dosud zkoumán.

ZÁVĚR

Lepší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých, či s postiženou motilitou, nám umožní lépe pochopit proces fyziologického oplodnění a zároveň pomůže i ve výběru té nevhodnější spermie pro léčbu neplodnosti asistovanou reprodukcí.

Tento projekt byl podpořen Programem rozvoje vědních oborů Karlovy univerzity (projekt P36), projektem OP VaVpl PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076, projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 266 802 a grantem GA UK 696212.

LITERATURA

1. Aitken, R.J., Ryan, A.L., Baker, M.A., et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36, 8, p. 994–1010.
2. Ankel-Simons, F., Cummins, J.M. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 24, p. 13859–13863.
3. Blum, A.E., Walsh, B.C., DUBYAK, G.R. Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptor-dependent ATP release from 1321NI astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298, 2, p. 386–396.
4. El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 2000, 275, 1, p. 223–228.
5. Escaller, D. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update*, 2006, 12, 4, p. 449–461.
6. Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem*, 1992, 30, 3, p. 279–280.
7. Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., et al. Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl*, 2008, 31, 3, p. 337–345.
8. Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., Zara, V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*, 2012, 79, 4, p. 809–814.
9. Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., et al. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*, 1993, 8, 11, p. 1863–1868.
10. Ford, W.C. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update*, 2006, 12, 3, p. 269–274.
11. Gnalger, E., Kuznetsov, A.V., Schneeberger, S., et al. Mitochondria in the cold. In: *Life in the Cold*. In: Heldmaier G, Klingenspor M. Heidelberg, Berlin, New York: Springer, 2000, p. 431–442.
12. Inaba, K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17, 8, p. 524–538.
13. Jansen, R.P., Burton, G.J. Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion*, 2004, 4, 5–6, p. 577–600.
14. Kao, S.H., Chao, H.T., Wei, Y.H. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4, 7, p. 657–666.
15. Katz, D.F., Vanagimachi, R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod*, 1980, 22, 4, p. 759–764.
16. Marchetti, P., Bailot, C., Jouy, N., et al. Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. *Andrologia*, 2012, 44, 2, p. 136–141.
17. Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett*, 2003, 554, 3, p. 342–346.
18. Mukai, C., Okuno, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, 2004, 71, 2, p. 540–547.
19. Mundy, A.J., Ryder, T.A., Edmonds, D.K. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod*, 1995, 10, 1, p. 116–119.
20. Okada, Y., Maeno, E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2001, 130, 3, p. 377–383.
21. Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., et al. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44, 2, p. 345–349.
22. Pesta, D., Gnalger, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*, 2012, 810, p. 25–58.
23. Plasecka, M., Kawiak, J. Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003, 41, 3, p. 125–139.
24. Plasecka, M., Gaczarzewicz, D., Laszczyńska, M., et al. Flow cytometry application in the assessment of sperm DNA integrity

- of men with asthenozoospermia. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, 45, Suppl. 1, p. 127-136.
25. **Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., et al.** The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*, 2012, 35, 2, p. 109-124.
26. **Rajender, S., Rahul, P., Mahdi, AA.** Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*, 2010, 10, 5, p. 419-428.
27. **Rousset, S., Alves-Guerra, MC., Mozo, J., et al.** The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 2004, 53, Suppl. 1, p. 130-135.
28. **Rutz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, MJ.** The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol*, 2007, 77, p. 3-19.
29. **Schelbye-Knudsen, M., Gulstorff, B.** Regulation of mitochondrial respiration by inorganic phosphate; comparing permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria prepared from type-1 and type-2 rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 2009, 105, 2, p. 279-287.
30. **Spiropoulos, J., Tumbuli, DM., Chinnery, PF.** Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod*, 2002, 8, 8, p. 719-721.
31. **Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., et al.** Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*, 2011, 34, 3, p. 247-255.
32. **St. John, JC., Sakkas, D., Barratt, CL.** A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl*, 2000, 21, 2, p. 189-199.
33. **Storey, BT., Kayne, FJ.** Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. *J Exp Zool*, 1980, 211, 3, p. 361-367.
34. **Storey, BT.** Mammalian sperm metabolisms: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol*, 2008, 52, 5-6, p. 427-437.
35. **Suarez, SS., Osman, RA.** Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod*, 1987, 36, 5, p. 1191-1198.
36. **Suarez, SS., Ho, HC.** Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2003, 49, 3, p. 351-356.
37. **Suarez, SS.** Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*, 2008, 14, 6, p. 647-657.
38. **Tumer, RM.** Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18, 1-2, p. 25-38.
39. **World Health Organization.** WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010, 287 p.
40. **Zhang, K., Shang, Y., Liao, S., et al.** Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360, 2, p. 327-332.

MUDr. Miroslava Čedíková

Ústav histologie a embryologie LF UK
Karlovarská 48
301 00 Plzeň
e-mail: miroslava.cedikova@lfp.cuni.cz

Příloha V

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, Michaela MIKLÍKOVÁ, Lenka STACHOVÁ, Martina GRUNDMANOVÁ, Zdeněk TŮMA, Václav VĚTVIČKA, Nicolas ZECH, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Jitka KUNCOVÁ. Effects of Czech propolis on sperm mitochondrial function. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, Vol. 2014, 10 pages. ISSN 1741-4288. Dostupné z doi: 10.1155/2014/248768. **IF₂₀₁₃ = 2,175**

Research Article

Effects of the Czech Propolis on Sperm Mitochondrial Function

Miroslava Cedikova,^{1,2} Michaela Miklikova,^{1,2} Lenka Stachova,³
Martina Grundmanova,⁴ Zdenek Tuma,^{2,5} Vaclav Vetvicka,⁶ Nicolas Zech,⁷
Milena Kralickova,^{1,2} and Jitka Kuncova^{2,4}

¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

² Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

³ Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁴ Department of Physiology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁵ 1st Internal Department, Faculty of Medicine and Teaching Hospital in Pilsen, Charles University in Prague, 301 00 Pilsen, Czech Republic

⁶ Department of Pathology, University of Louisville, Louisville, KY 40292, USA

⁷ IVF Centers Prof. Zech - Pilsen, 301 00 Pilsen, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Jitka Kuncova; jitka.kuncova@lfp.cuni.cz

Received 11 April 2014; Revised 2 June 2014; Accepted 6 June 2014; Published 1 July 2014

Academic Editor: Shi-Biao Wu

Copyright © 2014 Miroslava Cedikova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Propolis is a natural product that honeybees collect from various plants. It is known for its beneficial pharmacological effects. The aim of our study was to evaluate the impact of propolis on human sperm motility, mitochondrial respiratory activity, and membrane potential. Semen samples from 10 normozoospermic donors were processed according to the World Health Organization criteria. Propolis effects on the sperm motility and mitochondrial activity parameters were tested in the fresh ejaculate and purified spermatozoa. Propolis preserved progressive motility of spermatozoa in the native semen samples. Oxygen consumption determined in purified permeabilized spermatozoa by high-resolution respirometry in the presence of adenosine diphosphate and substrates of complex I and complex II (state OXPHOS_{I,II}) was significantly increased in the propolis-treated samples. Propolis also increased uncoupled respiration in the presence of rotenone (state ETS_{II}) and complex IV activity, but it did not influence state LEAK induced by oligomycin. Mitochondrial membrane potential was not affected by propolis. This study demonstrates that propolis maintains sperm motility in the native ejaculates and increases activities of mitochondrial respiratory complexes II and IV without affecting mitochondrial membrane potential. The data suggest that propolis improves the total mitochondrial respiratory efficiency in the human spermatozoa in vitro thereby having potential to improve sperm motility.

1. Introduction

Propolis (bee glue) is a natural product that honeybees (*Apis mellifera*) collect from various plants. It is used as building material (filling of cracks and gaps) or for protection against intruders (embalms killed invader insects) [1].

Propolis has been used as a remedy for thousands of years. The term is derived from Greek word *pro-* (meaning in front of) and *polis* (city, community). Its chemical composition depends on the place, time of collection, and plant sources

making it highly variable. To date, more than 300 compounds have been detected in various propolis extracts [2, 3]. It is composed mainly of resin (50%) and wax (30%). Other components are pollen (5%), essential and aromatic oils (10%), and minor compounds as flavonoids (quercetin, kaempferol, pinocembrin, apigenin, chrysin, etc.), beta-steroids, terpenes, minerals, and vitamins [1, 4–6]. Propolis is known in folk medicine for its pharmacological effects: antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic, anti-inflammatory, chemopreventive, immunomodulatory, hepatoprotective, antioxidant,

and antitumor [1, 7]. As a result of these effects, over the past 30 years, propolis has been the subject of intense medical studies.

Infertility affects 10–15% of couples of reproductive age and plenty of unanswered questions remain concerning the physiological mechanisms underlying the successful fertility [8]. Male factor contributes to about 50% of cases of infertility and most of them are still idiopathic [9]. More than 90% of male infertility cases are due to low sperm count (oligozoospermia), poor sperm motility (asthenozoospermia), abnormal sperm morphology (teratozoospermia), or all three. The remaining cases of male infertility can be caused by a number of factors including anatomical problems, hormonal imbalances, and genetic defects.

Appropriate sperm motility is fundamental for reproductive success in mammals since the spermatozoa have to travel a relatively long distance through the female reproductive system by active flagellar motion. The energy for the sperm movement in the form of adenosine triphosphate (ATP) is supplied by two metabolic processes: glycolysis taking place in the cytoplasm or oxidative phosphorylation in the mitochondria found only in the sperm midpiece, where 72–80 helically arranged organelles can be detected. However, the relative contributions of both pathways to the sperm motility in different species are a matter of long-standing debate [10, 11]. Nevertheless, recent experimental data suggest that reduced efficiency of the mitochondrial respiratory activity may contribute to the reduced sperm motility. In asthenozoospermic patients, morphological and functional changes in sperm mitochondria have been described [12, 13].

Until now, the effects of propolis on the mitochondrial morphology and function have been studied particularly in the somatic cells. However, the results of these studies are far from uniform showing both stimulation and inhibition of various mitochondrial functions including oxygen consumption, apoptosis, and mitochondrial membrane potential [14–17]. The aim of our study was to assess the effect of ethanolic extract of propolis (EEP) on the human sperm motility, mitochondrial respiratory activity, and membrane potential to test the putative therapeutic potential of this natural product in the treatment of asthenozoospermia.

2. Methods

2.1. Ethanolic Extract of Propolis Preparation. Propolis was collected using plastic nets in region of West Bohemia (Horní Slavkov—50° 8' 17.268" N, 12° 48' 48.992" E) in September 2012. Propolis was frozen at -20°C and ground in a mill. The resulting powder (10 g) was mixed at room temperature with 70% ethanol (100 mL) for 24 h and then filtered. The filtrate was then made up to 100 mL with 70% ethanol [18]. The sample was kept in darkness at 4°C until analysis. For experiments with live cells, propolis was further diluted resulting in a final ethanol concentration below 1% which is not toxic to cells [19]. The final concentration of propolis chosen for further experiments was 0.01 mg/mL of the corresponding medium.

2.2. High Performance Liquid Chromatography Analysis (HPLC). Qualitative and quantitative chromatographic analyses of phenolics were performed on a HPLC system equipped with a binary pump (Waters 1525), Waters 717 plus Autosampler, and dual UV/VIS detector 2487. Separation was performed on a Symmetry C18 column, particle size 5 μm (150 mm × 4.6 mm), using a mobile phase of 0.08% acetic acid in methanol (A) and 0.1% acetic acid and 10% methanol in water (B). The gradient was 10–47% A (25 min), 47% A (25–40 min), 47–70% A (40–70 min), and 70–100% A (70–80 min) at a flow rate of mobile phase 0.5 mL/min. Injection volume was 10 μL, and column temperature was 30°C.

Spectrophotometric detection was conducted at 280 nm and 330 nm. Identification of polyphenolic compounds was achieved by comparison of retention times with those of commercial pure compounds. All standards were dissolved in dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) to give 10 mmol/L standard solutions. Calibration standards were prepared by dilution of the standard solution in ethanol.

Quantitative analysis was carried out by external standard method. Calibration curves showed a linear response of $R^2 > 0.97$ over a concentration range of 5–100 μmol/L. Before the HPLC analysis, the EEP was filtered on teflon syringe microfilter Separon 0.45 μm. The propolis extract was diluted one hundred times for HPLC analysis.

Phenolic compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) (apigenin, chrysin, genistein, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, galangin and phenolic acids: caffeic, p-coumaric, t-ferulic, t-cinnamic, benzoic, and gallic acid and caffeic acid phenethyl ester). Vanillin was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.3. Sperm Sample Preparation. The study design was approved by the Local Ethics Committee of the University Hospital in Pilsen and a written informed consent was obtained from each of the 10 participants included in the study (mean age 24.2 years, SEM ± 2.8).

Ejaculates were collected after 3 days of sexual abstinence in IVF Center Prof. Zech, Pilsen. Semen samples were evaluated by an experienced employee. After liquefaction, they were analyzed according to the World Health Organization criteria 2010 [20]. We investigated semen volume and, under the microscope with phase-contrast optics at magnification ×200, concentration of spermatozoa, motility of spermatozoa and pathologies. Sperm motility was assessed at room temperature in Makler counting chamber. Two hundred spermatozoa per replicate were classified into three motility categories (progressive, nonprogressive, and immotile sperm cells). All samples were considered normozoospermic ejaculates (Table 1).

Fresh ejaculate (0.1 mL) was subjected to experiment with propolis. Propolis or ethanol only (1 μL) was added to 0.1 mL of fresh ejaculate (final concentration of propolis was 0.01 mg/mL) and sperm motility was evaluated after 60 minutes.

The remaining sample was prepared by gradient separation technique and used for experiment with polarographic oxygraph (Oroboros, Innsbruck, Austria) and sperm flow

TABLE 1: Main sperm parameters of the normozoospermic men (\pm SEM).

Parameters	Normozoospermic men ($n = 10$)
Volume (mL)	3.18 \pm 0.26
Concentration ($\times 10^6$ /mL)	81.22 \pm 13.97
Progressive motility (%)	62.5 \pm 4.4
Pathology morphology (%)	42.00 \pm 2.26
Concentration after separation ($\times 10^6$ /mL)	158.44 \pm 18.09
Progressive motility after separation (%)	86.43 \pm 2.10

cytometry evaluation. Sperm number after separation was also determined in the Makler counting chamber.

2.4. The Sperm Density Gradient Separation Technique. The sperm was separated and purified. This was performed using gradient solution media SpermGrad medium (SGM, Vitrolife, Sweden) and SpermRinse medium (SRM, Vitrolife, Sweden). SpermGrad medium was diluted to 90% (0.15 mL SGM: 1.35 mL SRM), 70% (0.09 mL SGM: 0.21 mL SRM) and 50% (0.15 mL SG: 0.15 mL SRM). Into a conical tube 1.5 mL 90%, 0.3 mL 70% and 0.3 mL of a 50% gradient media were layered. Full ejaculate was added and the sample was centrifuged for 20 minutes at 300 g. After removal of the supernatant, 8 mL SRM was added and then the sample was centrifuged 8 minutes at 300 g. After removal of supernatant, the sample was evaluated for the concentration and motility of spermatozoa and ready for injection into the oxygraph.

2.5. High-Resolution Respirometry. Oxygen consumption by purified spermatozoa was measured at 36°C in 2 mL glass chambers of oxygraph Oroboros (Oroboros, Innsbruck, Austria) connected to the computer with DatLab software for data acquisition and analysis (Oroboros, Innsbruck, Austria). The oxygen flux was calculated as a negative time derivative of the oxygen concentration. All values of oxygen fluxes were corrected for instrumental and chemical background measured in separate experiments performed in the same medium without human gametes.

The medium consisting of 0.5 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid, 3 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 60 mmol/L K-lactobionate, 20 mmol/L taurine, 10 mmol/L KH_2PO_4 , 20 mmol/L HEPES, 110 mmol/L sucrose, and 1 g/L albumin essentially fatty acid free [21] was stirred at 750 rpm and equilibrated for 60 min with air. After equilibration, oxygen concentration in the chamber corresponded to its concentration in the atmospheric air and solubility in the medium (0.92). The chambers were then closed and the samples of intact spermatozoa were injected into the chambers using Hamilton syringe. Into one of two chambers recording in parallel, propolis (0.01 mg/mL) was injected and the samples were further incubated at 36°C for 20 min. The spermatozoa cell membrane was permeabilized with digitonin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 5 μ g/mL) and combination of substrates, inhibitors, and uncouplers was

sequentially injected into the chambers to measure the respiration through different segments of the electron transport system (Figure 1). (1) Resting respiration with substrates providing electrons to complex I malate (2 mmol/L) and glutamate (10 mmol/L) was measured as a state S2 (non-phosphorylating LEAK state, L_N). (2) Active respiration was induced by 5 mmol/L adenosine diphosphate (ADP; state S3 or OXPHOS). (3) Oxygen consumption was further measured with pyruvate (5 mmol/L) and a substrate of electron transfer flavoprotein (ETF) palmitoyl carnitine (20 μ mol/L). (4) Integrity of the mitochondrial inner membrane was checked with cytochrome c (10 μ mol/L). (5) Mitochondrial respiration was then increased by succinate, complex II substrate (10 mmol/L). (6) State LEAK was induced again by inhibition of ATP-synthase oligomycin (2 μ g/mL). (7) Maximum capacity of the electron-transporting system (state S3u or ETS) was reached by titration of uncoupler trifluorocarbonyl cyanide phenylhydrazide (FCCP; 0.05 μ mol/L titration steps). (8) After addition of a complex I inhibitor rotenone, the oxygen flux corresponded to maximum capacity of the electron-transporting system with the complex II only. (9) Then, antimycin A (2.5 μ mol/L), a complex III inhibitor was injected into the chambers to measure residual oxygen consumption (ROX). (10) N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD; 0.5 mmol/L) and ascorbate (2 mmol/L) were injected simultaneously for respirometric assay for cytochrome c oxidase (C IV) activity. In the results, oxygen fluxes recorded in the individual titration steps were corrected for residual oxygen consumption.

The dose-response relationship between the propolis concentration and sperm respiratory activity was tested in another set of experiments, where the final concentrations of propolis 0.001, 0.005, and 0.01 mg/mL were used. Higher dose of propolis was not tested as in experiments running in parallel, higher concentrations of propolis in the incubation medium (0.03 and 0.05 mg/mL) were toxic for mouse embryonic stem cells reducing their growth, survival, and proliferation (unpublished observation).

2.6. Permeability of Cell Membrane in Sperm. Sperm was treated with the impermeable fluorescent dye propidium iodide to check cell membrane permeability for substrates, inhibitors, and uncouplers after treatment by digitonin. Final concentration of propidium iodide was 1 μ g/mL.

2.7. Sperm Flow Cytometry Evaluation. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was determined with MitoProbe JC-1 Assay Kit (Life Technologies). Each sperm sample was resuspended in 37°C warm phosphate-buffered saline (PBS) at approximately 1×10^6 cells/mL. Propolis (1 μ L) was added to test samples (100 μ L) to reach final concentration 0.01 mg/mL. Controls remained without intervention. Samples were incubated in propolis for 60 min and after that were washed with PBS. JC-1 (10 μ L of 200 μ mol/L) was added for 20 min incubation (37°C, 5% CO_2). Wash with PBS followed (5 min, 1500 rpm). Samples were resuspended in 500 μ L PBS and measured on BD FACS CANTO II cytometer (BD Biosciences, New Jersey, USA). Analysis was performed with BD FACS Diva software with 488 nm excitation using

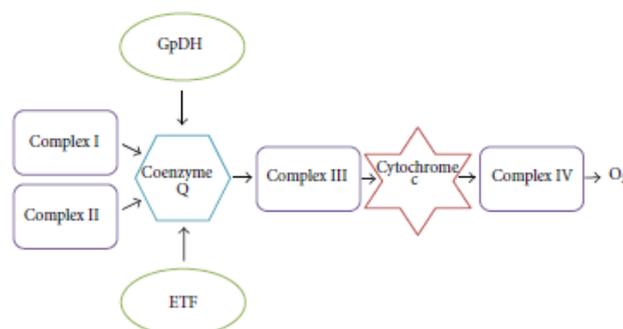


FIGURE 1: A scheme of an electrotransport convergent system. System is situated on the inner mitochondrial membrane. GpDH = glucose-6-phosphate dehydrogenase; complex I = NADH-Q reductase; complex II = succinate-Q oxidoreductase; complex III = cytochrome reductase; complex IV = cytochrome oxidase; ETF = electron-transporting flavoprotein; O_2 = oxygen.

emission filters appropriate for Alexa Fluor 488 dye and R-phycoerythrin.

2.8. Citrate Synthase Activity. Mitochondrial content in the samples aspirated from each oxygraph chamber was assayed by determination of the citrate synthase activity [22, 23]. The assay medium consisted of 0.1 mmol/L 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid, 0.25% Triton-X, 0.5 mmol/L oxalacetate, 0.31 mmol/L acetyl coenzyme A, 5 μ mol/L EDTA, 5 mmol/L triethanolamine hydrochloride, and 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.1 [22]. Two hundred microliters of the mixed and homogenized chamber content was added to 800 μ L of the medium. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 412 nm and 30°C over 200 s and expressed in mIU per 10^7 cells.

2.9. Data Analysis and Statistics. Results are presented as mean \pm SEM. Statistical differences were analyzed using software package STATISTICA Cz, 8 (StatSoft Inc., Prague, Czech Republic). After testing for the normality of distribution and homogeneity of variances, comparisons were made using Student's *t*-test, Wilcoxon signed-rank test and analysis of variance (ANOVA) with post hoc tests corrected for multiple comparisons by Bonferroni's method. The results were considered significantly different when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. HPLC Analysis. Analyzing the propolis by the HPLC, we were able to identify compounds as *t*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, vanillin, caffeic acid, *t*-cinnamic acid, kaempferol, apigenin, and chrysin. Although we analyzed standards of gallic acid, benzoic acid, quercetin, naringenin, luteolin, genistein, pinocembrin, galangin, and caffeic acid phenethyl ester, they were not identified in our propolis sample. Chromatogram of ethanolic extract of the Czech propolis is presented in Figure 2. Detailed results with concentrations of observed substances are shown in Table 2.

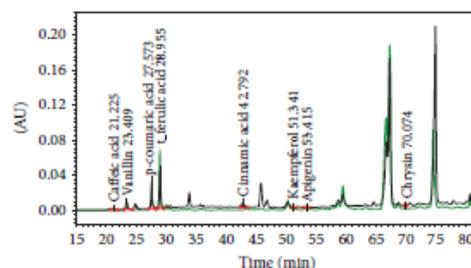


FIGURE 2: HPLC chromatogram of the Czech propolis extract and the identified compounds/retention time ($\lambda = 280$ nm—black line and $\lambda = 330$ nm—green line).

3.2. Semen Parameters and Effect of Propolis on Sperm Motility in Fresh Ejaculate. Ten healthy men were included in this study. The mean age was 24.2 years. The general sperm characteristic of the normozoospermic men after ejaculation is shown in Table 1. The effect of propolis on human sperm motility after incubation for 60 minutes is presented in Figure 3. Propolis preserved the progressive motility of spermatozoa in the native semen samples, since the percentage of the progressively motile spermatozoa after incubation with propolis remained nearly the same as in the fresh samples, whereas in the ejaculates without propolis, the progressive motility significantly declined with time ($P = 0.028$). Ethanol alone had no negative effect on sperm motility.

3.3. High Resolution Respirometry. Representative traces of the oxygen consumption in permeabilized spermatozoa with and without propolis 0.01 mg/mL are depicted in Figure 4. Oxygen consumption of intact spermatozoa (0.13 ± 0.01 nmol/(s-IU)) was significantly enhanced by propolis (0.27 ± 0.03 nmol/(s-IU); $P = 0.006$). After permeabilization with digitonin, state 2 determined in the presence of malate

TABLE 2: Analysis of the ethanolic extract of propolis by the HPLC.

Compound	Rt [min]	Concentration [mg/L of EEP]
Gallic acid	6.0	n.d.
Caffeic acid	21.2	65 ± 11
Vanillin	23.4	65 ± 11
p-Coumaric acid	27.5	231 ± 10
t-Ferulic acid	28.9	514 ± 15
Benzoic acid	33.6	n.d.
Quercetin	42.3	n.d.
t-Cinnamic acid	42.7	29 ± 1
Naringenin	43.2	n.d.
Luteolin	44.7	n.d.
Genistein	45.6	n.d.
Kaempferol	51.3	101 ± 45
Apigenin	53.4	73 ± 8
Chrysin	70.0	36 ± 5
Pinocembrin	65.1	n.d.
Galangin	73.1	n.d.
CAPE	71.4	n.d.

(n.d. = nondetected; CAPE = caffeic acid phenethyl ester).

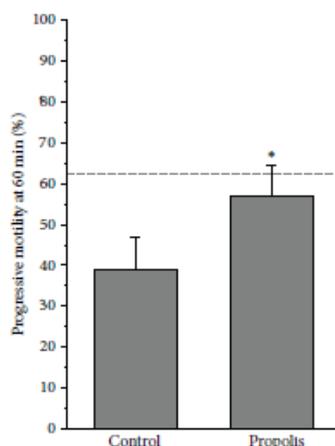


FIGURE 3: Effect of propolis on sperm motility. Columns represent progressive motility of spermatozoa in native ejaculates after 60 min incubation with propolis extract (mean ± SEM). Dashed line = progressive motility at time 0. * $P < 0.05$, compared to the respective control value.

and glutamate was 0.19 ± 0.04 nmol/(s-IU) in the control samples and it was significantly higher in the propolis-treated sperm samples (0.29 ± 0.05 nmol/(s-IU); $P = 0.014$). State 3, that is, oxygen consumption during oxidative phosphorylation, determined in the presence of ADP and substrates of the complex I, ETF, and complex II is depicted in Figure 5. Propolis significantly increased (by ~50%) $S_{3,II}$ oxygen flux ($P = 0.003$) suggesting increased activity of the complex II. Propolis did not influence state 4 induced by oligomycin that

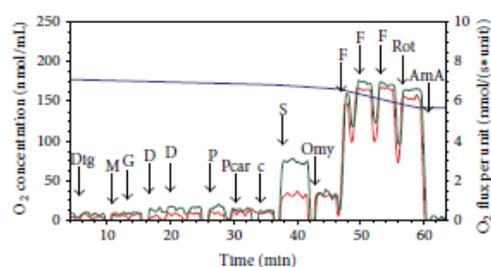


FIGURE 4: Substrate-uncoupler-inhibitor titration protocol in human spermatozoa. Substrate-uncoupler-inhibitor titration (SUIT) protocol with substrates for complex I, complex II, and electron-transferring flavoprotein (ETF) in human spermatozoa. Red line = oxygen flux expressed per IU citrate synthase activity in the control sample, green line = oxygen flux expressed per IU citrate synthase activity in the sample treated with propolis 0.01 mg/mL, and blue line = oxygen concentration in the oxygraph chamber. Dig = digitonin, M = malate, G = glutamate, D = ADP, P = pyruvate, Pcar = palmitoylcarnitine, c = cytochrome c, S = succinate, Omy = oligomycin, F = FCCP, Rot = rotenone, and AmA = antimycin A.

reached 0.81 ± 0.07 and 0.94 ± 0.09 nmol/(s-IU) in the control and propolis-treated spermatozoa, respectively. Maximum capacity of the electron-transporting system (state S_{3u}) tested for both complexes I and II and in the presence of the complex I inhibitor rotenone was significantly higher after propolis administration (Figure 6). In measurements with TMPD + ascorbate, complex IV respiration was 12.16 ± 2.58 nmol O_2 /(s-IU) in the control samples and it was significantly enhanced by propolis to 15.4 ± 3.19 nmol O_2 /(s-IU). Absolute ethanol alone (medium for propolis, oligomycin, antimycin A, FCCP, and rotenone) in the volume up to $10 \mu\text{L}$ did not influence respirometric parameters measured with substrates of complexes I, II, and ETF in the presence of ADP.

Flux control ratios were calculated to estimate the relative efficiency of individual interventions and coupling state of the sperm mitochondria. The ratio $\text{OXPHOS}_{I+II}/\text{OXPHOS}_I$ was significantly higher in the propolis-treated samples (3.53 ± 0.42) compared to controls (2.8 ± 0.28) suggesting increased efficiency of coupled respiration when complex II was stimulated by succinate. The LEAK control ratio is the ratio of LEAK respiration and ETS capacity; it reached 0.25 ± 0.02 in the control samples and it significantly decreased after propolis to 0.21 ± 0.02 ($P = 0.024$).

The dose-response relationship tested in separate experiments is shown in Figure 7 for state S_3 (OXPHOS), where glutamate, malate, pyruvate, succinate, and ADP were present in the medium, and for state S_{3u} (ETS), where mitochondria were uncoupled by FCCP. Propolis dose-dependently increased oxygen consumption, although the extent of its effect was greater for state S_3 than for state S_{3u} .

3.4. Permeability of Cell Membrane in Sperm. Addition of $5 \mu\text{g/mL}$ of digitonin made the sperm cell membrane permeable to dye propidium iodide and for the substrates,

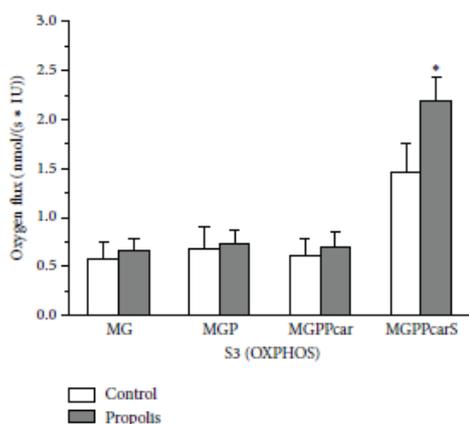


FIGURE 5: Oxygen consumption rates in the state S3 (OXPHOS) measured under control conditions and with propolis. Oxygen consumption rates in the state S3 (OXPHOS) measured under control conditions (control) and with propolis extract added (propolis) in the presence of ADP and substrates providing electrons to complex I, ETE, and complex II. M = malate, G = glutamate, P = pyruvate, Pcar = palmitoylcarnitine, and S = succinate. Oxygen fluxes were corrected for residual oxygen consumption and expressed per IU citrate synthase activity. * $P < 0.05$, compared to the respective control value.

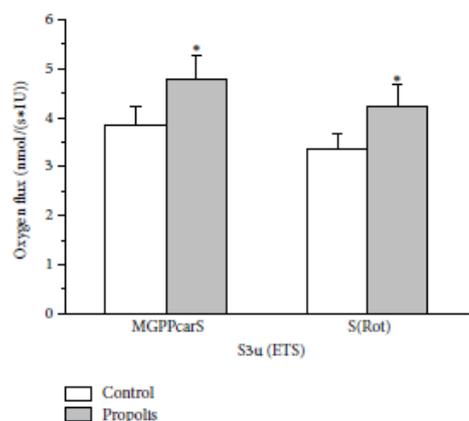


FIGURE 6: Oxygen consumption rates in the state S3u in permeabilized spermatozoa. Oxygen consumption rates in the state S3u (ETS) in permeabilized spermatozoa measured under control conditions (control) and with propolis extract added (propolis) in the presence of FCCP and substrates providing electrons to complex I, ETE, and complex II. M = malate, G = glutamate, P = pyruvate, Pcar = palmitoylcarnitine, S = succinate, and complex I inhibitor rotenone (Rot). Oxygen fluxes were corrected for residual oxygen consumption and expressed per IU citrate synthase activity. * $P < 0.05$, compared to the respective control value.

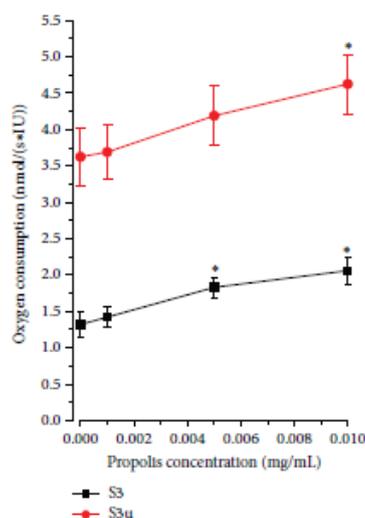


FIGURE 7: Dose response relationship between oxygen consumption and final propolis concentration. State S3 (OXPHOS) = oxygen consumption rate in permeabilized spermatozoa measured with malate, glutamate, pyruvate, succinate, and ADP. State S3u = oxygen consumption rate in permeabilized spermatozoa measured after sequential addition of malate, glutamate, ADP, pyruvate, succinate, and FCCP. Oxygen fluxes were corrected for residual oxygen consumption and expressed per IU citrate synthase activity. * $P < 0.05$, compared to the respective value without propolis.

inhibitors, and uncouplers required to determine high resolution respirometry (Figure 8).

3.5. Sperm Flow Cytometry Evaluation. Depolarization of the mitochondrial membrane is a sensitive indicator of mitochondrial damage. JC-1 is a membrane-permeable fluorescent probe aggregating in the mitochondrial matrix and then emitting red fluorescence, if $\Delta\Psi_m$ is high. In case of mitochondrial depolarization, the monomeric form of JC-1 cannot accumulate in the mitochondrial matrix and produce green fluorescence in the cytoplasm. In the spermatozoa, loss of $\Delta\Psi_m$ could serve as a marker of early apoptosis and sperm dysfunction [24]. In our experiments, incubation of the sperm samples with propolis (60 minutes) had no significant effect on $\Delta\Psi_m$ (Figure 9). In the control samples, the percentage of cells with high $\Delta\Psi_m$ was $98.43 \pm 1.07\%$ and it even slightly increased in the propolis-treated spermatozoa reaching $99.33 \pm 0.25\%$.

3.6. Citrate Synthase Activity. In the control samples, citrate synthase activity was 6.58 ± 0.84 mIU/ 10^7 cells and it was not significantly affected by propolis (6.08 ± 0.84 mIU/ 10^7 cells) and by the substances (substrates, inhibitors, media) added during the respirometric measurements, as tested in separate controls.

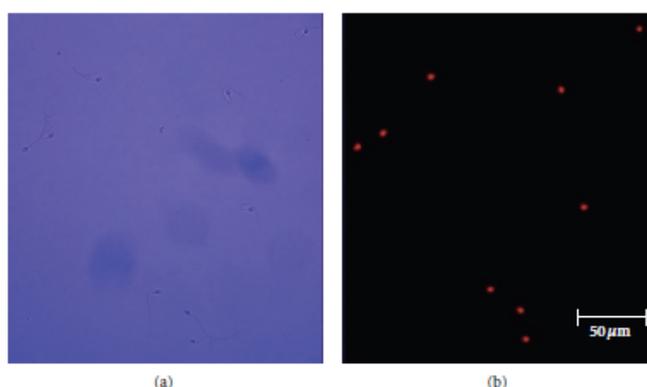


FIGURE 8: Effect of digitonin treatment on spermatozoa. (a) Micrograph of human spermatozoa and (b) fluorescent micrograph of the same optical field after treatment with the nonpermeable nuclear dye propidium iodide.

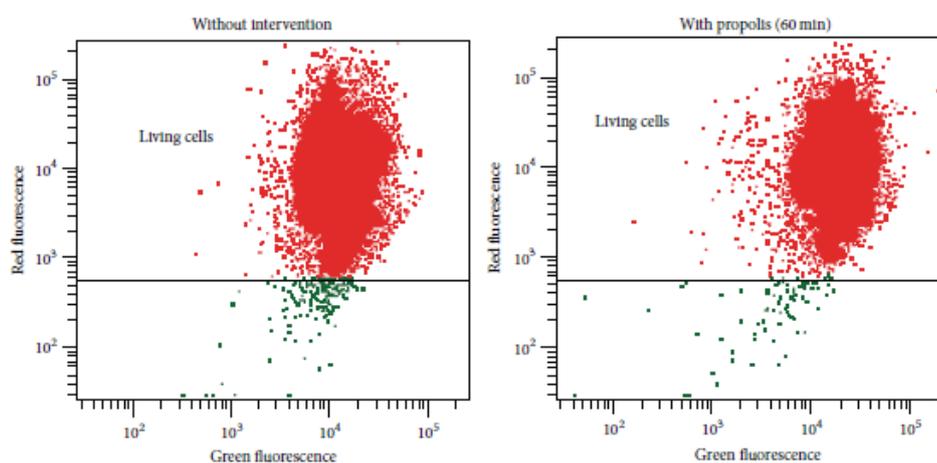


FIGURE 9: Typical double fluorescence dot plots of flow cytometry analysis. Mitochondrial membrane potential was determined with MitoProbe JC-1 Assay Kit (Life Technologies). R-phycoerythrin = red fluorescence, normal cells; Alexa Fluor 488 dye = green fluorescence, reduced mitochondrial membrane potential.

4. Discussion

This is the first study showing chemical composition of propolis collected in the Czech Republic. Bee glue has a very complex chemical composition that depends on a number of factors including diversity of plants and geographical location from which bees collect it. Although the region of collection of the tested sample of propolis is situated in the northern temperate zone where the “poplar” type propolis is a typical bee product [3], the tree structure within the mentioned locality is composed of coniferous trees (90%), birch (6%), alder (2%), beech (1%), and oak (1%) [25]. However, the tested sample contained chrysin,

the reference flavonoid in poplar propolis, and phenolic acids and other flavonoids typically found in bee glue extracts originating from similar geographical regions and reported to be responsible for various beneficial effects of propolis [26]. Among them, ferulic acid, coumaric acid, and kaempferol were present in the highest concentrations in the Czech propolis extract. Caffeic acid phenethyl ester, naringenin, and quercetin—substances frequently contained in the poplar propolis [2, 3] and widely tested for their anti-inflammatory, anticancer, and antioxidant activities in recent years [27]—have not been detected in the Czech propolis. The factors that could contribute to the above mentioned differences could include not only diversity of plant species growing around

the hive, but also season, illumination, altitude, collector type, and food availability [28]. It should be noted that the search for a single substance or a particular substance class that could be responsible for the beneficial actions of propolis has not been successful to date. Scientific studies demonstrated that biological activity of propolis could be almost identical (i.e., antimicrobial, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, etc.) in samples from different climatic zones and of completely different chemical composition [3]. Most probably, a combination of substances is essential for the biological activity of bee glue [29].

The present study describes the effects of propolis on the sperm motility, mitochondrial membrane potential, and mitochondrial respiratory activity assessed by high-resolution respirometry allowing determination of individual respiratory states in a sequential manner on the same sample, thus allowing complex evaluation of the mitochondrial function close to the situation *in vivo*. In addition, high sensitivity of the method enables determination of respirometric activity of individual mitochondrial complexes in a relatively small amount of cells [30]. In our experiments, we have used the purified spermatozoa that were subjected to membrane permeabilization by mild nonionic detergent digitonin, the dose of which was carefully titrated to permeabilize the cell membrane without damaging the mitochondrial function. To date, oxygen consumption by human sperm mitochondria has been determined mostly by traditional oxygraphy in the germ cells subjected to hypotonic swelling [13, 31–33]. However, in the spermatozoa of several mammalian species, hypotonic challenge could substantially influence the activity of various protein kinases (PK), including PKA, PKC, and protein-tyrosine kinase via osmosensitive K^+ and Cl^- channels in the process called regulatory volume decrease requiring energy supply [34].

The major finding of the present study is that propolis enhances the activity of mitochondrial respiratory complexes II and IV without affecting the coupling of the electron transport to ATP synthesis and/or mitochondrial membrane potential in permeabilized human spermatozoa *in vitro*. In the coupled state, propolis enhanced oxygen consumption with complex I and complex II substrates by ~50%. This increase was attributed to complex II, since the activity of complex I alone was not affected by propolis. In addition, the ratio P_{1+II}/P_I was significantly higher in the propolis-treated samples. Similarly, in the uncoupled state (S3u, E), oxygen consumption was significantly (by ~25%) higher after propolis, both in the presence of substrates of complexes I and II and after inhibition of complex I by rotenone. Activity of the complex IV was increased to the same extent (~27%).

The data available on the effects of propolis and its major compounds on mitochondrial respiration or activity of individual mitochondrial enzymes involved in the electron-transport convergent system are scarce. The most frequent finding is that this effect is negligible in normal somatic cells (cardiomyocytes, neurons, and hepatocytes), but becomes beneficial in the cells challenged by toxic stimuli where oxidative phosphorylation is compromised [16, 35, 36]. In contrast, in various types of tumor cells, propolis extract or its constituents inhibit oxidative phosphorylation and trigger

release of cytochrome c and subsequent apoptosis [15, 17]. In view of this, the action of propolis on the cellular respiration is not easily predictable and depends on the cell type.

Some studies suggested that propolis or its phenolic constituents might influence mitochondrial membrane potential via increased permeability of the inner mitochondrial membrane [14]. This issue was addressed in the experiments with MitoProbe JC-1 Assay Kit that clearly showed that in the human spermatozoa, mitochondrial membrane potential was not affected by propolis. In addition, oligomycin-induced respiratory state (LEAK) that reflects compensation for the proton leak, proton slip, electron slip, and cation cycling [30] was not affected by propolis. Thus, the decrease in the LEAK control ratio after propolis could be attributed to the increased efficiency of the electron transport through complex II. The putative molecular mechanism of complex II activation was suggested in study of Cimen et al. [37], where propolis constituent kaempferol increased deacetylation of succinate dehydrogenase thus increasing its activity.

To date, the effects of propolis or propolis compounds on the sperm characteristics have been rarely studied. The whole propolis extract was used in studies conducted by Yousef and collaborators on rats and rabbits that were treated with propolis for 10 to 12 weeks [38, 39]. Administration of propolis resulted in an increased sperm count and motility, plasma testosterone levels, and a decreased dead and abnormal sperm count. A single study documented positive effect of the propolis compound chrysin on the sperm motility, sperm concentration, and serum testosterone levels [40]. Ferulic acid was also reported to enhance sperm motility and viability [41]. All these findings were attributed to the activity of propolis as antioxidant and none of these studies dealt with the action of propolis or its constituents on mitochondrial energy production. Our study describes a novel beneficial effect of propolis on the sperm characteristics.

Recent experimental evidence suggests that oxidative phosphorylation in the human spermatozoa plays a crucial role in gaining energy for the sperm motility and indicates that asthenozoospermia might be related to the impaired mitochondrial functionality [42]. High-resolution respirometry could provide new data in search for substances that could positively affect human sperm motility and thus improve sperm fertilizing ability. In addition, detailed analysis of respiratory efficiency of individual mitochondrial enzymatic complexes under coupled and uncoupled conditions could provide better insight into pathophysiology of asthenozoospermia.

5. Conclusions

This study demonstrates, for the first time, that ethanolic extract of propolis increases activities of mitochondrial respiratory complexes II and IV without affecting mitochondrial membrane potential. The obtained data suggest that propolis improves the total mitochondrial respiratory efficiency in the human spermatozoa *in vitro* thereby having potential to improve the sperm motility.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Miroslava Cedikova and Jitka Kuncova contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was supported by the Project ED2.1.00/03.0076 from European Regional Development Fund, the Charles University Research Fund (Project no. P36), the Specific Student Research Project no. 260048/2014 of the Charles University in Prague and by the Grant from Charles University Grant Agency no. 969212.

References

- [1] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez, "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly," *Journal of Food Science*, vol. 73, no. 9, pp. R117–R124, 2008.
- [2] V. Bankova, M. Popova, S. Bogdanov, and A. G. Sabatini, "Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results," *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, vol. 57, no. 5–6, pp. 530–533, 2002.
- [3] V. Bankova, "Chemical diversity of propolis and the problem of standardization," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, no. 1–2, pp. 114–117, 2005.
- [4] A. Russo, R. Longo, and A. Vanella, "Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin," *Fitoterapia*, vol. 73, supplement 1, pp. S21–S29, 2002.
- [5] A. M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, "Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 4, pp. 1220–1234, 2006.
- [6] M. L. Khalil, "Biological activity of bee propolis in health and disease," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 7, no. 1, pp. 22–31, 2006.
- [7] A. H. Banskota, Y. Tezuka, and S. Kadota, "Recent progress in pharmacological research of propolis," *Phytotherapy Research*, vol. 15, no. 7, pp. 561–571, 2001.
- [8] M. Králíková, P. Sima, and Z. Rokyta, "Role of the leukemia-inhibitory factor gene mutations in infertile women: the embryo-endometrial cytokine cross talk during implantation—a delicate homeostatic equilibrium," *Folia Microbiologica*, vol. 50, no. 3, pp. 179–186, 2005.
- [9] J. C. St. John, D. Sakkas, and C. L. R. Barratt, "A role for mitochondrial DNA and sperm survival," *Journal of Andrology*, vol. 21, no. 2, pp. 189–199, 2000.
- [10] W. C. L. Ford, "Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?" *Human Reproduction Update*, vol. 12, no. 3, pp. 269–274, 2006.
- [11] R. M. Turner, "Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 18, no. 1–2, pp. 25–38, 2006.
- [12] V. Y. Rawe, R. Hermes, F. N. Nodar, G. Fiszbajn, and H. E. Chemes, "Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia," *Fertility and Sterility*, vol. 88, no. 3, pp. 649–653, 2007.
- [13] A. Ferramosca, R. Focarelli, P. Piomboni, I. Coppola, and V. Zara, "Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency," *International Journal of Andrology*, vol. 31, no. 3, pp. 337–345, 2008.
- [14] S. Das, J. Das, A. Samadder, N. Boujedaini, and A. R. Khuda-Bukhsh, "Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 237, no. 12, pp. 1433–1448, 2012.
- [15] V. Chen, R. E. Staub, S. Baggett et al., "Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract Bezielle," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 1, Article ID e30107, 2012.
- [16] R. Lagoa, I. Graziani, C. Lopez-Sanchez, V. Garcia-Martinez, and C. Gutierrez-Merino, "Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1807, no. 12, pp. 1562–1572, 2011.
- [17] R. D. Yeh, J. C. Chen, T. Y. Lai et al., "Gallic acid induces G₀/G₁ phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway," *Anticancer Research*, vol. 31, no. 9, pp. 2821–2832, 2011.
- [18] J. S. Bonvehí and A. L. Gutiérrez, "The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain)," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 4, pp. 1351–1358, 2012.
- [19] M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić et al., "Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 3, pp. 772–778, 2011.
- [20] WHO, "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen," 2010, <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>.
- [21] E. Gnaiger, G. Méndez, and S. C. Hand, "High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 20, pp. 11080–11085, 2000.
- [22] A. V. Kuznetsov, D. Strobl, E. Ruttman, A. Königsrainer, R. Margreiter, and E. Gnaiger, "Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver," *Analytical Biochemistry*, vol. 305, no. 2, pp. 186–194, 2002.
- [23] S. Larsen, J. Nielsen, C. N. Hansen et al., "Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects," *The Journal of Physiology*, vol. 590, no. 14, pp. 3349–3360, 2012.
- [24] G. Barroso, S. Taylor, M. Morshedi, F. Manzur, E. Gaviño, and S. Oehninger, "Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations," *Fertility and Sterility*, vol. 85, no. 1, pp. 149–154, 2006.
- [25] Č. R. Lesy, s. p., <http://www.lesycr.cz/ls229/charakteristika-lesni-spravy/Stranky/default.aspx>.
- [26] R. D. Wojtyczka, A. Dziedzic, D. Idzik et al., "Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone

- or in combination with antimicrobial drugs," *Molecules*, vol. 18, no. 8, pp. 9623–9640, 2013.
- [27] G. Ozturk, Z. Giris, S. Akyol, G. Erden, A. Gurel, and O. Akyol, "The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 16, no. 15, pp. 2064–2068, 2012.
- [28] V. C. Toreti, H. H. Sato, G. M. Pastore, and Y. K. Park, "Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 697390, 13 pages, 2013.
- [29] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, and S. Popov, "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64, no. 3, pp. 235–240, 1999.
- [30] D. Pesta and E. Gnaiger, "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle," *Methods in Molecular Biology*, vol. 810, pp. 25–58, 2012.
- [31] M. Piasecka and J. Kawiak, "Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: Morphological and functional study," *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol. 41, no. 3, pp. 125–139, 2003.
- [32] M. Piasecka, M. Laszczyńska, and D. Gaczarzewicz, "Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenoteratozoospermia," *Folia Morphologica*, vol. 62, no. 4, pp. 479–481, 2003.
- [33] A. Stendardi, R. Focarelli, P. Piomboni et al., "Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa," *International Journal of Andrology*, vol. 34, no. 3, pp. 247–255, 2011.
- [34] A. M. Petrunkina, R. A. P. Harrison, M. Tsoolova, E. Jebe, and E. Töpfer-Petersen, "Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume," *Reproduction*, vol. 133, no. 1, pp. 61–73, 2007.
- [35] R. Barros Silva, N. A. G. Santos, N. M. Martins et al., "Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats," *Neuroscience*, vol. 233, pp. 86–94, 2013.
- [36] K. S. Kumaran and P. S. M. Prince, "Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 15, no. 6, pp. 791–806, 2010.
- [37] H. Cimen, M. J. Han, Y. Yang, Q. Tong, H. Koc, and E. C. Koc, "Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria," *Biochemistry*, vol. 49, no. 2, pp. 304–311, 2010.
- [38] M. I. Yousef and A. F. Salama, "Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 6, pp. 1168–1175, 2009.
- [39] M. I. Yousef, K. I. Kamel, M. S. Hassan, and A. M. A. El-Morsy, "Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 7, pp. 1846–1852, 2010.
- [40] O. Ciftci, I. Ozdemir, M. Aydin, and A. Beytur, "Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats," *Andrologia*, vol. 44, no. 3, pp. 181–186, 2012.
- [41] R. Zheng and H. Zhang, "Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 22, no. 4, pp. 581–586, 1997.
- [42] A. Ferramosca, S. P. Provenzano, L. Coppola, and V. Zara, "Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility," *Urology*, vol. 79, no. 4, pp. 809–814, 2012.

Příloha VI

ČEDÍKOVÁ, M., Z. ULČOVÁ-GALLOVÁ, K. BIBKOVÁ and Z. MIČANOVÁ. The incidence of latent asymptomatic celiac disease in women with decreased fertility. *Ceska*

Gynekol. 2013, Vol. 78, No. 3, pp. 247-51. ISSN 1210-7832.

Výskyt latentní asymptomatické celiakie u žen se sníženou plodností

The incidence of latent asymptomatic celiac disease in women with decreased fertility

Čedíková M.¹, Ulčová-Gallová Z.^{2,3}, Bibková K.³, Mičanová Z.³

¹Ústav histologie a embryologie LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

²Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, přednostka doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

³Genetika-Plzeň, s.r.o., ředitel MUDr. P. Lošan

ABSTRACT

Objective: To determine whether patients with recurrent spontaneous abortions and IVF suffer from latent celiac disease.

Design: Perspective study.

Settings: Department of Gynecology and Obstetrics and Faculty Hospital, Charles University, Pilsen.

Material and methods: Sera from 442 infertile patients aged 23–47 years and 86 healthy fertile controls aged 22–38 years were examined by commercial ELISA sets for the presence (absence) of antibodies against gliadin IgG, IgA and tissue transglutaminase in IgG and IgA.

Results: We found a statistically significant difference between the control group and patients with decreased

fertility. They have a positive values in anti-tissue transglutaminase IgA ($p = 0.0096$). Frequent, very low positive reaction of anti-gliadin IgG was also found in the control group of women.

Conclusion: Patients with unexplained repeated miscarriages and repeated unsuccessful IVF with IgA positive tissue transglutaminase have new complement of other tests for autoimmunity and examination of a total IgA, and gastroenterological examination. Eleven patients with significant positive anti-tissue transglutaminase IgA were successfully conceived only under strict gluten-free diet.

KEYWORDS

infertility – celiac disease – antibodies – gliadin – tissue transglutaminase

SOUHRN

Cíl studie: Zjistit, zda pacientky s opakovanými potraty a opakovanými IVF netrpí také latentní asymptomatickou celiakií.

Typ studie: Perspektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, a Genetika, Plzeň.

Metodiky: Séra 442 pacientek ve věku 23–47 let se sníženou plodností a 86 zdravých fertálních kontrol ve věku 22–38 let jsme vyšetřili komerčními ELISA sety na přítomnost (nepřítomnost) protilátek proti gliadinu IgG, IgA a tkáňové transglutamináze v IgG a IgA.

Výsledky: Prokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a pacientkami se sníženou

plodností v pozitivních hodnotách tkáňové transglutaminázy v IgA ($p = 0,0096$). Častější, lehce pozitivní reakci anti-gliadinových protilátek v IgG jsme našli i u kontrolní skupiny žen.

Závěr: U opakovaně potrácejících pacientek a žen po opakovaných, doposud neúspěšných IVF s pozitivními hodnotami tkáňové transglutaminázy IgA doplňujeme další vyšetření celkového IgA a konzultaci u gastroenterologa. Jedenáct pacientek s výraznou pozitivitou proti tkáňové transglutamináze v IgA úspěšně otěhotnělo jen za přísné bezlepkové diety.

KLÍČOVÁ SLOVA

infertilita – celiakie – protilátky proti gliadinu – protilátky proti tkáňové transglutamináze

Čes. Gynek., 2013, 78, č. 3, s. 247–251

ÚVOD

Celiakie (CD) nebo glutenová (lepková) nesnášenlivost (glutenová enteropatie) patří mezi autoimunitní dědičná onemocnění tenkého střeva. Bílkovina obilí, lepek, pak způsobuje autoimunitní zánět střevní sliznice. Bez léčby - diety sliznice střeva postupně atrofuje a má sníženou absorpční schopnost. Odstranění lepku ze stravy vede k úplné remisi onemocnění. Pacientky doposud bez klinických známek tohoto autoimunitního onemocnění mohou opakovaně potráčet nebo rodit hypotrofitické plody. Již dříve bylo prokázáno (např. 1-6, 9, 10, 19, 23, 27-29), že glutenovou intoleranci způsobují proteiny z obilovin - glutenin a prolamin; studie [22] molekulárně-geneticky a imunologicky analyzuje glutenové proteiny z různých obilovin a rozebírá jejich odlišnosti ve vztahu k autoimunitní reakci a CD. Ze současného písemnictví (např. 8, 17, 18, 21) vyplývá, že v Evropě a Severní Americe je prevalence CD 1:100 a 1:300, v samotné České republice se odhaduje na 0,5 %. Bylo však také prokázáno [19, 24], že nemocní s CD mají genetickou predispozici v podobě HLA I. třídy B8, HLA II. třídy DQ2, DQ8, DQw2 velmi často spojenou s dalším autoimunitním onemocněním (např. 11, 14, 15, 25, 26). Příznaky CD jsou velmi různé, od klasických [6], atypických, silentních a asymptomatických [3] po latentní a možné [9, 30]. Mezi nejčastější příznaky CD patří řídká stolice, bolesti v podbřišku, známky malabsorpce. Většina pacientů však bývá bez těchto klasických příznaků. V případě silentní a atypické formy mohou pacienti být např. více unavitelní, někdy depresivní, ženy mívají problémy s otěhotněním, udržením gravidity, donošením zdravého plodu [11, 12-15, 16]. U pacientek s CD se mohou objevit i jiné nepravidelnosti, např. zpožděná menarche nebo amenorea, časná menopauza, v reprodukčním období pak častější potraty nebo se u jejich plodů objevuje růstová intrauterinní retardace (tab. 1) [7, 11, 14, 21]. Vedle základních klinických symptomů CD jsou důležité i sérologické markery tohoto onemocnění. Běžně se zjišťují protilátky proti gliadinu, tkáňové transglutamináze, protilátky proti endomysiu nebo řetikulinu. Tyto testy jsou pro odborníky jen pomocné, doplňkové k imunohistochemické analýze sliznice tenkého střeva. Vancikova a kol. [28] publikovali velmi rozsáhlou českou studii, která

sledovala téměř 1900 pacientů s různými diagnózami (zdravé dárce krve, pacienti s primární osteoporózou, s autoimunitním onemocněním, se sníženou plodností) v sérologických parametrech CD. Zjistila až čtyřnásobnou sérologickou pozitivitu u jmenovaných diagnóz proti zdravé skupině dárců krve.

V naší studii jsme se soustředili na náhodně vybrané pacientky po 2-3 spontánních potratech a ženy po opakovaných neúspěšných IVF léčebných cyklech. Vedle rutinních základních testů v reprodukční imunologii jsme se zaměřili i na protilátky proti gliadinu a tkáňové transglutamináze.

SOUBOR A METODIKA

Vyšetřili jsme celkem 442 pacientek ve věku 23-47 let (průměrný věk 32,6 let), 275 z nich spontánně potratilo dvakrát a vícekrát, 167 pacientek pak bylo po dvou a více neúspěšných IVF. Všechny ženy v té době navštívily Poradnu pro imunologii reprodukce na Gynekologicko-porodnické klinice LF UK a FN v Plzni. Kontrolní skupina se skládala z 86 zdravých fertálních dobrovolnic ve věku 22-38 let (průměrný věk 24,5 let). Všechny ženy podepsaly informovaný souhlas s tímto vyšetřením. Při podrobné anamnéze žádná ze sledovaných žen neměla subjektivní potíže týkající se CD.

K laboratornímu vyšetření jsme použili komerční ELISA (Tissue Transglutaminase IgA/IgG ELISA Kit a Gliadin IgA/IgG ELISA Kit, Omega) k určení sérových hladin IgA a IgG protilátek proti gliadinu a tkáňové transglutamináze. Statistickou analýzu jsme provedli pomocí χ^2 testu.

VÝSLEDKY

Výsledky sérových protilátek proti gliadinu a tkáňové transglutamináze v IgG a v IgA jsou uvedeny v tabulce 2. Zjistili jsme rozdíly mezi oběma skupinami pacientek a kontrolním souborem v hladinách protilátek proti tkáňové transglutamináze v IgA ($p = 0,0096^*$). Významný rozdíl byl i mezi samotnými pacientkami: mezi skupinou žen s opakovanými potraty a ženami po opakovaných IVF ($p = 0,0374^*$), a dále mezi kontrolní skupinou a pacientkami po opakovaných selháních v IVF ($p = 0,0303^*$).

Tab. 1 Možné reprodukční změny u žen s celiakií

Reprodukční změny během života ženy	opožděná menarche, amenorea, časná menopauza
Změny v graviditě	snížený počet otěhotnění, opakované samovolné potraty, porody hypotrofitických plodů, abnormální funkce placenty

Tab. 2 Analýza sérových protilátek proti gliadinu (Gli) a tkáňové transglutamináze (tTG) v IgA a v IgG

Sledované markery	Opakované spontánní potraty (n = 275)	sehnání v IVF (n = 167)	Kontroly (n = 86)	p hodnota
Pozitivní anti-tTG IgA	4	9	0	0,0096**
Pozitivní anti-tTG IgG	8	4	1	0,6582
Pozitivní anti-Gli IgA	0	0	0	X
Pozitivní anti-Gli IgG	39	27	28	0,0004***
Pozitivní anti-tTG IgA + pozitivní anti-tTG IgG	1	1	0	X
Pozitivní anti-Gli IgA + pozitivní anti-Gli IgG	2	0	0	X
Alešpoň jedna pozitivní anti-tTG + alespoň jedna pozitivní anti-Gli	6	7	0	0,1141

U kontrolní skupiny zdravých fertálních žen jsme zjistili signifikantně vyšší hladiny proti gliadinu v IgG ve srovnání s ostatními skupinami pacientek ($p = 0,0004^{***}$). (Statistickou analýzu uvádíme na čtyři desetinná místa na doporučení statistika.)

DISKUSE

Snížená plodnost u žen může být způsobena nejrůznějšími příčinami, izolovanými nebo sdruženými. Imunologická nadstavba snížené plodnosti se velmi často uvádí v podobě abnormalit v buněčné nebo protilátkové odpovědi [např. 12, 13, 25, 26]. Některé studie poukazují na to, že pacientky s CD mají problémy s otěhotněním, udržení časného embrya nebo rodí hypotrofní plody [např. 16]. Rozsáhlá česká studie [28] analyzovala výsledky protilátkových faktorů charakterizujících CD u 1835 dospělých, z nichž bylo 1312 zdravých dárců krve, 102 pacientů s primární osteoporózou, 58 se základním autoimunitním onemocněním a 365 žen se sníženou plodností. Dvojitý screening ukázal velmi pestrý protilátkový obraz proti gliadinu, tkáňové transglutamináze i endomysiu, při čemž latentní CD byla prokázána u 0,45 % zdravých dárců krve, u 0,98 % pacientů s osteoporózou, u 2,7 % s autoimunitním onemocněním a u 1,13 % žen se sníženou plodností. Ukázalo se tedy v této multicentrické české studii, že je zvýšená prevalence séropozitivity CD i u zdánlivě zdravé české populace. U vysoce rizikových skupin pak prevalence séropozitivity v CD je 2-4krát vyšší než u kontrolní skupiny zdravých dárců.

V naší současné studii 442 žen jen 13 pacientek (2,9 %) se sníženou plodností (4 po opakovaných spontánních potratech a 9 po neúspěšných opakovaných IVF) mělo laboratorně vysoké hladiny

tkáňové transglutaminázy v IgA, aniž by tyto ženy měly jakékoli klinické gastrointestinální obtíže. Žádná z 13 žen v době laboratorního „podezření“ na CD nepodstoupila histologické vyšetření střevní biopsie. Pacientky ale přistoupily na přísnou bezlepkovou dietu. Během diety úspěšně otěhotnělo jedenáct pacientek, sedm porodilo zdravý plod, u dalších ještě pokračuje gravidita.

Cena screeningového vyšetřování protilátek proti gliadinu i tkáňové transglutaminázy pomocí ELISA metody se pohybuje mezi 200–400 Kč. Do screeningu celiakie zahrnují některé laboratoře vyšetření protilátek i proti retikulínu, endomysiu. Ani jeden z testů však nemá stoprocentní senzitivitu a specifitu. Vyšetření na protilátky proti gliadinu však má značnou variabilitu, která záleží na purifikaci antigenu navázaného na destičce v systému ELISA metody [20, i vlastní zkušenost]. V současné době se upřednostňuje purifikovaný α -gliadin (vyšší specifita) [20], ale tento antigen jsme neměli možnost v naší studii použít. ELISA testy k detekci protilátek proti α -gliadinu jsou i mnohem dražší (kolem 500–600 Kč).

Vzhledem k vysoce purifikovanému antigenu tkáňové transglutaminázy v systému ELISA je test k vyšetření celiakie daleko citlivější a specifitější, má přímý vztah k sledovanému latentnímu doposud asymptomatickému onemocnění, je prakticky vyloučena zkřížená imunoreaktivita s jiným epitopem (to u gliadinu nešlo v našem testování vyloučit). Suverénní diagnostickou metodou celiakie je metoda střevní biopsie. Tu ani jedna pacientka v naší studii neměla.

Pravděpodobně i latentní, subklinická CD může participovat na snížené plodnosti. Bylo vysloveno několik hypotéz (lektinová hypotéza, hypotéza o vrozeném deficitu peptidáz, imunologická hypotéza). Všechny se snaží vysvětlit

lit příčinu snížené plodnosti u žen s CD. Jedna z nich se opírá [16] o morfologické změny na sliznici tenkého střeva s atrofií klků, což má pak za následek zhoršené vstřebávání i např. kyseliny listové, železa a vitamínů skupiny B se sekundárními následky snížené plodnosti. Latentní, dříve subklinická CD se zdá být čtenější především u žen se sníženou plodností ve smyslu opakovaných těhotenských ztrát ve srovnání se zdravou fertillní populací.

V naší studii jsme zcela náhodně u třinácti pacientek našli pozitivní laboratorní nález směřující k diagnóze celiakie (vysoké hladiny tkáňové transglutaminázy v IgA), doporučili jsme další vyšetření u gastroenterologa. Ten většinou rozšiřuje laboratorní diagnostické spektrum o vyšetření protilátek proti retikulínu a endomysiu. Laboratorní vyšetření ale nikdy nenahradí diagnostickou střevní biopsii. Léčbu pacientek pak zahajujeme společně. Většinou postačí přísná bezlepková dieta, při které dojde k obnovení fyziologických enzymatických pochodů a absorpční činnosti střevní sliznice. V dalším sdělení se budeme zabývat detailním rozbořením stavu našich třinácti pacientek, z nichž jedenáct otěhotnělo a zatím sedm úspěšně porodilo zdravý plod.

Práce vznikla s podporou grantu MŠMT ČR MSM 002 162 0812 a GAUKu č. 696212.

LITERATURA

- Anderson, C., Townley, RRW., Messer, M., Hubbard, L. Further observations on the relationship of wheat gluten to coeliac disease. *Proc R Soc Med*, 1962, 55, p. 983-985.
- Anderson, CM. Histological changes in the duodenal mucosa in coeliac disease: reversibility during treatment with a wheat gluten free diet. *Arch Dis Child*, 1960, 35, p. 419-427.
- Bottaro, G., Cataldo, F., Rotofo, N., et al. The clinical pattern of subclinical silent coeliac disease: An analysis on 1026 consecutive cases. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94, p. 691-696.
- Ciclitira, P.J., Johnson, MW., Dewar, DH., Ellis, H.J. The pathogenesis of coeliac disease. *Mol Aspects Med*, 2005, 26, p. 421-458.
- Farrell, R.J., Kelly, CP. Coeliac sprue. *N Engl J Med*, 2002, 346, p. 180-188.
- Fasano, A. Coeliac disease - how to handle a clinical chameleon. *N Engl J Med*, 2003, 348, p. 2568-2570.
- Freeman, H.J. Reproductive changes associated with coeliac disease. *World J Gastroenterol*, 2010, 16, p. 5810-5814.
- Fric, P. Celiakální sprue - současnost a perspektiva. *Postgrad Med*, 2006, 8, p. 588-593.
- Holmes, G.K. Potential and latent coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 13, p. 1057-1060.
- Holtmeier, W., Caspary, WF. Coeliac disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1, p. 3-9.
- Khoshbaten, M., Rostami, NM., Farzady, L., et al. Fertility disorder associated with coeliac disease in males and females: fact or fiction? *J Obstet Gynaecol Res*, 2011, 37, p. 1308-1312.
- Kwak-Kim, J., Park, J.C., Ahn, H.K., et al. Immunological modes of pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63, p. 611-623.
- Kralickova, M., Sliwa, P., Rokyta, Z. Role of the leukemia-inhibitory factor gene mutations in infertile women: the embryo-endometrial cytokine cross talk during implantation - a delicate homeostatic equilibrium. *Folia Microbiol*, 2005, 50, p. 179-186.
- Kumar, A., Meena, M., Begum, N., et al. Latent coeliac disease in reproductive performance of women. *Fertil Steril*, 2011, 95, p. 922-927.
- Maki, M., Hallstrom, O., Huupponen, T., et al. Increased prevalence of coeliac disease in diabetes. *Arch Dis Child*, 1984, 59, p. 739-742.
- Meloni, G.F., Dessole, S., Vargu, M., et al. The prevalence of coeliac disease in infertility. *Human Reprod*, 1999, 14, p. 2759-2761.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., et al. Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of coeliac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*, 2010, 42, p. 587-595.
- Not, T., Horvath, K., Hill, ID., et al. Coeliac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol*, 1998, 33, p. 494-498.
- Parnel, NDJ., Daniel, Y., Travers, P., et al. Binding of a coeliac toxic peptide, and point substituted analogues, to the disease associated HLA-DQB molecule. *Gut*, 1999, 44, p. A77-78.
- Rashtak, S., Ettore, MW., Homburger, HA., Murray, JA. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of coeliac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008, 6, 4, p. 426-432.
- Rajput, R., Chatterjee, S. Primary infertility as a rare presentation of coeliac disease. *Fertil Steril*, 2010, 94, p. 5-7.
- Real, A., Comino, I., de Lorenzo, L., et al. Molecular and immunological characterization of gluten proteins isolated from oat cultivars that differ in toxicity for coeliac disease. *PLoS One*, 2012, 7, p. 483-485.
- Schuppan, D., Junker, Y., Barlsani, D. Coeliac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 2009, 137, p. 1912-1933.
- Shidrawi, RG., Parnell, ND., Ciclitira, P.J., et al. Binding of gluten-derived peptides to the HLA-DQ2 (alpha*0501, beta*0201) molecule, assessed in the cellular assay. *Clin Exp Immunol*, 1998, 111, p. 158-165.
- Ulcova-Gallova, Z., Krauz, V., Novakova, P., et al. Antiphospholipid antibodies against phosphatidylinositol and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol*, 2005, 54, p. 112-117.
- Ulcova-Gallova, Z. Repeated miscarriages in patients with antiphospholipid syndrome and subjected to in vitro fertilization: the importance of preimplantation genetic diagnosis. *Lupus*, 2012, 21, p. 744-746.
- Vader, LW., Stepniak, DT., Bunnik, EM., et al. Characterization of cereal toxicity for coeliac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*, 2003, 125, p. 1105-1113.
- Vancikova, Z., Chlumecky, V., Sokol, D., et al. The serologic screening for coeliac disease in the general population (blood

donors) and in some high-risk groups of adults (patients with autoimmune diseases, osteoporosis and infertility) in the Czech Republic. *Folia Microbiol*, 2002, 47, p. 53-58.

29. **Walter-Smith, JA., Guandalini, S., Schmitz, J., et al.** Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child*, 1990, 65, p. 909-911.

30. **Weinstein, WM.** Latent celiac sprue. *Gastroenterology*, 1974, 66, p. 489-493.

Korespondující autorka

Prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.

Genetika-Plzeň
a Gynekologicko-porodnická klinika LF UK
Parková IIA
326 00 Plzeň-Cernice
e-mail: ulcova-gallova@email.cz

Příloha VII

LHOTSKÁ, P., P. MARTÍNEK, **M. ČEDÍKOVÁ**, P. LOŠAN, M. KRÁLÍČKOVÁ, V.

KALIŠ and Z. NOVOTNÝ. Analysis of point mutations in interleukin-11 gene in the population of infertile patients and fertile control women. *Ceska Gynekol.* 2014, Vol. 79,

No.1, pp. 48-52. ISSN 1210-7832.

Vyšetření bodových mutací v genu pro interleukin-11 v populaci neplodných žen a plodných kontrol

Analysis of point mutations in interleukin-11 gene in the population of infertile patients and fertile control women

Lhotská P.^{1,2}, Martínek P.¹, Čedíková M.^{1,2}, Lošan P.¹, Králíčková, M.^{1,2,3}, Kallš V.³, Novotný Z.³

¹Ústav histologie a embryologie LF UK, Plzeň, přednostka doc. MUDr. M. Králíčková, Ph.D.

²Biomedicínské centrum LF UK, Plzeň, vědecký ředitel doc. MUDr. M. Štengl, Ph.D.

³Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN, Plzeň, přednostka doc. MUDr. Z. Novotný, CSc.

ABSTRACT

Objective: The interleukin-11 (IL-11) is one of the most important signaling factors in the process of decidualization and embryo-maternal cross talk during the embryo implantation. We investigated the prevalence of the IL-11 gene point variants in the population of infertile women and fertile control subjects.

Design: A cohort study.

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and University Hospital of Charles University, Pilsen.

Subjects and methods: The population to screen consisted of 354 infertile women. The control population was comprised of 195 healthy fertile subjects. For the mutational analysis, the temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and direct sequencing had been used. The groups of fertile controls and infertile patients were compared for statistically significant difference using the Fisher's 2 by 2 Exact test.

Results: Thirteen potentially functional IL-11 gene variants, the G to A transversions at the position 3651 (G3651A) leading to the arginin to histidin exchange

on the position 113 (R113H) were detected in the group of infertile women. No mutations were identified in the control group, which means that the frequency of functionally relevant mutations of the IL-11 gene in infertile women is significantly enhanced in comparison with controls ($p = 0.01$, Fisher's 2 by 2 Exact test).

Conclusion: The results prove the presence of the potentially functionally relevant IL-11 gene variants in the population of infertile women. The presence of variants does not have to lead directly to decrease fertility but may contribute to the dysbalance of cytokine milieu which is needed for the decidualization as well as subsequent embryo implantation. Even though IL-11 gene variants occur infrequently, their impact on molecular events during early phases of pregnancy should be further elucidated.

KEYWORDS

interleukin-11 - variant - decidualization - embryo implantation - infertility - assisted reproduction - in vitro fertilization - temperature gradient gel electrophoresis - DNA sequencing

SOUHRN

Cíl studie: Interleukin-11 (IL-11) je jedním z klíčových cytokinů hrajících úlohu při decidualizaci a embryo-maternálním molekulárním dialogu, který probíhá během implantace embrya. Naším cílem bylo zjistit prevalenci variant v genu pro IL-11 v populaci neplodných žen a v populaci plodných kontrol.

Typ studie: Kohortová studie.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN v Plzni.

Metodika a soubor: Vyšetřili jsme 354 infertálních a 195 kontrolních zdravých plodných žen. K analýze jsme použili elektroforézu probíhající v teplotním

gradientu a přímou sekvenaci. Statistické zhodnocení rozdílu mezi skupinou neplodných pacientek a skupinou fertálních kontrol bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky.

Výsledky: Ve skupině neplodných žen byla u 13 z nich zjištěna varianta G3651A, přičemž tato varianta má za následek záměnu argininu za histidin na pozici 113 (R113H). V kontrolní skupině tato bodová mutace zjištěna nebyla, což znamená, že frekvence této mutace v genu pro IL-11 je u neplodných žen signifikantně vyšší ve srovnání s plodnými ženami ($p = 0,01$ Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky).

Závěr: Výsledky prokazují přítomnost bodových mutací v genu pro IL-11 v populaci neplodných pacientek. Výskyt variant nemusí být sám o sobě mechanismem snižujícím plodnost, ale může přispívat k narušení cytokinové rovnováhy, která je k decidualizaci a následné implantaci embrya nutná. Ačkoli se mutace v genu pro IL-11 vyskytují vzácně, jejich vliv na molekulární pochody během implantace a časné embryogeneze by měl být objasněn.

KLÍČOVÁ SLOVA

interleukin-11 – varianta – decidualizace – implantace embrya – neplodnost – asistovaná reprodukce – in vitro fertilizace – elektroforéza v teplotním gradientu – sekvenování DNA

Čes. Gynek., 2014, 79, č. 1, s. 48–52

ÚVOD

Jednou z příčin neplodnosti a také stále neuspokojivých výsledků její léčby [11] může být snížená schopnost embrya implantovat se do děložní sliznice. Implantaci embrya musí předcházet decidualizace děložní sliznice, která je kontrolována hierarchizovanou souhrnou řady humorálních faktorů včetně mnoha cytokinů. Souvislost vyvážené a delikátně regulované cytokinové souhry se schopností spontánního otěhotnění byla opakovaně prokázána [7]. Interleukin-11 (IL-11) je pokládán za klíčový cytokin celé vyvážené cytokinové souhry regulující decidualizaci [5].

Interleukin-11 je členem rodiny interleukinu-6 spolu s leukemickým inhibičním faktorem (LIF), ciliárním neurotrofickým faktorem (CNTF), kardiostrofinem (CT-1) a onkostatinem-M (OSM) a společně s nimi sdílí afinitu k receptorovému řetězci gp130. Hotový protein je monomer složený ze 179 aminokyselin o molekulové váze 150 kDa. Sám se váže na vysokoafinní receptor IL-11R α a po spojení s gp130 dochází k homodimerizaci IL-11 a přenosu signálu. IL-11 reguluje hematopoézu, indukuje proliferaci B buněk, stimuluje vývoj osteoblastů, buněk gastrointestinálního a nervového systému [6]. V roce 1997 byl schválen rekombinantní IL-11 (pod názvem Oprelvekin) jako lék pro prevenci závažné trombocytopenie u pacientů po chemoterapii.

Studie na myším modelu ukazují, že defekty v genu pro IL-11R α nevedou k žádným abnormalitám v hemopoetickém procesu, ale samice s tímto defektem jsou sterilní [10]. Jako příčina neplodnosti u těchto myší byla potvrzena nedostatečná decidualizace endometria a jeho postupná degradace. U člověka byla pomocí imunohistochemického barvení prokázána produkce IL-11 v endometriu během celého menstruačního cyklu a v epiteliálních buňkách glandulárních byla pozorována silnější intenzita produkce IL-11 než u stromálních buněk endometria [4]. Bylo prokázáno, že produk-

ce IL-11 epiteliálními buňkami endometria je silně snížena u žen s opakovanými potraty v anamnéze ve srovnání se zdravou skupinou [9] a také u žen s idiopatickou neplodností je přítomnost IL-11 v glandulárním epitelu signifikantně nižší [5].

Gen IL-11 se nachází na chromozomu 19 v oblasti q13.3-q13.4, je kódován pěti exony a čtyřmi introny. Dosud nebyla v literatuře popsána žádná mutace genu v souvislosti s neplodností. Je popsáno celkem 27 variant genu, z toho tři se nacházejí v exonech. Jako referenční sekvence byl v naší studii použit záznam genové banky číslo AY207429 z webových stránek <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> odpovídající referenční sekvenci číslo NM_000641, ze které byly získány varianty genu [1]. V minulosti nalezené varianty genu IL-11 jsou uvedeny v seznamu známých variant na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Tyto varianty byly zjištěny například firmou Seattle SNPs (CA, USA), která je částí National Heart Lung and Blood Institute's (NHLBI) a výzkum proběhl v rámci Programs for Genomic Applications (PGA). Jejich studie čítala 60 vzorků evropského původu, 60 vzorků afrického původu a 90 vzorků asijského původu.

Cílem naší práce bylo stanovit výskyt mutací v genu pro IL-11 v populaci neplodných žen a porovnat je s kontrolní populací zdravých plodných žen.

METODIKA A SOUBOR ŽEN

Soubor žen

DNA jsme vyšetřili u 354 infertilních pacientek, z toho 252 bylo primárně a 102 sekundárně neplodných. Skupinu neplodných žen jsme rozdělili podle příčin sterility na ovariální faktor (n = 45), tubární faktor (n = 34), endometriózu (n = 30), andrologický faktor (n = 93), idiopatickou infertilitu (n = 99) a kombinaci faktorů (n = 44). Pacientky s endometriózou nebyly členěny podle

stadia choroby. Pacientky klasifikované v naší studii jako idiopaticky neplodné měly ovulační cykly, laparoskopicky prokázanou průchodnost obou vejcovodů a absenci pelvických adhezí či endometriózy a měly též normální hysteroskopický či hysterosalpingografický nále. Jejich partneři měli normální spermioqramy a nebyly prokázány antispermatické protilátky.

Kontrolní populace pro vyšetřování DNA se skládala z 195 zdravých fertlních žen, které měly v anamnéze alespoň jedno spontánní otěhotnění následované porodem zdravého novorozence.

Studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

DNA extrakce

DNA byla izolována z leukocytů periferní krve za pomoci DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) podle firemního protokolu. Vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C.

Polymerázová řetězová reakce a vyšetřování mutací v genu pro IL-11

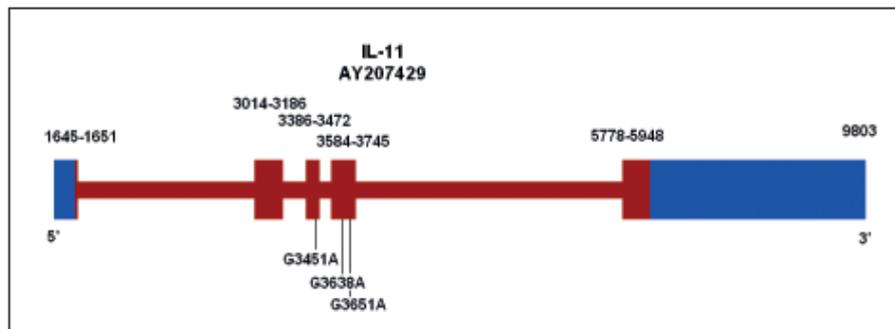
Pro analýzy DNA jsme používali gelovou elektroforézu probíhající v teplotním gradientu (TGGE) a přímé sekvenování. Analyzovány byly kódující oblasti a exon-intronové spoje genu. Za účelem vytvoření termostabilních domén byly primery modifikovány pomocí Poland java script přidáním GC svorek (www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html), ty vytvářejí u PCR produktu termostabilní domény, které umožňují analýzu variant pomocí TGGE. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla sestavena takto: 12,5 µl HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 10 pmol příslušných primerů, 100 ng DNA a destilovaná voda do celkového objemu 25 µl. Amplifikační program se skládal z denaturace při 95 °C po dobu 15 minut

a pak 35 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 30 sekund, annealingu při 60 °C po dobu 30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 1 minuty. PCR byla zakončena finální extenzí při 72 °C po dobu 7 minut. Délka a kvalita PCR produktů byla kontrolována na standardním agarózovém gelu.

Vyhledávání mutací bylo prováděno analýzou heteroduplexů na TGGE (Biometra, Goettingen, Germany) za použití akrylamidových gelů (8% akrylamid (AA: bis-AA [37,5:1]), 6M urea, 1x MOPS, 2% glycerol). Směs heteroduplexů byla provedena denaturací v termocykleru GeneAmp 9700 (PE/AB Foster City, CA, USA) při 95 °C po dobu 5 minut s následnou postupnou renaturací (1 °C za sekundu) na výslednou teplotu 55 °C, která byla udržována po dobu 15 minut. Poté byly vzorky zchlazeny na 4 °C.

TGGE analýzy se prováděly ve dvou krocích – nejprve byly podmínky elektroforézy optimalizovány pro každý PCR fragment zvlášť, pak byly vzorky pacientek analyzovány na paralelních gelech. DNA byla detekována metodou barvení stříbrem, kterou jsme popsali již v našich předšlých publikacích [2, 8].

Všechny vzorky pozitivní v TGGE jsme sekvenovali. Pro přípravu sekvenačních reakcí byl použit Big Dye Terminator Sequencing kit verze 1.1 či verze 3.1 (PE/AB, Foster City, CA, USA). Na jednu sekvenační reakci bylo použito přibližně 100 ng templátové DNA, 3,2 pmol sekvenačního primeru, 2 µl Big Dye Terminator Sequencing kit vl.1 (v3.1), 2 µl 5x Sequencing buffer, vše bylo doplněno sterilní deionizovanou vodou do objemu 10 µl. Reakce probíhala v termocykleru GeneAmp 9700 (PE/AB Foster City, CA, USA) v následujících krocích: denaturace 96 °C/1 minuta, 25 cyklů (96 °C/15 sekund, teplota annealingu viz tabulka 2/5 sekund, 60 °C/4 minuty) a na sekvenátoru ABI Prism 310 (PE/Applied Biosystems,



Obr. 1 Ideogram genu pro IL-11 s vyznačením variant v exonech

Foster City, USA) při 11.3 kV po dobu 20 minut. Pro přečištění PCR produktů po amplifikaci byl použit kit Agencourt AMPure a pro přečištění sekvenanční reakce kit Agencourt CleanSeq (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, MA, USA) podle návodu výrobce.

Statistické hodnocení

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky. Hodnoty $p < 0,05$ se považovaly za statisticky signifikantní.

VÝSLEDKY

V námi vyšetřované populaci byly detekovány dvě různé varianty - varianta G3451A, která nevede k záměně aminokyselin v proteinovém řetězci a varianta G3651A, která má za následek záměnu argininu za histidin na pozici 113 (R113H).

U varianty G3451A byla zjištěna vyšší frekvence (0,74), než je celková frekvence této varianty podle Seattle SNPs (0,3) [1]. To je zřejmě dáno tím, že všechny vzorky v námi vyšetřované skupině byly evropského původu, a nikoli smíšené jako u studie Seattle SNPs. Jejich frekvence pro evropskou populaci byla 0,58, kdežto například pro africkou 0,0 [1]. Tato varianta nezpůsobuje aminokyselinovou záměnu, lze ji považovat za „silent mutaci“ nebo polymorfismus. Navíc její výskyt se statisticky významně neliší ve skupině neplodných žen a plodných kontrol.

Druhá námi detekovaná varianta, varianta G3651A, byla v populaci, kterou jsme vyšetřovali, nalezena u 13 případů neplodných žen. Tato varianta má za následek záměnu argininu za histidin na pozici 113 (R113H), takže její vliv na například prostorové uspořádání molekuly je možný. V kontrolní skupině tato bodová mutace zjištěna nebyla, což znamená, že frekvence této mutace v genu pro IL-11 je u neplodných žen signifikantně vyšší ve srovnání s plodnými ženami ($p = 0,01$ Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky).

DISKUSE

Naše pilotní výsledky prokazují, že frekvence varianty G3651A v genu pro IL-11 je u neplodných žen signifikantně vyšší ve srovnání s plodnými ženami. Protože tato varianta vede k záměně aminokyselin v proteinovém řetězci, existuje možnost, že by její výskyt mohl souviset např. se změnou prostorového uspořádání molekuly IL-11, a tím i se změnou její afinity k receptoru apod.

Jeden cytokin sám o sobě pravděpodobně nemůže významnou měrou ovlivnit proces decidualizace, ale existuje možnost, že abnormalita

jednoho činitele naruší celkovou harmonii cytokinového prostředí, která je obecně uznávanou podmínkou úspěšnosti periimplantačních dějů [3]. K jednoznačným závěrům je však třeba mít populaci rozsáhlejší a studii doplnit analýzami následných dějů.

Ačkoli se varianty v genu pro IL-11 vyskytují vzácně [1], mohou mít vliv na molekulární pochody během decidualizace, a tím pádem i implantace a časné embryogeneze. Porozumění působení IL-11 může sloužit k pochopení molekulárních procesů peri-implantačních dějů, a tím i k vytvoření nových léčebných postupů, jež podpoří schopnost implantace a viabilitu embrya, a zvýší tím úspěšnost léčby neplodnosti.

ZÁVER

Ačkoli je zřejmé, že mutace v genu pro IL-11 nejsou časté a samy o sobě klinicky významné, představují dílek v poznání zatím nepochopených peri-implantačních dějů. Souvislost vyvážené a delikátně regulované cytokinové souhry s možností spontánního otěhotnění byla opakovaně prokázána. Pochopení imunogenetického pozadí implantace embrya má tedy potenciál přispět k objasnění příčin některých zatím nevysvětlitelných případů neplodnosti a otvírá nové možnosti léčby.

Tato studie je podporována projektem OP VaVpl PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076 a programem rozvoje vědních oblastí na Karlově Univerzitě (projekt P36).

LITERATURA

1. Balakrishnan, L., Soman, S., Patil, YB., et al. IL-11/IL11RA receptor mediated signaling: a web accessible knowledgebase. *Cell Commun Adhes*, 2013, 20, 3–4, p. 81–86.
2. Beranová, M., Oliveira, LM., Bedecarrats, GY., et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 4, p. 1580–1588.
3. Carp, H. Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus*, 2004, 13, 9, p. 630–634.
4. Cork, BA., Li, TC., Warren, MA., Laird, MS. Interleukin-11 in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro. *J Reprod Immunol*, 2001, 50, p. 3–17.
5. Dimitriadis, E., Sharkey, AM., Tan, YL., et al. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin-11 and leukemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007, 29, 5, p. 44.

6. **Du, XX., Williams, DA.** Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the haemopoietic microenvironment. *Blood*, 1994, 83, 8, p. 2023–2030.

7. **Granot, L., Gnainsky, Y., Dekel, N.** Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction*, 2012, 144, 6, p. 661–668.

8. **Kráčková, M., Šíma, R., Vaněček, T., et al.** Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, 127, 2, p. 231–235.

9. **Unjawi, S., Li, TC., Tuckerman, EM., et al.** Expression of Interleukin-11 receptor alpha and interleukin-11 protein in the endometrium of normal fertile women and women with recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*, 2004, 64, 1–2, p. 145–155.

10. **Robb, L., Li, R., Hartley, L., et al.** Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to defective uterine response to implantation. *Nat Med*, 1998, 4, 3, p. 303–308.

11. **Sullivan, EA., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., et al.** International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2004. *Hum Reprod*, 2013, 28, 5, p. 1375–1390.

Mgr. Pavla Lhotská

Ústav histologie a embryologie LF UK

Karlovarská 48

306 05 Plzeň

e-mail: lhotskap@pilsfree.cz

Příloha VIII

ULČOVÁ-GALLOVÁ, Zdenka, Alena MOCKOVÁ and Miroslava ČEDÍKOVÁ.

Screening tests of reproductive immunology in systemic lupus erythematosus. *Autoimmune*

Dis. 2012; Vol. 1, No. 1, 6 pages. ISSN 2090-0422. Dostupné z doi: 10.1155/2012/812138.

Clinical Study

Screening Tests of Reproductive Immunology in Systemic Lupus Erythematosus

Zdenka Ulcova-Gallova,¹ Alice Mockova,² and Miroslava Cedikova³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine in Pilsen and University Hospital, University in Pilsen, 30460 Pilsen, Czech Republic

²Department of Neonatology, Faculty of Medicine in Pilsen and University Hospital, Charles University in Prague, Alej Svobody 80, 30460 Pilsen, Czech Republic

³Institute of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarská 48, 30166 Pilsen, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Zdenka Ulcova-Gallova, ulcova-gallova@email.cz

Received 13 June 2012; Revised 30 September 2012; Accepted 30 September 2012

Academic Editor: Hiroshi Okamoto

Copyright © 2012 Zdenka Ulcova-Gallova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Female patients in reproductive age with systemic lupus erythematosus and fertility complications together are observed by rheumatologists, gynecologists, and reproductive immunologists. The paper notes the presence of autoantibodies to zona pellucida, to phospholipids (phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl glycerol, phosphatidic acid, annexin V, beta-2 glycoprotein I, and cardiolipin) and of isoantibodies to sperm cells. Isoantibodies to sperm cells are not significantly predominant, but autoimmunity is well expressed in IgG positivity against phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine, cardiolipin, and beta-2 glycoprotein I, as well as antizona pellucida antibodies in IgG isotype. According to the levels of autoantibodies we have to choose preventive treatment to protect mother and her foetus.

1. Introduction

Although autoimmune diseases (AIDs) are not in general considered a major cause of impaired reproductive capacity some AIDs are associated with infertility or pregnancy wastage. Autoimmune conditions may affect all stages of fertility, from ovarian to implantation failure and pregnancy loss. Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of the most common autoimmune disorders that affect women during their childbearing age. Prevalence of SLE in Europe is similar as in USA, ranging from 3.3 to 4.8 per 100,000 person-years [1].

Typical clinical symptoms of SLE include fatigue, fever, arthritis, a photosensitive rash serositis, Raynaud phenomenon, glomerulonephritis, vasculitis, and hematologic abnormalities. Although patients with SLE are as fertile as women in the general population, their pregnancies could be associated with complications [2]. Fertility may be compromised by menstrual irregularities with anovulatory cycles

during episodes of active disease or chronic renal failure, use of nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs), high-dose corticosteroids, or cyclophosphamide.

High rate of fetal losses up to 45 percent in SLE women has been described in some studies [2]. Another complication may be implantation failure after in vivo fertilization and embryo transfer or impaired fetal development.

There is a wide variety of autoantibodies associated with SLE. Some of the antibodies are helpful in the diagnostics of the illness, while others are more useful in detecting and monitoring disease activity or potential complications. Antibodies to native double-strand DNA (dsDNA) are relatively specific for the diagnosis of SLE. Serum antinuclear antibodies (ANAs) are found in nearly all individuals with active SLE. Significant for SLE diagnosis is assessment of spectrum extractable nuclear antibodies (Sm, La, Ro), antibodies to ribonucleoprotein (RNP), complement and N-methyl-D-aspartate receptor (ENA panel).

Antiphospholipid antibodies (aPLs) form a large group of antibodies that are detected in patients with SLE as well as with other autoimmune conditions. These antibodies are associated with a wide range of potential complications during pregnancy, including miscarriage, fetal death, intrauterine growth restriction, prematurity, and preeclampsia—especially in the primary antiphospholipid syndrome (APS).

In SLE women, pregnancy should be best planned during periods of disease stabilization and nephritis remission lasting at least six months. Closed collaboration of rheumatologist, obstetrician, and neonatologist is necessary for successful pregnancy and delivery. Fulfilling these prerequisites, there is still around 5% of women with SLE that have fertility or pregnancy problems [3].

A complication in reproduction is very often a reason for thorough immunological examination. We present here our experience with SLE patients from the perspective of reproductive immunology.

2. Objectives

The general aim of our paper is to evaluate the results of screening tests in reproductive immunology in women of childbearing age with SLE. The primary aim is to investigate the occurrence of autoantibodies to zona pellucida and eight various phospholipids and occurrence of isoantibodies to sperm cells in patients with SLE in remission planning pregnancy.

3. Subjects

The study group consists of 52 women with SLE (mean time from diagnosis 4.62 ± 2.28 years; age 18–42 years, mean 30.4 ± 3.9) that were referred for pregnancy planning to Special Division for Infertility and Immunology of Reproduction at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Charles University and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic. All patients fulfilled the revised criteria for SLE diagnosis [4]. All patients were in remission during the study examinations and during attempts to fertilize, none had acute nephritis or serious renal impairment. None of the patients were treated with corticosteroids in a dose exceeding 10 mg per day, immunosuppressive drugs, only three were on hydroxychloroquine sulfate (plaquenil) medication. Before being examined and treated at our Division, all patients were examined by endocrinologist, gynecologist, and had genetic consultation. No substantial pathology was found in the following hormonal tests that are known to impair fertility: FSH, LH, progesterone, estradiol, prolactin. Pregnancy loss occurred in 38 women from the study group prior to our testing.

The control group consisted of 25 age-matched healthy fertile women (age 24–43 years, mean 31.2 ± 3.2). All control subjects have successfully conceived and have given spontaneous birth to two healthy children, they had prior to our examination regular sexual intercourse and menstrual cycle and did not use hormonal contraceptives. The study was approved by the local research ethics committee at the

Charles University Medical Faculty Hospital, Pilsen, and written informed consent was obtained from all participants.

4. Methods

Detection of autoantibodies to zona pellucida, eight phospholipids (phosphatidyl-serine, phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-inositol, DL-glycerol, phosphatidic acid, annexin V, beta-2-glycoprotein I, and cardiolipin), and isoantibodies to sperm cells was performed as described below.

Both groups were tested with *F*-test of equality of variances. For each immunology test percentage values were calculated independently in study and control group, and antibody occurrences were analyzed using standard odds ratio formulas where applicable.

4.1. Sperm Antibodies of Serum (ASA). We have performed tray agglutination test (TAT) [2] and indirect-mixed agglutination test (i-MAR) according to previously published guidelines for examination of the serum ASA [3]. TAT test serves as an initial screening examination. The blood from studied subjects was collected by venipuncture into evacuated tubes and centrifuged. Isolated serum was inactivated by heat (56°C for 30 min) and stored at -20°C until analysis. We performed the TAT test by adding $5\ \mu\text{L}$ of inactivated, geometrically diluted serum and $1\ \mu\text{L}$ of motile donor sperm ($40 \cdot 10^6/\text{mL}$), isolated by “swim-up technique” into microchambers covered by paraffin oil. After the incubation (2 h at 37°C), the immunological reaction was evaluated under inverted microscope at 200x magnification. Agglutination of the sperm cells at dilution at least 1:64 was considered as a positive result.

The i-MAR test was performed to analyze the antisperm response in IgG and IgA class. One microliter of native sperm suspension, $1\ \mu\text{L}$ of inactivated serum, and $1\ \mu\text{L}$ of glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes precoated with human IgG and IgA were mixed together. Then, $1\ \mu\text{L}$ of the corresponding antiserum anti-IgG and anti-IgA (Behringer, Hannover, Germany) was added. Finally, the mixture was covered with coverslip and incubated in humid Petri chamber for 5–10 min. The result of the sperm agglutination reaction was watched under the inverted microscope at 200x magnification. The i-MAR test was considered as positive, if more than 49% of motile spermatozoa were involved in mixed agglutinates (spermatozoa and sheep erythrocytes coated by the corresponding immunoglobulin).

4.2. Sperm Antibodies in Cervical Ovulatory Mucus. We use ovulatory cervical mucus taken by a special syringe 5 days after condom protected intercourse that is planned to happen during ovulation time. Sperm capillary penetration test serves as screening test, and i-MAR test detects local sperm antibodies of IgG and/or IgA [4].

4.3. Zona Pellucida Antibodies. Classic ELISA tests (Laboserv) for detection of zona pellucida antibodies in isotype of IgG and IgM were used.

TABLE 1: Prevalence of positive results for each performed antibody analysis with comparison between study and control groups.

Antibody	Number of positive subjects		Odds ratio (95% confidence interval)
	Study group (n = 52)	Control group (n = 25)	
Antisperm antibodies (ASAs)			
Serum ASA	5/52 (9.6%)	1/25 (4.0%)	2.55 (0.28–23.10)
Cervical ovulatory mucus ASA	6/52 (11.5%)	1/25 (4.0%)	3.13 (0.36–27.52)
Antizona pellucida antibodies (aZP)			
aZP IgG	12/52 (23.0%)	0/25 (0.0%)	N/A
aZP IgM	1/52 (1.9%)	0/25 (0.0%)	N/A
Antiphospholipid antibodies (aPL) against			
phosphatic acid IgG	1/52 (1.9%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatic acid IgM	0/52 (0.0%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl glycerol IgG	2/52 (3.8%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl glycerol IgM	0/52 (0.0%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl inositol IgG	35/52 (67.3%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl inositol IgM	2/52 (3.8%)	1/25 (4.0%)	0.96 (0.08–11.12)
phosphatidyl ethanolamine IgG	16/52 (30.8%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl ethanolamine IgM	3/52 (5.8%)	1/25 (4.0%)	1.47 (0.15–14.88)
phosphatidyl serine IgG	32/52 (61.5%)	0/25 (0.0%)	N/A
phosphatidyl serine IgM	2/52 (3.8%)	2/25 (8.0%)	0.46 (0.06–3.47)
cardiolipin IgG	16/52 (30.8%)	2/25 (8.0%)	5.11 (1.07–24.33)
cardiolipin IgM	4/52 (7.7%)	0/25 (0.0%)	N/A
beta-2-glycoprotein IgG	15/52 (28.8%)	0/25 (0.0%)	N/A
beta-2-glycoprotein IgA	9/52 (17.3%)	0/25 (0.0%)	N/A
annexin-V	7/52 (13.5%)	0/25 (0.0%)	N/A

Note: statistically significant values are marked in bold script.

4.4. Panel of Antiphospholipid Antibodies (aPL). ELISA was also used for detection of aPL against phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, DL-glycerol, and phosphatidic acid. For ELISA, polystyrene microtiter plates were coated with 50 μ L of phospholipid (50 μ L/mL of methanol) and were allowed to dry overnight at 4°C. The plates were then blocked by solution containing 10% of fetal calf serum (FCS) in 1 M TRIS buffer solution (TBS—250 mM Tris, 1.5 M NaCl), for 30 min at room temperature. Subsequently, polystyrene microtiter plates were washed three times by binding buffer (Na₂CO₃, NaHCO₃, NaN₃, pH 9.6).

Serum from patients and controls, diluted to a ratio of 1:50 in TBS containing 10% FCS were added to the wells after the wash. The plates were incubated for 2 hours at room temperature and then washed five times with TBS containing 0.05% Tween 20. Fifty microliters of peroxidase-conjugated antihuman immunoglobulin (IgG, IgA, or IgM) was added and incubated for 1 hour at room temperature. The plates were then washed five times in TBS Tween. Fifty microliters of substrate solution were added to each well and incubated in the darkness for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 50 μ L of 2 M sulphuric acid. The optical density of each well was determined using a Titertek Multiskan MCC/340 (Flow

Laboratories, London, UK) at 492 nm. Background optical density was run for all patients' sera diluted 1:50 in wells on identical microtiter plates coated with methanol but without phospholipids. The phospholipids used to coat the ELISA plates were: phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, DL-glycerol, and phosphatidic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA).

For detection and quantification of serum antiannexin V (Szabo-Scandic Handels GMBH & Co KG, Vienna, Austria) commercial ELISA kits were used, as well as for detection of IgG and IgA antibodies against beta2-glycoprotein I (beta2GPI) (Immunotech, Prague Division, Czech Republic), cardiolipin levels in IgG and IgM (Millenia, London, UK) (Table 1). Statistical analysis with the use of Statgraphics software was performed to obtain cut-off levels for Ig isotypes of aPLs that were derived as values above 3 standard deviations (SDs).

5. Results

Because equality of variance test proved that both groups were similar in age (as an independent baseline characteristic), we were able to assess individual antibody prevalence percentages as follows: nonzero prevalences of tested antibodies were all higher in the study group compared to

controls with the exception of antiphosphatidyl inositol IgM and antiphosphatidyl serine IgM (3.8% versus 4.0% and 3.8% versus 8.0%, resp.). Difference between study group and control group in antisperm antibodies (ASAs) predominance was only nominal and statistically insignificant in both serum ASA (9.6% versus 4.0%, odds ratio 2.55, 95% confidence interval 0.28–23.10) and cervical ovulatory mucus ASA (11.5% versus 4.0%, OR 3.13, 95% CI 0.36–27.52). Concerning antizona pellucida (aZP) and antiphospholipid (aPL) antibodies, no significant difference was observed in IgG subtype across all tests. However, in aZP IgG subclass a difference was found to be significant in favor of study group (12 out of 52 subjects, 23.0%, versus zero of 25 subjects). The same was true for almost all individual aPL antibodies in IgG isotype, the exception being antiphosphatic acid IgG and antiphosphatidyl glycerol IgG (detailed results are shown in Table 1 with significant values marked in bold script). Even though we detected anticardiolipin IgG positivity in two of the patients from control group (unlike any other IgG in this study), the difference in prevalence between groups (30.8% in study group versus 8.0% in controls) still yielded statistically significant result (odds ratio 5.11, 95% CI 1.07–24.33).

6. Discussion

Pregnancy is the most significant exception to the immunological rules where the mother's body not only tolerates, but also broadly supports semiallogenic blastocyst, embryo, and fetus. Remarkable tolerance is provided by complex immunoregulatory mechanisms between the mother and fetal trophoblast. Failure of this tolerance is one of the most common causes of fetal loss. As mentioned in many papers, reproductive failure including recurrent pregnancy loss (RPL) and infertility has been linked to presence of various autoantibodies [5].

In SLE as well as in other autoimmune diseases an overproduction of autoantibodies is described, especially against organ-nonspecific antigens. This feature is based on the loss of B-cell tolerance to antigens, nucleic acids, and their binding proteins. Antinuclear antibodies can trigger proliferation of autoreactive lymphocytes in genetically susceptible individuals under the influence of environmental factors (infections, drugs, toxins, smoking, and hormonal factors) leading to expansion of their specificity towards more nuclear antigens or other structures (elements of blood, plasma components, coagulation factors, and complement cascade) [5]. Influenced by many proinflammatory cytokines and chemokines inflammatory cells migrate into target organs, activate their effector mechanisms, and cause chronic inflammation with the help of chronic humoral components.

The aim of our study was to evaluate the occurrence of variety of antibodies possibly responsible for immunological reproduction failure in women with SLE and compare these results with findings in healthy controls.

Many retrospective and prospective studies have proven effect of antisperm antibodies in various human body

fluids (serum, semen, cervical ovulatory mucus, follicular, or peritoneal fluid) on fertility of women and men [6]. ASA can influence the mechanisms of transport of spermatozoa within the female genital tract due to decreasing sperm motility, may alter sperm capacitation or the acrosome reaction, can interfere with egg fertilization, or have post-fertilization effects on the zygote and preimplantation early embryo [6].

It seems clear that repeated sperm exposition is not sufficient for most women to start production of antisperm antibodies. Other factors such as mechanical, chemical, or inflammatory lesions of the mucosa in female genital system play an important role [7]. Especially in SLE women the immunosuppressive therapy might affect the likelihood of genital tract infection. The proven higher incidence of CMV, EBV virus, and *Chlamydia trachomatis* infection in SLE patients may contribute to their infertility [8, 9].

Antisperm antibodies (ASAs) in both of our groups were determined to evaluate the difference. In contrast to the above mentioned facts we have found no significant difference between antisperm antibody prevalence in study group and control group. Our prevalence data from control group are in consent with evidence about the presence of these antibodies in healthy women with undisturbed reproductive capability (several authors reported that these antibodies occur in approximately 1 to 2.5% of fertile men and in 4% of fertile women) [6]. Even though our data may suffer from low sample size bias, the benefit of both serum and cervical ovulatory mucus antibody tests seems to be the lowest in our pool of patients and controls.

Zona pellucida (ZP), ten micrometers "strong" oogenetic glycoprotein matrix, is formed during oogenesis and its thickness increases with the growth of the oocyte. It serves basically as a protective layer surrounding the oocyte as it matures and is composed of three major glycoproteins ZP1, ZP2, and ZP3. These glycoproteins seem to be the important ovarian antigens participating in the etiology of some infertility disorders, including autoimmune premature ovarian failure (POF). POF can be seen in approximately 1–2% of healthy women, in 30% is connected with some autoimmune causes and is often presented in women with SLE [10]. Autoimmune POF has been proven in animal studies, where the preantral mouse follicles with both anti-ZP2 and anti-ZP antibodies were cultured and thereafter have shown smaller diameter than controls [11]. Furthermore, antizonal antibodies against glycoproteins of ZP are able to inhibit sperm attachment and penetration into oocyte and may be the cause of natural or artificial fertilization failure. The increased levels of serum AZA are very often detected after repeated unsuccessful IVF as we reported earlier [12]. Some studies confirmed an antigamete antibodies (AGAs) in high percentage of patients with unexplained infertility versus patients with proven etiology of infertility [13].

In the present study we have found borderline significant prevalence of aZP IgG antibodies in the study group in comparison with the control group.

Antiphospholipid antibodies (aPL) form a group of antibodies that is probably associated with compromised fertility

not only in SLE women. Although some retrospective studies reported nonsignificant association between antiphospholipid antibodies and pregnancy loss in patients with SLE other studies have confirmed statistically significant interrelation between them [14]. APL could be present in up to 5% of apparently healthy controls and up to 37% of patients with SLE. Less frequently they also accompany other autoimmune diseases [15, 16]. In animal models the administration of aPL during pregnancy causes placental impairment followed by miscarriage. The thrombosis in uteroplacental vasculature is then the result of endothelial cell activation, inhibition of protein C/S system and fibrinolysis, and annexin V displacement. Another significant mechanism for nonthrombotic fetal damage is straight influence of aPL on the anionic phospholipids and β 2-glycoprotein I of trophoblast that very probably impairs the placental production of chorionic gonadotropin during the early phases of pregnancy [17]. Although the current classification for the antiphospholipid syndrome is based on positive identification of one or more of three standardized laboratory assays: anticardiolipin antibodies (aCL), lupus anticoagulant (LA), and anti β (2)glycoprotein I (anti- β (2)GPI) according to the report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies, Galveston, Texas in April 2010 several other antibodies have been proposed to be relevant to APS. In our laboratory we use the expanded scale of aPL detection of antiannexin V, antiphosphatidylserine, antiphosphatidylethanolamine, antiphosphatidylinositol, antiphosphatidylglycerol, and antiphosphatidic acid. Our results suggest that in women with SLE the aPL IgM screening is unsatisfactory. On the other hand, IgG screening shows a marked difference that may well be associated with reproductive failure. The observed integrity (5 of 7 aPL IgG antibodies are significantly different between study and control group) may be due to hypothetical associations of certain IgG antibodies resulting in notional fixed antibody profiles that carry sufficient potential for infertility or pregnancy wastage only in cooperation.

A review of 10 studies of 554 women with SLE found that fetal demise was more common in those with aPL (38 to 59 percent versus 16 to 20 percent in those without such antibodies), LAs (36 versus 13 percent), or aCL (39 versus 18 percent). Fetal loss typically occurs after 10 weeks gestation [5, 18].

The relationship between autoimmunity and reproduction has long been recognized. Although in one critical review about the impact of abnormal autoimmunity on female fertility doubts about influence of aPL to POF in SLE were expressed SLE remains the autoimmune disease mostly compromised by humoral changes. It seems possible that another unexplained mechanism (e.g. presence of other antibodies as an IgG antilaminin-I antibodies, anticorpus luteum glycoprotein and antilymphocytotoxic autoantibodies, or antimitochondrial M5 type antibodies) could be involved [5]. These antibodies were found to interfere with markers of placental and yolk sac differentiation, invasion, endocytosis, signaling, and others promote thrombotic processes [19, 20].

7. Conclusion

Based on our results and long-term experience, we believe that it is appropriate in women with SLE with recurrent and otherwise unexplained fetal loss to recommend a detailed evaluation by a specialist in reproductive immunology. In the case of positive findings of autoantibodies, preventive treatment is to be considered (e.g. corticosteroids, low molecular weight heparin, low dose of aspirin, intravenous immunoglobulin therapy). Because the evidence supporting association of various individual antibodies with reproductive failure is inconclusive a new meta-analysis of antibody profiles in women at risk may be of benefit.

Conflict of Interests

The authors state no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank all west Bohemian rheumatologists for close collaboration. The study was supported by the Grant GA UK no. 696212 from the Grant Agency of the Charles University in Prague, and from Charles University Research Fund (Project Number P36).

References

- [1] D. J. McCarty, S. Manzi, T. A. Medsger, R. Ramsey-Goldman, R. E. LaPorte, and C. K. Kwok, "Incidence of systemic lupus erythematosus: race and gender differences," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 38, no. 9, pp. 1260–1270, 1995.
- [2] R. Andrade, M. L. Sanchez, G. S. Alarcón et al., "Adverse pregnancy outcomes in women with systemic lupus erythematosus from a multiethnic US cohort: LUMINA (LU1)," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 26, no. 2, pp. 268–274, 2008.
- [3] R. A. Hickman and C. Gordon, "Causes and management of infertility in systemic lupus erythematosus," *Rheumatology*, vol. 50, no. 9, pp. 1551–1558, 2011.
- [4] M. Petri, "Review of classification criteria for systemic lupus erythematosus," *Rheumatic Disease Clinics of North America*, vol. 31, no. 2, pp. 245–254, 2005.
- [5] Y. Shoenfeld and M. Blank, "Autoantibodies associated with reproductive failure," *Lupus*, vol. 13, no. 9, pp. 643–648, 2004.
- [6] W. W. C. Chiu and L. W. Chamley, "Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies," *Fertility and Sterility*, vol. 82, no. 3, pp. 529–535, 2004.
- [7] S. Mazumdar and A. S. Levine, "Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment," *Fertility and Sterility*, vol. 70, no. 5, pp. 799–810, 1998.
- [8] M. V. Febrônio, R. M. R. Pereira, E. Bonfá, A. D. Takiuti, E. A. G. Pereyra, and C. A. A. Silva, "Inflammatory cervicovaginal cytology is associated with disease activity in juvenile systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 16, no. 6, pp. 430–435, 2007.
- [9] Y. Berkun, G. Zandman-Goddard, O. Barzilai et al., "Infectious antibodies in systemic lupus erythematosus patients," *Lupus*, vol. 18, no. 13, pp. 1129–1135, 2009.
- [10] T. Forges, P. Monnier-Barbarino, G. C. Faure, and M. C. Béné, "Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology," *Human Reproduction Update*, vol. 10, no. 2, pp. 163–175, 2004.

- [11] G. Calongos, A. Hasegawa, S. Komori, and K. Koyama, "Harmful effects of anti-zona pellucida antibodies in folliculogenesis, oogenesis, and fertilization," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 79, no. 2, pp. 148–155, 2009.
- [12] Z. Ulcova-Galova, "Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 86, no. 2, pp. 115–121, 2010.
- [13] K. Koyama, A. Hasegawa, Y. Tsuji, and S. Iosjima, "Production and characterization of monoclonal antibodies to cross-reactive antigens of human and porcine zonae pellucidae," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 7, no. 3, pp. 187–198, 1985.
- [14] K. C. Kalunian, J. B. Peter, H. R. Middlekauff et al., "Clinical significance of a single test for anti-cardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus," *American Journal of Medicine*, vol. 85, no. 5, pp. 602–608, 1988.
- [15] R. Cervera, J. C. Piette, J. Font et al., "Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 46, no. 4, pp. 1019–1027, 2002.
- [16] J. S. Ginsberg, P. Brill-Edwards, M. Johnston et al., "Relationship of antiphospholipid antibodies to pregnancy loss in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study," *Blood*, vol. 80, no. 4, pp. 975–980, 1992.
- [17] A. Tincani, L. Spatola, M. Cinquini, P. Merino, G. Balestrieri, and Y. Shoenfeld, "Animal models of antiphospholipid syndrome," *Revue du Rhumatisme*, vol. 65, no. 11, pp. 614–618, 1998.
- [18] H. P. McNeil, C. N. Chesterman, and S. A. Krilis, "Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies," *Advances in Immunology*, vol. 49, pp. 193–280, 1991.
- [19] R. Cervera and J. Balasch, "Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction," *Human Reproduction Update*, vol. 14, no. 4, pp. 359–366, 2008.
- [20] H. J. A. Carp, C. Selmi, and Y. Shoenfeld, "The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss," *Journal of Autoimmunity*, vol. 38, no. 2-3, pp. J266–J274, 2012.

Příloha IX

GONCALVES FERREIRA, N., L. ČERNÁ, M. ČEDÍKOVÁ, K. BIBKOVÁ, Z.
MIČANOVÁ and Z. ULČOVÁ-GALLOVÁ. Some immunological properties of female
saliva and its effect on sperm motility. *Cas Lek Cesk.* 2014, Vol. 153, No. 2, pp. 86-90.

ISSN 0008-7335.

Some immunological properties of female saliva and its effect on sperm motility

¹Nadia Gonçalves Ferreira, ¹Lenka Černá, ¹Miroslava Čedíková, ^{1,2}Katarina Bibková, ^{1,2}Zdenka Mičanová, ^{1,2}Zdenka Ulčová-Gallová

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University Pilsen
²Genetics Pilsen

Cas. Lék. ces. 2014; 153: xx-xx

SUMMARY

Background. In this study, we investigated pH, levels of IgA, IgG, IgM, lysozyme and spermagglutinating antibodies in human saliva of healthy women, with or without hormonal contraception (HC) and their effect on sperm motility.

Methods and results. Saliva was collected immediately after waking up from 59 healthy randomly selected women. We measured pH in sera and in saliva as well as immunoglobulin G, A and M levels in saliva by radial immunodiffusion. Sperm - saliva capillary penetration test in native saliva served for examination of sperm motility, indirect-MAR test for detection of sperm antibodies in sera, and in saliva, both observed by inverted microscope. The average pH values in native saliva according to the menstrual cycles were: from 2-5 days 6.896, from 6-17 days 7.027, and from 18 and more days 7.17. Rapid decrease of sperm motility was registered in acidic saliva in comparison with alkali-

line. The average concentration of IgA, IgG, IgM and lysozyme slightly differed in women with or without hormonal contraception. Moderate decreasing of sperm motility was found in saliva with higher levels of IgA. No sperm agglutinating antibodies in saliva and in serum were detected in all subjects.

Conclusions. The pH of saliva is influenced by several causes (hormonal, immunological, microbiological factors, by meal and drinks, smoking, etc.). We demonstrated that sperm motility is lower in acidic saliva. pH is markedly changed during various days of menstrual cycles. We proved individual high levels of saliva IgA. Human saliva used as coital lubricant decreases sperm motility, but does not replace a local form of contraception.

KEYWORDS

human saliva - immunoglobulins - lysozyme - pH - sperm motility - sperm antibodies

SOUHRN

Ferreira GN, Černá L, Čedíková M, Bibková K, Mičanová Z, Ulčová-Gallová Z. Imunologické vlastnosti ženských slin a jejich vliv na pohyblivost spermií

Východisko. Cílem studie bylo sledovat pH, hladiny IgA, IgG, IgM, lysozymu a spermaglutinační protilátky ve slinách zdravých dívek s nebo bez hormonální antikoncepce, a účinek slin na motilitu spermií.

Metody a výsledky. Sliny 59 dívek byly odebrány ihned po probuzení. Změřili jsme pH v jejich sérech a slinách, IgG, M a A radiální imunodifuzí jen ve slinách. Spermie - slina kapilární penetrační test sloužil k vyšetření pohyblivosti spermií, nepřímý MAR-test k určení protilátek proti spermiím v sérech a ve slinách sledovaných pod inverzním mikroskopem. Průměrné pH nativní sliny rozdělené podle dnů menstruačního cyklu byly: mezi 2-5 dnem 6,896, mezi 6-17 dnem 7,027, od 18. dne a výše pak 7,17. Rychlý pokles pohyblivosti spermií jsme zjistili

v kyselější slině ve srovnání se zásaditější. Průměrná koncentrace IgA, IgG, IgM a lysozymu se u dívek s hormonální nebo bez hormonální antikoncepce velmi málo liší. Mírné snížení motility spermií jsme zaznamenali ve slinách s vyššími hladinami IgA. Nezjistili jsme žádné spermaglutinační protilátky ve slinách ani v sérech u sledovaných dívek. **Závěry.** pH ve slinách je ovlivňováno různými faktory (hormonální, imunologické, mikrobiální, ale i jídel, pitím, kouřením apod.). Poukázali jsme na to, že motilita spermií je nižší v kyselější slině. pH slin se výrazně mění během menstruačního cyklu. Prokázali jsme individuálně vysoké hladiny IgA ve slinách. Přirozené lidské sliny používané jako koitální lubrikans snižují pohyblivost spermií, ale nenahrazují lokální přípravky antikoncepce.

KLÍČOVÁ SLOVA

lidská slina - imunoglobuliny - lysozym - pH - pohyblivost spermií - protilátky proti spermiím

INTRODUCTION

Saliva is a complex aqueous fluid composed of electrolytes (bicarbonate, potassium, sodium chloride), mucopolysaccharides and glycoproteins, some antibacterial components such as hydrogen peroxide, thiocyanate or secretory

immunoglobulin A and several enzymes like alpha-amylase, lingual lipase, lysozyme, salivary lactoperoxidase, lactoferrin, beta-glucuronidase, esterases, phosphatases, kallikrein, ribonucleases (1). Immunoglobulins of all isotypes are also detected in human saliva (2, 3). Saliva is easily available

through non-invasive methods and as a body fluid is constantly exposed to external factors such as smoking, food intake and internal aggressors such as microbes in dental caries that easily disturb salivary biochemical composition (3-5). Due to its properties, saliva can be involved in several important physiological mechanisms such as digestion. Properties of saliva are also influenced by disinfection and hormones (6). Currently, 15% of the couples of reproductive age suffer from infertility. Some of them use saliva as "natural lubricant", often recommended during the initial phase of sexual intercourse. However, saliva has a negative effect on sperm motility (7, 8).

Our experimental study assesses selected immunological properties of human saliva on sperm motility in young women with and without hormonal contraception.

STUDY AND METHODS

In this study we included blood and saliva samples from 59 randomly selected healthy female students aged 14-30 years (average age 22 years); 13 of them were on HC, 46 without hormonal contraception; 50 girls were sexually active and 9 still virgin. The questionnaire given to any girl informed about basic gynaecological information. This study was approved by the Czech Institutional Ethics Committee. A written informed consent and a questionnaire were obtained from each subject participating in the study. Table 1 and 2 provide additional anamnestic data. All samples of sera and saliva were collected under fasting conditions and under abstinence of alcohol and cigarette smoking for at least 9 hours before collection. Saliva samples were collected in sterile containers and immediately after the student woke up. The saliva was then transported within half hour into laboratory.

Each sample was centrifuged (5000 rpm for 10 minutes), to remove mucin. Supernatants were stored at -80 °C for later immunological examination. We took also 5 ml of blood and serum was obtained and stored at -20 °C.

Fresh semen samples without spermagglutinating antibodies were collected from two healthy fertile men by masturbation for next study.

Our following experiments were performed at room temperature.

pH measurement

pH meter (Hannah Instruments, Hamilton-electrodes) was used for determination of the pH of native and supernatant of saliva, and blood serum in each sample. The pH values were distributed according to the day of the menstrual cycle, and hormonal contraception. All measurements were repeated twice and the mean value was plotted on a graph for further analysis.

Radial immunodiffusion technique

BIND A RID (The Binding Site, UK) was used for detection of IgA, IgG, IgM isotypes, and lysozyme levels in the 59 supernatants of saliva only.

Sperm motility in saliva

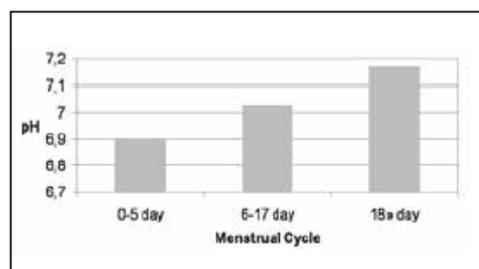
We used a simple sperm-saliva capillary penetration test, modification of the Kremer test for ovulatory cervical mucus (9). For our experiments, we have chosen 2 saliva samples with different pH (acidic and alkaline), and another 2 samples with different values of IgA.

A vertically tube was filled with saliva supernatants and put to a reservoir filled with 200 µl of fresh semen with a cell concentration of 60.000.000/ml from a healthy donor. Under inverted Microscope (Olympus, Japan), sperm progressive motility and vitality was measured at the intervals of start 0, 2, 5, 10 and 15-20 minutes.

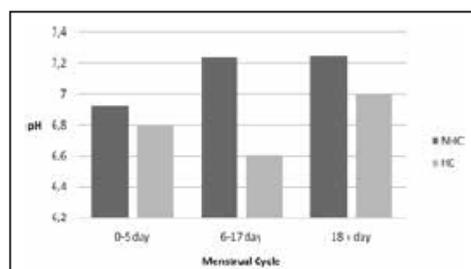
Indirect mixed antiglobulin reaction test (i-MAR)

We examined sperm agglutinating antibodies in donors semen by direct MAR and in all supernatants of saliva samples by i-MAR-test.

The i-MAR test was performed to analyze the anti-sperm response in IgG and IgA class. One microliter of native sperm suspension, 1 µl of inactivated saliva, 1 µl of glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes pre-coated with human IgG, and IgA, were mixed together. Then, 1 µl of the corresponding antiserum anti-IgG, anti-IgA (Behringer, Hannover, Germany) was added. Finally, the mixture was covered with coverslip and incubated in humid Petri chamber for 5-10 min. The result of the sperm agglutination reaction was observed under the inverted microscope at 200x magnification. The i-MAR test was considered as positive, if more than 49% of motile spermatozoa were involved in mixed agglutinates

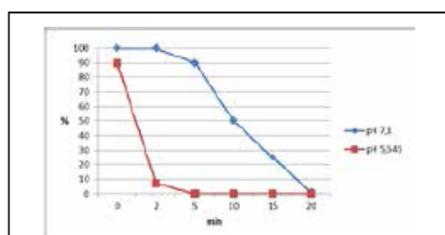


Obr. 1 pH values of native saliva according to the menstrual cycle in all studied samples



Obr. 2 pH values of native saliva from patients using HC and without HC according to the menstrual cycle
NHC - not used HC, HC - hormonal control

ORIGINAL ARTICLE



Obr. 3 Sperm motility according to various pH. Two saliva samples were chosen according to various pH (alkaline and acidic) for the experiment. Results are expressed in percentage of decreased viability and progressive movement of sperm (used concentration of 60 millions per ml).

Tab. 1 Basic gynaecological data from 59 questionnaires of female students

Patients data	Number of patients
hormonal contraception	13/59
no hormonal contraception	46/59
irregular menstrual cycle	6/59
virgins	9/59
sexually active	50/59

Tab. 2 Social history and up to date information from student questionnaire

	Patients data	Number of patients
social history	smokers	11/59
	occasional drinker	53/59
	immunological diseases	0/59
medical condition	cancer	0/59
	present infection	0/59
	dental carrie(s)	0/59

Tab. 3 Average pH of saliva and blood serum in all examined samples

	pH	s	o
native saliva	7.1 (6.7–7.7)	0.297	0.294
supernatant of saliva	7.4 (7.0–7.6)	0.204	0.202
serum	7.35 (7.3–7.45)	0.131	0.129

(spermatozoa and sheep erythrocytes coated by the corresponding immunoglobulin).

RESULTS

Native saliva sample had a lower pH (average 7.10) value compared with supernatant saliva (7.4). Average pH of sera was 7.35 (Table 3).

The average pH values during menstrual cycle from 0–5 days 6.896, from 6–17 days 7.027, and in secretory phase, from 18 and more days 7.17 in all girls are shown in Figure 1.

Women using hormonal contraception have a lower (more acidic) pH value compared with no hormonal contraception (Figure 2).

Two saliva samples chosen for experiment show decreased sperm motility and viability in acidic saliva (pH 5.545) compared with alkaline saliva (pH 7.1) in sperm-saliva capillary penetration test (Figure 3). The sperm motility was reduced by 50% in one minute with the more acidic saliva and after 5 min no sperm motility was observed.

The average levels of IgA, IgG, IgM isotypes and lysozyme were almost the same in women with or without HC (Fig. 4, Table 4).

In all semen samples, saliva reduced sperm progression and motility. For example Figure 5 shows the result of reduced sperm motility in a saliva sample with higher and lower IgA levels (very similar results also for IgG, IgM isotypes and lysozyme).

DISCUSSION

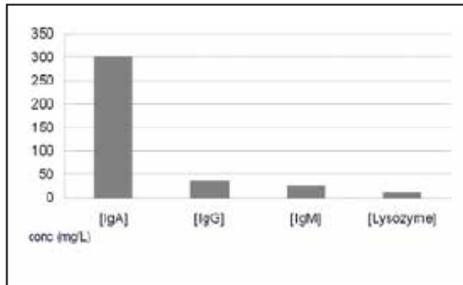
Previous studies (e.g. 2, 5, 10) highlight the fact that human saliva contains direct antibacterial components such as various antimicrobial peptides as thiocyanate ions, even increased amylase levels, lactoperoxidase, and lysozyme, immune cells as well as secretory IgA and other immunoglobulin isotypes, which participate in the mechanism decreasing sperm motility. Whole saliva is composed of the secretions of the parotid glands, the submandibular, the sublingual, and the minor salivary glands.

We found that the pH of saliva increases during the menstrual cycle. The fact can be explained by hormonal changes not only in physiological cycle but also by hormonal contraception. We noted a small difference in pH in supernatant and native saliva. Slightly acidic native saliva is affected by mucin (e.g. 3).

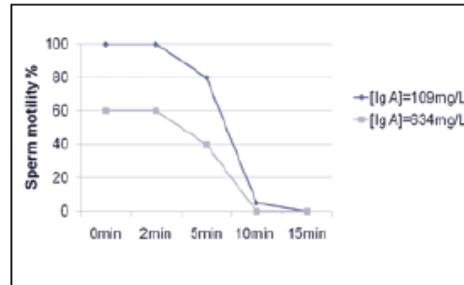
Our study demonstrates that young women with hormonal contraception have nearly the same levels of IgG, IgA, IgM isotypes and lysozyme in saliva compared with those without artificial cycles. Identification of basic immunoglobulins suggests an IgA predominance, which is powerfully secreted directly by salivary glands.

Saliva is a mirror of our body (4, 11–17) allowing detection of many hormonal and metabolic disease as diabetes, thyroid disorder, adrenal disease, cancer, viral infections etc. Our group of young women were healthy, without oral acute or chronic periodontal pathologies such as gingivitis and/or other autoimmune disease as e.g. Sjogren's syndrome.

We have shown in this work some properties of human saliva and their differences in women with and without hormonal contraception. We modeled the situation of unprotected intercourse (using human saliva as lubricant) as



Obr. 4 Average levels of IgA, IgG, IgM and lysozyme in all supernatants of saliva samples



Obr. 5 Sperm motility according to IgA levels into two individual samples chosen according to the higher and lower levels of IgA in saliva supernatant. Decreased sperm progressive motility is expressed as a percentage of the sperm and in time.

simple sperm - saliva capillary penetration test. We proved that human saliva impairs motility and progressive movement of sperm. Our data highlights to two facts:

1. The effect of saliva as lubricant for couples trying to be pregnant is not suitable because the movement of sperm into vagina and uterine cervix will be slower as we have shown in our experiments.

2. Saliva cannot be used as a local contraceptive "treatment" for fertile couples even though some spermicidal properties on the sperm are proven.

CONCLUSION

Saliva with its chemical and immunological properties used as a coital lubricant could not use as a nature form of contraception even if sperm progressive motility impairs.

This work was supported by a grant number MSM 002 62 0812 of the Charles University Medical Faculty of Pilsen, Czech Republic, and by the Charles University Research Fund (project number P36).

References

1. Beeley JS. Clinical applications of electrophoresis of human salivary proteins. *Chromatography* 1991; 569: 261-280.
2. Brandtzaeg P. Salivary immunoglobulins. In Tenover JO (ed.) *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*, Vol II. Boca Raton, Florida: CRC Press 1989; 1- 55.
3. Fos P. Saliva composition and its importance in dental health. *Compend Contin Educ Dent* 1989; 13: 457-460.
4. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, de Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007; 383: 30-40.
5. Dougherty KA, Cockett ATK, Urry RL. Effect on amylases on sperm motility and viability. *J Urol* 1978; 120: 426-430.
6. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar, G et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *Br J Cancer* 2009; 101: 1194-1198.
7. Anderson L, Lewis SEM, McClure N. The effect of coital lubricants on sperm motility in vitro. *Human Reproduction* 1998; 13: 3351-3356.
8. Tulandi T, Plouffe L, McInnes RA. Effect of saliva on sperm motility and activity. *Fertility and Sterility* 1982; 38: 721-723.
9. Kremer J, Jager S. The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Human Reprod* 1992; 6: 781-784.

Tab. 4 Concentration of IgA (78-983 mg/l), IgG (15-176 mg/l), IgM (18.7-27.4 mg/l) and lysozyme (2.6-15.2 mg/l) with standard deviation in native saliva samples

	mg/l			
	IgA	IgG	IgM	Lysozyme
HC	252,8 (s 141 ÷ 133)	24,45 (s 13.99 ÷ 12.77)	28,8 (s 2.64 ÷ 2,47)	12,1 (s 5.5 ÷ 3.9)
NHC	249,5 (s 178 ÷ 172)	39,2 (s 39.9 ÷ 38.8)	28,1 (s 1,8 ÷ 1,76)	10,7 (s 5.9 ÷ 6.03)

HC - hormonal contraception (13 girls), NHC - non hormonal contraception (46 young women)

ORIGINAL ARTICLE

10. **Farnaud SJ, Kostl O, Getting SJ, Renshaw D.** Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. *Scientific World Journal* 2010; 16: 434–456.
11. **Bosker WM, Huestis MA.** Oral fluid testing for drugs of abuse. *CASOPIS??NAZEV??* 2009; 55: 1910–1913.
12. **Greabu M, Battino M, Mohora M, et al.** Saliva – a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life* 2009; 32: 124–132.
13. **Pesce MA, Spitalnik SL.** Saliva and the clinical pathology laboratory. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1098: 192–199.
14. **Pink R, Simek J, Vondrakova J, et al.** Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic* 2009; 153: 103–110.
15. **Gröschl M.** Current status of salivary hormone analysis. *Ann Biol Clin (Paris)* 2009; 67: 493–504.
16. **Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ, et al.** Salivary: Interleukin-1beta concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 922–927.
17. **Vining RF, McGinley RA.** The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem* 1987; 27: 81–94.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.
Genetika Plzeň
Parková 11A, 326 00 Plzeň
e-mail: ulcova-gallova@email.cz

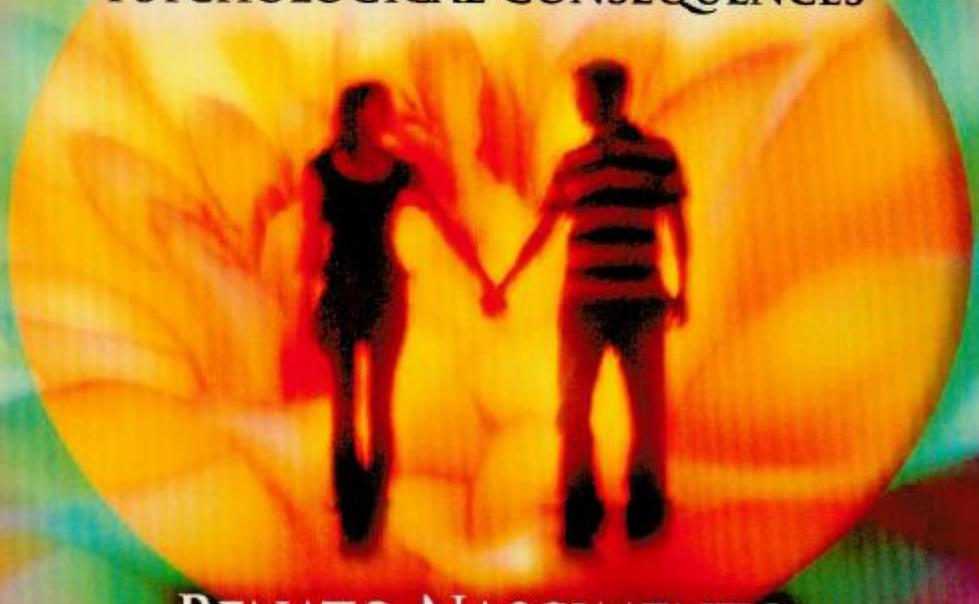
Příloha X

KRÁLÍČKOVÁ, M., M. ČEDÍKOVÁ, P. PITULE, P. ŠÍMA and V. VĚTVIČKA. The Impact of Follicular Fluid Components and Embryo-Endometrial Cross-Talk on the Oocyte Quality or Embryo Viability: Search for New Biomarkers . – In: Renato NASCIMENTO, and Henrique Vilas BOAS, eds. *Infertility: Genetic Factors, Treatment Risks and Benefits, Social and Psychological Consequences*. New York: Nova Science Publishers, January 2013, pp. 59-76, ISBN: 978-1-62257-909-9.

OBSTETRICS AND GYNECOLOGY ADVANCES

Infertility

GENETIC FACTORS, TREATMENT RISKS
AND BENEFITS, SOCIAL AND
PSYCHOLOGICAL CONSEQUENCES



RENATO NASCIMENTO
HENRIQUE VILAS BOAS
EDITORS

NOVA



N
o
v
a

B
i
o
m
e
d
i
c
a
l



The Impact of Follicular Fluid Components and Embryo-endometrial Cross-talk on the Oocyte Quality or Embryo Viability: Search for New Biomarkers

*M. Králíčková^{1,2}, M. Čedíková^{1,3}, P. Pitule^{1,3}, P. Šíma⁴
and V. Větvicka^{5,*}*

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine,
Charles University, Plzen, Czech Republic

²Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital,
Faculty of Medicine, Charles University, Plzen, Czech Republic

³Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University,
Plzen, Czech Republic

⁴Department of Immunology and Gnotobiology,
Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁵University of Louisville, Department of Pathology, Louisville, KY, US

Abstract

To overcome the still insufficient implantation rate following *in vitro* fertilization (IVF) in humans, more than two embryos are commonly replaced which potentially leads to a high number of multiple pregnancies with associated risks such as low birth weight. The solution for avoiding multiple pregnancies could be optimization of embryo selection and single embryo transfer.

The traditional systems for assessing gamete and embryo viability have limited ability to accurately select those with the best developmental potential. Morphological

* Correspondence to: Vaclav Větvicka, University of Louisville, Department of Pathology, 511 S. Floyd, Louisville, KY 40202, U.S.A. email: vaclav.vetvicka@louisville.edu.

evaluation remains the primary method of oocyte and embryo assessment during IVF cycles. However, its modest predictive power and inherent inter- and intra-observer variability limits its clinical value. Prolonged embryo culture to blastocyst stage was introduced as a possible strategy for selecting the best embryos but the extended period of *in vitro* culture may have its side effects.

Successful embryo implantation requires accurate temporal regulation of maternal immune functions to accommodate a semi-allogeneic embryo. To prepare the immunological tolerance at the beginning of implantation, the precise temporal regulations between the immune and endocrine components are required. Our review will focus on molecules of embryo-endometrial cross-talk that are engaged in regulation of the embryo implantation, and on selected follicular fluid components that might play a role in developmental/embryogenic potential of the oocyte.

The review will also discuss advances in the understanding of the regulation of fertility that has been made during last 15 years with the production of over 400 mutant mouse models with a reproductive phenotype. Indeed, the past few years have witnessed a virtual explosion in the identification of gene mutations or polymorphisms that cause or are linked to human infertility and that are inherited in a polygenic/multifactorial fashion.

The aim of this review is to point out two recent trends in reproductive medicine - the search for potentially useful biomarkers for improvement of pregnancy rates after the assisted reproduction techniques (ART); and the importance of homeostasis that makes spontaneous conception possible. Especially in diagnoses like the endometriosis, the causes of infertility remains not fully understood and the best option for these patients is a return to the balance that enables the spontaneous conception.

Introduction

Since the first successful *in vitro* fertilization (IVF) in humans and the birth of Louise Joy Brown, the world's first test-tube baby in 1978, the number of patients using Assisted Reproductive Technologies (ART) has increased tremendously. ART have increased in number, their spectrum has widened and, of course, their efficiency is increasing. But ART are not efficient enough yet and even today, many women seeking medical treatment for infertility never give birth to a child.

Successful implantation requires a functionally normal, viable embryo (or embryos) at the blastocyst stage and a receptive endometrium. The embryo - endometrium cross-talk is highly regulated. Numerous molecules are taking part, organized in a hierarchized cascade of events initiated by steroid hormones and mediated by a row of cytokines, growth factors and integrins that determine establishment of a timely dialogue between endometrium and blastocyst.

Current ART as well as most of present investigative attention in the field of infertility are devoted mainly to the embryo or the endometrium. For the enhancement of ART efficiency, it is necessary to pay more investigative effort to the marginalized topic, the role of molecular vectors transferring the cross-talk signals between the maternal uterine tissues and trophoblast and subsequently to transfer new findings in two directions - to identify potential biomarkers for prediction of the success of infertility treatment and to enable new

ways in the infertility treatment by returning the homeostasis and making the spontaneous conception possible again.

Assisted Reproductive Technologies - On the Search of "Positive" and "Negative" Predictive Markers

Infertility affects 10-15% of couples at reproductive age. At present, a strong demand for assistance in resolving this problem exists, but the implantation and pregnancy rates following IVF are still not sufficient [1, 2]. To increase the success of the treatment, more than two embryos are commonly replaced, which might potentially result in high number of multiple pregnancies with associated elevated risks such as low birth weight. Possible solution for avoiding multiple pregnancies could be optimization of embryo selection and subsequent single embryo transfer.

Morphological criteria remains the primary method of the oocyte and embryo assessment during IVF cycles, but its modest predictive power and inherent inter- and intra-observer variability limits its value [3]. Prolonged embryo culture to blastocyst stage was introduced as a possible strategy for selecting the best embryos. Unfortunately, the method has its limits in increasing the rates and the extended period of *in vitro* culture may have its side effects – e. g. predispose the embryo to phenomenon such as 'large offspring syndrome,' which is probably linked to altered gene expression, particularly of imprinted genes [4].

It is supposed that evaluation criteria should be changed by adding the detection of certain molecular markers (either in follicular fluid, blood or embryo culture media) that will have a predictive value. In the follicular fluid, various molecules have already been proved to be reliable in predicting the oocyte quality or even embryo viability. These have the potential to be used during infertility treatment as "positive predictive markers." Results obtained by our group [5, 6] demonstrated that *lif* gene mutations coincide with infertility but do not influence the infertility treatment outcome in general, only in the presence of certain other factors or diagnosis, e.g. endometriosis, therefore serving as "negative predictive markers." Both approaches could be combined and lead to individualization of the therapy, which is highly desirable way of approach.

What is the Role of Genetic Alterations in Infertility?

Pivotal information has been derived for a host of rare genetic disorders. Unfortunately, in the common causes of female infertility, the progress has been much slower. Many infertile couples continue to be diagnosed as idiopathic infertility or given descriptive diagnoses not providing a real cause for their reproductive defect.

Important advances in the understanding of the treatment of infertility have been made during last 15 years, with the production of over 400 mutant mouse models with a reproductive phenotype (for review see [7-9]). Indeed, the past years have witnessed a virtual explosion in the identification of genetic mutations or polymorphisms that cause or are linked to human infertility and that are inherited in a polygenic/multifactorial fashion (for review see [10]). Nevertheless, translation of these findings to the clinical practice remains agonizingly slow.

There are three necessary conditions for successful embryo implantation – the viable embryo, the receptive endometrium, and their mutual molecular cross-talk [11]. Under the influence of steroid hormones and paracrine signals from the developing embryo, the endometrium becomes receptive for only a limited period of time. The receptive state is characterized by the expression of particular genes that allow the refractory endometrium to respond to the embryo and permit attachment.

Numerous studies in mice have suggested the importance of different cytokines produced by both embryo and maternal tissue [12, 13] and participating in the cross-talk between the implanting blastocyst and the endometrium [14]. The presence of complex network of cytokines and their overlapping biological activities means that alteration of one cytokine is likely to affect others, making studies of their role in implantation failure extremely difficult.

p53 – A New Player in Reproduction Regulation

The p53 (OMIM[®]191170) is a key tumor suppressor. Its function is lost in many types of cancers, either by mutation or by excessive negative regulation (for review see [15]). Since 2002, several groups have identified the existence of several p53 isoforms and have demonstrated their roles in modulation of p53 suppressive activity in cancer (for review see [16]). However, little is known about p53's normal physiological function. Recently, it has been shown that p53 is important in reproduction in a gender-specific manner [17]. Significant decreases in embryonic implantation, pregnancy rate and litter size were observed in mating with p53^{-/-} female mice but not with p53^{-/-} male mice. The gene encoding leukemia inhibitory factor (LIF) was identified as a p53-regulated gene that functions as the downstream mediator of this effect. p53 can regulate both basal and inducible transcription of LIF and loss of p53 decreased both the level and function of LIF in uterus. Lower LIF levels were observed in the uterus of p53^{-/-} mice than in those of p53^{+/+} mice, particularly at day 4 of pregnancy when transiently induced high levels of LIF were crucial for embryonic implantation [18, 19]. This observation probably accounts for the impaired implantation of embryos in p53^{-/-} female mice. Administration of LIF to pregnant p53^{-/-} mice restored maternal reproduction by improving implantation. These results clearly confirm function for p53 in maternal reproduction through the regulation of LIF [20, 21].

Evidence is accumulating that p53 may have a similar function in humans - an association has been reported between women carrying the p53 codon 72 mutation (a proline to arginine change) and recurrent implantation failure [21]. In addition, the p53 gene was suggested to be a candidate gene for endometriosis [22]. The p53 pathway is therefore the subject of intense research trying to identify its role in both cancer and infertility.

The Role of LIF in Embryo Implantation

The LIF is a pluripotent cytokine that plays a central role in the control of the embryo implantation. LIF (OMIM[®]159540) is a secreted glycoprotein first described as a factor inducing the differentiation of myeloid leukemic M1 cells into macrophages [23]. An important role for LIF in implantation was shown in LIF knockout mice, where embryo implantation did not occur [24]. In endometrium of healthy women, LIF and LIF mRNA are

expressed throughout the menstrual cycle with a striking increase in the midsecretory phase, coinciding with a supposed window of implantation. Binding of LIF to LIF receptor (LIFR) activates signal transduction pathways [25]. Human blastocysts express mRNAs for LIFR participating actively in establishing contact with the endometrium. In the endometrium, LIFR are expressed in the epithelium throughout the cycle with strong increase in the midsecretory phase. Endometrium of infertile women produces significantly less LIF during the period of receptivity [26]. In addition, LIF is detected in uterine flushing, and its level is significantly lower in women with idiopathic infertility. Likewise, endometrial explants derived from women with idiopathic infertility showed reduced levels of LIF secretion (for review see [27-29]).

The first report of *lif* gene mutations in human searched for mutations in 74 non-selected nulligravid infertile women and identified three point mutations. Two of them were G to A transitions located in exon 3 at the positions 3400 and 3424 of the *lif* gene that lead to an amino acid exchanges (valine 64 methionine and alanine 72 threonine) in the regions corresponding to AB loop of the LIF protein. The AB loop seems to be highly important for interaction with the LIFR, so that the mutation causing the amino acid exchange within the region could result in reduced biological activity of the LIF protein. The third mutation, the C to A transition at position 715, was located in the regulatory region, 6 bp from the start codon of the LIF gene. It was hypothesized that this mutation could lead to transcription abnormalities and result in the decreased LIF expression [30].

The second report of *lif* gene mutations in infertile women focused on patients with recurrent failure of IVF or intracytoplasmic sperm injection, defined as three or more embryo transfers, and on women diagnosed with unexplained infertility for at least two years. The previously described G to A transition at the position 3400 and the G to A transition at position 3441 were identified in nulligravid women with unexplained infertility. The G to T transition at the position 3453 was identified in a nulligravid woman with more than three failure of IVF. Both newly described transitions, at the position 3453 and 3441, did not cause the protein structure alterations. The only one woman with the heterozygous potentially functional mutation at position 3400 conceived after IVF treatment. From these results, the authors concluded that the second allele of the *lif* gene, stimulated hormonally during superovulated cycle, might compensate the defect [31]. Their hypothesis was supported by another study, which demonstrated that LIF on luminal epithelium enhances the expression of a subset of progesterone-regulated genes [25].

In our studies 15 positive samples were identified in exon 3.2 in the group of infertile women (n=176) [5, 6]. All samples showed an alteration in DNA sequence that was identical to previously described potentially functional *lif* gene point mutation, the G to A transition at the position 3400. Out of the 15 infertile women, the group A was made up of women with diagnoses that are frequently accompanied by changes in humoral and cell mediated immunity - idiopathic infertility and endometriosis (n=7). Group B was comprised of patients with polycystic ovary syndrome, andrological factor, tubal factor and hyperprolactinemia (n=8). The control group was comprised of 136 infertile women with no *lif* gene mutation diagnosed with idiopathic infertility and endometriosis (n=37) (group C) and patients with polycystic ovary syndrome, tubal and andrological factor (n=99) (group D). Seven of the mutation-positive patients were successfully treated by IVF, but in this group there was no diagnosis of idiopathic infertility and only one of endometriosis, meaning that there is a statistically significant difference in the pregnancy rates between groups A and B, but no

statistically significant difference when comparing patients with the *lif* gene mutation (group A+B) to no *lif* gene mutation (group C+D). These results suggest that the idiopathic infertility and endometriosis have a negative impact on the outcome of IVF treatment in mutation-positive women [6].

The Role of IL-11 in Endometrial Decidualisation

Interleukin 11 (IL-11) (OMIM*147681) is essential for murine implantation and signals *via* intracellular phosphorylation of STAT3 in the endometrium similar to LIF [32]. Both molecules are present in the endometrium of women during the receptive window. IL-11 expression is critically important during decidualization in the human endometrium and its aberrant regulation may be associated with some types of infertility [33]. Reduced endometrial pSTAT3 and IL-11 levels were shown in some women with idiopathic infertility [34] and in some endometriotic patients [35].

The Oocyte – Another Key Player in the Success of Implantation

The oocyte quality profoundly affects fertilization and subsequent embryo development driving the continued search for reliable predictors of oocyte developmental competence. Traditional methods for the evaluation of oocyte quality are based on morphological classification of the follicle, cumulus-oocyte complex, polar body and/or meiotic spindle (for review see [36]). Several intrinsic (such as mitochondrial status and glucose-6-phosphate dehydrogenase 1 activity) and extrinsic markers (such as apoptosis of follicular cells, levels of the transforming growth factor-beta superfamily, anti-müllerian hormone, inhibin B, granulocyte colony stimulating factor, macrophage colony stimulating factor and vascular endothelial growth factor in follicular fluid (FF)) have also been reported as useful indicators of oocyte competence and embryo quality [37-46]. In some cases, the controversy about the role of an individual marker remains – e.g. in the question whether LIF or leptin in FF can predict the oocyte quality or outcome of IVF, there were various studies done with contradictory results [47-49].

Oxidative Stress in Follicular Fluid (FF) – A Field for Search of Valid Biomarkers?

Oxidative stress is defined as an increased intracellular concentration of the reactive oxygen species (ROS) in a steady-state condition. The possibility that ROS and oxygen radicals might be involved in human reproduction was suggested nearly 80 years ago [50]. Their pathological effects result from damage to lipids (particularly in the cell membrane), nucleic acids, proteins and other cellular materials [51]. *In vivo*, the damaging effects of oxygen radicals are usually prevented or limited by endogenous antioxidants or scavengers of free radicals. These include enzymes such as superoxide dismutase, catalase and selenium-

dependent glutathione peroxidase as well as lipid- and water-soluble antioxidants such as vitamins C, E and uric acid [52]. Ho et al. [53] and Matzuk et al. [54] reported decreased litter size and number of litters per month in female homozygous mutant mice lacking superoxide dismutase.

Proteome analysis of human follicular fluid from 25 normo-ovulatory women undergoing assisted reproduction techniques due to a male infertility factor (that means that they are fully fertile) identified several important antioxidant enzymes; i.e., catalase, superoxide dismutase, glutathione transferase, paraoxonase, heat shock protein 27 and protein disulfide isomerase. This indicates that during maturation the human follicle is well protected against toxic injury caused by oxidative stress [55].

Some findings suggest that cumulus cells may have a critical role in protecting oocytes against oxidative stress-induced apoptosis through the increase of glutathione content in oocytes [56]. Oxidative stress has an impact on the production of granulosa cell steroid hormones (estradiol in particular), which are important predictors of ovarian response. The positive association between FF estradiol and total antioxidant capacity (TAC) suggests that estradiol may play a role in the ovarian antioxidant-oxidant balance [57].

Individual FF analysis (from separate follicles) showed that ROS levels in FF participates in embryo formation and quality [58]. Both lipid peroxidation (LPO) and TAC levels were positively correlated with the pregnancy rate. LPO is a good marker of metabolic activity within the follicle, and some amounts may be necessary to establish a pregnancy [59-62]. Malondialdehyde can be used as another marker of oxidative stress and also in predicting assisted reproductive techniques outcome [63].

Although there was no significant relationship between plasma and/or FF TAC and the underlying etiology of infertility [57], the oxidative stress is engaged in pathophysiology of many of them. For example, the ROS action is one of the mechanisms responsible for the embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid and for the decreased quality of oocytes and embryos of endometriosis patients [64]. Decreased levels of SeGPx were confirmed in FF of women with idiopathic infertility [65, 66].

The age-related decline of the success in IVF is largely attributable to a progressive decline of ovarian oocyte quality and quantity which can be at least partially caused by the age-related increase in free radical activity [67, 68]. It was confirmed that active smoking affects the pro-oxidant/antioxidant balance inside the pre-ovulatory ovarian follicle by inducing intrafollicular oxidative stress impairing folliculogenesis [69] especially by accelerated follicular depletion [70].

Detrimental effects of oxygen-derived free radicals on embryos during culture have been demonstrated in several species [71, 72]. Yang et al. [73] found higher levels of hydrogen peroxide in fragmented compared with non-fragmented human embryos and unfertilized oocytes, whilst Paszkowski and Clarke [66] reported increased antioxidant consumption (suggesting increased ROS activity) during incubation of poor quality embryos.

Infertility in Endometriosis Patients

Endometriosis is a common gynecological problem of reproductive-age women, and despite the increasing evidence proving genetic component to this disease, its basic etiology

remains unclear. It is likely that it is a polygenic/multifactorial disease caused by an interaction between multiple genes [74]. The association between endometriosis and infertility is complex. There are four principle factors that contribute to subfertility - impaired folliculogenesis, decreased fertilization, inflammatory factors in follicular, peritoneal and reproductive tract fluid, and implantation defects [75, 76]. Nevertheless, in the absence of tubal distortion, spontaneous conception remains possible. That means that the optimal choice for endometriosis patients is to be treated and then to get pregnant after spontaneous conception.

Endometriosis in reproductive-age women is associated with various immunopathologies - there are changes in both cell-mediated and humoral immunity and these changes seem to play a crucial role in allowing endometriosis implants to persist and progress [77].

Many various cytokines are present in the peritoneal fluid. They are produced by a variety of cells including mesothelial cells, leukocytes and ectopic endometrial cells. Their increased levels might promote implantation and growth of ectopic endometrium by inducing proliferation and angiogenesis [78, 79].

The peritoneal fluid of women with endometriosis contains increased numbers of cells which facilitate rather than inhibit the development of endometriosis. Macrophages that would be expected to clear endometrial cells from the peritoneal cavity appear to enhance their proliferation by secreting growth factors and cytokines [77, 80]. Nevertheless, the exact immunological mechanisms that support persistence and proliferation of ectopic endometrial implants within the peritoneal cavity remain unknown.

The observation that natural killer (NK) cell activity is abnormally low in endometriosis patients has led to a hypothesis that the inhibition of NK and cytotoxic T-cell function is one of the key mechanisms of pathogenesis [81].

The reports about the role of LIF in the infertility of endometriosis patients are rather conflicting. In patients with endometriosis the LIF staining intensity in uterine epithelium was studied. Staining intensity of LIF was evaluated using semi-quantitative immunohistochemistry scores and immunoreactive LIF was present predominantly in glandular epithelium, while luminal epithelium showed patchy staining. LIF staining intensity in glandular epithelium was significantly lower in endometriosis and the results suggested that reduced endometrial LIF contributes to infertility in some endometriotic women [35].

In the mouse model, expression of LIF in endometrium peaked at the time of implantation and was reduced by injections of human peritoneal fluid from infertile patients with endometriosis. PF from women with endometriosis has a detrimental effect on embryo implantation, perhaps by adversely affecting LIF expression as well as uterine receptivity [82]. On the other hand, in the uterine flushings and endometrial samples from 7 to 9 days after ovulation no statistically significant differences in levels of LIF between endometriosis patients and controls were found. The authors concluded that there is no receptivity defect with regard to LIF secretion by eutopic endometrium in infertile women with endometriosis [83].

Role of NK Cells in Endometriosis and Infertility in General

Large populations of macrophages and uterine-specific (NK) cells infiltrate the implantation site, and are believed to be important modulators of trophoblast invasion and

decidualization [84-86]. However, our knowledge regarding selective recruitment of leukocyte subtypes is not complete. Adequacy of the endometrium for fertility has been classically investigated by histologic evaluation of a mid-late luteal phase biopsy. Recent studies demonstrate histologically normal, but biochemically abnormal, endometrium during the window of implantation in some women with endometriosis [87]. Such evidence continues to reinforce the hypothesis that endometrium from some women with endometriosis might be dysfunctional. The reduced endometrial receptivity seems to account for the reduction in cycle fecundity [88].

Increased CD158a⁺ NK cells in peripheral blood and peritoneal fluid indicates decreased NK cell cytotoxicity [89]. The percentage of these cells in blood as well as in peritoneal fluid is significantly higher in women with than without endometriosis [90]. These properties of NK cells (as well as macrophages) in women with endometriosis promote immunotolerance to implanted tissue in the peritoneal environment [90]. According to the present knowledge, NK cells and their number as well as their low activity in endometriosis is mediated by cytokines and by HLA-G [91]. LIF is one of the cytokines that were shown to regulate NK cells. The *lif* gene knockout mice have doubled the percentage of NK cells in endometrium compared to wild-type mice at the time of implantation window, indicating that LIF restricts the migration of NK cells to the uterus [93]. Nevertheless, the mechanisms involved in homing of mouse uterine NK cell precursors to the uterus regulated by LIF are not fully understood yet. Strong expression of LIF mRNA was detected in decidual leukocytes, which are abundant at the implantation site. Extravillous trophoblast invading the maternal decidua expresses LIFR as it moves past decidual leukocytes, which express LIF mRNA. Although its effects on trophoblast are not clear, LIF appears to mediate interactions between maternal decidual leukocytes and invading trophoblast [94, 95]. LIF may also play a critical role in controlling angiogenesis in the placental villi, since human fetal endothelial cells express LIFR, and mice lacking a functional LIF receptor gene show altered vascular development in the placenta [96-98].

Various cytokines have already been suggested and some of them (such as TNF-binding protein-1 and IL-12) have already been proven to be effective in reducing endometriotic lesions in animal models, while pentoxifylline and INF-alpha 2b have shown encouraging results in clinical studies [99]. HLA-G is expressed by endometriotic glandular epithelium, but not by eutopic endometrium. Differential expression of HLA-G suggests that peritoneal inflammation or cellular stress may up-regulate mechanisms to promote ectopic endometrial survival [100].

There is a need for immunological diagnostics in the group of patients with unexplained infertility and endometriosis. It was proven that these patients suffer by various immunologic disturbances, some of the endometriosis patients are even at higher risk than the general female population of developing autoimmune and atopic disorders as well as breast and other cancers (for review see [101]).

Conclusion

Present progress in various techniques gives researchers options to employ variety of molecular biological techniques to understand the biological processes intricately linked to

oocyte, ovarian follicle development, fertilization and embryo development in general. Despite an abundance of knowledge concerning essential pathways which may have critical roles in regulation of fertility and necessary homeostasis, the repertoire of medications to treat female fertility problems remains limited to a few classes of drugs involved in the induction or suppression of folliculogenesis and ovulation; many of which are not specific in their drug actions and can give rise to complications during clinical application.

Studies on LIF proved that: 1) LIF gene mutations are significantly more frequent in infertile women compared to fertile controls; 2) LIF gene mutations are not restricted to primary or secondary infertility or to any specific infertility diagnosis; and 3) LIF gene mutations do not affect the outcome of infertility treatment in most patients but do in a subgroup of infertile women diagnosed with endometriosis or idiopathic infertility. In addition, the IVF outcome is statistically significantly lower than in control population of women with same diagnosis but no LIF gene mutation [6].

A fundamental aim of current research in infertility treatment is to develop new therapeutic approaches based on the knowledge of its etiopathogenesis. Further studies are needed to identify susceptibility gene(s) and the mechanism involved in endometriosis. DNA mutational analysis of these genes as well as the analysis of their functions will contribute to understanding the implantation failure in women with endometriosis and infertility in general.

Acknowledgment

Supported by the project CZ.1.05/2.1.00/03.0076 from European Regional Development Fund.

References

- [1] Moragianni V. A., Penzias A. S. Cumulative live-birth rates after assisted reproductive technology. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2010 22, 189-192.
- [2] Brown R., Harper J. The clinical benefit and safety of current and future assisted reproductive technology. *Reprod. Biomed. Online*, 2012, in press.
- [3] Borini A., Lagalla C., Cattoli M., Sereni E., Sciejajno R., Flamigni C., Coticchio G. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, 10, 653-668.
- [4] Corcoran D., Fair T. A., Lonergan P. Predicting embryo quality: mRNA expression and the preimplantation embryo. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, 11:240-438.
- [5] Kralickova M., Sima R., Vanecek T., Sima P., Rokyta Z., Ulcova-Gallova Z., Sucha R., Uher P., Hes O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2006, 127, 231-235.

- [6] Novotný Z., Křížan J., Šíma R., Šíma P., Uher P., Zech N., Hüttelová R., Baborová P., Ulčová-Gallová Z., Šubrt I., Ulmanová E., Houdek Z., Rokyta Z., Králíčková M. Leukemia inhibitory factor (lif) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have negative impact on the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol.*, 2009, 55, 92-97.
- [7] Simpson J. L. Molecular approach to common causes of female infertility. *Best Pract. Res Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2002, 16, 685-702.
- [8] Furnes B., Schimenti J. Fast forward to new genes in mammalian reproduction. *J. Physiol.*, 2007, 578, 25-32.
- [9] Saso S., Ghaem-Maghani S., Chatterjee J., Brewig N., Ungar L., Smith J. R., el Priore G. Immunology of uterine transplantation: a review. *Reprod. Sci.*, 2012 19, 123-134.
- [10] Matzuk M. M., Lamb D. J. The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nat. Med.*, 2008, 14, 1197-1213.
- [11] Tabibzadeh S., Shea W., Lessey B. A., Broome J. From endometrial receptivity to infertility. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 1999, 17, 197-203.
- [12] Makrigiannakis A., Minas V., Kalantaridou S. N., Nikas G., Chrousos G. P. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2006, 178-185.
- [13] Makrigiannakis A., Minas V. Mechanisms of implantation. *Reprod. Biomed. Online*, 2007, 14, 75-82.
- [14] Sharkey A. M., Smith S. K. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2003, 17, 289-307.
- [15] Whibley C., Pharoah P. D., Hollstein M. p 53 polymorphisms: Cancer implications. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, 9, 95-107.
- [16] Marcel V., Hainaut P. p 53 isoforms: a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009, 66, 391-406.
- [17] Stewart C. L. Reproduction: the unusual suspect. *Nature*, 2007, 450, 619.
- [18] Feng Z., Zhang C., Kang H. J., Sun Y., Wang H., Naqvi A., Frank A. K., Rosenwaks Z., Murphy M. E., Levine A. J., Hu W. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J.*, 2011, 25, 2245-2255.
- [19] Kang H. J., Feng Z., Sun Y., Atwal G., Murphy M. E., Rebbeck T. R., Rosenwaks Z., Levine A. J., Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106, 9761-9766.
- [20] Hu W., Teresky A. K., Levine A. J. P53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, 2007, 450, 721-724.
- [21] Hu W., Feng Z., Atwal G. S., Levine A. J. P53: A new player in reproduction. *Cell Cycle*, 2008, 7, 848-852.
- [22] Nezhat F., Datta M. S., Hanson V., Pejovic T., Nezhat C. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 1559-1570.
- [23] Tomida M., Yamamoto-Yamaguchi Y., Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 10978-10982.
- [24] Stewart C. L., Kaspar P., Brunet L. J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F., Abbondanzo S. J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, 359, 76-79.

- [25] Sherwin J. R., Freeman T. C., Stephens R. J., Kimber S., Smith A. G., Chambers I., Smith S. K., Sharkey A. M. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol. Endocrinol.*, 2004, 18, 2185-2195.
- [26] Hambartsoumian E., Taupin J. L., Moreau J. F., Frydman R., Chaouat G. *In-vivo* administration of progesterone inhibits the secretion of endometrial leukaemia inhibitory factor *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998, 4, 1039-1044.
- [27] Laird S. M., Tuckerman E. M., Li T. C. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Repr. Bio Med. Online*, 2006, 13, 12-23.
- [28] Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann.N. Y. Acad. Sci.*, 2004, 1034, 176-183.
- [29] Lass A., Weiser W., Munafo A., Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil. Steril.*, 2001, 76, 1091-1096.
- [30] Giess R., Tanasescu I., Steck T., Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod.*, 1999 5, 581-586.
- [31] Steck T., Giess R., Suetterlin M. W., Bolland M., Wiest S., Poehls U. G., Dietl J. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur. J.Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2004, 112, 69-73.
- [32] von Rango U., Alfer J., Kertschanska S., Kemp B., Muller-Newen G., Heinrich P. C. Beier H. M., Classen-Linke I. Interleukin-11 expression: its significance in eutopic and ectopic human implantation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004, 10, 783-792.
- [33] Karpovich N., Klemmt P., Hwang J. H., McVeigh J. E., Heath J. K., Barlow D. H., Mardon H. J. The production of interleukin-11 and decidualization are compromised in endometrial stromal cells derived from patients with infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, 90, 1607-1612.
- [34] Dimitriadis E., Sharkey A. M., Tan Y. L., Salamosen L. A., Sherwin J. R. A. Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2007, 5, 44.
- [35] Dimitriadis E., Stoikos C., Stafford-Bell M., Clark I., Paiva P., Kovacs G., Salamonsen L. A. Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J. Reprod. Immunol.*, 2006, 69, 53-64.
- [36] Wang Q., Sun Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007, 19, 1-12.
- [37] Ledee N., Lombroso R., Lombardelli L., Selva J., Dubanchet S., Chaouat G, Franckene F, Foidart J. M., Romagnani S., Ville Y., Piccinni M. P. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Human Reprod.*, 2008, 23, 2001-2009.
- [38] Salmassi A., Acil Y., Schmutzler A. G., Koch K., Jonat W., Mettler L. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil. Steril.*, 2008, 89, 1578-1584.

- [39] Asimakopoulos B., Koster F., Felberbaum R., Tripsiannis G., Caglar G. S., Nikolettos N., Al-Hasani S., Diedrich K. Intrafollicular and circulating concentrations of leptin do not predict the outcome in IVF-ICSI cycles. *Reprod. Sci.*, 2009, 16, 113-119.
- [40] Asimakopoulos B., Abu-Hassan D., Metzen E., Al-Hasani S., Diedrich K., Nikolettos N. The level of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 60-64.
- [41] Asimakopoulos B., Nikolettos N., Papachristou D. N., Simopoulou M., Al-Hasani S., Diedrich K. Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Physiol. Res.*, 2005, 54, 263-270.
- [42] Wunder D. M., Guibourdenche J., Birkhauser M. H., Bersinger N. A. Anti-Mullerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 2203–2210.
- [43] Anifandis G., Koutselini E., Stefanidis I., Liakopoulos V., Leivaditis C., Mantzavinos T., Vamvakopoulos N. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction*, 2005, 130, 917-921.
- [44] Salmassi A., Schmutzler A. G., Schaefer S., Koch K., Hedderich J., Jonat W., Mettler L. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum. Reprod.*, 2005, 20, :2434-2440.
- [45] Lewicka S., von Hagens C., Hettinger U., Grunwald K., Vecsei P., Runnebaum B., Rabe T. Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum.Reprod.*, 2003, 18, 1613–1617.
- [46] Fried G., Remaeus K., Harlin J., Krog E., Csemiczky G., Aanesen A., Tally M. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2003, 20, 167-176.
- [47] Hsieh Y. Y., Chang C. C., Tsai H. D., Lin C. S. Leukemia inhibitory factor in follicular fluid is not related to the number and quality of embryos as well as implantation and pregnancy rates. *Biochem. Genet.*, 2005, 43, 501-506.
- [48] Ledee-Bataille N., Lapree-Delage G., Taupin J. L., Dubanchet S., Taieb J., Moreau J. F., Chaouat G. Follicular fluid concentration of leukemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovaian syndrome during assisted reproduction cycles. *Human Reprod.*, 2001, 16, 2073-2078.
- [49] Ozornek M. H., Bielfeld P., Krussel J. S., Hirschenhain J., Jeyendran R. S., Koldovsky U. Epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with *in vitro* fertilization outcome. *J. Reprod. Med.*, 1999, 44, 367-369.
- [50] MacLeod, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, 1943, 138, 512-518.
- [51] Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd Edn. Oxford, OxfordUniversity Press, 1989.
- [52] Knapen M. F., Zusterzeel P. L., Peters W. H., Steegers E. A. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1999, 82, 171–184.

- [53] Ho Y. S., Gargano M., Cao J., Bronson R. T., Heimler I., Hutz R. J. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 7765-7769.
- [54] Matzuk M. M., Dionne L., Guo Q., Kumar T. R., Lebovitz R. M. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*, 1998, 139, 4008-4011.
- [55] Angelucci S., Ciavardelli D., di Giuseppe F., Eleuterio E., Sulpizio M., Tiboni G. M., Giampietro F., Palumbo P., di Illio C. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1764, 1775-1785.
- [56] Tatemoto H., Sakurai N., Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 2000, 63, 805-810.
- [57] Appasamy M., Jauniaux E., Serhal P., Al-Qahtani A., Groome N. P., Muttukrishna S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil. Steril.*, 2008, 89, 912-921.
- [58] Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S., Ghosh S., Goswami S. K., Chakravarty B. N., Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF? *Human Reprod.*, 2006, 21:2403-2407.
- [59] Pasqualotto E. B., Lara L. V., Salvador M., Sobreiro B. P., Borges E., Pasqualotto F. F. The role of enzymatic antioxidants detected in the follicular fluid and semen of infertile couples undergoing assisted reproduction. *Hum. Fertil.*, 2009, 12, 166-171.
- [60] Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H., Taketani T., Matsuoka A., Yamagata Y., Shimurama K., Morioka H., Ishikawa H., Reiter R. J., Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J. Pineal Res.*, 2008, 44, 280-287.
- [61] Basini G., Simona B., Santini S. E., Grasselli F. Reactive oxygen species and antioxidant defences in swine follicular fluids. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2008, 20, 269-274.
- [62] Baka S., Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod. Biomed. Online*. 2006, 12, 500-506.
- [63] Oral O., Kutlu T., Aksoy E., Ficiocioglu C., Uslu H., Tugrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2006, 23, 81-85.
- [64] Seino T., Saito H., Kaneko T., Takahashi T., Kawachiya S., Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil. Steril.*, 2002, 77, 1184-1190.
- [65] Paszkowski T., Traub A. I., Robinson S. Y., McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta*, 1995, 236, 173-180.
- [66] Paszkowski T., Clarke R. N. Antioxidant capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 2493-2495.
- [67] Wiener-Megnazi Z., Vardi L., Lissak A., Schnizer S., Reznick A. Z., Ishai D., Lahav-Baratz S., Shilog H., Koifman M., Dirnfeld M. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 2004, 82 (Suppl. 3), 1171-1176.

- [68] Broekmans F. J., Kwee J., Hendriks D. J., Mol B. W., Lambalk C. B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human Reprod. Update*, 2006, 12, 685-718.
- [69] Paszkowski T., Clarke R. N., Hornstein M. D. Smokind induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reprod.*, 2002, 17, 921-925.
- [70] Tiboni G. M., Bucciarelli T., Giampietro F., Sulpizio M., Di Ilio C. Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, beta-carotene and lycopene concentrations in human preovulatory follicular fluid. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2004, 17, 389-393.
- [71] Agca C., Ries J. E., Kolath S. J., Kim J. H., Forrester L. J., Antoniou E., Whitworth K. M., Mathialagan N., Springer G. K., Prather R. S., Lucy M. C. Luteinization of porcine preovulatory follicles lead to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction*, 2006, 132, 133-145.
- [72] Gupta S., Choi A., Yu H. Y., Czerniak S. M., Holick E. A., Paoella L. J., Agarwal A., Combelles C. M. Fluctuation in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011, 23, 673-680.
- [73] Yang H. W., Hwang K. J., Kwon H. C., Kim H. S., Choi K. W., Oh K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reprod.*, 1998, 13, 998-1002.
- [74] Bischoff F. Z., Simpson J. L. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum. Reprod. Update*, 2000, 6, 37-44.
- [75] Mahutte N. G., Arici A. New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J. Reprod. Immunol.*, 2002, 55, 73-83.
- [76] Senapati S., Barnhart K. Managing endometriosis-associated infertility. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 2011, 54, 720-726.
- [77] Seli E., Arici A. Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin. Reprod. Med.*, 2003, 21, 135-144.
- [78] Wu M. Y., Ho H. N. The role of cytokines in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2003, 49, 285-296.
- [79] Matarese G., de Placido G., Nikas Y., Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol. Med.*, 2003, 9, 223-228.
- [80] Ulukus M., Arici A. Immunology of endometriosis. *Minerva Gynecol.*, 2005, 57, 237-248.
- [81] Sikora J., Mielczarek-Palacz A., Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18, 200-208.
- [82] Illera M. J., Juan L., Stewart C. L., Cullinan E., Ruman J., Lessey B. A. Effect of peritoneal fluid from women with endometriosis on implantation in the mouse model. *Fertil. Steril.*, 2000, 74, 41-48.
- [83] Mikolajczyk M., Wirstlein P., Skrzypczak J. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 3054-3058.
- [84] Johnson P. M., Christmas S. E., Vince G. S. Immunological aspects of implantation and implantation failure. *Hum. Reprod.*, 1999, Suppl. 2, 26-36.

- [85] Flynn L., Byrne B., Carton J., Kelehan P., O'Herlihy C., O'Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2000, 43, 209-217.
- [86] Croy B. A., Esadeg S., Chantakru S., van den Heuvel M., Paffaro V. A., He H., Black G. P., Ashkar A. A., Kiso Y., Zhang J. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J. Reprod. Immunol.*, 2003, 59, 175-191.
- [87] Giudice L. C., Telles T. L., Lobo S., Kao L. *The molecular basis for implantation failure in endometriosis: on the road to discovery.*
- [88] Surrey E. S., Schoolcraft W. B. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, 955, 252-264. Management of endometriosis-associated infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2003, 30, 193-208.
- [89] Zhang C., Maeda N., Izumiya C., Yamamoto Y., Kusume T., Oguri H., Yamashita C., Nishimori Y., Hayashi K., Luo J., Fukaya T. Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen expression as immunodiagnostic parameters for pelvic endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, 55, 106-114.
- [90] Matsuoka S., Maeda N., Izumiya C., Yamashita C., Nishimori Y., Fukaya T. Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2005, 53, 249-254.
- [91] Maeda N., Izumiya C., Oguri H., Kusume T., Yamamoto Y., Fukaya T. Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis. *Fertil. Steril.*, 2002, 77, 679-683.
- [92] Maeda N., Izumiya C., Taniguchi K., Matsushima S., Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front. Biosci.*, 2012, 4, 1568-1581.
- [93] Schofield G., Kimber S. J. Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2005, 72, 872-878.
- [94] Fraccaroli L., Grasso E., Zeitler E., Lombardi E., Gogorza S., Etchepareborda J. J., Nagle C., Cortelezzi M., Pérez Leirós C., Ramhorst R. Modulation of maternal LIF producers T cells by trophoblast and paternal antigens. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, 65, 133-145.
- [95] Dimitriadis E., Menkhorst E., Salamonsen L. A., Paiva P. Review: LIF and IL-11 in trophoblast-ndometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Placenta*, 2010, 31, S99-S104.
- [96] Sharkey A. M., King A., Clark D. E., Burrows T. D., Jokhi P. P., Charnock-Jones D. S., Loke Y. W., Smith S. K.: Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol. Reprod.*, 1999, 60, 355-364.
- [97] Saito S., Nishikawa K., Morii T., Enomoto M., Narita N., Motoyoshi K., Ichijo M. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.*, 1993, 5, 559-563.
- [98] Jokhi P. P., King A., Sharkey A. M., Smith S. K., Loke Y. W.: Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Immunol.*, 1994, 153, 4427-4435.
- [99] Fedele L., Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 2004, 9, 167-177.

- [100] Barrier B. F., Kendall B. S., Ryan C. E., Sharpe-Timms K. L. HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 864-869.
- [101] Giudice L. C., Kao L. C. Endometriosis. *Lancet*, 2004, 364, 1789-1799.

Příloha XI

Seznam publikací mimo hlavní téma dizertační práce.

SEZBAM PUBLIKACÍ MIMO HLAVNÍ TÉMA DIZERTAČNÍ PRÁCE:

DVOŘÁKOVÁ, J., M. KRIPNEROVÁ, M. ČEDÍKOVÁ, V. BABUŠKA, V. KULDA, M. PEŠTA, M. KRÁLÍČKOVÁ and D. MÜLLEROVÁ. Vliv perzistentních organických polutantů na mitochondriální funkce a vliv metabolického syndromu. *Chemické listy*, 2014. [Article in press]. ISSN 0009-2770. **IF₂₀₁₂ = 0,453**

PITULE, Pavel, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Ondřej DAUM, Jan VOJTÍŠEK, Ondřej VYČÍTAL, Petr HOŠEK, Vladimír TŘEŠKA, Ondřej HES, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Václav Liška. Immunohistochemical detection of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in metastatic colorectal cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014 Vol. 2014, 7 pages. Dostupné z doi: 10.1155/2014/432139. ISSN 2314-6133. **IF₂₀₁₃ = 2,706**

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, Zbyněk HOUDEK, Václav BABUŠKA, Vlastimil KULDA, František VOŽEH, Nicolas ZECH, Lenka ČERNÁ, Kristýna KRAKOROVÁ, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Jan CENDELÍN. Fate of two types of cerebellar graft in wild type and cerebellar mutant mice. *J Appl Biomed.* 2014, Vol. 12, No. 1, pp. 17 - 23. ISSN 1214-021X. **IF₂₀₁₂ = 1,775.**

PITULE, Pavel, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Vladislav TŘEŠKA, Milena KRÁLÍČKOVÁ and Václav LIŠKA. Assessing colorectal cancer heterogeneity: one step closer to tailored medicine. *J Appl Biomed.* 2013, Vol. 11, No. 3, pp. 115-129. ISSN 1214-021X. **IF₂₀₁₃ = 1,775.**

8 Poděkování

Tato práce vznikla na Ústavu histologie a embryologie a Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy v Praze a v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Zentren Prof. Zech-Pilsen.

Ráda bych poděkovala svým školitelkám doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D. a doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za inspirující vedení, pomoc při výběru tématu a cenné rady při tvorbě práce.

Děkuji také všem svým spolupracovníkům, zejména MUDr. Michaelle Miklíkové a Mgr. Pavlu Pitulovi za jejich pomoc a podporu, Ing. Václavu Babuškovi, MUDr. Martině Grundmanové, MUDr. Janu Cendelínovi, Ph.D., Mgr. Zbyňku Houdkovi, Ph.D., MUDr. Kristýně Krakorové, Mgr. Pavle Lhotské a celému týmu z Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie za jejich spolupráci a ochotu při pokusech.

Tento projekt byl podpořen Programem rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36), projektem OP VaVpI PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076, projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 264804/2012, 266802/2013, 260048/2014 a grantem GA UK 696212.