

## **CZYNNIK MOLEKULARNY W ROZRODZIE. ROLA I CHARAKTERYSTYKA PRZECIWCIAŁ PRZECIWPLEMNIKOWYCH**

### **MOLECULAR FACTOR IN REPRODUCTION. THE ROLE AND CHARACTERISTICS OF ANTISPERM ANTIBODIES**

Renata WYRZYKOWSKA, Alina DOMAGAŁA, Maciej KURPISZ\*

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

*Streszczenie:* Ocenia się, że niepłodność w Polsce dotyka co piątą parę w wieku rozrodczym. Główną przyczyną niepłodności na tle immunologicznym jest obecność przeciwciał przeciwplemnikowych, stonkowo niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów, które wywołują powstanie reakcji auto- i izoimmunologicznych u ludzi. Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom plemnika stwierdza się w surowicy krwi kobiet i mężczyzn, jak również w wydzielinach dróg rozrodczych: w płazmie nasiennej, wolne lub związane z powierzchnią plemnika, natomiast u kobiet także w śluzie szyjkowym, płynie otrzewnowym, jajowodowym oraz pęcherzykowym. Obecność przeciwciał przeciwplemnikowych może zaburzać własności rozrodcze męskiej gamety zarówno w stadium przed-, jak i pozapłodnieniowym. ASA mogą zakłócać ruch postępujący plemnika, penetrację przez plemniki śluzu szyjkowego, reakcję akrosomalną, wiązanie plemników do osłonki przejrzystej, fuzję gamety męskiej z komórką jajową oraz podziały komórkowe rozwijającego się wczesnego zarodka. Pełna identyfikacja i charakterystyka auto- i izoimmunoreaktywnych antygenów plemnikowych umożliwiłyby poznanie mechanizmów wywołujących niepłodność immunologiczną. Ponadto, szczegółowa wiedza na temat tych antygenów dostarczyłaby bardziej precyzyjnych narzędzi diagnostycznych oraz pozwoliłaby na lepsze określanie metod leczenia.

*Słowa kluczowe:* antygeny plemnikowe, niepłodność, przeciwciała przeciwplemnikowe.

*Summary:* Infertility is estimated to affect one of every five Polish couples in the reproductive age. Antisperm antibodies (ASA) are considered to be the main cause for immunological infertility, but it is still relatively little known about the specific mechanisms that elicit development of auto- and isoimmune reactions in humans. Antibodies directed to sperm antigens can be detected in serum of men and women, but also in reproductive tract secretions such as seminal fluid, where they can be bound to the sperm surface. Free ASA can be also found in cervical mucus, peritoneal, oviductal and follicular fluids of women. Presence of ASA may impair sperm fertilization capacity through various effects, interfering with pre- as well as post-fertilization stages of the reproductive process. They may affect sperm motility.

\*Autor jest stypendystą Polskiej Akademii Nauk.

ty, sperm penetration to cervical mucus, the acrosome reaction, sperm binding to zona pellucida, sperm-oocyte fusion and embryo cleavage. The detailed identification and characterization of the auto- and isoimmune reactive sperm antigens would be useful in understanding the mechanisms underlying the immunological infertility. Moreover, a precise knowledge on the sperm antigens would provide more accurate diagnostic approaches and treatment options.

*Key words:* antisperm antibodies, infertility, sperm antigens.

*Wykaz skrótów:* **LDH-C<sub>4</sub>** (*lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa; **GB-24** – antygen GB-24; **PH-20** (*posterior head-20*) – antygen tylnego regionu główki-20; **PH-30** (*posterior head-30*) – antygen tylnego regionu główki-30; **FA-1** (*fertilization antigen-1*) – związany z procesem zapłodnienia antygen-1; **FA-2** (*fertilization antigen-2*) – związany z procesem zapłodnienia antygen-2; **NZ-1** – antygen NZ-1; **NZ-2** – antygen NZ-2; **SP-10** (*sperm protein antigen-10*) – związany z białkiem plemnikowym antygen-10; **CS-1** (*cleavage signal-1*) – związane z podziałami komórkowymi białko sygnałowe-1; **SAGA-1** (*sperm agglutination antigen-1*) – aglutynujący plemniki antygen-1; **YLP-12** – antygen YLP-12.

## WSTĘP

Niepłodność została uznana przez Światową Organizację Zdrowia za chorobę cywilizacyjną. Z klinicznego punktu widzenia niepłodność oznacza niemożność zajścia w ciążę po roku regularnego współżycia bez stosowania antykoncepcji [7]. W ostatnich latach problem niepłodności narasta i nabiera znaczenia społecznego. Szacuje się, że w Polsce co piąta para ma trudności z poczęciem, przy czym 40–60% niepłodności małżeńskiej jest głównie lub częściowo spowodowana zaburzeniem zdolności prokreacyjnych mężczyzny [43]. Spadek zdolności koncepcyjnych tłumaczy się rozwojem cywilizacyjnym, zmianą stylu życia oraz większą ekspozycją na czynniki stresogenne i środowiskowe. Również zmiana statusu kobiet w społeczeństwie spowodowała, że świadomie odkładają one macierzyństwo w czasie zapominając, że wiek jest decydującym czynnikiem biologicznym w płodności [31].

Niemożność posiadania dziecka wywiera bardzo silny wpływ na stan emocjonalny pary, jest źródłem frustracji, poczucia winy i bezsilności; doprowadza do zmian w stosunkach partnerskich, konfliktów rodzinnych, a przede wszystkim rodzi poczucie niepełnej wartości. W większości przypadków pary zgłaszające się do lekarza nie są niepłodne, ale mają obniżoną płodność. Ustalenie przyczyny takiego stanu wymaga często szerokiej współpracy z innymi specjalistami, ponieważ o niepłodności najczęściej decyduje kilka czynników. W etiologii niepłodności wyróżnia się przyczyny: endokrynologiczną, anatomiczną, psychogenną, immunologiczną, idiopatyczną i inne [25].

Ze względu na wagę problemu obserwuje się olbrzymi postęp w diagnostyce i określaniu nieznanych dotąd czynników niepłodności. Stosunkowo mało poznanym zagadnieniem jest nadal niepłodność na tle immunologicznym. Sprowadza się ona do występowania u kobiet uczulenia w stosunku do antygenów własnych narządów rozrodczych, jak również obecności u kobiet (i/lub u mężczyzn) przeciwciał przeciwplemnikowych. Reaktywność immunologiczna wobec antygenów plemnikowych jest znana od dawna i w etiologii niepłodności immunologicznej ma największe znaczenie kliniczne.

## INDUKCJA REAKCJI AUTO- I IZOIMMUNOLOGICZNEJ W ODPOWIEDZI NA ANTYGENY PLEMNIKOWE

Częstość występowania przeciwciał przeciwplemnikowych (ASA, ang. *antisperm antibodies*), zarówno w populacji płodnych kobiet jak i u mężczyzn, oceniana jest na 0,9–4%, natomiast u niepłodnych osobników wynosi ona 9–36% [33]. Najwyższą ich częstość obserwuje się u pacjentów z niepłodnością o niewyjaśnionej etiologii, bowiem wynosi ona u nich od 14% do 40% [22, 28]. Oszacowanie częstości występowania ASA napotyka na pewne trudności spowodowane różną czułością i swoistością testów detekcyjnych, różnicami w interpretacji uzyskanych wyników oraz niejednorodnością badanych populacji pacjentów [10, 29].

Wciąż nie jest znany czynnik inicjujący odpowiedź układu immunologicznego na antygeny plemnikowe. U niektórych osobników płci męskiej dochodzi do uformowania przeciwciał, skierowanych przeciw autoantygenom plemnika, w różnych przedziałach funkcjonalnych układu rozrodczego i zachodzi to często spontanicznie, bez uchwytniej przyczyny.

Wyróżnia się co najmniej trzy możliwe mechanizmy formowania ASA u mężczyzn. Są to: obniżenie liczebności i aktywności komórek supresorowych w układzie rozrodczym, brak lub niedobór czynników aktywujących komórki supresorowe w męskich drogach rozrodczych oraz zaburzenia w antygenowości samych plemników powodujące niewystarczającą indukcję supresji odpowiedzi immunologicznej wobec plemników. Przypuszcza się, że immunogenność męskich komórek rozrodczych może być zwiększona przez bierne zaadsorbowanie na powierzchni plemnika łańcuchów ciężkich antygenów HLA, pochodzących z ulegających degeneracji komórek nabłonkowych lub migrujących komórek układu immunologicznego. Ponadto ekspresja antygenów HLA może być spowodowana zaburzeniem procesów spermatogenezy [28].

Do najczęstszych sytuacji klinicznych, które związane są ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przeciwciał przeciwplemnikowych u mężczyzn zalicza się: operację na nasieniowodach (np. przerwanie ciągłości nasieniowodu w celach antykoncepcyjnych), uraz lub inwazyjne naruszenie bariery krew-jądro (np. rozległa biopsja jądra), skręt jądra, niedrożność męskich dróg rozrodczych, ruchomość gonad, wnetrostwo, żyłaki powrózka nasiennego, uraz rdzenia kręgowego i inne [30, 36]. Powstawaniu ASA sprzyjają również wszelkie infekcje wirusowo-bakteryjne męskich narządów rozrodczych, zwłaszcza w okresie okołopokwitaniowym (w tym zapalenie ślinianek przyusznych). Ponadto powstaniu odpowiedzi immunologicznej sprzyjają kontakty homoseksualne [6]. Mężczyźni uczestniczący w stosunkach oralno-analnych wiążą naturalne autoprzeciwciała, które w pierwszej fazie oddziałują z pomocniczymi komórkami T CD4+, a następnie reagują krzyżowo lub bardziej swoiście z plemnikami [6, 47].

Zjawiskiem kontrowersyjnym jest występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u chłopców w wieku przedpokwitaniowym, u których wystąpiły różne schorzenia w obrębie układu rozrodczego m.in. obustronne wnetrostwo jąder czy przepuklina pachwinowa [29]. Obecność ASA reagujących z antygenami dojrzałych gamet u chłopców, którzy nie mają jeszcze własnych plemników, sugeruje występowanie w przedpokwitaniowej gonadzie męskiej determinant antygenowych o strukturze moleku-

larnej podobnej do tych, które obecne są na powierzchni finalnie zróżnicowanych plemników i przez to zdolnych do reakcji z tą samą rodziną przeciwciał [14]. Syntezę ASA o szerokiej swoistości tłumaczy się również podwyższoną reaktywnością układu immunologicznego przeciw krzyżowo reagującym grupom cukrowcowym, stanowiącym wspólnie z plemnikami determinanty antygenowe czynników infekcyjnych. Zbadanie mechanizmów reakcji autoimmunologicznej u chłopców przed pokwitaniem pomogłoby w opracowaniu terapii zmniejszającej ryzyko wystąpienia problemów prokreacyjnych (obniżenia jakości nasienia, a w dalszej konsekwencji niepłodności), po osiągnięciu przez nich dojrzałości płciowej [14].

Równie dyskusyjne jest występowanie przeciwciał przeciwplemnikowych u kobiet. Organizm kobiety w trakcie całego życia osobniczego poddany jest ekspozycji na ok. trylion plemników, zakładając regularnie prowadzone współżycie [47]. Przyjmuje się, że aby naturalny stan tolerancji osobnika żeńskiego na męskie komórki rozrodcze uległ załamaniu, musi zaistnieć kilka czynników usposabiających, występujących razem. Ekspozycja na oplaszczone przeciwciałami plemniki, spadek liczby supresorowych limfocytów T w szyjce macicy oraz jakość czynników immunosupresyjnych nasienia, a także obecność w nasieniu dużej liczby pomocniczych komórek T (np. wskutek infekcji), mogą prowadzić do indukcji lokalnej odpowiedzi immunologicznej w obrębie błony śluzowej żeńskich dróg rozrodczych [36 30].

Udowodniono, iż istnieje silny związek pomiędzy występowaniem ASA u kobiet, których partnerzy mają plemniki oplaszczone przeciwciałami przeciwplemnikowymi [6]. Fakt ten tłumaczy się tym, że gamety męskie indukują produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty T, co prowadzi do zwiększenia ekspresji antygenów klasy II MHC na powierzchni komórek prezentujących antygen, przez co możliwe jest w następstwie dalszych reakcji rozpoznanie nowego antygeny przez pomocnicze limfocyty T ( $T_H$ ) i przekazanie przez nie sygnału do produkcji swoistych przeciwciał przeciwplemnikowych przez komórki plazmatyczne. Uważa się również, że obecność ASA u kobiet może być także związana z nieprawidłowościami w sieci immunologicznej idiotypowo - antyidiotypowej [36].

Czynnikiem predysponującym do indukcji ASA u kobiet są wszelkie infekcje bakteryjne i wirusowe dróg rozrodczych. Zjawisko to interpretuje się podobieństwem molekularnym (ang. *molecular mimicry*) determinant antygenowych drobnoustrojów chorobotwórczych (m.in. *Chlamydia*, mykoplazmy) i pojawiających się w wyniku współżycia plemników [10, 45]. Również wszelkie stany chorobowe w obrębie układu rozrodczego (nadżerki, zmiany nowotworowe, histerektomia), mogą wzmocnić już zainicjowaną odpowiedź układu immunologicznego bądź zaburzyć pierwotny stan jego tolerancji [47].

## WPLYW OBECNOŚCI PRZECIWCIAŁ PRZECIWPLEMNIKOWYCH NA PROCESY ROZRODCZE

Przeciwciała przeciwplemnikowe, występujące zarówno u kobiet jak i mężczyzn, należą do klas IgA, IgG oraz IgM. Ze względu na znaczną heterogenność ASA nie ustalono jak dotąd, która klasa immunoglobulin jest przede wszystkim odpowiedzialna za wywoływanie niepłodności.

W surowicy krwi najczęściej stwierdza się obecność przeciwciał przeciwplemnikowych klasy IgG, natomiast w drogach rozrodczych przeważają przeciwciała klasy IgA. Immunoglobuliny IgG przesiąkają do dróg rozrodczych, a ich miano zwykle odzwierciedla stężenie ASA we krwi. Pojawienie się przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy krwi nie prowadzi do trwałej niepłodności, a jedynie do jej obniżenia. Niższe miano ASA wywołuje porównywalny spadek stopnia płodności w przypadku równoległego stwierdzenia przeciwciał przeciwplemnikowych w drogach rozrodczych, szczególnie przy pojawieniu się dimerycznej formy sekrecyjnej immunoglobuliny A [47]. Miejscowa produkcja ASA w układzie rozrodczym jest krótkotrwała i niezależna od produkcji systemowej. Ponadto oba te procesy mogą przebiegać równoległe lub oddzielnie [6].

U mężczyzn, podobnie jak u kobiet, duże znaczenie kliniczne ma miejscowa odpowiedź immunologiczna na antygeny plemnikowe. ASA pojawiają się w plazmie nasiennej i/lub są opłaszczane na powierzchni plemnika, przy czym najczęściej wiążą się do główki i końca wtki [22]. Wolne przeciwciała w plazmie wystąpią jedynie w przypadku, gdy możliwości ich adsorbowania przez plemniki zostaną przekroczone [23].

Udowodniono, że IgA nie ogranicza interakcji plemnika z komórką jajową tak silnie, jak obecność przeciwciał IgG/IgA, IgG/IgM [27, 49]. Ponadto wykazano, że spośród wszystkich klas immunoglobulin, IgM zlokalizowana na główce i końcu wtki, w największym stopniu obniża zdolność do rozpoznania, związania i fuzji męskiej gamety z komórką jajową [46].

U kobiet większość miejscowo występujących ASA produkowana jest w szyjce macicy, ponieważ w błaszcze właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) obecne są liczne komórki plazmatyczne produkujące przede wszystkim wydzielnicze immunoglobuliny klasy IgA, ale także IgG i IgM. Komórki plazmatyczne, obecne w sąsiedztwie gruczołów endometrium, są źródłem przeciwciał w macicy, która jest organem pozbawionym tkanki limfoidalnej. Natomiast źródłem ASA występujących w płynie jajowodowym jest przesącz z surowicy, przy czym ich miano zwykle nie przekracza 10% stężenia we krwi [47]. Badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych potwierdzają, że procent ten wystarcza do zablokowania przez ASA funkcji rozrodczych gamety męskiej.

Zasadnicze działanie przeciwciał przeciwplemnikowych nie polega na mechanicznym uszkodzeniu plemnika i jego śmierci, ale na zaburzeniu jego funkcji, czego skutkiem jest zakłócenie poszczególnych etapów procesu zapłodnienia [36]. ASA mogą opłaszczać plemniki w specyficznych miejscach: na główce, zaburzając interakcję z komórką jajową, na wstawce czy końcu wtki, upośledzając ruch plemnika. Lokalizacja ta uwarunkowana jest występowaniem poszczególnych determinant antygenowych. ASA mogą również interferować z procesami przygotowującymi błonę komórkową plemnika do zapłodnienia, odbywającymi się w drogach rodnych kobiety. Wywołują wówczas przedwczesną kapacytację i/lub reakcję akrosomalną [6].

Przeciwciała przeciwplemnikowe mogą powodować aglutynację plemników, hamując tym samym ich ruch postępowy. Sieciowanie plemników może być również wywołane zarówno infekcją w narządach rozrodczych męskich, jak i zmianą środowiska chemicznego plazmy nasiennej [11].

Występowanie ASA u mężczyzn może hamować dojrzewanie plemników (najądrze), a także uszkadzać różnicujące się plemniki już w gonadzie, co obserwuje się w przypadku autoimmunologicznego zapalenia jąder. W bardzo wczesnym stadium tego schorzenia dochodzi do nacieku makrofagów lub limfocytów, które poprzez swoje działanie destrukcyjne prowadzą do oligozoospermii lub asthenozoospermii. W tym przypadku ASA są efektem towarzyszącym w stosunku do pierwotnej przyczyny choroby [47].

Głównym następstwem obecności ASA zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet jest upośledzenie penetracji śluzu szyjkowego przez plemniki. Przeciwciała przeciwplemnikowe, a szczególnie klasy IgA, wykazują zdolność do sieciowania plemników, a następnie ich kotwiczenia do glikoproteinowych micelli śluzu szyjkowego, co odbywa się za pomocą fragmentów Fc cząsteczek IgA. W rezultacie obserwuje się tzw. *shaking phenomenon*, czyli ruch witki w miejscu bez ruchu postępującego plemnika [20]. Doświadczenia wykonane na zwierzętach wykazały, że nawet te plemniki, które przedostają się przez śluz szyjkowy, nie są następnie zdolne do fuzji z komórką jajową [28].

ASA blokując miejsca receptorowe na powierzchni plemników mogą hamować ich łączenie się z osłonką przejrzystą (ZP, ang. *zona pellucida*) i/lub oolemmą, co w konsekwencji upośledza wzajemne rozpoznanie i późniejszą fuzję gamet [20]. Dowiedziono przy tym, że zaburzenie tych etapów zapłodnienia może przebiegać przy jednoczesnym braku upośledzenia penetracji śluzu szyjkowego przez plemniki [28].

Przeciwciała przeciwplemnikowe mogą także zakłócać podziały komórkowe rozwijającego się embrionu i doprowadzać do poronień nawykowych [10, 36]. Wykazano, że ASA mogą interferować z zachowanymi na powierzchni zarodka antygenami plemnikowymi, nawet w 10–14 dni po zapłodnieniu, co może prowadzić do zahamowania rozwoju zarodka. Przypuszcza się również, że poronienia mogą wystąpić na skutek stymulacji interferonu gamma przez ASA, a w konsekwencji zwiększonej ekspresji ojcowskich antygenów MHC na trofoblaście [8, 28].

## **CZY PRZECIWCIAŁA PRZECIWPLEMNIKOWE WYKAZUJĄ SWOISTOŚĆ REAGOWANIA?**

Łańcuchy cukrowcowe stanowią główny składnik zewnętrznej powierzchni komórek eukariotycznych. W dorosłym organizmie ekspresja poszczególnych ugrupowań oligosacharydowych jest komórkowo specyficzna, dlatego mówi się, że komórki mają unikatowy glikotyp.

Błona komórkowa plemnika zawiera reszty cukrowcowe zarówno O-, jak i N-wiązane. Glikoproteiny O-wiązane mają wiązania pomiędzy seryną lub treoniną a N-acetylogalaktozoaminą (GalNAc), natomiast N-wiązane pomiędzy resztą asparaginową a N-acetyloglukozoaminą (GlcNAc). Większość łańcuchów glikoproteinowych zawiera szereg miejsc glikozylacji, które różnią się strukturą i miejscem przyłączenia reszt oligosacharydowych do danej sekwencji aminokwasowej. Tworzą one glikoformy, które charakteryzuje ogromna pula wariacji strukturalnych. Szacuje się, że glikokaliks komórki plemnikowej składa się z około 50 do 150 różnych glikokoniugatów. Niewiele jednak wiadomo na temat glikolipidowych komponentów plemnikowej błony komórkowej [44].

Reszty cukrowcowe, obecne na powierzchni męskich gamet, są immunogenne i indukują reakcje immunologiczne przeciwko plemnikom. Strukturalne podobieństwo glikozylowanych determinant (ang. *molecular mimicry*) na powierzchni różnych komórek powoduje, że przeciwciała mogą wchodzić w reakcje krzyżowe. Stwierdzono, że przeciwciała poliklonalne, pierwotnie wytworzone w surowicy w odpowiedzi na antygeny drobnoustrojów chorobotwórczych, mogą wtórnie reagować z determinantami antygenowymi obecnymi na plemnikach. Jeśli antygeny te są bezpośrednio zaangażowane w proces zapłodnienia, może dojść do zablokowania ich funkcji, a w rezultacie prowadzić do niepłodności na tle immunologicznym [15].

Potwierdzono krzyżową reaktywność monoklonalnych przeciwciał (mAbs, ang. *monoclonal antibodies*) przeciwplemnikowych z antygenami obecnymi na powierzchni erytrocytów oraz z glikozylowanymi antygenami różnych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [24]. Spośród 30 testowanych mAbs, skierowanych przeciwko powierzchniowym antygenom plemnikowym, aż 27 wykazało reaktywność z komórkami bakteryjnymi, przede wszystkim z *E. coli 08*, *Streptococcus viridans* i *Staphylococcus aureus*. Natomiast tylko 3 monoklonalne przeciwciała reagowały z deglikozylowanymi lipopolisacharydami ściany komórkowej szczepów *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* i *Escherichia coli 08*. Stąd wysunięto przypuszczenie, że przeciwciała przeciwplemnikowe niepłodnych kobiet i mężczyzn mogą stanowić krzyżowo reagujące przeciwciała, których produkcja została pierwotnie zainicjowana przez infekcje bakteryjne [11, 24].

Za pomocą techniki immunoprecypitacji udowodniono, że niezależnie od obecności lub braku przeciwciał przeciwplemnikowych, surowice od niepłodnych i płodnych osobników oraz od chłopców w wieku przedpokwitaniowym, mają aktywność skierowaną przeciwko antygenom komórek somatycznych (erytrocytów i limfocytów). Fakt ten interpretuje się zdolnością naturalnie występujących w surowicy przeciwciał do niespecyficznego wiązania powszechnie występujących na komórkach determinant antygenowych [16].

Powszechnie wiadomo, że przeciwciała przeciwplemnikowe występują zarówno u niepłodnych, jak i płodnych osobników, przy czym większe miano ASA stwierdza się w tej pierwszej populacji [40]. Obserwacje te sugerują, że nie wszystkie przeciwciała przeciwplemnikowe mogą w jednakowy i istotny sposób wpływać na procesy rozrodcze.

Chiu i Chamley wykazali, że ASA, obecne w surowicach od płodnych mężczyzn, mogą reagować z dokładnie tymi samymi antygenami plemnikowymi co przeciwciała obecne w surowicach od niepłodnych mężczyzn. Sugeruje się, że w reakcji tej mogą uczestniczyć różne białka, ale o tej samej masie cząsteczkowej lub że przeciwciała przeciwplemnikowe pochodzące z dwóch populacji osobników mogą rozpoznawać różne epitopy tego samego antygeny [9]. Twierdzi się również, że różnice ilościowe w stężeniu przeciwciał przeciwplemnikowych mogą w decydujący sposób determinować ich negatywny wpływ na płodność [46].

Aby zrozumieć mechanizm wywołujący niepłodność na podłożu immunologicznym, próbuje się wyodrębnić immunoreaktywne antygeny obecne na powierzchni plemników, odpowiedzialne za wywoływanie reakcji auto- i izoimmunologicznych.

Za pomocą przeciwciał monoklonalnych oraz poliklonalnych surowic od niepłodnych osób, scharakteryzowano biochemiczny i molekularny profil wielu antygenów

plemnikowych (tabela) [3, 9, 42, 45]. W niektórych przypadkach jednak nie potwierdzono ich specyficzności względem swoistych poliklonalnych przeciwciał przeciwplemnikowych zawartych w surowicach od pacjentów uczulonych *in vivo* na plemniki.

Przy użyciu techniki immunoblotowania oraz systemowo i lokalnie występujących przeciwciał przeciwplemnikowych, od płodnej i niepłodnej populacji pacjentów, wykazano, że profil immunoreaktywnych antygenów plemnikowych u niepłodnych osobników różni się w znacznym stopniu od tego, jaki reprezentowany jest u osobników płodnych [40]. Fakt ten tłumaczy się tym, że w plemnikach u niepłodnych mężczyzn mogło dojść do przedwczesnej kapacytacji lub reakcji akrosomalnej, co wiąże się z ekspozycją na działanie układu immunologicznego „ukrytych” normalnie antygenów.

Jak dotąd nie ustalono jednoznacznie, które determinanty reprezentują struktury plemnikowo-swoiste, a które reagują krzyżowo na zasadzie podobieństwa molekularnego do komórek somatycznych (erytrocytów i limfocytów) czy czynników infekcyjnych.

Można jednak wprowadzić umowny podział immunoreaktywnych antygenów plemnikowych na trzy grupy [16, 40]:

- Antygeny niezwiązane z procesem zapłodnienia – są to antygeny rozpoznawane przez naturalnie występujące niespecyficzne przeciwciała, pochodzące zarówno od osobników płodnych, jak i niepłodnych; niezależnie od obecności ASA. Krzyżowo reagujące przeciwciała mogą wiązać się do powierzchni plemników, erytrocytów, limfocytów oraz komórek bakteryjnych. Antygeny te nie są zaangażowane w istotny sposób w proces zapłodnienia.

- Antygeny istotne w procesie zapłodnienia – są to antygeny rozpoznawane przez przeciwciała obecne w populacji niepłodnych osób (ASA), pierwotnie produkowane w odpowiedzi na inne antygeny (somatyczne, bakteryjne) i wykazujące reaktywność zarówno wobec komórek plemnikowych, jak i somatycznych.

- Antygeny plemnikowo-swoiste – są to antygeny rozpoznawane przez swoiste przeciwciała przeciwplemnikowe występujące u niepłodnych osób (ASA), u których doszło do zaburzenia mechanizmów auto- i izotolerancji na plemniki.

Dane literaturowe na temat mas cząsteczkowych immunoreaktywnych antygenów plemnikowych, zidentyfikowanych za pomocą poliklonalnych surowic od niepłodnych kobiet i mężczyzn, są często niezgodne [1, 2, 4, 12, 45, 48]. Wskazuje to na fakt, że w indukcji odpowiedzi immunologicznej biorą udział różne antygeny powierzchniowe męskiej gamety, co pociąga za sobą upośledzenie procesu zapłodnienia na różnych etapach. Identyfikacja istotnych dla procesu zapłodnienia determinant antygenowych pozwoliłaby nie tylko na poznanie mechanizmu niepłodności immunologicznej na poziomie molekularnym, ale również na postawienie dokładnej diagnozy i określenie metod leczenia.

## LECZENIE NIEPŁODNOŚCI NA TLE IMMUNOLOGICZNYM

Leczenie niepłodności na tle immunologicznym jest procesem wielostopniowym i obejmuje działania zachowawcze, jak zmniejszenie ekspozycji na antygen, leczenie farmakologiczne, frakcjonowanie nasienia oraz inwazyjne techniki wspomaganego rozrodu.

TABELA. Wybrane autoantygeny plemnika

Antygen	Wielkość	Literatura
LDH-C4	140 kDa, 4 podjednostki, 35 kDa każda	Goldberg i wsp. (1999) [18]
GB-24	48 kDa	Fenichel i wsp. (1990) [17]
PH-20	64 kDa	Lin i wsp. (1993) [26]
PH-30	$\alpha$ – 60 kDa, $\beta$ – 44 kDa	Primakoff i wsp. (1997) [41]
FA-1	monomer 23 kDa, dimer 51±2 kDa	Naz i wsp. (1993, 1998) [37, 39]
FA-2	95 kDa	Naz i wsp. (1993) [37]
NZ-1	17 kDa	Naz i wsp. (1997) [38]
NZ-2	20 kDa	Zhu i wsp. (1998) [51]
SP-10	18–34 kDa	Herr i wsp. (1990) [19]
CS-1	dimer: 14 i 18 kDa	Naz i wsp. (1992) [32], Javed i wsp. (1992) [21]
SAGA-1	15–25 kDa	Diekman i wsp. (1997) [13]
YLP-12	50 ± 5 kDa	Naz i wsp. (2002) [34, 35]

Terapia farmakologiczna kortykosteroidami pozostaje kontrowersyjna i pomimo poważnych skutków ubocznych jest nadal stosowana. Kortykosteroidy mają działanie immunosupresyjne i obniżają stężenie przeciwciał przeciwplemnikowych. W odróżnieniu od działania ogólnego, stosunkowo bezpieczna i skuteczna jest terapia miejscowa w szyjce macicy stosowana u kobiet z obecnością ASA w śluzie szyjkowym [28].

Negatywnemu efektowi, jaki wywołują związane na powierzchni komórek przeciwciała przeciwplemnikowe, próbuje się przeciwdziałać frakcjonując nasienie i usuwając plemniki opłaszczane ASA. Zwykle odpłukiwanie przeciwciał jest mało efektywne, a ekspozycja na roztwory o dużej sile jonowej zaburza zdolność plemników do ruchu. Metody te są dostępne w bardzo wyspecjalizowanych laboratoriach.

Zastosowanie klasycznych technik wspomaganego rozrodu w leczeniu niepłodności na podłożu immunologicznym nie przynosi spodziewanych rezultatów. Odsetek niepowodzeń sięga aż 60–80% [49]. Inseminacje wewnątrzmaciczne nasieniem męża, w przypadku obecności ASA w nasieniu, są mało skuteczne [33]. W takiej sytuacji rozwiązaniem są inseminacje prawidłowym nasieniem pozyskanym od dawcy.

Pozaustrojowe zapłodnienie i transfer zarodka (IVF-ET, ang. *in vitro fertilizatio - embryo transfer*) jest zaakceptowaną i rozpowszechnioną na całym świecie metodą, a wskazania do jej stosowania obejmują prawie wszystkie czynniki etiologiczne niepłodności. Istnieje wiele modyfikacji podstawowej techniki IVF, jednak istotą każdej z nich jest zapłodnienie komórki jajowej poza ustrojem kobiety, a następnie przeniesienie

zarodka do macicy lub jajowodu. Przy wysokim wskaźniku opłaszczenia plemników przeciwciałami przeciwplemnikowymi (>50%) metody IVF-ET, jak i do jajowodowe przenoszenie zygot – ZIFT (ang. *zygote intrafallopian transfer*) zawodzą. Udowodniono, że immunologiczny czynnik męski, w przeciwieństwie do czynnika żeńskiego, determinuje w większości przypadków niepowodzenie zapłodnienia metodą IVF [33]. Zaobserwowano również, że obecność przeciwciał klasy IgA znacznie obniża wskaźnik powodzeń tylko wtedy, gdy występują one wspólnie z immunoglobuliną klasy IgM i wiążą się do główki plemnika [50]. ASA mogą interferować na kilku etapach zapłodnienia: zakłócając wiązanie plemnika do osłonki przejrzystej oocytu, blokując jej penetrację, uniemożliwiając fuzję gamet, podziały komórkowe i rozwój zarodka.

Leczenie niepłodności wywołanej immunologicznym czynnikiem męskim zrewolucjonizowały techniki mikromanipulacyjne. Mikroiniekcja plemnika pod osłonkę przejrzystą oocytów (SUZI, ang. *subzonal sperm insertion*), enzymatyczne zmiękczenie osłonki przejrzystej, przerywanie jej ciągłości w drodze chemicznej lub mechanicznej z użyciem mikromanipulatorów, czy też prosta iniekcja plemnika do cytoplazmy komórki jajowej (ICSI, ang. *intracytoplasmic sperm injection*) pozwalają pominąć te etapy zapłodnienia, które zakłócają się przez ASA (przede wszystkim pierwotną interakcję plemnika z osłonką przejrzystą).

ICSI charakteryzuje wysoka skuteczność i jest to obecnie najczęściej polecana metoda leczenia pozaustrojowego w przyczynach immunologicznych [8, 29]. Potwierdzono, że obecność przeciwciał przeciwplemnikowych opłaszczających męskie gamety nie obniża wskaźnika liczby ciąży uzyskanych w metodzie ICSI (wobec innych przyczyn niepłodności), ani nie zwiększa prawdopodobieństwa samoistnych poronień [8]. Według Bohring i Krause ICSI powinno być oferowane tylko pacjentom z bardzo wysokim mianem przeciwciał przeciwplemnikowych (>50%), natomiast pozostali powinni być leczeni mniej inwazyjnymi metodami [5].

## LITERATURA

- [1] AUER J, PIGNOT-PAINTRAND I, DE ALMEIDA M. Identification of human sperm surface glycoproteins by sperm membrane-specific autoantibodies. *Hum Reprod* 1995; **10**: 551–556.
- [2] AUER J, SENECHAL H, DE ALMEIDA M. Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. *J Reprod Immunol* 1997; **34**: 121–136.
- [3] BOHRING C, KRAUSE E, HABERMANN B, KRAUSE W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 113–118.
- [4] BOHRING C, KRAUSE W. Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *Am J Reprod* 2003; **50**: 411–419.
- [5] BOHRING C, KRAUSE W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto-)immunity. The value of proteomic analysis. *Hum Reprod* 2003; **18**: 915–924.
- [6] BRONSON RA, FUSI FM. Autoimmunity to sperm antigens. *Immunol Allergy Clin North Amer* 1994; **14**: 773–786.

- [7] BROSENS I, GORDTS S, VALKENBURG M, PUTTEMANS P, CAMPO R, GORDTS S. Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility? *Hum Reprod* 2004; **19**: 1689–1692.
- [8] CHECK ML, CHECK JH, KATSOFF D, SUMMERS-CHASE D. ICSI as an effective therapy for male factor with antisperm antibodies. *Arch Androl* 2000; **45**: 125–130.
- [9] CHIU WWC, CHAMLEY LWC. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility. *Hum Reprod* 2002; **17**: 984–989.
- [10] CHOUDHURY SR, KNAPP LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2000; **7**: 113–134.
- [11] CLAYTON R, MOORE H. Immunology and immunopathology of the male genital tract. Experimental models to investigate the pathology of antisperm antibodies: approaches and problems. *Hum Reprod Update* 2001; **7**: 457–459.
- [12] D'CRUZ OJ, HAAS GG, LAMBERT H. Heterogeneity of human sperm surface antigens identified by indirect immunoprecipitation of antisperm antibody bound to biotinylated sperm. *J Immunol* 1993; **151**: 1062–1074.
- [13] DIEKMAN AB, WESTBROOK-CASE VA, NAABY-HANSEN S, KLOTZ KL, FLICKINGER CJ, HERR JC. Biochemical characterization of Sperm Agglutination Antigen-1, a human sperm antigen implicated in gamete interactions. *Biol Reprod* 1997; **57**: 1136–1145.
- [14] DOMAGAŁA A, KAMIENICZNA M, KURPISZ M. Przeciwciała przeciwplemnikowe u chłopców w wieku przedpokwitaniowym. [w] Bręborowicz G. [red.] Seminarium Med. Pren. Poznań: Ośrodek Wydawnictw Naukowych 1999: t4: 185–193.
- [15] DOMAGAŁA A, KURPISZ M. Autoantygeny plemnikowe – aspekty funkcjonalne i aplikacyjne. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 497–507.
- [16] DOMAGAŁA A, KURPISZ M. Immunoprecipitation of sperm and somatic antigens with antibodies from sera of sperm-sensitized and anti-sperm antibody-free individuals. *Am J Reprod Immunol* 2004; **51**: 226–234.
- [17] FENICHEL P, DOHR G, GRIVAUX C, CERVONI F, DONZEAU M, HSI B. Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; **27**: 173–178.
- [18] GOLDBERG E, HERR JC. LDH- C<sub>4</sub> as a contraceptive vaccine. [w] Gupta SK. [red] Reproductive immunology. New Delhi: Narosa Publishing House 1999: 309–315.
- [19] HERR JC, FLICKINGER CJ, HOMYK M, KLOTZ K, JOHN E. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biol Reprod* 1990; **42**: 181–193.
- [20] HJORT T. Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? *Hum Reprod* 1999; **14**: 2423–2429.
- [21] JAVED AA, NAZ RK. Human cleavage signal-1 protein: molecular cloning, transcription and immunological analysis of *in vitro* translated protein. *Gene* 1992; **112**: 205–211.
- [22] KAMIENICZNA M, DOMAGAŁA A, KURPISZ M. The frequency of antisperm antibodies in infertile couples – a Polish pilot study. *Med Sci Monit* 2003; **9**: 142–149.
- [23] KURPISZ M. Immunologia nasienia. [W] Semczuk M, Kurpisz M. [red] Andrologia. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1998: 112–128.
- [24] KURPISZ M, ALEXANDER NJ. Carbohydrate moieties on sperm surface: physiological relevance. *Fertil Steril* 1995; **63**: 158–165.
- [25] LASHEN H. Investigations for infertility. *C Obst Gynaecol* 2004; **14**: 269–276.
- [26] LIN Y, KIMMEL LH, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10071–10075.
- [27] LOMBARDO F, GANDINI L, LENZI A, DONDERO F. Antisperm immunity in assisted reproduction. *J Reprod Immunol* 2004; **62**: 101–109.
- [28] MALINOWSKI A. Immunologiczne zaburzenia rozrodu. [W] Kowalski ML. [red.] Immunologia kliniczna. Łódź: Oficyna Wydawnicza 2000: 557–565.
- [29] MAZUMDAR S, LEVINE AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril* 1998; **70**: 799–810.
- [30] McLACHLAN RI. Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men. *J Reprod Immunol* 2002; **57**: 35–45.
- [31] NAKAGAWA K, YAMANO S, MASAHARU K, HINOKIO K, MAEGAWA M, AONO T. Quality of embryo does not affect the implantation rate of IVF-ET in infertile woman with antisperm antibody. *Fertil Steril* 1999; **72**: 1055–1060.

- [32] NAZ RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992; **46**: 130–139.
- [33] NAZ RK. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: novel perspectives. *Am J Reprod* 2004; **51**: 390–397.
- [34] NAZ RK, CHAUHAN SC. Presence of antibodies to sperm YLP<sub>12</sub> synthetic peptide in sera and seminal plasma of immunoinfertile men. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 21–26.
- [35] NAZ RK, CHAUHAN SC. Human sperm-specific peptide vaccine that causes long term reversible contraception. *Biol Reprod* 2002; **67**: 674–680.
- [36] NAZ RK, MENGE AC. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility. *Fertil Steril* 1994; **61**: 1001–1013.
- [37] NAZ RK, MORTE C, GARCIA FRAMIS V, KAPLAN P, MARTINEZ P. Characterization of a sperm-specific monoclonal antibody and isolation of 95-kilodalton fertilization antigen-2 from human sperm. *Biol Reprod* 1993; **49**: 1236–1244.
- [38] NAZ RK, ZHU X. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding for a novel testis-specific antigen. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 449–457.
- [39] NAZ RK, ZHU X. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1095–1100.
- [40] PARADISI R, BELLAVIA E, PESSION A, VENTUROLI S, FLAMIGNI C. Characterization of human sperm antigens reacting with sperm antibodies from autologous serum and seminal plasma in an infertile population. *Biol Reprod* 1996; **55**: 54–61.
- [41] PRIMAKOFF P, WOOLMAN-GAMER L, TUNG K, MYLES D. Reversible effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol Reprod* 1997; **5**: 1142–1146.
- [42] RAJEEV SK, REDDY KVR. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 2004; **19**: 234–242.
- [43] SANOCKA D, KURPISZ M. Infertility in Poland – present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med Sci Monit* 2003; **9**: 16–20.
- [44] SCHRÖTER S, OSTERHOFF C, McARDLE W, IVELL R. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod* 1999; **5**: 302–313.
- [45] SHETTY J, NAABY-HANSEN S, SHIBAHARA H, BRONSON R, FLICKINGER CJ, HERR JC. Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol Reprod* 1999; **61**: 61–69.
- [46] SHIBAHARA H, SHIRAISHI Y, HIRANO Y, SUZUKI T, TAKAMIZAWA S, SUZUKI M. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by anti-sperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1469–1473.
- [47] SKRZYPCZAK J, JĘDRZEJCZAK P, KURPISZ M, SZYMANOWSKI K. Niepłodność. [W] Słomko Z. [red.] Ginekologia. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1997: 598–658.
- [48] TSUJI Y. Carbohydrate antigens recognized by anti-sperm antibodies. Immunology of Human Reproduction, [W] Kurpisz M, Fernandez N [red.] BIOS Scientific Publishers Limited 1995: 23–32.
- [49] WOŁCZYŃSKI S, KUCZYŃSKI W, STYRNA J, SZAMATOWICZ M. Niepłodność. [W] Kurpisz M. [red.] Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. Poznań: Termedia Wydaw. Medyczne 2002: 269–289.
- [50] YEH WR, ACOSTA AA, SELTMAN HJ, DONCEL G. Impact of immunoglobulin isotype and sperm surface location of antisperm antibodies on fertilization *in vitro* in the human. *Fertil Steril* 1995; **63**: 1287–1292.
- [51] ZHU X, NAZ RK. Cloning and sequencing of cDNA encoding for a human sperm antigen involved in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 176–183.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.05.2005 r.

Przyjęto: 30.05.2005 r.

ul. Strzeszyńska 32, 61-606 Poznań,

kurpimac@man.pozman.pl