

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



Diplomová práce

**Využití cytometrické analýzy kvality spermií pro optimalizaci
metod asistované reprodukce**

Bc. Nella Tarantová

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Šimoník
Konzultant: RNDr. Zuzana Krátká, PhD.

Studijní obor: Reprodukční biotechnologie

8. dubna 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Využití cytometrické analýzy kvality spermií pro optimalizaci metod asistované reprodukce jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2019

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali během studia a při tvorbě této práce. V první řadě bych chtěla upřímně poděkovat své konzultance RNDr. Zuzaně Krátké, Ph.D. za důsledné odborné vedení, za neocenitelné rady a připomínky k tématu, ale především za velkou ochotu, trpělivost a vynaložený čas při zpracování této diplomové práce. Rovněž srdečně děkuji svému školiteli Ing. Ondřeji Šimoníkovi za rady, připomínky a náměty důležité pro sepsání této práce. Také celému skvělému kolektivu z imunologické laboratoře GENNET bych ráda poděkovala za příjemné pracovní prostředí, ochotu a pomoc. Děkuji také všem embryologům, lékařům, koordinátorkám a sestřám IVF GENNET - Archa, kteří se podíleli na zajištění klinické části této práce.

Velmi děkuji Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování statistických dat a vyhodnocení výsledků. Poděkování patří i paní Mgr. Ireně Horové za jazykovou korekci mé diplomové práce.

Závěrem děkuji své rodině za podporu a trpělivost, zejména mému manželovi za nekončící podporu, důvěru a pochopení během mého studia.

Diplomová práce byla finančně podporována klinikou GENNET, s.r.o., která je členem skupiny FutureLife a.s.

Souhrn

Jedním z problémů současné společnosti je bezesporu téma stále se zvyšující neplodnosti mužů. Tlak vyvíjený na laboratoře center asistované reprodukce je tak obrovský, protože je velmi důležité maximálně optimalizovat současné postupy a testovat nové metody separace kvalitních spermií s cílem zvýšit úspěšnost cyklů.

K diagnostice kvality ejakulátu se využívá nejen spermioqram, ale také cytometrické stanovení procenta živých a apoptotických spermií nebo stanovení spermií s fragmentací DNA. Selekcce spermií z ejakulátu se provádí tradičně gradientovou centrifugací (GC) nebo swim-up (SU). Testují se ale i nové metody jako magnetická separace spermií (MACS) nebo separace pomocí mikrofluidního systému (MFSS).

Diplomová práce je rozdělena na experimentální a klinickou část. Cílem experimentální části bylo pomocí průtokové cytometrie ověřit účinnost odstranění apoptotických spermií v ejakulátu u vybraných separačních metod. Byla stanovena hypotéza, že rutinní GC není vhodná pro vzorky s nízkým zastoupením živých spermií v ejakulátu.

Statisticky významný pokles procenta živých spermií po GC separaci byl zjištěn u vzorků, které měly nízké zastoupení živých spermií v ejakulátu (< 50 %). Tímto bylo prokázáno, že pro tyto pacienty není GC vhodná metoda. Experimentálně byly u podobných typů ejakulátů ověřeny alternativní metody separace (SU, MFSS, MACS). Za nejvýznamnější výsledek byl považován signifikantní vzestup procenta živých spermií po MFSS. Metoda MFSS byla proto doporučena pro rutinní využívání u pacientů s vysokým zastoupením apoptotických spermií nebo vysokou fragmentací DNA.

Cílem klinické části bylo ověřit, zda stanovení procenta živých a apoptotických spermií v ejakulátu může předpovědět kvalitu embryí. Předpokladem bylo, že vysoké zastoupení apoptotických spermií bude mít negativní vliv na úspěšnost cyklu.

Obdobně jako v jiných publikacích, tak ani v této práci se tato hypotéza neprokázala. Z výsledků vyplývá, že u skupiny s nízkým procentem apoptotických spermií (ApoLow) byl signifikantně vyšší parametr FR (fertilizaton rate), avšak ostatní parametry úspěšnosti cyklu byly vyšší u skupiny s vysokým procentem apoptotických spermií (ApoHigh). Možným důvodem byl vyšší počet transferů nejkvalitnějších blastocyst (BL5) u skupiny ApoHigh. Byla totiž prokázána významně vyšší úspěšnost cyklu při transferu BL5.

Závěrem lze říci, že cytometrické vyšetření ejakulátu je kvalitní diagnostickou metodou a získané informace mohou přispět k volbě vhodných postupů zpracování ejakulátu před *in vitro* oplozením.

Klíčová slova

průtoková cytometrie, spermie, asistovaná reprodukce, apoptóza, spermioqram

Summary

One of the biggest problems in current society is the increasing amount of men's infertility. The pressure on laboratories for assisted reproduction technology (ART) is huge. The most important requirements in this field are specifying the diagnosis of infertile men and developing better techniques for more successful ART.

Diagnosis methods include the spermiogram, the flow cytometric analysis of the viable and apoptotic sperm, or the analysis of sperm DNA fragmentation. Sperm selected was through density gradient centrifugation (GC), swim-up (SU), or methods such as magnetic sperm separation (MACS) and microfluidic separation (MFSS).

This diploma thesis has two parts, experimental and clinical. The aim of the experimental part was to verify the efficiency of sperm separation techniques by analysis of the viable and apoptotic sperm in semen. The hypothesis was that routine density gradient centrifugation is not suitable for samples with low levels of viable sperm in the ejaculate and more gentle separation techniques would be more effective. A decrease in the viable sperm percentage after GC separation was found in samples with low levels of viable sperm in semen (<50 %), which confirmed the first hypothesis.

Separation techniques such as GC, SU, MFSS and MACS were also tested using similar quality semen (<50 % viable sperm). The most significant result was the increase in the viable sperm percentage after MFSS. The MFSS technique would be recommended for routine use for patients with high levels of apoptotic sperm or high DNA fragmentation. The aim of the clinical part was to verify whether the analysis of the viable and apoptotic sperm in the ejaculate can predict lower embryo quality. The hypothesis was that a high level of apoptotic sperm has a negative impact on the success of ART.

The outcome was that FR (fertilization rate) was much higher in the low apoptotic sperm percentage group (ApoLow), but other parameters of ART efficiency were higher in the high apoptotic sperm percentage group (ApoHigh). The hypothesis was not confirmed like in similar studies. It was likely due to more embryo transfers of the highest quality blastocysts (BL5) in the ApoHigh group compared to ApoLow group. The transfer of BL5 was significantly more successful.

In summary, the flow cytometric analysis of semen is a quality diagnostic technique and information gained can help with the proper choice of sperm separation technique earlier *in vitro* fertilization.

Keywords

flow cytometry, sperm, assisted reproduction technology, apoptosis, spermiogram

Obsah

1	Úvod	1
2	Hypotézy a cíle	3
3	Neplodnost	5
3.1	Současná porodnost v České republice	6
3.2	Mužská neplodnost	8
3.3	Vyšetření kvality ejakulátu	8
3.3.1	Spermiogram	10
3.3.1.1	Makroskopické hodnocení ejakulátu	10
3.3.1.2	Mikroskopické hodnocení ejakulátu	11
3.3.1.3	Výsledné hodnocení	13
3.3.2	Průtoková cytometrie	13
3.3.3	Vyšetření ejakulátu	14
3.3.3.1	Stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií	15
3.3.3.2	Integrita akrozomu	16
3.3.3.3	Fragmentace DNA ve spermiích	16
4	Metody asistované reprodukce	19
4.1	Separace kvalitních spermií před <i>in vitro</i> oplozením	19
4.1.1	Swim-up separace spermií (SU)	19
4.1.2	Gradientová centrifugace (GC)	20
4.1.3	Separace spermií vazbou na hyaluronan (PICSI)	20
4.1.4	Magnetická separace apoptotických spermií (MACS)	20
4.1.5	Mikrofluidní separace spermií (MFSS)	21
4.1.6	Kombinace separačních metod	21
4.2	Odběr a příprava oocytů pro <i>in vitro</i> oplození	21
4.3	<i>In vitro</i> oplození oocytů	23
4.4	Kultivace embryí	24
4.4.1	Kultivace embryí - Den 1	24
4.4.2	Kultivace embryí - Den 2 a Den 3	25
4.4.3	Kultivace embryí - Den 4	26
4.4.4	Kultivace embryí - Den 5 a Den 6	27
4.5	Transfer embryí (ET)	27
4.6	Darování oocytů	28

4.7	Monitoring těhotenství	28
5	Metodika a materiál	31
5.1	Design experimentu	31
5.2	Statistické vyhodnocení výsledků	33
5.3	Charakteristika souboru	33
5.3.1	Ženy	33
5.3.2	Muži	34
5.3.3	Dárkyně oocytů	34
5.4	Embryologické metody	34
5.4.1	Spermiogram	34
5.4.2	Gradientová centrifugace (GC)	35
5.4.3	Swim-up (SU)	36
5.4.4	Magnetická separace apoptotických spermií (MACS)	36
5.4.5	Mikrofluidní separace spermií (MFSS)	38
5.5	Cytometrické metody	38
5.5.1	Stanovení apoptózy spermií	38
5.5.2	Stanovení fragmentace DNA spermií (TUNEL)	39
6	Výsledky	41
6.1	Základní vyšetření ejakulátu	41
6.1.1	Vyšetření spermiogramu	41
6.1.2	Stanovení apoptózy spermií	41
6.1.3	Stanovení fragmentace DNA spermií	43
6.1.4	Porovnání skupin ApoLow a ApoHigh	44
6.2	Vliv gradientové centrifugace (GC) na kvalitu spermií	45
6.3	Porovnání separačních metod a jejich vliv na počet živých spermií	49
6.3.1	Porovnání metod SU a GC	50
6.3.2	Porovnání metod MACS a MFSS	51
6.3.3	Porovnání metod MACS a GC	52
6.4	Hodnocení kvality embryí	53
6.4.1	Celkový přehled	53
6.4.2	Úspěšnost ET	54
6.4.3	Vliv věku na úspěšnost ET	55
6.4.4	Vliv kvality embrya na úspěšnost ET	55
6.5	Vliv kvality spermií na vývoj embryí a úspěšnost ET	57
6.5.1	Vliv spermiogramu	57
6.5.2	Vliv apoptózy spermií	59
6.5.3	Vliv fragmentace DNA spermií	62
6.5.4	Vliv koncentrace spermií po GC	64
7	Diskuze	69
7.1	Stanovení apoptózy a fragmentace DNA spermií	69
7.2	Separací metody a jejich vliv na počet živých spermií	71
7.2.1	Porovnání metod SU a GC	71
7.2.2	Porovnání metod MACS a MFSS	73

7.2.3	Porovnání metod MACS a GC	75
7.2.4	Vlastní doporučení použití separačních metod	76
7.3	Hodnocení kvality embryí a její vliv na úspěšnost ET	77
7.3.1	Vliv kvality spermií na vývoj embryí a úspěšnost ET	78
8	Závěr	81

Kapitola 1

Úvod

Léčba neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce je jednou z nejprogresivnějších oblastí moderní medicíny. Je obecně známo, že rok od roku mírně stoupá počet infertilních párů, které vyhledávají lékařskou pomoc. Proto je důležité pracovat na stále nových, vylepšených metodách, které zlepšují léčbu neplodnosti. Pokrok v reprodukčních metodách je nezbytný pro dnešní společnost a je proto nutné toto odvětví zdokonalovat.

Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje neplodnost jako onemocnění, při kterém nebylo opakovaně dosaženo klinického těhotenství po dvanácti a více měsících pohlavního styku (WHO 2010). Odhaduje se, že infertilita postihuje přibližně 15 % párů v plodném věku (Sharlip et al. 2002). Podíl párů potýkajících se s problémem neplodnosti se však v blízké budoucnosti může ještě zvýšit, protože stoupá počet žen, které odkládají narození dítěte do vyššího věku (Evers 2002). V minulosti se při hledání příčiny neplodnosti pozornost obracela často jen k ženě, avšak podle současných studií se zjistilo, že chyba je téměř stejnou měrou na straně muže. Proto je nutné, aby byli muži diagnostikováni a léčeni stejně intenzivně jako ženy, což se v současnosti bohužel neděje.

Při diagnostice mužské neplodnosti se jako základní vyšetření provádí spermioqram. Hodnotí se parametry, které ovlivňují schopnost spermií oplodnit oocyt. Mezi ně patří např. koncentrace spermií v ejakulátu, jejich pohyblivost a morfologie. V poslední době se však objevují nová vyšetření, která poskytují více informací o kvalitě spermií a rozšiřují tím spermioqram.

Cílem diplomové práce je představit cytometrická vyšetření ejakulátu, která jsou dostupná v laboratořích reprodukční imunologie. Pomocí průtokové cytometrie je možné stanovit koncentraci spermií, koncentraci leukocytů, zastoupení živých a apoptotických spermií a ověřit integritu akrozomu. Dále je možné stanovit fragmentaci DNA ve spermiích. Tyto údaje mohou pomoci lépe porozumět příčinám neplodnosti a také k přesnější indikaci léčby. Zároveň cytometrická vyšetření mohou poskytnout informace embryologickým pracovníkům a umožnit jim volbu metody pro separaci spermií. Pro úspěšné *in vitro* oplození oocytu je důležité nejen posoudit kvalitu ejakulátu, ale také je potřeba z ejakulátu separovat co nejvyšší počet živých spermií. Separčních postupů je celá řada, ale ne všechny jsou vhodné pro pacienty s nízkou kvalitou ejakulátu. V diplomové práci jsou porovnány tradičně používané postupy - gradientová centrifugace (GC) a swim-up (SU) s novými metodami založenými na magnetické (MACS) a mikrofluidní (MFSS) separaci.

Průběh asistované reprodukce zahrnuje několik kroků, které jsou v diplomové práci podrobně probrány. Základem je správný odběr, příprava a hodnocení kvality oocytů, které

jsou vybrány pro oplození. V současné době se při výběru metody oplození nejčastěji přistupuje k metodě ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie), kterou práce přibližuje. Oplozené oocyty jsou inkubovány 3–5 dní v inkubátoru a vývoj embryí je pečlivě sledován a hodnocen. Součástí práce je shrnutí pravidel, podle kterých se embrya hodnotí a jaké parametry musí splňovat vybraná embrya pro transfer nebo případné zamrazení. V době po provedení transferu jsou pacientky nadále sledovány a je kontrolován stav jejich případné gravidity. V práci je uvedeno, jak probíhá monitoring těhotenství a jaké se sledují parametry pro zhodnocení úspěšnosti cyklu. U žen, které mají nekvalitní oocyty a embrya či u žen, jež jsou ohroženy ovariálním selháním nebo rizikem přenosu závažné geneticky podmíněné choroby, je zvažován darovací program oocytů. Této problematice je věnována pozornost a jsou popsány nezbytné kroky pro úspěšné provedení transferu oocytů příjemkyním.

Experimentální část diplomové práce je realizována v imunologické laboratoři GENNET za významné pomoci laboratoře IVF GENNET - Archa. Jedním z cílů je pomocí průtokové cytometrie ověřit účinnost separace apoptotických spermií z ejakulátu u vybraných metod používaných pro selekci spermií při asistované reprodukci. Výsledky práce a literární řešerše přispěly k výběru vhodných metod využitelných v rutinním provozu embryologické laboratoře.

V klinické studii této diplomové práce je cílem zjistit, zda cytometricky stanovená hodnota živých a apoptotických spermií v ejakulátu použitém pro ICSI, koreluje s kvalitou embryí a může predikovat výsledek embryotransferu. Pozornost je věnována porovnáváním pacientů s normálním nebo patologickým spermiogramem, vysokým či nízkým zastoupením apoptotických spermií v ejakulátu a vysokou a nízkou fragmentací DNA ve spermiích.

Průtoková cytometrie poskytuje nové informace o kvalitě spermií, které mohou být přínosné pro rutinní andrologické a embryologické laboratoře. Může přispět nejen k objasnění příčin neplodnosti, ale i k volbě vhodné metody *in vitro* oplození.

Kapitola 2

Hypotézy a cíle

1. Gradientová centrifugace (GC) je riziková pro některé patologické vzorky nebo vzorky s vysokým % apoptotických spermií, protože může dojít k uvolnění reaktivních kyslíkových radikálů a k poklesu životnosti spermií.

Cíl – Stanovit u jakých ejakulátů se snižuje % živých spermií po GC separaci.

2. Pro pacienty s vysokým zastoupením apoptotických spermií nebo s vysokou fragmentací DNA je nezbytné najít vhodnou separační metodu. Otázkou je, která ze současných metod používaných na klinikách IVF (*In Vitro* Fertilization) je pro tyto pacienty nejvhodnější.

Cíl– Experimentálně porovnat účinnost separace živých spermií metodami GC, swim-up, magnetické separace spermií (MACS) a mikrofluidní separace spermií (MFSS). Doporučit vhodný postup separace spermií pro rutinní praxi.

3. Počet a kvalita embryí vzniklých po oplození darovaných oocytů se mezi jednotlivými páry významně liší. Kvalitnější transferovaná embrya zvýší úspěšnost embryotransferu.

Cíl – Zhodnotit kvalitu embryí v celém souboru. Stanovit celkovou úspěšnost léčby a posoudit, zda byla vyšší úspěšnost embryotransferu spojena s vyšší kvalitou transferovaných blastocyst.

4. Nižší zastoupení apoptotických spermií ve vzorku použitém na oplození oocytů pozitivně přispívá ke vzniku vyššího počtu kvalitních blastocyst. Díky kvalitnějším blastocystám stoupe i úspěšnost cyklu.

Cíl – Vyhodnotit úspěšnost oplození, kvalitu embryí a počet gravidních žen u skupiny s nižším a vyšším zastoupením apoptotických spermií v ejakulátu. Zjistit, zda je vysoké zastoupení apoptotických spermií rizikovým prvkem snižujícím parametry úspěšnosti cyklu.

5. V případě ejakulátu s normálním spermiogramem bude počet kvalitních blastocyst vyšší než při použití ejakulátu s patologickým spermiogramem. Díky kvalitnějším blastocystám stoupne i úspěšnost cyklu.

Cíl – Vyhodnotit úspěšnost oplození, kvalitu embryí a počet gravidních žen u skupiny s normálním a patologickým spermiogramem. Zjistit, zda je úspěšnost cyklu vyšší v případě použití ejakulátu s normálním než patologickým spermiogramem.

6. Nižší zastoupení spermií s fragmentací DNA ve vzorku použitém na oplození oocytů pozitivně přispívá ke vzniku vyššího počtu kvalitních blastocyst. Díky kvalitnějším blastocystám stoupe i úspěšnost cyklu.

Cíl – Vyhodnotit úspěšnost oplození, kvalitu embryí a počet gravidních žen u skupin s vyšším a nižším zastoupením spermií s fragmentací DNA v ejakulátu. Zjistit, zda je vysoké zastoupení spermií s fragmentací DNA rizikovým prvkem snižujícím parametry úspěšnosti cyklu.

7. Vyšší koncentrace spermií ovlivňuje kvalitu separace GC a později v případě negativního vlivu na spermie tak přispívá k nižší kvalitě embryí.

Cíl – Vyhodnotit úspěšnost oplození, kvalitu embryí a počet gravidních žen u skupin rozdělených podle koncentrace spermií po GC. Zjistit, zda je vysoká koncentrace spermií po GC rizikovým prvkem snižujícím parametry úspěšnosti cyklu.

Kapitola 3

Neplodnost

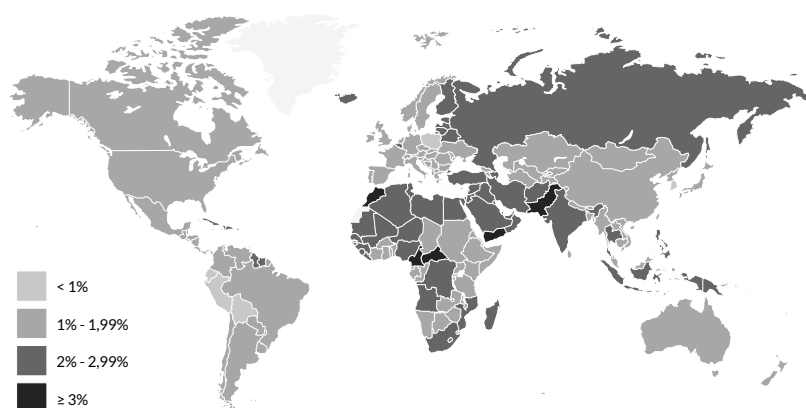
Neplodnost je takové onemocnění reprodukčního systému, při kterém nebylo dosaženo klinického těhotenství po dvanácti a více měsících pravidelného pohlavního styku bez používání kontraceptivních prostředků (Zegers-Hochschilda et al. 2009). Dříve byla hranice neplodnosti stanovená na 2 roky intenzivního snažení, ale to bylo v době, kdy byl průměrný věk prvorodiček výrazně nižší než v současnosti. U žen starších 35 let se dokonce hranice, kdy nebylo dosaženo těhotenství, zkrátila jen na 6 měsíců (Dostál 2012). To souvisí především s moderním stylem života, protože stále více párů uvažuje o početí potomků ve vyšším věku. Oddalování mateřství do pozdějších období fertilního věku postupně vzrůstá s posledními dvěma dekadami, zvláště ve vyspělých zemích. Zatímco ke konci 80. let představovala populace těhotných nad 35 let cca 5 %, v posledních letech se procento těchto žen vyšplhalo nad 20 %. Hranice vyššího věku matky je nejčastěji definována z hlediska rizika vzniku vrozených vývojových vad jako věk nad 35 let (Hašlík 2013).

Místo termínu neplodnost se lze setkat s termíny sterilita, infertilita. Tato označení znamenají totéž, ale jednotně se nepoužívají. Termín sterilita se v české terminologii používá pro úplnou neschopnost páru otěhotnět a infertilita při nemožnosti donošení životaschopného plodu. V současném českém názvosloví se však výraz infertilita stále více používá pro poruchy plodnosti v obecném slova smyslu (Citterbart et al. 2001). Nezáleží přitom na tom, zda se jedná o neplodnost či potrácivost ženy, neplodnost muže nebo obou (Konečná 2003).

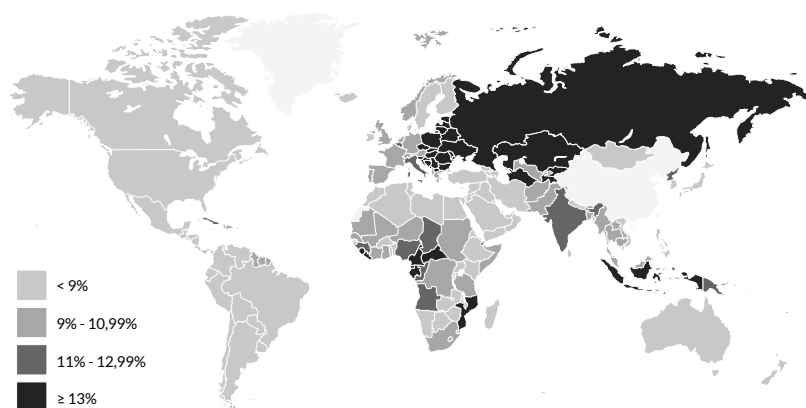
Rozlišuje se primární a sekundární neplodnost. Diagnózou primární neplodnosti se označují ženy, kterým se nikdy nepodařilo otěhotnět. Sekundární neplodnost je definována jako neschopnost počít po předchozím otěhotnění (ať už zakončeném porodem, interrupcí nebo potratem) (Doherty & Clark 2006). Výzkumy ukázaly, že sekundární neplodnost je častější než primární plodnost (obr. 3.1)¹. V roce 2010 se přibližně 10,5 % žen potýkalo se sekundární neplodností a zhruba 2 % s neplodností primární. Prevalence sekundární neplodnosti (tj. podíl počtu žen trpících neplodností a počtu všech žen ve sledované populaci) se pohybuje v rozmezí od 6 % do 16 % žen a liší se v závislosti na regionu a zemi (obr. 3.2).

Odhaduje se, že infertilita postihuje přibližně 15 % párů v plodném věku (Sharlip et al. 2002). Ačkoliv se dříve posuzovala neplodnost především ze strany ženy, zjistilo se, že na neplodnosti se podílejí oba partneři (Dohle et al. 2005). Pouze mužský faktor neplodnosti je ve 30 % případů, pouze ženský v 35 %, kombinovaný faktor ve 20 % a idiopatický faktor

¹Data převzata z: <<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>>



Obrázek 3.1: Prevalence světového výskytu primární neplodnosti žen ve věku 20-44 let (2010)



Obrázek 3.2: Prevalence světového výskytu sekundární neplodnosti žen ve věku 20-44 let (2010)

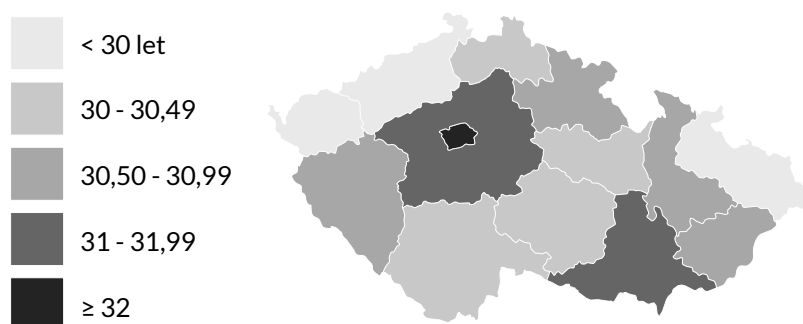
v 15 % případů. V případě idiopatické neplodnosti není zřejmá příčina neplodnosti (Thonneau et al. 1991; Schenken & Guzick 1997; Evers 2002). Příčin neplodnosti je celá řada, a proto se na léčbě neplodných párů podílejí nejen gynekologové, ale i endokrinologové a andrologové/urologové. V některých případech je vhodná konzultace léčby neplodnosti také s imunologem či genetikem. V případě psychických obtíží je vhodná konzultace s psychologem nebo psychiatrem (Ulčová-Gallová & Lošan 2013).

3.1 Současná porodnost v České republice

Podle údajů Českého statistického úřadu v roce 2016 přišlo na svět v České republice 114 400 živě narozených dětí. Z toho se 4 % dětí narodila pomocí asistované reprodukce (Český statistický úřad 2017) a předpokládá se, že počet *in vitro* počatých dětí bude nadále narůstat. Za 15–20 let může být až polovina narozených dětí počata uměle (Rumpík 2014).

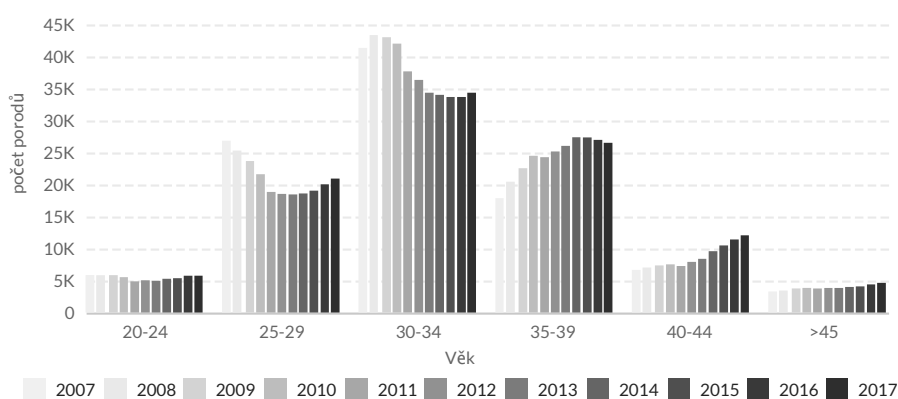
V České republice je v současnosti 15–25 % párů neplodných (Kubíček 2018). Úspěšnost umělého oplodnění se pohybuje mezi 20 až 75 % a je ovlivněna mnoha faktory. Předpokládá se, že kdyby bylo možné mužský faktor neplodnosti úspěšně léčebně ovlivnit, pak by se ročně mohlo narodit až o 8 % (tj. o 9152) dětí více (Kubíček 2018).

Velmi významným faktorem ovlivňujícím plodnost páru je věk partnerů. Optimální biologický věk ženy, ve kterém by měla otěhotnět, je 20–25 let (Vácha 2017). Avšak průměrný věk prvorodiček je v současnosti 28,9 roku. V České republice se v letech 2008–2016 nejvíce dětí narodilo rodičům ve věku 30–34 let, navíc významně narůstá počet rodičů starších 35 let (Český statistický úřad 2017)². V roce 2015 poprvé v historii ČR průměrný věk rodiček překročil hranici 30 let (Mardešić 2016) (obr. 3.3).



Obrázek 3.3: Průměrný věk matky při narození dítěte v krajích v roce 2017 (ČSÚ)

Významně stoupá také věk otců novorozенých dětí. Ačkoliv se průměrný věk otců neuvádí, ve statistických datech je možné dohledat informace o věku otců novorozенých dětí. Z grafu 1 je zřejmé, že se v posledním desetiletí posunul věk otců do vyšších věkových skupin (Český statistický úřad 2017).

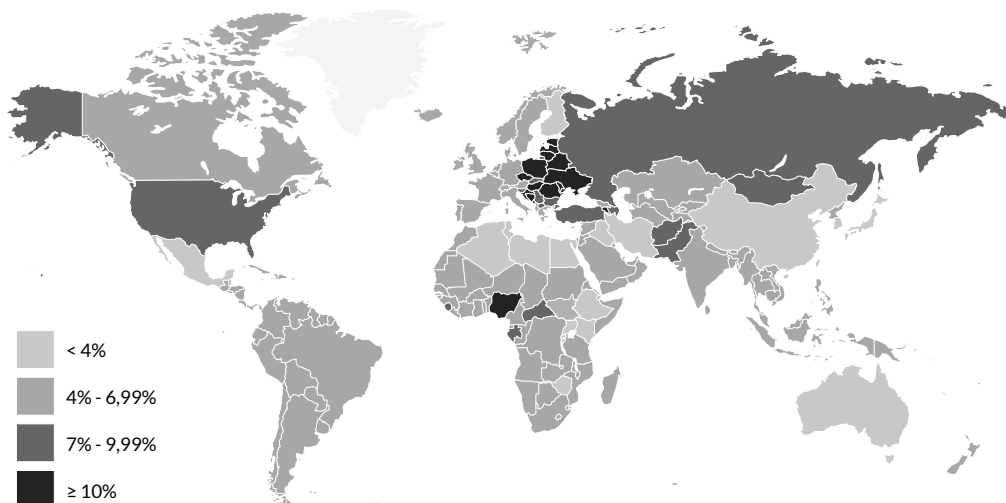


Graf 1: Celkový počet porodů dle věkových skupin otců v letech 2007-2017 (ČSÚ)

²Data převzata z: <<https://www.czso.cz/csu/czso/demograficka-prirucka-2017>>

3.2 Mužská neplodnost

Mužská neplodnost je celosvětovým problémem a ke snížení kvality ejakulátu dochází téměř ve všech zemích (obr. 3.4)³. Neplodnost může být považována za syndrom, který je výsledkem mnoha vrozených nebo získaných faktorů (Ulčová-Gallová & Lošan 2013). K vrozeným faktorům mužské neplodnosti patří varikokéla, poruchy endokrinního systému, genetické příčiny, poruchy v ejakulaci a anatomické problémy (Wald 2005). Mezi získané faktory mužské neplodnosti řadíme např. infekci a zánětlivá onemocnění, imunologické příčiny, úrazy a následky chirurgických zákroků (Wald 2005). K poklesu kvality ejakulátu dochází také vlivem kouření, obezity, působením toxických látek, účinkem rentgenového záření nebo působením extrémních teplot. V mnohých případech příčina neplodnosti nemusí být zjištěna a stav se označuje jako idiopatická neplodnost (Evers 2002). Před každým vyšetřením je nutná anamnéza, která se zaměřuje na předcházející otcovství, frekvenci a charakteristiku pohlavního života, prodělané nemoci a případné operace, vývojové vady (např. kryptorchismus), sexuálně přenosné choroby, infekční onemocnění a další (Doherty 2006). Zjišťuje se také rodinná anamnéza. Důležité je provedení fyzického a ultrazvukového vyšetření pohlavních orgánů. Základním vyšetřením kvality spermií je spermioqram a případně cytometrické vyšetření spermií (Krátká 2017). Kromě toho je vhodné provést vyšetření infekcí v moči pacienta (a případně i jeho partnerky). V krvi se stanovuje také hladina pohlavních hormonů. V případě nízké koncentrace spermií je vhodné provést genetické vyšetření.



Obrázek 3.4: Prevalence světového výskytu mužské neplodnosti (2017)

3.3 Vyšetření kvality ejakulátu

Základním laboratorním vyšetřením muže je spermioqram. Ve snaze o zajištění určitého standardu a srovnatelnosti výsledků z různých pracovišť vydala World Health Organi-

³Data převzata z: <<https://media.nature.com/original/nature-assets/nrurol/journal/v14/n12/extref/nrurol.2017.175-s1.pdf>>

zation (WHO) manuál (Manual for Semen Analysis). Manuály jsou vydávány od roku 1980 a byly pravidelně aktualizovány. Zatím poslední verze pochází z roku 2010. V tomto manuálu je uveden doporučený postup vyšetření včetně hraničních hodnot jednotlivých parametrů (tabulka 3.1). Mezi makroskopicky hodnocené parametry patří objem ejakulátu po zkapalnění, viskozita, barva a pH. Mikroskopicky je určována koncentrace spermií, jejich motilita, morfologie a případně aglutinace buněk. Z objemu a koncentrace je vypočítán celkový počet spermií v ejakulátu. Pravděpodobně nejdůležitějším údajem spermioqramu jsou koncentrace pohyblivých spermií a kvalita jejich pohybu (Řežábek 2014).

Celkový počet spermií u mužů v posledních desetiletích významně klesá, jak prokázala metaanalýza dat získaných od 43 000 mužů ze Severní Ameriky, Evropy, Austrálie a Nového Zélandu provedená v roce 2017 Levinem et al. Do analýzy bylo zařazeno 185 studií. Autoři vypočítali, že mezi lety 1973 až 2011 poklesl celkový počet spermií u zdravých mužů o 59,3 % a koncentrace spermií v ejakulátu klesla o 52 %.

Počet spermií a další parametry ejakulátu jsou spojeny s vlivy prostředí a životním stylem. Mezi vlivy prostředí patří endokrinní disruptory (Gore et al. 2015), pesticidy (Chiu et al. 2016) a změna teploty (Zhang et al. 2015). Faktory životního stylu zahrnují stres (Nordkap et al. 2016), diety (Jensen et al. 2013), kouření (Sharma et al. 2016) a Body Mass Index (BMI) (Sermondade et al. 2013).

Také hraniční hodnoty jednotlivých parametrů spermioqramu se ve WHO manuálu výrazně změnilo (tab. 3.1)(Mardešić 2013). Aktuální spodní hranice normy z roku 2010 udává koncentraci 15 milionů spermií na mililitr spermatu, přičemž ve WHO doporučení z roku 1999 bylo uvedeno 20 milionů spermií na mililitr. Aktuální referenční hodnoty byly zjištěny vyšetřením 4500 vzorků ejakulátu plodných mužů ve věku 31 ± 5 let. Nově zjištěné hodnoty jsou ve srovnání s předcházejícími doposud nejnižší. Tyto normy jsou z několika důvodů kritizovány. Data byla získána ze 14 zemí, ale pouze ze severní polokoule a nejsou zahrnuty vzorky z Jižní Ameriky, Afriky a Asie (Vieira 2013). Parametry jsou založeny na údajích mužů, jejichž partnerky otěhotněly v době do 12 měsíců od provedení vyšetření, což je velmi dlouhá doba a kvalita ejakulátu se mohla mezitím výrazně změnit. Navíc u každého z mužů byl proveden pouze jeden odběr spermatu (Esteves et al. 2012). Nové referenční hodnoty mají významný dopad na klinickou praxi. Mírnější hraniční hodnoty umožňují mezi normozoospermiky zařadit muže, kteří byli v minulosti považováni za neplodné. To může zpozdit indikaci léčby neplodnosti a postihnout i její výsledek (Yerram et al. 2012).

Tabulka 3.1: Vývoj referenčních hodnot parametrů spermioqramu podle WHO

Parametry SPG dle WHO	1980	1987	1992	1999	2010
Objem (ml)	-	≥ 2	≥ 2	≥ 2	1,5
koncentrace spermií ($10^6/ml$)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15
celková koncentrace spermií (10^6)	-	≥ 40	≥ 40	≥ 40	39
celková motilita	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	40
progresivní motilita (% motilních)	≥ 2	≥ 25	$\geq 25(a)$	$\geq 25(a)$	32(a+b)
vitalita (% živých)	-	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58
morfologie (% normálních)	80,5	≥ 50	≥ 30	> 14	4

SPG - Spermioqram

3.3.1 Spermioqram

V období před odběrem je pacient požádán, aby dodržel 3-5denní sexuální abstinenci (WHO 2010). Před vyšetřením je pacient poučen o způsobu odběru ejakulátu. Odběr vzorku ejakulátu by měl ideálně proběhnout ve speciální odběrové místnosti vedle laboratoře, aby byl interval mezi odběrem a analýzou vzorku co nejkratší a aby nedošlo k vystavení výkyvu teplot vzorku. Pro účely vyšetření spermioqramu je vzorek ejakulátu získán masturbací a odebírání se do širokohrdlé nádoby označené jménem a identifikačním číslem. Pacient podepisuje informovaný souhlas s odběrem, na kterém je uveden i čas odběru a informace, zda je vzorek kompletní. Zaznamenány jsou i informace o užívaných lécích, horečnatých onemocněních prodělaných v poslední době a počet dní pohlavní abstinence. Během transportu do laboratoře by měl být vzorek uchován při teplotě mezi 20 °C a 37 °C a měl by být doručen ke zpracování maximálně do 60 minut od odběru (WHO 2010; SOP 001).

3.3.1.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu

Ejakulát se hodnotí v laboratoři jak z makroskopického, tak mikroskopického hlediska. Makroskopické hodnocení zahrnuje zkapalnění, viskozitu, vzhled, objem a pH ejakulátu.

Zkapalnění, vzhled ejakulátu

Normální vzorek ejakulátu je homogenní, šedavě bílý a opalescentní (Weiss et al. 2010). Při pokojové teplotě zkapalní během 15 minut, pokud je doba zkapalnění delší než 60 minut, je třeba to zaznamenat do protokolu. Žlutavé zbarvení ejakulátu může být způsobeno užíváním multivitaminů nebo některých léků a nemusí znamenat nic patologického. Červené a hnědavé zbarvení bývá způsobeno přítomností červených krvinek v ejakulátu. V takových případech by pacient měl být podrobněji vyšetřen, aby byla zjištěna příčina krvácení (Björndahl et al. 2010). Silně žlutozelené nebo zelené zbarvení značí příměs hnisu, moče nebo mikroorganismů. Zkapalněný ejakulát může fyziologicky obsahovat gelová zrna, která nezkapalní. Taková gelová zrna nemají žádný klinický význam, jejich přítomnost však může negativně ovlivnit průběh další analýzy (Kubíček 2010).

Objem

Objem se stanovuje buď pomocí válce nebo pomocí plastové široké pipety (WHO 2010). Příčinami sníženého objemu ejakulátu (<1,5 ml) mohou být obstrukce ve vývodných cestách, vrozená bilaterální absence chámovodu nebo odběr nekompletního vzorku. Zvýšený objem vzorku (>6 ml) může být způsobený přítomností zánětlivého exsudátu, vyvolaného akutní infekcí některých přídatných orgánů (např. prostaty) (Tamler et al. 2007).

Stanovení pH

K vyšetření hodnoty pH se používá pH papírek s indikačním rozmezím 6,4-8,0. Normální pH je 7,2-7,8. Je-li pH vyšší než 7,8, je možná přítomnost infekce. Je-li pH při azoospermii pod 7,0, je nutno vyšetřit chámovod, semenné vácčky a nadvarlata, neboť může jít o obstrukci semenného traktu (Kubíček 1998).

3.3.1.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Při mikroskopickém hodnocení vzorku ejakulátu se hodnotí koncentrace, motilita, vitalita, morfologie a aglutinace spermií (WHO 2010). Zjišťuje se přítomnost jiných buněčných elementů než spermií. Mikroskopické zhodnocení spermií by mělo být provedeno maximálně do 1 hodiny od odběru (SOP 001).

Koncentrace

Koncentrace spermií je hodnocena pomocí Maklerovy počítací komůrky (WHO 2010; Řežábek 2014). Komůrka se skládá ze dvou sklíček, která jsou přesně zbroušena tak, že je mezi nimi malá mezera o tloušťce 10 μm . Do krycího sklíčka je vyryta mřížka. Díky tomu se v každém čtverci mřížky ukazuje tak malý počet spermií, že ho lze dobře spočítat v nativním ejakulátu bez ředění (Řežábek 2014). Odečet preparátu se provádí pod 200násobným zvětšením. V deseti čtverečcích buď v řadě nebo ve sloupci se spočítá počet spermií a výsledek se vynásobí 10^6 . Údaj udává počet spermií v jednom mililitru ejakulátu. Počítají se jen spolehlivě rozpoznatelné spermie. Volné hlavičky, bičíky a jiné elementy nejsou zahrnuty do počítání (Kubíček 1998). Hraniční hodnota koncentrace spermií je 15×10^6 spermií v ml. Označení oligozoospermie znamená nízkou koncentraci spermií v ejakulátu. Azoospermie označuje nepřítomnost spermií v ejakulátu (nejsou přítomné ani po centrifugaci vzorku) (WHO 2010).

Motilita spermií

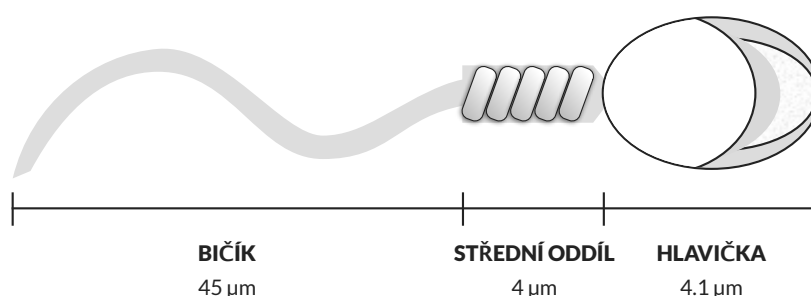
Analýza pohyblivosti spermií by se měla provádět co nejdříve po zkapalnění vzorku, aby se omezilo nepříznivé působení dehydratace, pH nebo změny teploty na motilitu spermií. Pohyblivost spermií se také hodnotí v Maklerově komůrce. Hodnotí se progresivně motilní (A,B), nonprogresivně motilní (C) a nakonec imotilní spermie (D). V ejakulátu by mělo být minimálně 32 % progresivně pohyblivých spermií (WHO 2010). Astenozoospermie označuje nižší počet pohyblivých spermií, nekrozoospermie je označení ejakulátu bez pohyblivých spermií. Snížená motilita spermií může být způsobena např. infekčním onemocněním (zánětem prostaty nebo semenných váčků). Pohyblivost spermií omezují některé spermatické protilátky (Björndahl et al. 2010; Madár et al. 2016).

Vitalita spermií

Ve vzorcích ejakulátu s nízkým zastoupením pohyblivých spermií se doporučuje stanovit % živých a mrtvých spermií. Dříve se provádělo mikroskopické stanovení vitality spermií klasickým barvením eosinem v kombinaci s nigrosinem a anilinovou modří pro vytvoření pozadí pro živé buňky, které se neobarvily eosinem (Graham 2001). V poslední době se na klinikách začíná používat měření vitality spermií pomocí propidium jodidu. Měření poté probíhá na průtokovém cytometru (viz kap. 3.3.3).

Morfologie spermií

Zralá lidská spermie je štíhlá pohyblivá buňka skládající se z hlavičky, středního oddílu a bičíku (Freund 1966) (obr. 3.5). Hlavička má oválný, zploštělý, při pohledu ze strany hruškovitý tvar (Malinský & Lichnovský 2003). Střední oddíl se skládá z krčku a spojovacího oddílu (Klika 1985). Bičík normální spermie je asi 10krát delší než hlavička. Neměl by být výrazně zahnutý ani nesmí být zdvojený. Odchylek od normálního tvaru je mnoho, např. dvojitá hlavička, dvojité bičíky, deformace hlaviček, defekty krčku. V ejakulátu by měly být alespoň 4 % spermií s normální morfologií. Teratozoospermie označuje ejakulát s nižším zastoupením morfologicky normálních spermií. Vyšší procento patologických spermií bývá někdy spojeno s poruchou spermiogeneze nebo s onemocněním varlat (WHO 2010).



Obrázek 3.5: Základní morfologické znaky a rozměry spermie
Autor obrázku: Petr Tarant

Aglutinace spermií

Jde o vzájemné shlukování pohyblivých spermií. Dle WHO se rozlišuje 1-4 stupně aglutinace podle počtu spermií ve shluku. Aglutinace mohou být způsobené mj. přítomností anti-spermatických protilátek ve vzorku (Rose et al. 1976).

Stanovení protilátek proti spermiím v ejakulátu

Protilátky proti spermiím v ejakulátu se prokazují pomocí smíšené aglutinační reakce (Mixed Anti-immunoglobulin Reaction (MAR) test) nebo pomocí immunobead testu (IBT) (Madár et al. 2016). MAR test využívá latexové částice označené lidskými imunoglobuliny IgA, IgM nebo IgG. Sérum proti lidským Ig způsobí aglutinaci mezi spermiemi a částicemi (McLachlan 2002). IBT využívá polyakrylamidové kuličky potažené protilátkami proti lidským IgG, IgM a IgA, které jsou inkubovány s promytými spermiemi pacienta (přímý test). V případě nepřímého testu se nejprve inkubují spermie zdravého dárce se seminální tekutinou pacienta (příčemž se na povrch spermií naváží protilátky od pacienta) a pak se přidají kuličky (McLachlan 2002).

Koncentrace leukocytů a stanovení přítomnosti dalších buněk

V ejakulátu se vyskytují i jiné buňky než spermie, např. nezralé zárodečné buňky (spermatocyty, spermatidy, spermatogonie), leukocyty, epiteliální buňky, prostatické buňky, bakterie či prvoci (Řežábek 2014). Ke stanovení koncentrace těchto buněk se doporučuje využívat průtokové cytometrie (Krátká et al. 2017) (viz kap. 3.3.3). Leukocyty jsou ve velmi nízké koncentraci detekovány i ve zdravém ejakulátu (Diemer et al. 2003). Koncentrace leukocytů má být nižší než 1 mil/ml (WHO 2010). Vysoká koncentrace leukocytů v ejakulátu může signalizovat probíhající zánět či infekci pohlavního ústrojí (Talbert et al. 1987; Wolff 1995). Leukocyty mohou přímo ničit spermie nebo produkují cytokiny, které spermie poškozují (Ulčová-Gallová & Lošan 2013).

3.3.1.3 Výsledné hodnocení

Celkový výsledek spermioqramu se hodnotí slovně a zahrnuje kombinaci předpon popisujících jednotlivé patologie. Nejčastější termíny jsou uvedené v tabulce 3.2.

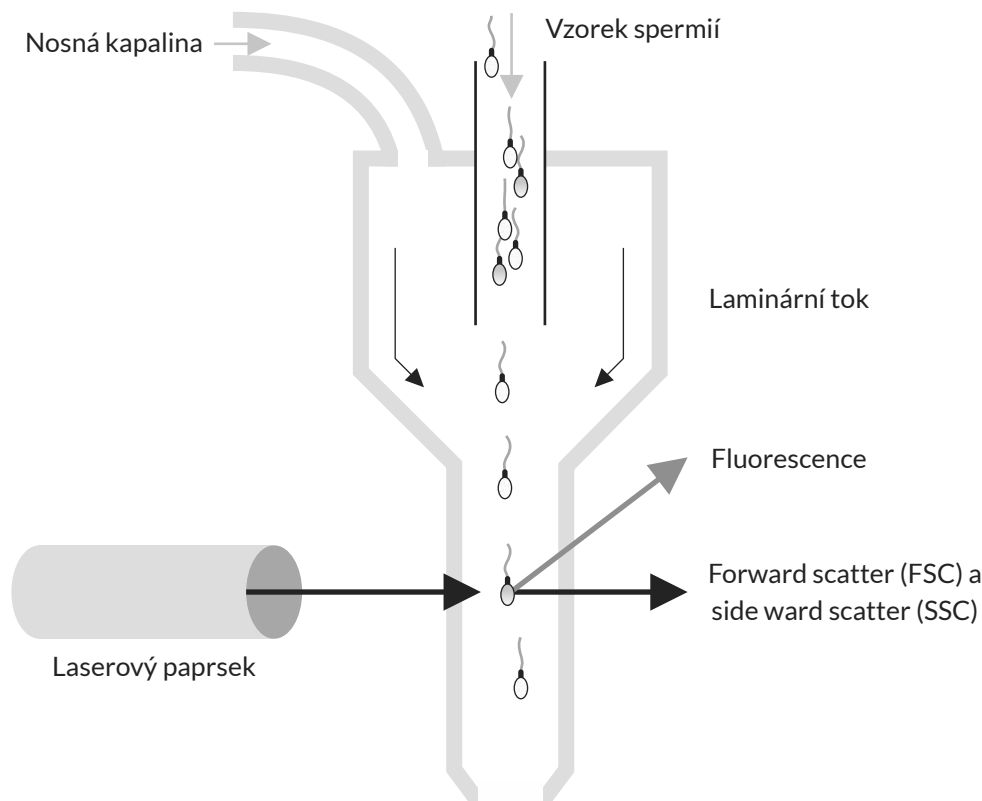
Tabulka 3.2: Závěry hodnocení spermioqramu (WHO 2010)

Závěr	Hodnocení
Normozoospermie	Všechny parametry v normě
Oligozoospermie	Koncentrace spermií nižší než 15 mil/ml
Teratozoospermie	Méně než 4 % spermií s normální morfologií
Asthenozoospermie	Méně než 40 % spermií s celkovou motilitou nebo méně než 32 % spermií s progresivní motilitou
Azoospermie	Absence spermií ve vzorku
Aspermie	Nepřítomnost ejakulátu
Nekrozoospermie	V ejakulátu přítomny pouze spermie bez pohybu
Kryptozoospermie	V čerstvém vzorku absence spermií, ale po centrifugaci celého vzorku spermie obsaženy v peletě
Globozoospermie	V ejakulátu přítomny spermie se zakulacenou hlavičkou a bez akrozomu

3.3.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda umožňující simultánní měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem v průtokovém cytometru (Vávrová et al. 2002). Buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny (sheath fluid) a jsou usměrněny do tenkého laminárního proudu buněk, které postupují jedna za druhou detekční komůrkou a v ní protínají světelný paprsek (Eckschlager et al. 1999). Přitom dochází k rozptýlení paprsku. V úhlu do 20° proti ose paprsku je snímán tzv. Forward scatter (FSC), kterým se zjišťuje velikost částic. V úhlu 90° proti ose světelného paprsku je snímán tzv. Sideward scatter (SSC), kterým se zjišťuje vnitřní struktura a granularita částic (Wu et al. 2010) (obr. 3.6).

Buněčná suspenze je před měřením označena protilátkami konjugovanými s různými fluorescenčními značkami. Průtokový cytometr umožňuje detekovat fluorescenci, a tedy i jednotlivé subpopulace procházejících buněk. Fluorescence je zachycena fotonásobičem pro každou vlnovou délku specifickou pro fluorochrom (Eckschlager et al. 1999; Marinov 2008). Výstupem měření jsou data, která mohou být zobrazena různými typy grafů a umožňují znázornit odlišné subpopulace buněk (Eckschlager et al. 1999).



Obrázek 3.6: Princip fluidního systému průtokového cytometru

Autor obrázku: Petr Tarant

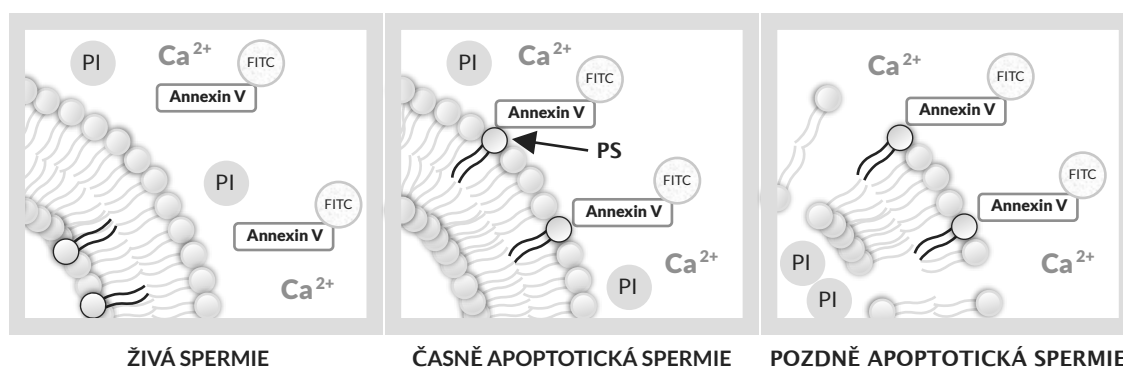
3.3.3 Vyšetření ejakulátu

Využití průtokové cytometrie ke stanovení kvality ejakulátu je objektivnější než mikroskopické zhodnocení. Při cytometrické analýze dochází k měření velkého počtu spermii. Použitím protilátek je možné označit některé subpopulace buněk (leukocyty) nebo označit např. spermie s permeabilizovaným akrozomem. Výhodou je i velká rychlost měření a objektivnost (Shai et al. 2005). Pro práci s průtokovým cytometrem je nutná znalost správného nastavení analýz dat a tzv. kompenzací. Mezi základní cytometrická stanovení patří koncentrace spermii a leukocytů v ejakulátu, stanovení živých a apoptotických spermii, stanovení integrity akrozomu nebo fragmenatace DNA spermii (Krátká et al. 2017). Stanovení koncentrace buněk průtokovou cytometrií je založeno na přidání vnitřního standardu (fluorescenčních kuliček o známém počtu) ke vzorku ejakulátu.

3.3.3.1 Stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií

Apoptóza je geneticky přísně regulovaný druh buněčné smrti spojený s četnými typickými biochemickými a morfologickými změnami buněčné architektury (Elmore 2007). Důsledkem apoptózy není jen smrt buňky, ale také účinné bezpečné odstranění mrtvých buněk a jejich částí (apoptotických tělísek) fagocytujícími buňkami bez rozvoje zánětlivé (škodlivé) reakce (Schultz et al. 2003). Typickými znaky apoptózy jsou smršťování buňky, postupné zhušťování cytoplazmy, fragmentace DNA, kondenzace chromatinu, rozpad jádra, externalizace fosfatidylserinů (PS) z vnitřní na vnější vrstvu buněčné membrány, aktivace kaspáz a rozpad buňky na apoptotická tělíška, přičemž ale nedochází k porušení membránové integrity (Henry et al. 2013). Uvnitř apoptotických tělísek zůstává uzavřený vnitřní obsah buňky. Pokud by došlo k vylití intracelulárního obsahu (mrtvých) buněk do okolí, pak by došlo k poškození okolní tkáně a k vyvolání zánětlivé reakce. Apoptotická tělíška jsou velmi rychle odstraněna fagocytózou, přičemž fagocyty neprodukují cytokiny, které by vyvolaly zánět (Kurosaka et al. 2003; Hart et al. 2008).

Apoptóza má během spermatogeneze významnou roli. Pomocí apoptózy je regulována koncentrace vyvíjejících se zárodečných buněk tak, aby mohly být dostatečně vyživovány Sertoliho buňkami. Apoptózou jsou také likvidovány abnormální spermie (Sakkas et al. 2003). Apoptózou dochází k eliminaci například starých, infikovaných, poškozených buněk nebo buněk s mutacemi v DNA. Za normálních podmínek se více než polovina možného počtu zralých zárodečných buněk zničí, většinou právě v důsledku apoptózy spermatogonií a spermatocytů (Dunkel et al. 1997). Pro detekci apoptotických buněk se používá protein annexin V konjugovaný s fluorescenční značkou (např. fluorescein isothiokyanát (FITC)), který se za účasti iontů vápníku váže na PS na vnější straně membrány (Dvorská et al. 2008). Současně se používá propidium jodid (PI), který proniká poškozenou membránou do mrtvých buněk a dostává se do jádra, kde barví DNA (Joux & Lebaron 2000). Živé spermie jsou annexin V negativní a PI negativní buňky (Dvorská et al. 2008). Časně apoptotické buňky jsou annexin V pozitivní a současně jsou PI negativní. Pozdně apoptotické buňky jsou pozitivní na annexin V i na PI a nekrotické buňky jsou pozitivní převážně na PI (obr. 3.7).



Obrázek 3.7: Princip stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií pomocí Annexin V/ PI assay

Autor obrázku: Petr Tarant

V čerstvém ejakulátu u fertálních mužů by měly převažovat živé spermie (Krátká et al. 2017). Vysoké zastoupení apoptotických spermií signalizuje patologii a může být způsobeno mnoha faktory, např. přítomností infekce, vysokou teplotou, vlivem chemických látek či kouřením (Aitken et al. 2013). Častěji než zastoupení apoptotických spermií se stanovuje tzv. vitalita. Při tomto testu se používá pouze PI (Christensen et al. 2004).

3.3.3.2 Integrita akrozomu

Cytometricky může být integrita akrozomu hodnocena pomocí protilátky proti intraakrozomálnímu proteinu Hs-8 (Čapková et al. 2016). U spermií s poškozeným akrozomem proniká protilátka do akrozomu a váže se na intraakrozomální protein. Pokud je akrozom spermie celistvý, není umožněna vazba na proteiny uvnitř akrozomu (Čapková et al. 2016). Hodnocení stavu akrozomu se může provést také mikroskopicky. Norma je <30 % spermií s nízkou integritou akrozomu (tj. Hs-8 pozitivních) (Pěkníková et al. 2005).

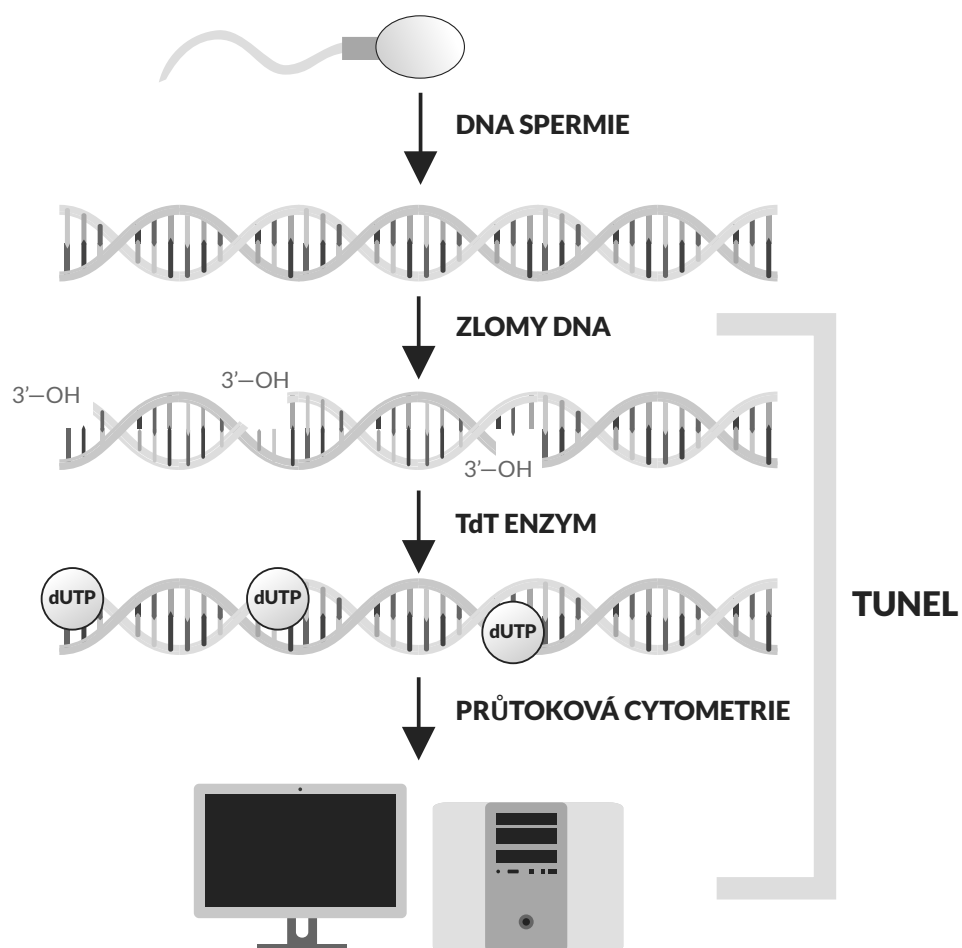
3.3.3.3 Fragmentace DNA ve spermiích

Jedním z projevů apoptózy spermií je fragmentace DNA. Fragmentace DNA je charakterizována zlomy jednoho nebo obou vláken DNA. Vysoké zastoupení spermií s fragmentovanou DNA bylo prokázáno v ejakulátu subfertálních mužů (Irvine 2000), ale signifikantně zvýšené poškození DNA spermií bylo detekováno i u některých normozoospermiků (Saleh et al. 2002). Spermie od somatických buněk odlišují dvě vlastnosti, a to protaminace a absence reparačních mechanismů DNA. Spermie nejsou schopné opravit poškození DNA, ke kterému došlo např. při transportu přes epididymis a po ejakulaci. K částečné opravě otcovské DNA může dojít po oplození oocyty, protože v oocytech jsou zachovány enzymy schopné opravovat poškozenou DNA (Matsuda 1988; Genesca 1992; Steger et al. 2010).

Etiologie poškození DNA spermií je tedy multifaktoriální (González–Marín et al. 2012). Ke ztrátě integrity DNA může dojít při vývoji u testikulárních spermií, u epididymálních spermií, nebo i u zralých spermií až v samotném ejakulátu (Shamsi et al. 2009). Např. v průběhu spermiogeneze dochází k tvorbě zlomů díky topoizomeráze. Zlomy DNA vznikají v důsledku torzního napětí, které nastává při balení velkého množství DNA do velmi malého prostoru hlavičky spermie (Aitken et al. 2005). Mezi vnější faktory, které mohou vyvolat apoptózu spermií a následnou fragmentaci DNA patří varikokéla, kryptorchismus, infekce nebo rakovina a její léčba. Na kvalitu spermií a jejich DNA mají vliv vyšší věk, dlouhá pohlavní abstinence, kouření, znečištěné ovzduší, práce v prostředí s vysokou koncentrací pesticidů nebo nebezpečných chemikálií (Skakkebaek et al. 2016).

Při analýze apoptózy spermií a fragmentace DNA je třeba dodržet doporučenou délku preanalytické fáze. DNA může být poškozena také při nesprávné manipulaci se vzorkem, např. vlivem teploty při skladování vzorku nebo při příliš dlouhém skladování vzorku ejakulátu (Aitken & De Iuliis 2010). Stanovení fragmentace DNA ve spermiích se považuje za nadějný biomarker fertility mužů (Cissen et al. 2016). Kvalitní DNA je nezbytná pro zdravý vývoj embrya a pokud DNA není kvalitní, pak může dojít buď k zastavení vývoje embrya v časném stádiu těhotenství či později k potratu. Nekvalitní DNA se může projevit také později, a to rozvojem různých systémových onemocnění (Aitken & Koppers 2011; Sakkas et al. 2015). Vysoký počet spermií s fragmentací DNA tedy významně snižuje pravděpodobnost početí a narození zdravého dítěte (Cissen et al. 2016; Simon et al. 2017).

Nejčastěji využívanou spolehlivou metodou pro stanovení fragmentace DNA je metoda Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) (Simon et al. 2017). Kromě ní se používá i cytometrická metoda SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson 2016). Existují i mikroskopické metody stanovení fragmentace jako Comet assay nebo SCD (Sperm Chromatin Dispersion) (Novotná et al. 2016). Princip TUNEL testu spočívá v tom, že terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT) inkorporuje na volné 3' OH konce DNA značený deoxyuridintrifosfát (dUTP). Poškozenou DNA je možné hodnotit pomocí světelné mikroskopie, fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Huerta et al. 2007) (obr. 3.8). K výhodám metody TUNEL patří schopnost měřit jednovláknové i dvouvláknové zlomy zároveň (Shamsi et al. 2009). Další výhodou testu je i možnost používat zamražené spermie. Mezi nevýhody patří zejména časová a finanční náročnost (Grasl-Kraupp et al. 1995). Je třeba brát ohled na to, že zlomy v DNA nenastávají jen při apoptóze, ale fragmentovaná DNA je přítomna i v nekrotických buňkách (Charriaut-Marlangue & Ben-Ari 1995).



Obrázek 3.8: Princip metody stanovení fragmentace DNA - TUNEL

Autor obrázku: Petr Tarant

Kapitola 4

Metody asistované reprodukce

V případě neschopnosti spontánního početí se využívá při léčbě neplodných párů možnost *in vitro* oplození oocytů spermii partnera. Tato práce se zaměřuje především na metody ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) a PICSI (Preselected Intracytoplasmic Sperm Injection).

Intracytoplasmatická injekce spermie je metoda asistované reprodukce, při které je jedna spermie injikována do oocytu (Řežábek 2014). V současnosti je ICSI nejvíce používanou metodou *in vitro* oplození. Metoda PICSI je modifikací ICSI. Používají se spermie selektované na základě jejich schopnosti vázat se na hyaluronan (viz kap. 4.1.3).

4.1 Separace kvalitních spermií před *in vitro* oplozením

Před oplozením oocytů pomocí technik asistované reprodukce je potřeba z ejakulátu selektovat co nejkvalitnější spermie. Metody separace spermií jsou nezbytné jak pro běžnou IVF, tak pro ICSI. Při těchto metodách nejsou spermie vystaveny fyziologickým bariérám (např. cervikální hlen, vaginální pH, záhyby vejcovodu, odpověď imunitního systému), které působí jako přirozený mechanismus výběru motilních spermií (Perez-Cerezales et al. 2017).

Ideální technika separace spermií by měla být rychlá, snadná a izolovat co nejvíce motilních spermií. Neměla by způsobovat poškození spermií nebo nefyziologické změny u separovaných spermií. Eliminuje semennou plazmu, mrtvé spermie a ostatní buňky, včetně leukocytů a bakterií. Také eliminuje toxické nebo bioaktivní látky, jako jsou dekapacitační faktory a reaktivní druhy kyslíku (ROS) (Matás et al. 2011). Použití jednotlivých metod by se mělo zvolit podle kvality spermií.

4.1.1 Swim-up separace spermií (SU)

Swim-up je metoda založená na separaci spermií na základě jejich motility. Při této technice pohyblivé spermie aktivně migrují (vyplavou) do kultivačního média, ve kterém poté dochází k jejich kapacitaci (WHO 2010). Migrace spermií skrz médium je považováno za ekvivalentní proces, při kterém lidské spermie unikají z ejakulátu a kolonizují cervikální hlen (Mortimer et al. 1982; Katz et al 1990; Mortimer 1997). Selektce spermií podle motility a morfologie během metody swim-up je tedy vysoce srovnatelná s *in vivo* podmínkami. K separaci

metodou swim-up by mělo docházet přednostně před centrifugací, v jejímž důsledku dochází k rozrušení defektních spermií, které tvoří ROS (Aitken & Clarkson 1987; Aitken & Baker 2013). Pomocí techniky swim-up se získává suspenze s nižší koncentrací spermií, které jsou však plně pohyblivé.

4.1.2 Gradientová centrifugace (GC)

Obecně platí, že pohyblivá zralá spermie má vyšší hustotu než imotilní nebo nezralá spermie (Oshio et al. 1987). Principem separace gradientovou centrifugací je rozdělení složek ejakulátu podle jejich hustoty. Hustotní gradient se vytvoří vrstvením koloidních roztoků různé denzity. Ejakulát se opatrně navrství nad gradient. Během centrifugace se nezárodečné buňky, nečistoty a nepohyblivé spermie zachytí na rozhraní dvou vrstev, zatímco zcela pohyblivé, zralé spermie, které mají vyšší denzitu, sedimentují na dno zkumavky (Malvezzi et al. 2014). Sedimentované spermie se resuspendují v kultivačním médiu. Centrifugace však může způsobit poškození integrity spermií a zvýšení ROS (Alvarez et al. 1993). To způsobuje vyšší fragmentaci DNA spermií, která může ovlivnit úspěšnost těhotenství a embryonální vývoj.

4.1.3 Separace spermií vazbou na hyaluronan (PICSI)

Pro úspěšnou penetraci a fertilizaci oocyty jsou potřebné zralé spermie, které mají receptory pro hyaluronan. Glykosaminoglykan hyaluronan je hlavní součástí tzv. cumulus oophorus – mezibuněčné hmoty obalové vrstvy oocyty (Salustri et al. 1989). Separace zralých spermií může probíhat pomocí speciálních Petriho misek, jejichž dno je pokryto vrstvou gelu, který obsahuje hyaluronan. Spermie suspendované v médiu se napipetují na povrch tohoto gelu. Poté spermie migrují ke gelu, na který se zralé spermie naváží prostřednictvím hyaluronan-specifických receptorů. Nezralé spermie, které nemají specifické receptory, se na gelovou vrstvu nenavážou. Pro ICSI jsou následně embryologem vybírány pouze spermie navázané na hyaluronan, které vykazují pohyb na místě (Saymé et al. 2013).

4.1.4 Magnetická separace apoptotických spermií (MACS)

Separční systém MACS (Miltenyi Biotec, Německo) využívá vazby železných částic označených specifickou molekulou na povrch buněk (Miltenyi et al. 1990). Využívá kovové nanočástice o velikosti 50 nm, které nemění strukturu, funkci nebo aktivitu buněk. Používají se v mnoha různých testech, přičemž se liší pouze molekulami, které jsou navázány na povrchu nanočástic. Tyto molekuly se naváží na buňky a specificky označí určitou populaci buněk. Po separaci buněčných suspenzí v koloně umístěné v magnetickém poli se zpravidla používá pro další zpracování neoznačená (negativní) populace, která kolonou prochází.

Metoda MACS Art Annexin V využívá vazby nanočástic na povrch apoptotických spermií. Na povrch nanočástic jsou navázány molekuly annexinu V, který se specificky váže na PS na buňkách (Said et al. 2008). Po vazbě nanočástic na spermie je směs přenesena na separační kolonu umístěnou v magnetickém poli. Značené apoptotické buňky zůstávají zachycené v koloně. Kolonou protečou a dále se používají pouze spermie bez navázaných nanočástic (živé spermie).

4.1.5 Mikrofluidní separace spermií (MFSS)

Mikrofluidní separace spermií patří mezi nejnovější metody používané pro selekci spermií. Při MFSS se využívají principy chemotaxe, termotaxe a fluidního toku. V klinikách asistované reprodukce se nejčastěji používá pasivní systém mikrofluidní separace, kde jediným mechanismem separace je aktivní pohyb spermií. Tato metoda selekce spermií se nejvíce blíží k mechanismu přirozeného výběru. Spermie se izolují laminárním prouděním, které prochází kolem mikrobariér (Cho et al. 2003; Chung et al. 2006). Tyto bariéry napodobují přirozené prostředí, kdy spermie putuje děložním čípkem, dutinou dělohy a vejcovody (Koyama et al. 2006; Xie et al. 2010). Čip má dvě komory oddělené polykarbonátovým filtrem o různých průměrech pórů, a to 8, 14 a 20 μm . Vzorek ejakulátu se napipetuje do vstupní komory a následně se druhá komora naplní separačním médiem. Obě tekutiny se v čipu pod mírným tlakem spojí. Jakmile dojde uvnitř čipu ke spojení obou toků tekutin, pohyblivé spermie svým aktivním pohybem přechází do proudu média, zatímco nepohyblivé a mrtvé spermie jsou unášeny ve svém původním proudu. Čip je 30 minut inkubován při 37 °C, poté jsou z výstupního otvoru odsáty separované spermie. Nekvalitní spermie zůstávají v kanálku (Zhang et al. 2011; Tasoglu et al. 2013a; Tasoglu et al. 2013b). Separované spermie mají lepší morfologii, integrovanou DNA a více než dvojnásobnou životaschopnost a pohyblivost oproti spermiím neseparovaným. Výhodou této separace je rychlé a šetrné zpracování ejakulátu bez použití centrifugace.

4.1.6 Kombinace separačních metod

Uvedené metody, které se používají pro separaci spermií, lze také mezi sebou kombinovat, což může zvýšit jejich separační účinek. Nejčastějšími kombinacemi, které se využívají jsou GC+SU, SU+MACS, GC+MACS. Přílišná kombinace může i uškodit. Zvláště u pacientů s patologickým spermioqramem mohou být spermie poměrně křehké a příliš mnoho kroků může naopak kvalitu separovaného vzorku zhoršit.

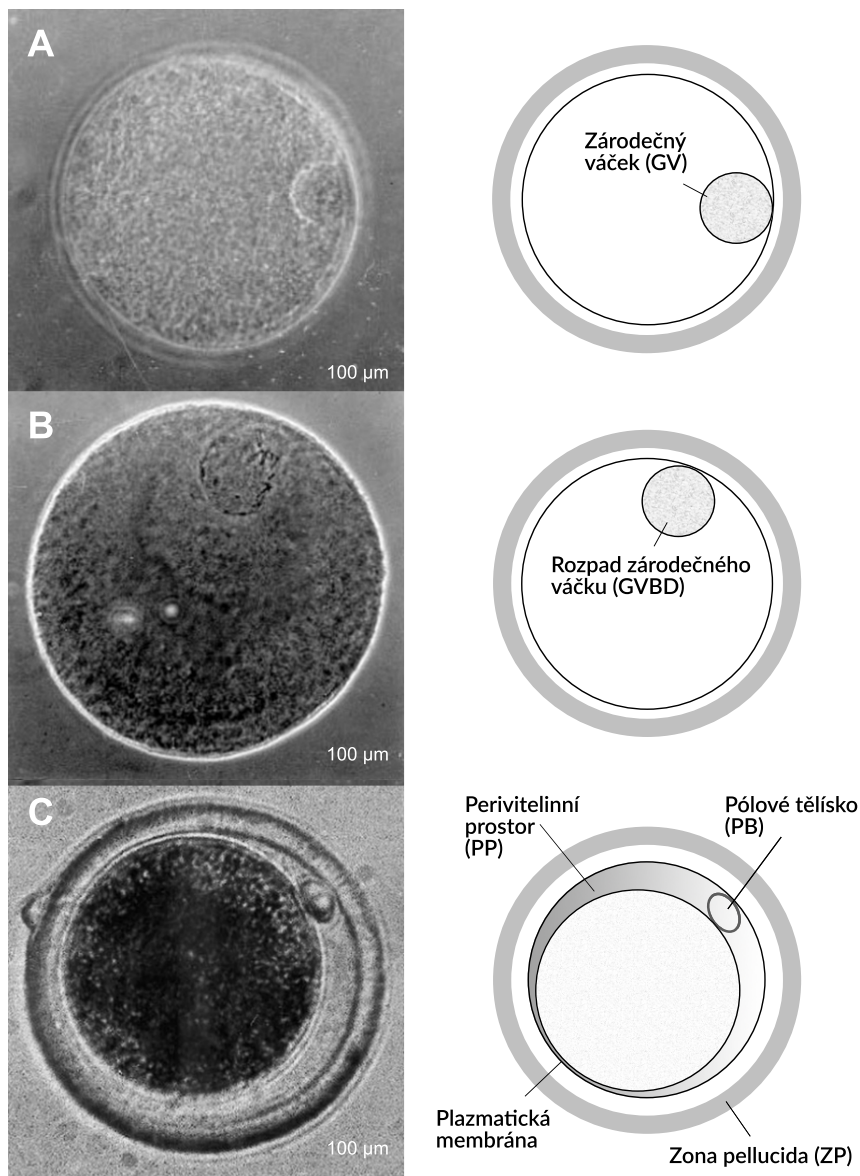
4.2 Odběr a příprava oocytů pro *in vitro* oplození

Hormonální stimulace vyvolává tvorbu folikulů různé velikosti, které nejsou zcela synchronní ve svém vývoji. Počet a maturační status oocytů determinuje stimulační protokol, časování podání hCG (humánní choriový gonadotropin), interval mezi injekcí hCG a punkcí vaječníků a samozřejmě individuální reakce každé pacientky (Tauwinklová 2000).

Odběr oocytů se obvykle provádí v krátkodobé celkové anestézii. Samotný odběr je prováděn pomocí punkční jehly, která je vedena pomocí transvaginální sondy ultrazvuku. Vpich je situován do klenby poševní. Postupně lékař vpichuje jehlu do jednotlivých folikulů a odsává jejich obsah s oocyty. Počet a kvalita odebraných oocytů se bezprostředně po výkonu hodnotí v embryologické laboratoři. V době odběru se nachází oocyty ve třech maturačních stadiích (SOP 003)(obr. 4.1).

- **GV (Germinal Vesicle)** – plně nezralý oocyt (se zárodečným váčkem). Zárodečný váček je meioticky nezralý, uprostřed nebo na okraji ooplazmy je sférický, obsahuje velké refraktilní jádro (nucleolus).

- **M1 oocyt (metafáze I)** - oocyt po rozpadu jádra (GVBD = germinal vesicle breakdown). Záradečný váček již není patrný, došlo k jeho rozpadu. Pólové tělísko (PB) ještě není extrudované.
- **M2 oocyt (metafáze II)** - zralý, ovulační oocyt. Má vřeténko s chromozomy, vydělené 1. PB v periviteliním prostoru. Zona pellucida (ZP) má dvě jasné vrstvy – vnější porózní a vnitřní kompaktní. V tomto stadiu oocyt setrvává do doby oplození.



Obrázek 4.1: Stádia zrání: A - GV; B - M1 oocyt (metafáze I); C - M2 oocyt (metafáze II)

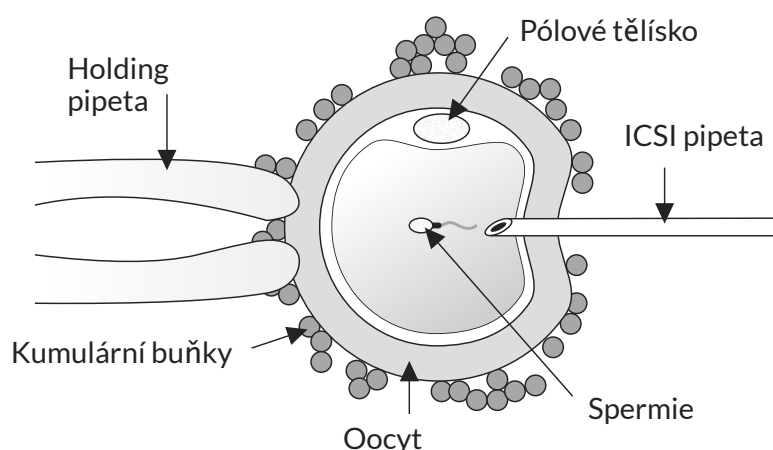
Autor obrázku: Miščíková 2016, Petr Tarant

Během dozrávání probíhá v oocytu řada morfologických změn. Pod jeho povrchem vzrůstá počet kortikálních granul bránících polyspermii, corona radiata nasedající v GV-stadiu těsně na oolemu se postupně stahuje nad ZP, vazebná kapacita ZP pro spermie se zvyšuje a vrcholí v M2-stadiu, kdy je oocyt připraven k fertilizaci (Sathananthan et al. 1993).

Příprava oocytů spočívá v odstranění kumulárních buněk tvořící coronu radiatu, aby se zpřístupnil oocyt pro potřeby mikromanipulace. Odebrané oocyty se přenesou do připravené kapky zahřátého denudačního média. Opakovaným nasáváním a vypuzováním se oocyty zbaví části kumulárních buněk. Nakonec se oocyty přenesou do jamek a pomocí denudační pipety se zbaví zbylých buněk corony radiaty. Po úplné denudaci se stanoví stupeň zralosti a oocyty se umístí do kultivační misky s médiem. Zralé oocyty (M2) se umístí do jamek odděleně od nezralých (GV, M1) a degenerovaných (SOP 003). Odstranění buněk kumulárního komplexu je doporučeno provádět alespoň 2 hodiny po odběru oocytů (Worrilow et al. 2013). Oplození oocytů musí proběhnout do 16 hodin od odběru.

4.3 *In vitro* oplození oocytů

Oplození oocytu se provádí na vyhřívané pracovní ploše inverzního ICSI mikroskopu pomocí mikromanipulátoru s použitím injektorů a mikromanipulačních jehel. Embryolog vybere spermii s nejpřirozenějším tvarem a zachovalým nebo nejlepším pohybem. Oocyty jsou ve stádiu M2 (Stricker 1999) a uvolňují se z tohoto stavu pouze tehdy, když jsou fertilizovány spermii v procesu známém jako „aktivace oocytů“ (Jones 2007; Machaca 2007). Přítomnost spermie v cytoplasmě oocytu vyvolává vzestup intracelulárního vápníku (Ca^{2+}) (Swann 1990), který nastartuje řadu dalších kroků jako exocytóza kortikálních granulí, blokace polyspermie, vyloučení pólového tělíska, obnovení meiózy, tvorba prvojádra, iniciace prvního mitotického rozdělení v nové zygotě a regulace genové exprese (Abassi & Foltz 1994; Swann et al. 2004). Faktory spermii, které vyvolávají vzestup intracelulárního vápníku, nejsou stále zcela objasněny (Yeste et al. 2015).



Obrázek 4.2: ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection
Autor obrázku: Petr Tarant

Těsně před oplozením oocyty proto musí dojít k narušení buněčné membrány vybrané spermie, aby se po vpravení do oocyty začaly ze spermie uvolňovat faktory aktivující oocyt. Vybraná a znehybněná spermie se nasaje do ICSI pipety od konce bičíku. K imobilizaci spermie a jejímu narušení lze také využít laser (Ebner 2001). Oocyt se nastaví do zorného pole a jemným tlakem se zafixuje do Holding pipety. Jemným tlakem se zavede ICSI pipeta pod ZP i oolemu. Kontrolovaně se aspiruje cytoplasma, dokud nedojde k viditelnému prasknutí oolemy. Cytoplasma spolu se spermií je injikována do oocyty (SOP 003) (obr. 4.2).

4.4 Kultivace embryí

Oplozené oocyty jsou kultivovány v médiu v miskách uložených v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ (Trávník 1990). Délka kultivace je 2-6 dní. V případě kultivace do pátého nebo šestého dne, kdy embrya dosahují stádia blastocysty, se jedná o tzv. prodlouženou kultivaci. Prodloužení kultivace může pomoci k výběru vhodných embryí, protože abnormální a ne-životaschopná embrya v průběhu *in vitro* kultivace svůj vývoj ukončí. V průběhu kultivace jsou embrya pravidelně kontrolována a je hodnocen jejich vývoj (obr. 4.4). Pro kontrolu vývoje lze použít tzv. Time-laps systém. Při běžném morfologickém hodnocení se embrya vyjímají z inkubátoru a poté se zhodnotí pod mikroskopem. Výhodou systému Time-laps je kontrola vývoje embryí ve standardním prostředí inkubátoru, tudíž za dodržení konstantních podmínek (Kirkegaard et al. 2012). Nejčastěji používaným systémem je EmbryoScope. Systémy umí posoudit po dvou dnech monitoringu, zda vývoj embrya do stádia blastocysty probíhá řádně či nikoliv. K tomuto zhodnocení používá tři časové parametry – délku první cytokineze, dobu mezi první cytokinezí a začátkem první mitózy a dobu mezi druhou a třetí mitózou (Wong et al. 2010). Díky kontinuálnímu monitoringu se můžou u embryí odhalit poruchy dělení a tato embrya se vyřazují. Kvalitní embrya jsou použita pro oplození ženy (embryotransfer) nebo mohou být zamrazena (kryokonzervace).

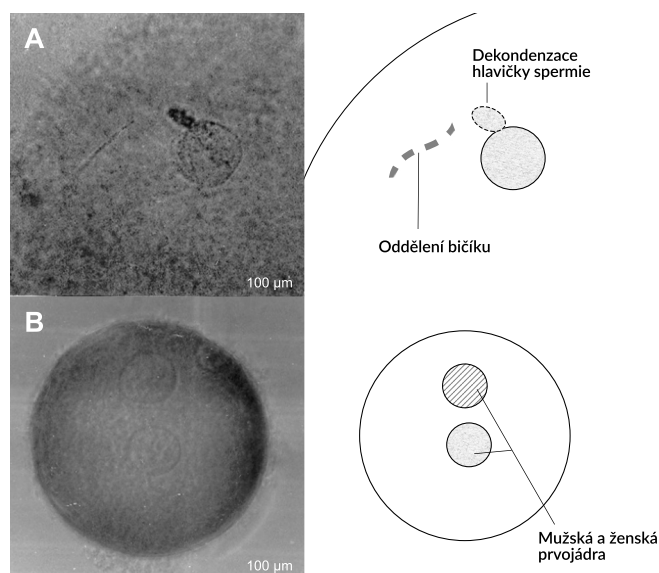
V následujících podkapitolách týkajících se hodnocení embryí je uvedeno interní nastavení IVF GENNET, které je popsáno v SOP 003. Existuje i další systém hodnocení embryí podle postupu zavedeném v Saiz et al. (2017).

4.4.1 Kultivace embryí - Den 1

Hodnocení oplozených oocytů se provádí 16-22 hodin po ICSI. Hodnotí se, zda byly oocyty úspěšně oplozené, a to na základě přítomnosti dvou prvojader (2PN) a dvou PB v perivitellinním prostoru (PP) (tab. 4.1 a obr. 4.3). Zároveň se zjišťuje počet neoplozených, degenerovaných a špatně oplozených oocytů (0PN, 1PN, 3PN-nPN, DEG) a ty se odstraní (SOP 003).

Tabulka 4.1: Vyhodnocení oplozených oocytů v den 1

Stádium	Název	Hodnocení
0PN	Neoplozený oocyt	V cytoplasmě oocytu není vidět žádný PN a v PP je 1 PB (známky zralého oocytu před oplozením).
1PN	Aktivovaný (partenogenetický) oocyt	Oocyt je abnormálně oplozený. V cytoplasmě je přítomno pouze jedno PN a v PP je pouze jedno PB.
2PN	Normálně oplozený oocyt	V cytoplasmě jsou přítomna 2 PN a v PP jsou vydělena 2 PB.
3PN/4PN - nPN	Triploidně/tetraploidně, polyploidně oplozený oocyt.	Přítomnost 3/4PN – nPN v cytoplasmě. Jestliže se v PP vyskytnou 2 PB, pak se jedná o diandry.
DEG	Zdegenerovaný oocyt	Nehomogenní tmavá cytoplazma se známkami nebo bez známek oplození.



Obrázek 4.3: Dekondenzace hlavičky spermie a tvorba prvojader
 Autor obrázku: Miščíková 2016, Petr Tarant

4.4.2 Kultivace embryí - Den 2 a Den 3

Vyhodnocení kvality embryí se provádí pod stereolupou nebo se rychlost dělení embryí sleduje pomocí permanentního monitoringu v EmbryoScopu. Hodnotí se rychlost dělení embrya a jeho kvalita. Po dvou dnech vývoje by mělo embryo ideálně obsahovat 4 blastomery a po třech dnech 8 blastomer. V tabulce 4.2 je uveden kódový systém hodnocení, kdy se kombinují číslce a písmena. Při hodnocení kvality embryí se vychází z počtu buněk v závislosti na dni kultivace, pravidelnosti ve velikosti buněk embrya a ze stupně fragmentace embrya (SOP 003).

Nejkvalitnější jsou embrya označená jako Grade 1 (G1) a Grade 2 (G2), která se mohou

transferovat již 3. den po oplození. Pokud se provádí prodloužená kultivace, přemístí se embrya do média určeného pro kultivaci embryí do 120, eventuálně 144 hodin po oplození. Další možností je kvalitní embrya zamrazit.

Embrya ohodnocená jako Grade 3 (G3) se kultivují do dalšího dne. Embrya Grade 4 (G4), která se zastaví ve vývoji, nebo degenerovaná embrya jsou odstraněna.

Tabulka 4.2: Hodnocení kvality embryí

Kód	Počet blastomer	Velikost buněk	Stupeň fragmentace embrya
G1	2-4/ 6-8	Všechny stejně velké	< 10 %
G2	2-4/ 6-8	Všechny stejně velké	< 30 %
G3+	2-4/ 5-8	Nestejně velikosti	< 10 %
G3	2-4/ 5-8	Nestejně velikosti	< 50 %
G4	2-4/ 5-8	Nestejně velikosti	> 50 %

4.4.3 Kultivace embryí - Den 4

Čtvrtý den po oplození se hodnotí stupeň kompaktace moruly (tab. 4.3). U počáteční moruly jsou ještě viditelné blastomery, které se postupně začínají formovat do souvislé buněčné hmoty. Plně kompaktní morula je tvořena blastomery, které jsou k sobě těsně přilnuty a jejich membrány nejsou patrné. Vyřazená jsou embrya, která čtvrtý den po oplození nevykazují žádné známky kompaktace. U kompaktních morul se dále sleduje podíl blastomer, morfologie a podíl buněčných fragmentů (Veeck et al. 2003).

Tabulka 4.3: Hodnocení moruly

Kód	Název	Hodnocení
M1	Morula	Morula má od 14-16 buněk bez známek kompaktace (splynutí buněk).
M2	Kompaktující morula	Morula vykazuje různé stupně kompaktace, současně lze rozlišit i jednotlivé buňky.
M3	Zcela kompaktní morula	Morula je bez výskytu samostatných buněk.

4.4.4 Kultivace embryí - Den 5 a Den 6

Blastocysta se vyvíjí pátý a šestý den po oplození (tab. 4.4). Tvoří ji dva typy buněk, tzv. trofektoderm a blastocoel, neboli vnitřní buněčná hmota uložená v dutině embrya. Při hodnocení kvality blastocyst se sledují 4 parametry: stupeň expanze, hatching, vzhled vnitřní buněčné masy a trofektoderm (Veeck et al. 2003).

Tabulka 4.4: Hodnocení blastocysty

Kód	Název	Hodnocení
BL1	Časná blastocysta	Blastocoel vyplňuje méně jak 1/2 embrya.
BL2	Blastocysta	Blastocoel vyplňuje 1/2 embrya.
BL3	Plná blastocysta	Blastocoel vyplňuje více jak 1/2 embrya, podobné BL4, ale ZP je stále silná.
BL4	Expandovaná blastocysta	Blastocoel vyplňuje celé embryo, je zřetelný embryoblast a trofoblast, ZP je značně ztenčena.
BL5	Hatchující blastocysta	Stejně znaky jako BL4 ale část embrya protrhla ZP a vyces-tovala ven.

U blastocysty BL3 až BL6 se hodnotí také kvalita embryoblastu (struktury, ze které vznikne embryo) a trofoblastu (struktury, ze které vzniknou plodové obaly). Hodnocení se kombinují, přičemž za kvalitní se považují embrya s hodnocením AA, AB, BA a BB (tab. 4.5).

Tabulka 4.5: Hodnocení embryoblastu a trofoblastu u blastocysty

Embryoblast		Trofoblast	
A	Buňky těsně semknuté, mnoho buněk	A	Mnoho buněk formujících ucelený epitel
B	Buňky volně seskupené, několik buněk	B	Několik buněk formujících volně seskupený epitel
C	Velmi málo buněk	C	Velmi málo buněk

4.5 Transfer embryí (ET)

Embryotransferem (ET) se rozumí ambulantní výkon, kdy lékař s embryologem šetrně zavádí embryo v katetru přes děložní hrdlo do sliznice dutiny děložní. Před zavedením embrya je možné využít speciální kultivační médium EmbryoGlue[®] (Vitrolife, Švédsko). Médium zvyšuje přilnavosti embrya k endometriu, jelikož obsahuje vyšší koncentraci hyaluronanu (HA). HA je glykosaminoglykan, který se vyskytuje v tělních tekutinách (v sekretu dutiny děložní a vejcovodů) a v extracelulárním matrixu (Salustri et al. 1999). Vlivem HA se významně podporuje proces apozice a adheze blastocysty (Turley a Moore 1984; Yanagishita 1994). K embryotransferu se vybírají embrya v nejvyšším stádiu embryonálního vývoje odpovídající danému dni kultivace, v kategorii G1-G3+, u embryí do stádia BL2 a u vyšších

stádií v kvalitě A až B. Zbylá kvalitní embrya jsou zpravidla zamrzena a mohou být použita při případném dalším cyklu. Kryoembryotransfer (KET) je cyklus, při kterém je použito rozmrazené embryo.

4.6 Darování oocytů

Darovací program je zvažován zejména u žen s rizikem přenosu závažné geneticky podmíněné choroby, u žen s ovariálním selháním (např. stav po odstranění ovarií, u starších žen), u žen s agenezí či dysgenezí ovarií a u žen, které měly nekvalitní oocyty nebo nekvalitní embrya v několika předchozích cyklech IVF. Ženy (příjemkyně) musí být mladší 39 let, musejí být zdravé, aby zvládly zátěž gravidity a musejí mít kvalitní endometrium (Mardešić et al. 2013).

Dárkyněmi se mohou stát zdravé ženy ve věku od 18 do 35 let, které úspěšně absolvovaly potřebná vyšetření a jsou registrované v evidenci dárců center asistované reprodukce. U dárkyň se zjišťuje, zda nemají pohlavně přenosné choroby (syphilis, HIV, CMV – cytomegalovirus, HCV – Hepatitis C Virus, HBsAg – Hepatitis B surface Antigen, chlamydie). Provádějí se genetická vyšetření a ověřuje se karyotyp. V rámci rodinné anamnézy se zjišťuje, jestli se u rodičů, sourozenců a potomků dárkyně nevyskytla závažná genetická malformace či onemocnění (např. Huntingtonova nemoc, chromozomální abnormalita) a také závažná psychiatrická onemocnění. Ženám se také zjišťuje krevní skupina a Rh faktor (Rob et al. 2008; Mardešić et al. 2013). Výběr dárkyně je anonymní a zajišťují ho koordinátorky darovacího programu. Pro příjemkyni se vybírá typově vhodná dárkyně (s podobnou barvou očí, vlasů, váhou, výškou).

U vybraného páru dárkyně/příjemkyně je pomocí hormonální léčby nastaven cyklus tak, aby došlo k časové synchronizaci cyklů. Hormonální stimulací dárkyně dojde ke stimulaci ovarií, při které je vyprodukován vysoký počet zralých folikulů. Příjemkyně užívá estrogeny podle protokolu 10–50 dnů před „fresh“ ET, jejichž působením naroste sliznice endometria. Poté, co se dárkyni odeberou oocyty a oplodní se spermii partnera, začne příjemkyně užívat progesteron. K transferu embrya dochází v tzv. implantačním okénku, což je časový interval od 2. do 6. dne podávání progesteronu. V tomto období je sliznice nejlépe připravena k přijetí embrya.

4.7 Monitoring těhotenství

První těhotenský test se provádí z moči přibližně 14. den po embryotransferu. V případě pozitivního výsledku se 15.–17. den provádí vyšetření hladiny hCG, estradiolu a progesteronu z krve a současně se provádí i ultrazvukové vyšetření (UZ). Za pozitivní výsledek se považuje hCG > 10 IU/l. Koncentrace hCG v dalším období stoupá.

Za klinickou graviditu se označuje stav, kdy je UZ prokázán gestační váček a přítomnost srdeční akce v 6.–7. týdnu těhotenství. Biochemická gravidita je stav, kdy na počátku stoupla hladina hCG, ale poté se zastavil vývoj embrya a nedošlo k UZ prokázání srdeční akce. Biochemická gravidita končí menstruací. Pokud v průběhu těhotenství dojde k zastavení vývoje plodu, pak dochází k abortu (potratu). Potraty se rozdělují na tři typy – samovolný potrat, umělé přerušení těhotenství a ostatní potraty. Samovolný či přirozený potrat je spontánní

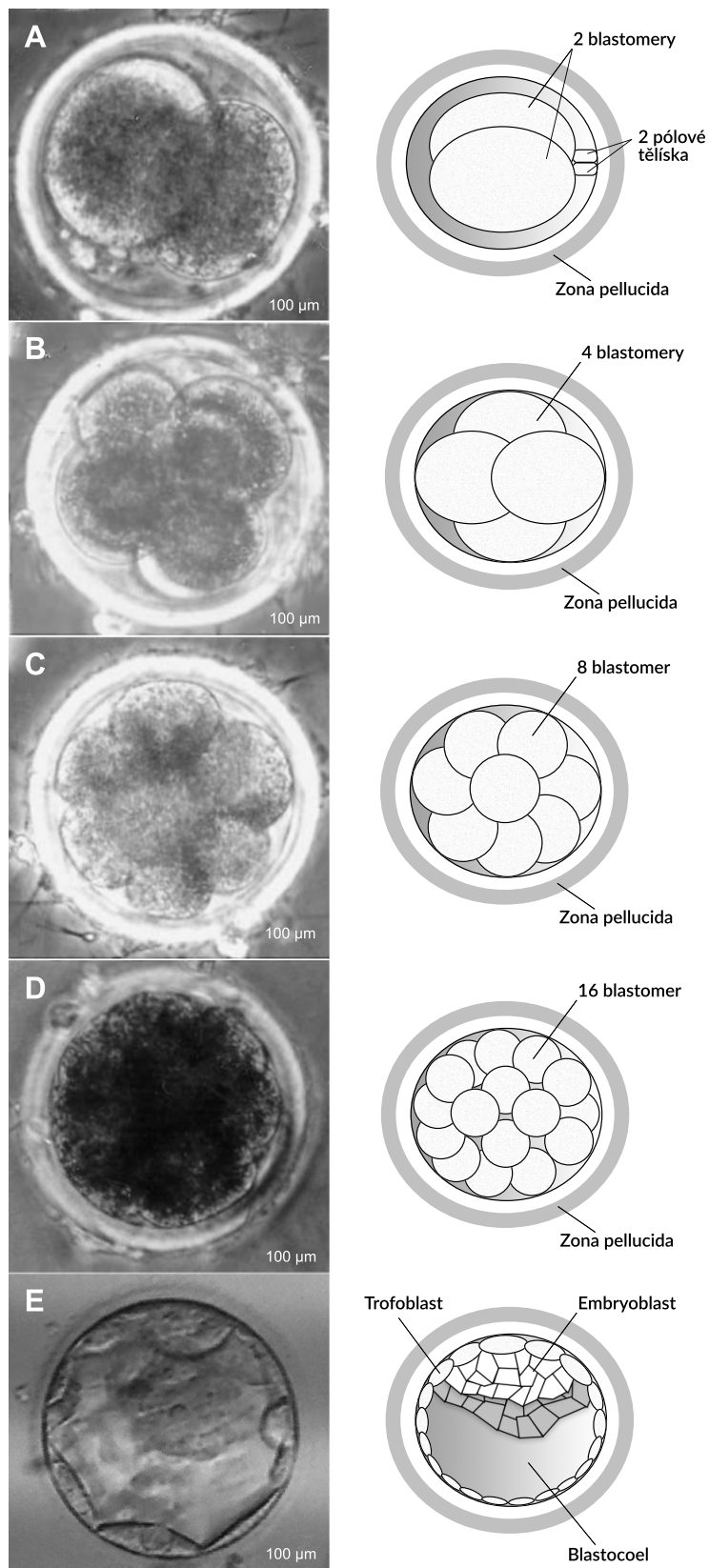
vypuzení plodu z dělohy. Za umělé přerušování těhotenství (interrupci) se považují indukované potraty. Do kategorie ostatní potraty spadá např. zamlklý potrat (missed abort), což je situace, kdy plod odumře v děloze a není samovolně vyloučen (Koschin 2000).

Ukazatelé efektivity léčby metodami asistované reprodukce jsou především Pregnancy rate (PR), Implantation rate (IR) a Take-home baby rate (THBR).

PR je podíl žen, které otěhotněly, ze všech žen, u nichž byl proveden embryotransfer. Vždy platí, že po vnesení 2 a více embryí do dělohy bude pravděpodobnost otěhotnění ženy vyšší než při vnesení pouze jednoho. Proto nelze porovnávat PR bez znalosti toho, kolik embryí bylo v dané skupině sledovaných cyklů transferováno (Řežábek 2014).

IR je podíl počtu gestačních váček viditelných UZ v děloze a počtu transferovaných embryí. Je tedy parametrem automaticky zohledňujícím transfer vícero embryí. THBR je nejkomplexnější ukazatel výsledku léčby neplodnosti, který zohledňuje i všechny těhotenské ztráty až do porodu. Je to poměr narozených dětí ku celkovému počtu transferovaných embryí. Stejně jako PR je THBR srovnatelný jen při stejném počtu transferovaných embryí. Tento parametr významně závisí zejména na věku ženy. U darovacích cyklů bývá vyšší než v případě cyklu s vlastními oocyty u stejně staré věkové skupiny žen (Řežábek 2014).

Metody asistované reprodukce umožňují získat kvalitní embryo v *in vitro* podmínkách. Kvalita embryí je ovlivněna mnoha faktory a jedním z nich může být i kvalita spermií použitých na oplození oocytů. Oocyty mladých žen jsou kvalitnější než oocyty starších pacientek a vzniklé embryo by mělo mít vysokou šanci se ujmout. Nicméně to, zda dojde či nedojde k těhotenství, ovlivňuje mnoho faktorů, mj. stav endometria či reakce imunitního systému ženy.



Obrázek 4.4: Vývoj embrya: A - 2-bun.; B - 4-bun.; C - 8-bun.; D - morula; E - blastocysta
 Autor obrázku: Miščíková 2016, Petr Tarant

Kapitola 5

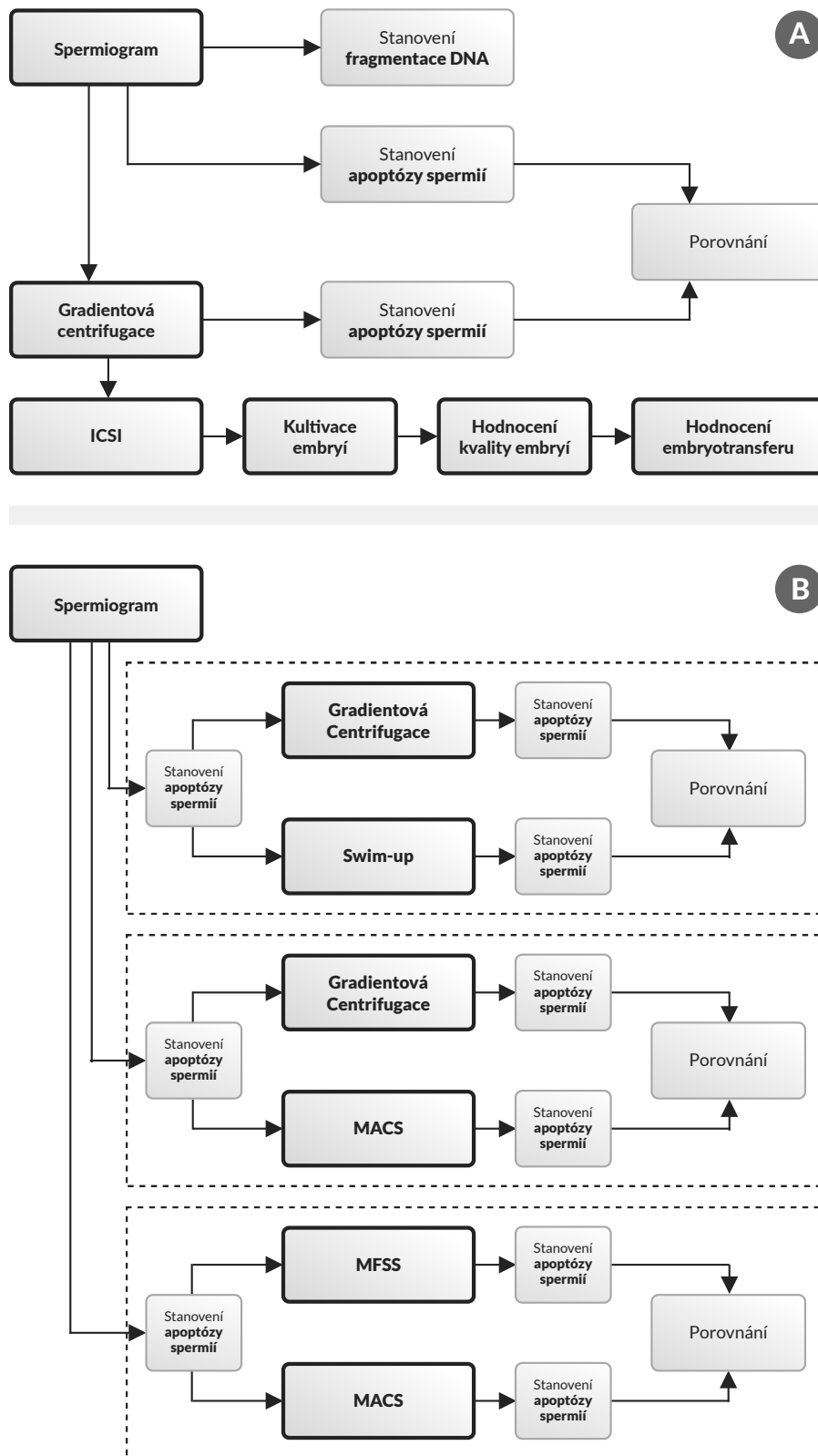
Metodika a materiál

5.1 Design experimentu

Experiment se skládal ze dvou částí. V první části (obr. 5.1 část A) byl ejakulát odebrán masturbací do označené sterilní nádoby v odběrových místnostech. V andrologické laboratoři GENNET byl andrologem nejprve proveden spermioqram podle WHO 2010. Poté byl ejakulát separován metodou gradientové centrifugace a následně byl použit na fertilizaci oocytů získaných od dárekyně metodou ICSI. Po ukončení všech standardních procedur byl předán nepotřebný zbytek ejakulátu a vzorek izolovaných spermií do imunologické laboratoře GENNET, kde byly použity jako materiály k experimentální části této práce.

V imunologické laboratoři bylo provedeno cytometrické stanovení apoptózy obou vzorků. Zároveň byl zamrazen vzorek ejakulátu na cytometrické stanovení fragmentace DNA, které bylo provedeno později. Výsledky vývoje, kvality embryí a informace o proběhlém embryotransferu byly získány 3.–5. den po oplození v závislosti na použitém protokolu. Dále se monitoroval průběh těhotenství prostřednictvím interního informačního systému. Vliv apoptózy a fragmentace DNA spermií na kvalitu embryí a graviditu není na klinice GENNET sledován, jelikož se tyto údaje nachází v několika oddělených informačních systémech. Jednou z unikátností této práce je souhrnná analýza těchto dat.

V druhé části experimentu (obr. 5.1 část B) se v andrologické laboratoři GENNET stanovil spermioqram a ejakulát byl předán do imunologické laboratoře GENNET, kde byl použit jako materiál k této části experimentu. Cytometricky byla stanovena apoptóza spermií a provedena separace spermií. Separovalo se metodami gradientové centrifugace (GC), swim-up (SU), magnetické separace spermií (MACS) a mikrofluidní separace spermií (MFSS). Po provedení jednotlivých separací se ve vzorku stanovila apoptóza spermií. V závěru se porovnála účinnost separace.



Obrázek 5.1: Design experimentu

5.2 Statistické vyhodnocení výsledků

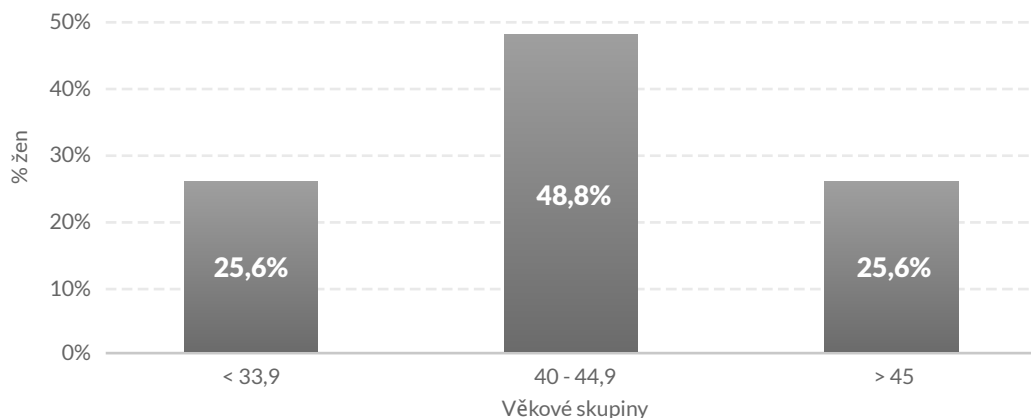
Získaná data byla převedena do MS Excel verze 16.22. Pro stanovení základních parametrů souborů byla využita procedura UNIVARIATE. Frekvence byly vypočteny za pomoci procedury FREQ. Při výběru vhodného modelu hodnocení daných ukazatelů byla využita procedura REG, metoda STEPWISE. Pro vlastní vyhodnocení významnosti efektů byla použita procedura GLM, s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu s použitím metody nulové hypotézy (tj. se soubory významně neliší). K rozhodnutí platnosti nulové hypotézy byl použit 95% interval spolehlivosti ($p < 0,05$). Rozdíly byly považovány za signifikantní, pokud dosáhly $p \leq 0,05$.

5.3 Charakteristika souboru

Soubor tvořilo 43 párů s diagnózou primární či sekundární neplodnosti, které podstupovaly léčbu s darovanými oocyty. Všechny sledované cykly proběhly v IVF GENNET Archa v období od června do listopadu 2018. Od všech párů byl získán informovaný souhlas s provedením cytometrického vyšetření spermií v den oplození oocytů a s možností využití klinických dat. Hodnocená data zahrnovala např. informace o počtu a kvalitě darovaných oocytů, o kvalitě spermií i embryí, o průběhu a výsledku embryotransferu (potvrzení gravidity, abort apod.).

5.3.1 Ženy

Soubor zahrnoval 43 žen. Průměrný věk patientek byl 41,4 let (31–46 let). Věkové složení souboru je uvedeno v grafu 2. Nejvíce žen bylo ve věkové skupině 40–44,9 let (48,8 %).



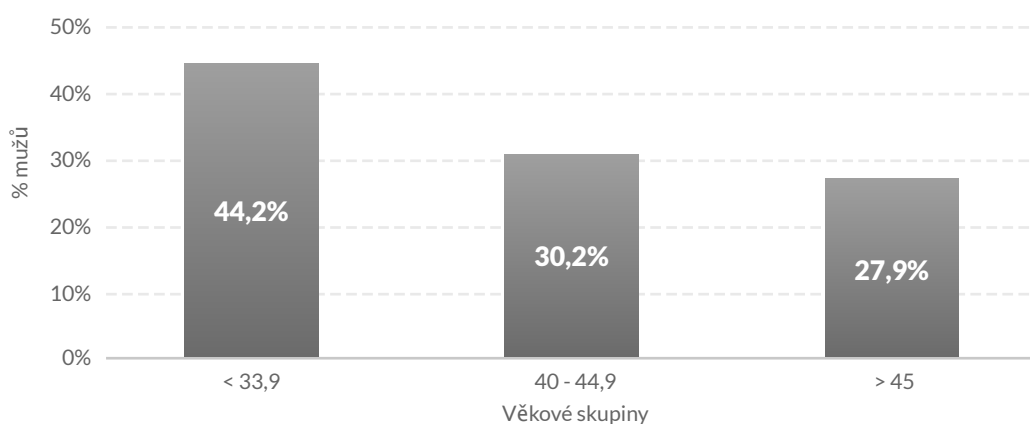
Graf 2: Věkové zastoupení žen

V souboru bylo 53,5 % žen s primární neplodností a 46,6 % žen se sekundární neplodností. Ženy se léčily s neplodností od 1 roku do 7 let, průměrná doba léčby neplodnosti byla 2,6 let. Během této doby podstoupily ženy 1 až 12 cyklů. V průměru bylo zjištěno 2,6 cyklů

asistované reprodukce na pár. Pouze dvě ženy měly za sebou úspěšný porod. Soubor byl velmi heterogenní z hlediska různých zdravotních komplikací. Nejčastějším zdravotním problémem byla endometrióza, vyskytovala se také myomektomie, ovarektomie, polypektomie a cysty ovarií.

5.3.2 Muži

Soubor zahrnoval 43 mužů. Průměrný věk mužů byl 41,0 let (29–63 let). Věkové složení je uvedeno v grafu 3. Nejvíce mužů bylo ve věkové skupině < 39,9 let. Většina mužů byla bez významných zdravotních komplikací (86 % mužů), ale někteří byli léčeni s varikokélou či hydrokélou.



Graf 3: Věkové zastoupení mužů

5.3.3 Dárkyně oocytů

Všechny oocyty byly darované od mladých zdravých žen ve věku 18-30 let. Odběr oocytů byl proveden v den ICSI v IVF GENNET a na spolupracujících pracovištích. Transport oocytů do IVF GENNET Archa byl zajištěn ve vhodných fyziologických podmínkách. Vzhledem k nutnosti zachovat anonymitu dárkyň není možné zjistit o nich detailnější informace.

5.4 Embryologické metody

5.4.1 Spermogram

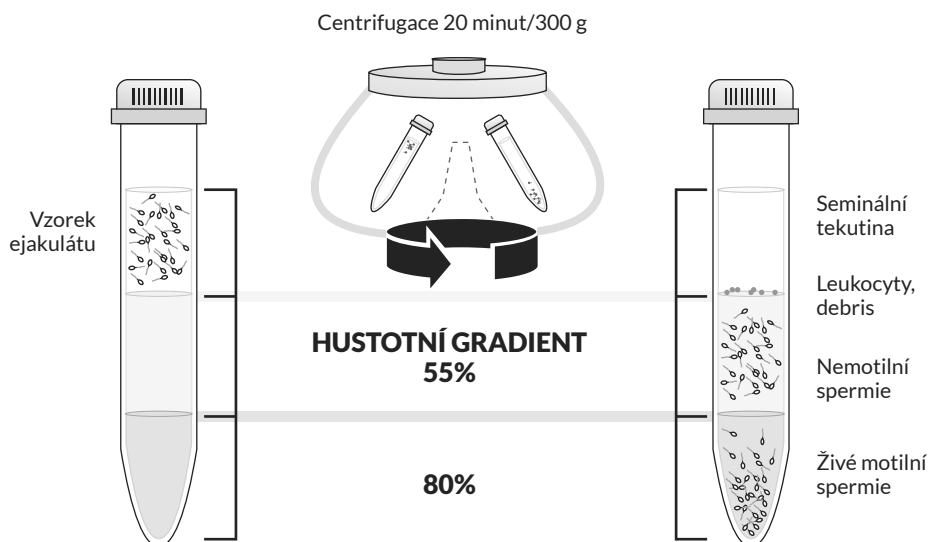
Po obdržení nádoby s ejakulátem byl zkontrolován zrakem vzhled ejakulátu v odběrové nádobce (barva a eventuální příměsi, bílé či žlutavé vločky). Před vlastním zpracováním bylo zkontrolováno ztekucení tak, že se sterilní Pasteurovou pipetou nasálo asi 1 ml ejakulátu a vytlačovalo se ven z pipety. Když ejakulát opouštěl pipetu v samostatných kapičkách, byl vzorek ztekucený. Pokud ejakulát tvořil provazec delší než cca 2 cm, byl neztekucený.

Nedošlo-li ke ztekucení, byl ejakulát naředěn médiem - Sperm Medium (Origio) (1:1) a celý objem byl opakovaně nasáván a vytlačován z Pasteurovy pipety až do úplného ztekucení. Po ztekucení ejakulátu (při pokojové teplotě) byl stanoven jeho objem pomocí Pasteurovy pipety. Ejakulát byl promíchán a pak bylo odebráno 10 μl ejakulátu a naneseno na spodní sklo Maklerovy komůrky. Komůrka se po naplnění kapkou ejakulátu nechala chvíli stát, aby buněčné elementy sedimentovaly. Odečet koncentrace spermií byl prováděn pod 200násobným zvětšením. V deseti čtverečcích buď v řadě nebo jen ve sloupci byl spočítán počet spermií a vynásobil se 10^6 , čímž se získal počet spermií v miliónu na jeden mililitr ejakulátu. Byly počítány jen spolehlivě rozpoznatelné spermie.

Nejdříve byla hodnocena celková pohyblivost, tzn. že byly spočítány všechny spermie, které se jakýmkoli způsobem pohybovaly v těch samých deseti čtverečcích, ve kterých byla hodnocena koncentrace. Po vyhodnocení celkové motility v procentech z celkového počtu spermií byla hodnocena progresivní pohyblivost. Počet motilních spermií (v mil/ml), byla uvedena v kategoriích přímočaře motilních (a), progresivně motilních (b), motilních na místě (c) a nemotilních (d). Jednotlivé kategorie motilních spermií byly uvedeny v %. Dále byla stanovena morfologie spermií. Hodnotil se tvar hlavičky, krčku, střední části i bičíku. Počet patologických spermií byl poté uveden v %. V ejakulátu mohou být zjištěny i kulaté buňky, mezi které patří leukocyty a nezralé buňky (spermatocyty, spermatogonie). Počet kulatých buněk byl počítán stejně jako koncentrace spermií a byl uveden v mil/ml.

5.4.2 Gradientová centrifugace (GC)

Ejakulát byl zpracován dle instrukcí v kitu SupraSperm[®] System 55%+80% gradients (Origio), jako kultivační médium byl použito médium Sperm Medium (SM) (Origio). Do sterilní 9 ml kónické zkumavky (Nunc) byl napipetován 1 ml SupraSperm 80% hustotního média a to bylo převrstveno 1 ml SupraSperm o 55% hustotě.

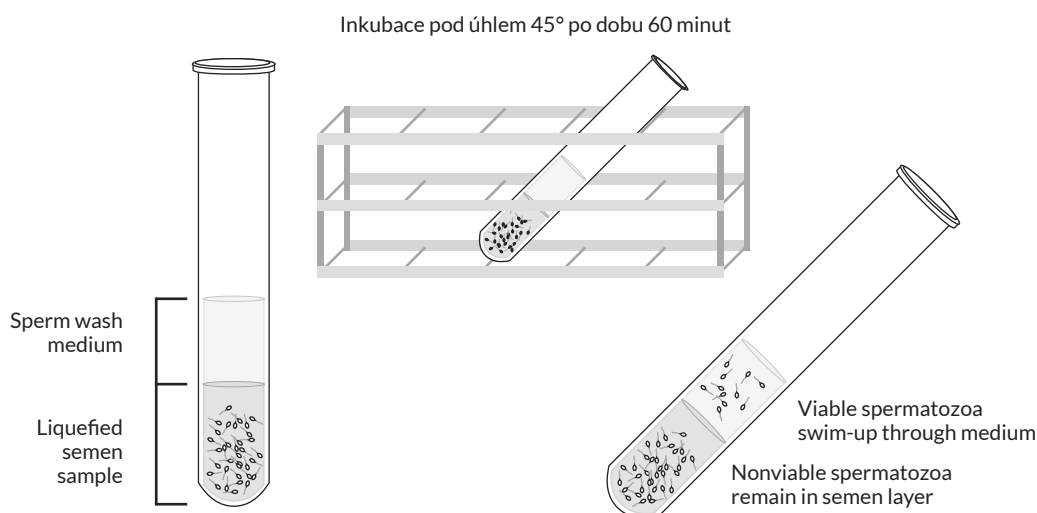


Obrázek 5.2: Metoda gradientové centrifugace
Autor obrázku: Petr Tarant

Na takto připravený gradient byl napipetován 1 ml ztekuceného ejakulátu a centrifugováno se při 300 x g po dobu 20 min. Po centrifugaci byla odstraněna pomocí skleněné sterilní Pasteurovy pipety ze dna zkumavky peleta a přenesena do sterilní 5ml zkumavky. K peletě bylo přidáno 0,5 ml SM a centrifugováno se 250-350 x g/10 min. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, přidalo se 0,5 ml SM a vzorek byl promíchán (obr. 5.2).

5.4.3 Swim-up (SU)

Při metodě swim-up bylo jako kultivační médium použito médium Sperm Medium (Origio). Do 10ml plastové zkumavky s kulatým dnem bylo napipetováno 2 ml SM, pod nějž byl opatrně pipetou navrstven 1 ml zkapalněného ejakulátu tak, aby se jednotlivé fáze nepromísily. Zkumavka byla vložena do stojanu pod úhlem 45° a na 60 minut se umístila do inkubátoru (při 37 °C). Úhel sklonu zkumavky sloužil ke zvětšení styčné plochy ejakulátu s kultivačním médiem (obr. 5.3). Poté byla vrchní zkalená vrstva (0,5 ml) s vycestovanými spermii odpipetována do nové zkumavky.

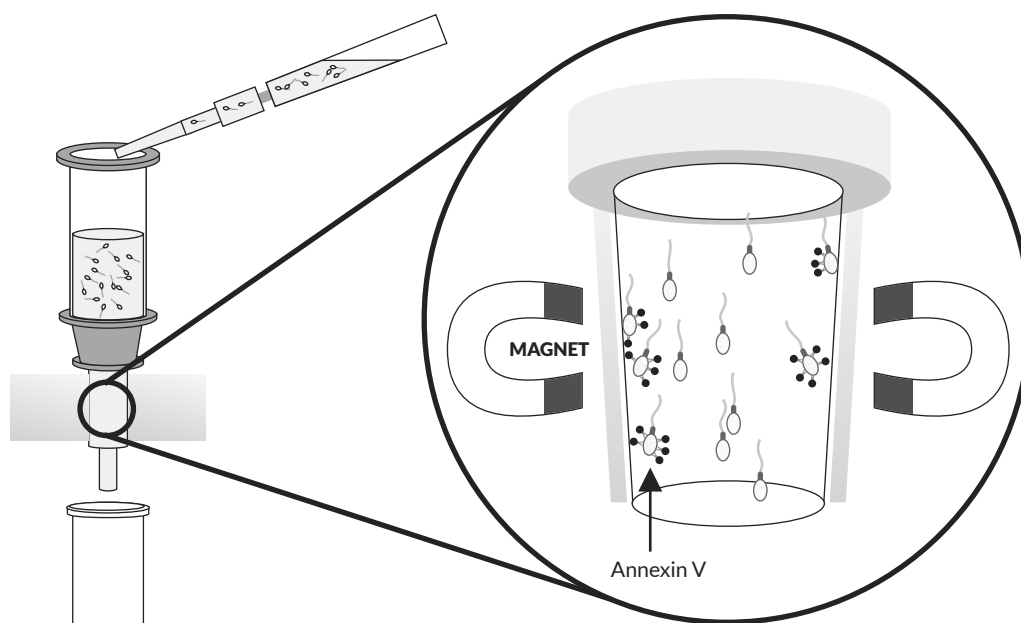


Obrázek 5.3: Swim-up metoda separace spermií

Autor obrázku: Petr Tarant

5.4.4 Magnetická separace apoptotických spermií (MACS)

Pro separaci MACS byl použit kit MACS ART Annexin V Reagent (Miltenyi Biotec), MACS Art Binding Buffer (Miltenyi Biotec), MACS ART MS Column (Miltenyi Biotec) a MACS MultiStand (Miltenyi Biotec). Separace MACS se skládala ze tří kroků (obr. 5.4).



Obrázek 5.4: Metoda magnetická separace apoptotických spermií (MACS)

Autor obrázku: Petr Tarant

Příprava buněk před magnetickou separací

Nejprve byl napipetován 1 ml vzorku zkapalněného ejakulátu do kónické zkumavky a pomalu byl naředěn 2 ml MACS ART Binding pufru. Suspenze byla centrifugována 4 minuty při 300 x g. Supernatant byl zcela odstaněn a peleta byla resuspendována ve 100 μ l roztoku MACS ART Annexin V Reagent. Suspenze byla doplněna roztokem MACS ART Binding pufru do konečného objemu 500 μ l. Takto připravená suspenze byla jemně a důkladně homogenizována a inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek připraven k magnetické separaci.

Magnetická separace

Na kovový stojan (MACS MultiStand) byla připevněna separační jednotka (MACS ART Separation Unit). Byla připravena magnetická separační kolona (MACS ART MS Column) a vložila se do separační jednotky („křídélky“ na koloně směrem dopředu). Pod separační kolonu byla umístěna zkumavka pro sběr oplachovacího roztoku. Byl proveden proplach separační kolony pomocí 1 000 μ l MACS ART Binding pufru. Po přidání roztoku do sloupce bylo nutné počkat, dokud se nevyprázdní.

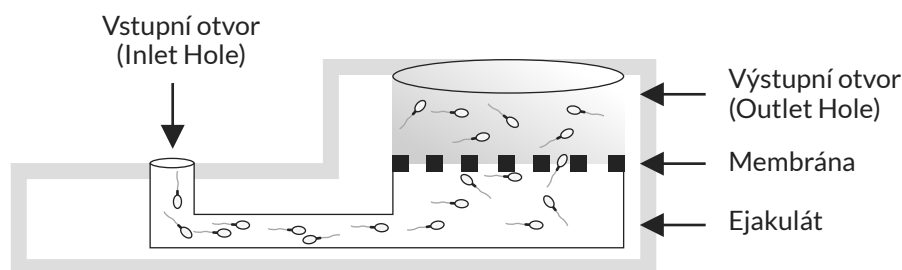
Po odkapání média byla zkumavka pod separační kolonou vyměněna za čistou zkumavku. Do separační kolony bylo napipetováno 500 μ l připraveného vzorku a nechal se protéci kolonou. Tato frakce obsahovala cílové buňky. MACS ART Binding pufr obsahuje vápenaté ionty, které mohou aktivovat oocyty, proto museli být spermie od tohoto média odděleny.

Promytí vzorku

Buněčná suspenze byla centrifugována 4 minuty při 300 x g, supernatant byl kompletně odpipetován. Supernatant byl finálně naředěn v 0,5 ml SM.

5.4.5 Mikrofluidní separace spermií (MFSS)

Separace pomocí MFSS byla provedena podle instrukcí uvedených v kitu FERTILE PLUS[®] Microfluidic Sperm Sorting Chip (KOEK Biotechnology) a jako separační médium bylo použito Sperm Medium (Origio). Inzulínovou stříkačkou bylo nasáto 850 μ l zkapalněného ejakulátu. Stříkačka byla ve vertikální poloze opatrně vložena do vstupního otvoru (Inlet Hole) a pod mírným plynulým tlakem byl naplněn čip. Bylo třeba plnit čip opatrně, aby se pod membránou netvořily bubliny. Po naplnění čipu ejakulátem bylo novou inzulínovou stříkačkou nasáto 750 μ l SM a stejným způsobem bylo aplikováno do výstupního otvoru (Outlet Hole). Čip byl na 30 minut vložen do inkubátoru (při 37 °C). Po inkubaci bylo novou stříkačkou odsáto médium s vyizolovanými spermii z výstupního otvoru (obr. 5.5).



Obrázek 5.5: Metoda Microfluidic Sperm Sorting (MFSS)

Autor obrázku: Petr Tarant

5.5 Cytometrické metody

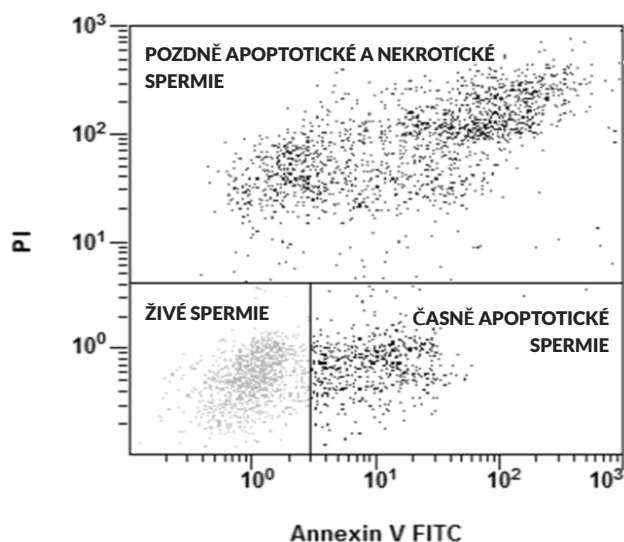
Pro analýzu spermií byl použit průtokový cytometr NAVIOS Beckman Coulter. Přístroj současně měří příčný rozptyl, boční rozptyl a až deset fluorescenčních barviv pomocí tří polovodičových laserů při vlnových délkách 488 nm, 638 nm a 405 nm. Přístroj umožňuje provádět víceparametrovou analýzu jednotlivých buněk. Při použití reagentie obsahující propidium jodid dochází k zachycení signálu o vlnové délce 623 nm, u FITC při vlnové délce 520 nm.

5.5.1 Stanovení apoptózy spermií

Ejakulát byl zpracován podle instrukcí uvedených v kitu ApoFlowEx[®] FITC kit (Exbio Praha). Pro analýzu bylo připraveno 25 μ l promíchaného ejakulátu a 1 ml PBS do cytometrické zkumavky. Zkumavka byla centrifugována 5 minut při 150 x g a pokojové teplotě.

Supernatant byl odstraněn a k sedimentu byl přidán 1 ml PBS. Vzorek byl promíchán špičkou a centrifugován 5 minut při 150 x g. Celé promytí bylo znovu opakováno. Po odstranění supernatantu bylo k sedimentu přidáno 1 ml naředěného Annexin V Binding pufru. Byla označena nová cytometrická zkumavka a napipetovalo se do ní 5 μ l Annexin V–FITC a 5 μ l propidium jodidu. Do nové zkumavky bylo přidáno 100 μ l naředěného vzorku a promíchalo se. Vzorek byl inkubován 15 minut za nepřístupu světla. Poté bylo přidáno 100 μ l Annexin V Binding pufru. Vzorek byl změřen na průtokovém cytometru Navios Beckman Coulter a hodnocení naměřených dat bylo provedeno v softwaru Kaluza, verze 1.5.

Obarvený vzorek spermií byl vložen do přístroje. Po změření 10 000 událostí (events) byly výsledky zobrazeny v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scater (FSC). Dále byly vybrány spermie z ohraničené populace intaktních buněk (bez debris). Tyto vybrané spermie byly zobrazeny v diagramu Annexin V FITC (FL1) vs PI (FL4) a byly rozdělené na tři části (obr. 5.6). Apoptotické spermie vykazovaly intenzivní fluorescenci v kanálu pro FITC. V ApoFlow Ex kitu není k dispozici pozitivní ani negativní kontrola, ale nastavení bylo provedeno pomocí vysoce kvalitních vzorků a vzorků, u nichž byla vyvolaná apoptóza.



Obrázek 5.6: Reprezentativní graf z analýzy stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií pomocí Annexin V/ PI assay

5.5.2 Stanovení fragmentace DNA spermií (TUNEL)

Pro stanovení počtu spermií s fragmentovanou DNA metodou TUNEL byl použit kit Apo DirectTM (Phoenix Flow Systems). Rozmrazený ejakulát byl centrifugován v 1 ml PBS 5 minut při 150 x g a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu byl přidán 1 ml vychlazeného permeabilizačního roztoku Intracellular Staining Perm Wash Buffer (BioLegend). Vzorek byl inkubován 30-45 minut v lednici na ledové podložce. Poté byl centrifugován 5 minut při 150 x g a pokojové teplotě. Byl odstraněn supernatant a k sedimentu byl přidán 1 ml PBS. Vzorek byl promíchán špičkou a znovu centrifugován 5 minut při 150 x

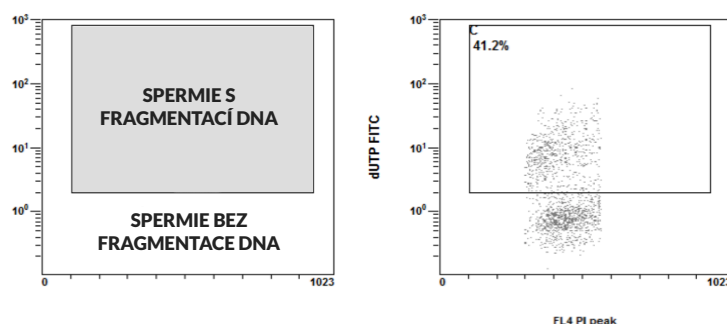
g. Celé promytí bylo ještě jednou opakováno. Následně bylo k sedimentu přidáno 1 ml ledového 70% etanolu a vzorek byl inkubován v lednici na ledové podložce přibližně 30 minut. Po inkubaci byl vzorek centrifugován 10 minut při 3 000 x g a pokojové teplotě. Po odstranění supernatantu byl přidán 1 ml promývacího pufru (Wash Buffer) a vzorek byl promíchán na vortexu. Centrifugovalo se 10 min při 3 000 x g a pokojové teplotě. Ze vzorku byl odstraněn supernatant a přidal se 1 ml promývacího pufru. Vzorek byl promíchán na vortexu a centrifugoval se 5 minut při 300 x g a pokojové teplotě.

Stimulační směs reagensů byla následně připravena podle tabulky:

	Na 1 vzorek
Reaction buffer	10,0 μ l
TdT Enzym	0,8 μ l
FITC dUTP	8,0 μ l
Destilovaná voda	32,3 μ l

Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 50 μ l připravené směsi reagensů. Vzorek byl vložen do vyhřátého bloku o teplotě 37 °C a inkubován 60 minut, přičemž každých 15 minut byla provedena jejich homogenizace. Po inkubaci byl přidán 1 ml proplachovacího pufru (Rinse Buffer) a vzorek byl promíchán na vortexu. Následovala centrifugace 5 minut při 300 x g a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a poté byl přidán 1 ml proplachovacího pufru. Vzorek byl centrifugován 5 minut při 300 x g a pokojové teplotě. Po odstranění supernatantu byl k sedimentu přidán 0,5 ml propidium jodidu a vzorek byl inkubován 5 minut za nepřístupu světla. Vzorek byl změřen na průtokovém cytometru Navios Beckman Coulter a hodnocení naměřených dat bylo provedeno v softwaru Kaluza, verze 1.5.

Obarvený vzorek spermií byl vložen do přístroje. Po změření 10 000 událostí (events) byly výsledky zobrazeny v grafu side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC). Z tohoto zobrazení byly na základě velikosti a granularity vyloučeny rozpadlé buňky, debris a případně shluky buněk. Výsledkem byl histogram (osa x - intenzita fluorescence PI), kde byly ohraničeny haploidní buňky – spermie. V dalším grafu byly zobrazeny pouze haploidní spermie. Na ose x byla vynesena hodnota FL4-PI (peak) a na ose y hodnota dUTP FITC (obr. 5.7). Pomocí negativní kontroly (vzorek bez TdT) a pozitivní kontroly (pacient s vysokou fragmentací DNA zjištěnou metodou Halosperm) bylo nastaveno rozhraní pro pozitivitu.



Obrázek 5.7: Reprezentativní graf z analýzy stanovení fragmentace DNA TUNEL

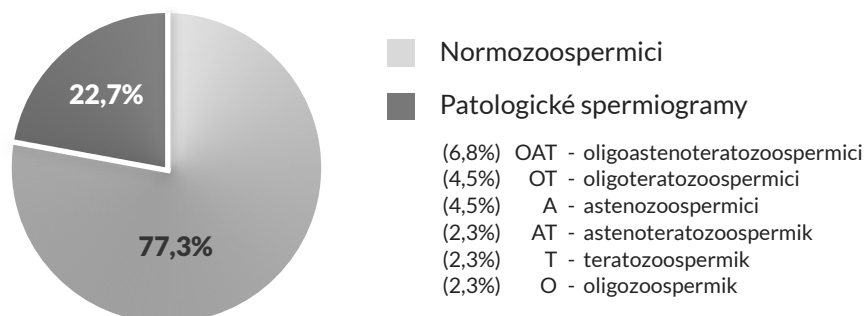
Kapitola 6

Výsledky

6.1 Základní vyšetření ejakulátu

6.1.1 Vyšetření spermiogramu

V IVF laboratoři GENNET Archa bylo provedeno vyšetření spermiogramu podle postupu v SOP 001. V souboru bylo 34 normozoospermiků a 10 mužů s patologickým spermiogramem (graf 4). Mezi muži s patologickým spermiogramem byli 2 astenozoospermici (A), 1 oligozoospermik (O), 1 teratozoospermik (T), 2 oligoteratozoospermici (OT), 1 astenoteratozoospermik (AT) a 3 oligoastenoteratozoospermici (OAT). Výskyt jednotlivých patologií je uveden v grafu 4.



Graf 4: Výsledky spermiogramů

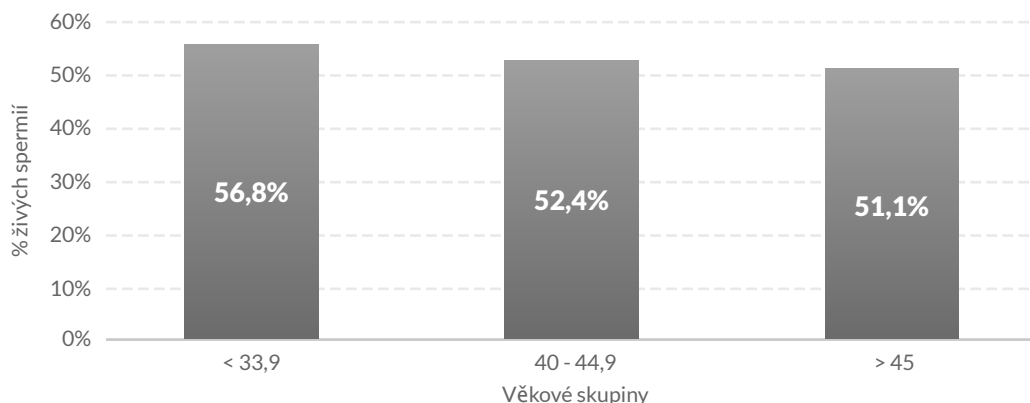
6.1.2 Stanovení apoptózy spermií

V imunologické laboratoři bylo ze stejného vzorku ejakulátu provedeno cytometrické vyšetření procenta živých, časně apoptotických a pozdně apoptotických + mrtvých spermií podle postupu viz kap. 5.5.1.

Průměrný počet živých spermií byl 53,9 % (od 8,7 % do 81 %). Na základě hodnoty % živých spermií byly vzorky rozdělené na skupinu ApoLow s nízkým zastoupením apoptotických spermií (> 50 % živých spermií) a ApoHigh s vysokým zastoupením apoptotických

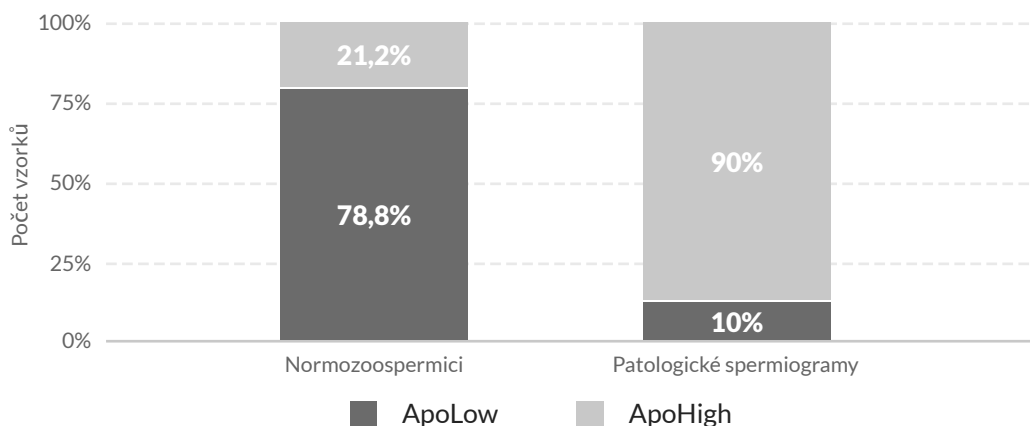
spermií (< 50 % živých spermií). ApoLow tedy reprezentuje skupinu s fyziologickým zastoupením apoptotických spermií a ApoHigh s patologicky zvýšeným zastoupením apoptotických spermií.

V grafu 5 je uvedeno průměrné procento živých spermií ve třech věkových skupinách. Průměrné % živých spermií v ejakulátu klesá s rostoucím věkem mužů a tento pokles je statisticky signifikantní ($r = -0,326$, $p = 0,03$). U mužů starších 45 let je již průměrné % živých spermií na hranici hodnoty pro normu. Zajímavé je, že s věkem nekoreloval žádný z parametrů spermiogramu.



Graf 5: Průměrné procentuální zastoupení živých spermií v různých věkových skupinách

Vyšší zastoupení apoptotických spermií (vzorky ApoHigh) se vyskytovalo nejen u pacientů s patologickým spermiogramem (u 90,0 %), ale i v poměrně vysokém počtu u normozoospermiků (21,2 %), jak vyplývá z grafu 6.



Graf 6: Zastoupení vzorků s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) počtem apoptotických spermií u normozoospermiků a pacientů s patologickým spermiogramem

Procentuální zastoupení živých spermií statisticky významně pozitivně koreluje s koncentrací spermií, celkovým počtem spermií, % pohyblivých spermií a statisticky významně

negativně koreluje s % morfologicky abnormálních spermií (tab. 6.1).

Tabulka 6.1: Korelace % živých spermií v ejakulátu s parametry spermiogramu

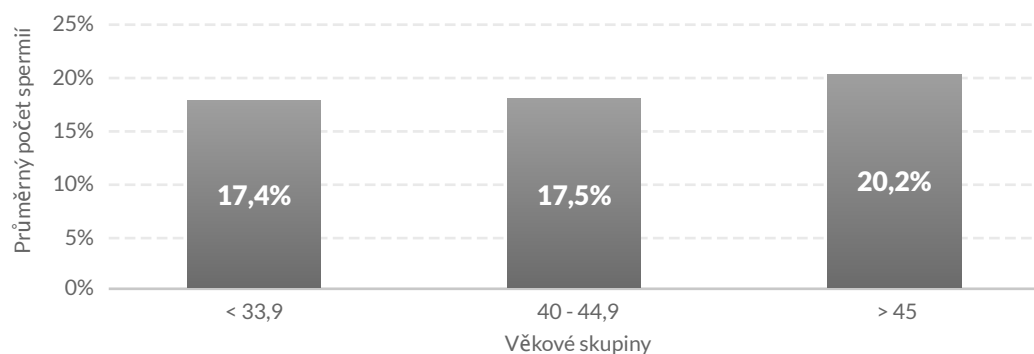
	Počet vzorků	% živých spermií v ejakulátu Hodnota r	Statistická průkaznost Hodnota p
Koncentrace spermií v ejakulátu ($10e^6$ /ml)	43	0,552	< 0,001
Celkový počet spermií v ejakulátu ($10e^6$)	43	0,344	0,023
Koncentrace kulatých buněk ($10e^6$ /ml)	43	-0,185	NS
Objem (ml)	43	-0,154	NS
Počet progres. pohyblivých sp. (%)	43	0,383	0,011
Počet morfolog. abnorm sp. (%)	43	-0,668	< 0,001

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$.

6.1.3 Stanovení fragmentace DNA spermií

Vzorky ejakulátu byly zamrazeny pro pozdější stanovení fragmentace DNA ve spermiích. Stanovení bylo provedeno cytometricky pomocí metody TUNEL podle postupu viz kap. 5.5.2. Průměrný počet spermií s fragmentací DNA v souboru pacientů byl 18,2 % (od 2,5 % do 46,7 %). Fyziologický počet spermií s fragmentací DNA mělo 69,8 % pacientů, vyšší počet spermií s fragmentací DNA mělo 30,2 % pacientů. Vzorky byly rozdělené do dvou skupin na základě hodnoty fragmentace DNA. Skupina FragLow měla fyziologický počet spermií s fragmentovanou DNA (méně než 20 %). Skupina FragHigh měla patologicky zvýšený počet spermií s fragmentací DNA (více než 20 %).

V grafu 7 je uveden průměrný počet spermií s fragmentací DNA ve třech věkových skupinách. Nejvyšší průměrná hodnota počtu spermií s fragmentací DNA byla zjištěna u nejstarších mužů nad 45 let, rozdíly mezi věkovými skupinami nebyly statisticky průkazné. Hodnoty fragmentace DNA nekorelovaly s věkem mužů ($r = 0,143$, $p = 0,359$).



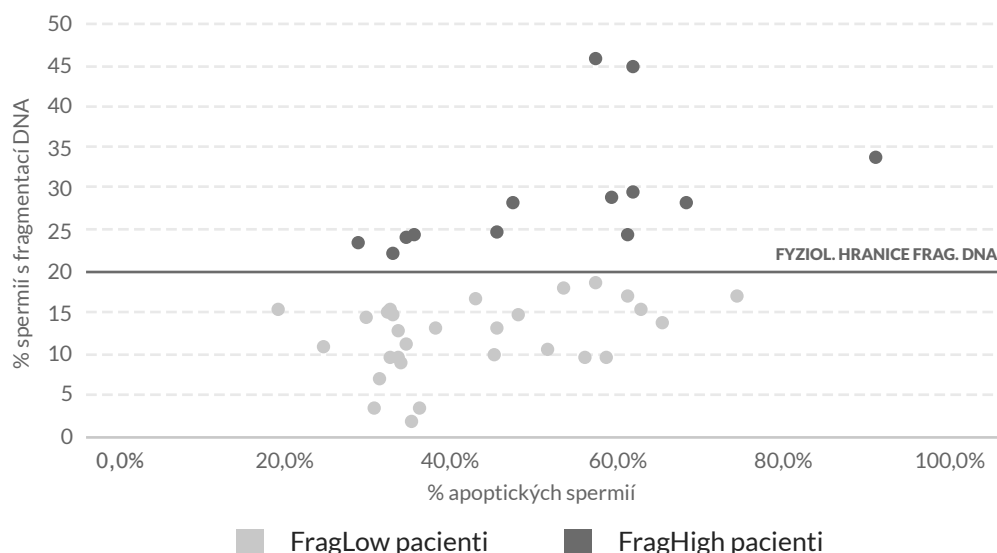
Graf 7: Průměrný počet spermií s fragmentací DNA v různých věkových skupinách

U 3/10 pacientů (30,0 %) s patologickým spermiogramem a u 10/33 (30,3 %) normozoospermiků se vyskytovaly vyšší hodnoty fragmentace DNA. U pacientů s patologickým spermiogramem bylo v průměru 19,3 % spermií s fragmentací DNA, zatímco u normozoospermiků 17,9 % spermií s fragmentací DNA.

6.1.4 Porovnání skupin ApoLow a ApoHigh

Stanovení apoptotických spermií v ejakulátu je méně častou diagnostickou metodou než stanovení fragmentace DNA. Výhodou metody je velmi rychlé provedení, což umožňuje test provádět z čerstvého ejakulátu. Metoda stanovení fragmentace DNA je časově náročná a provádí se proto ze zamrazeného ejakulátu.

Za významný výsledek je považována statisticky průkazná závislost fragmentace DNA na % apoptotických spermií ($r = 0,423$, $p < 0,01$). Čím vyšší je zastoupení apoptotických spermií ve vzorku, tím vyšší je riziko, že pacient bude mít vyšší fragmentaci DNA (graf 8).



Graf 8: Závislost počtu spermií s fragmentací DNA na počtu apoptotických spermií

U skupin ApoHigh a ApoLow byly statisticky porovnány hodnoty spermiogramu a cytometrických vyšetření. V tabulce 6.2 jsou uvedené průměrné hodnoty % živých spermií, % spermií s fragmentací DNA, koncentrace spermií, celkového počtu spermií, % pohyblivých spermií, % morfologicky abnormálních spermií, objemu a počtu kulatých buněk. U ApoLow skupiny byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty koncentrace spermií, celkového počtu spermií, % progresivně pohyblivých spermií a % živých spermií. Statisticky významně nižší hodnoty byly u % morfologicky abnormálních spermií a % spermií s fragmentací DNA.

Tabulka 6.2: Porovnání hodnot spermioqramu a cytometrického vyšetření spermií u skupin s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením spermií v ejakulátu

	ApoLow	ApoHigh	Statistická průkaznost
	<i>N</i> = 27	<i>N</i> = 16	Hodnota <i>p</i>
Koncentrace spermií v ejakulátu ($10e^6/ml$)	72,2	32,8	< 0,001
Celkový počet spermií v ejakulátu ($10e^6$)	214,9	137,7	< 0,001
Koncentrace kulatých buněk ($10e^6/ml$)	0,8	1,3	NS
Objem (ml)	3,2	3,7	NS
Počet progres. pohyblivých sp. (%)	54,5	39,4	< 0,001
Počet morfolog. abnorm sp. (%)	81,5	91,9	< 0,001
Počet živých spermií v ejakulátu (%)	63,7	37,3	< 0,001
Počet spermií s fragmentací DNA (%)	14,3	23,6	< 0,001

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

Závěry základního vyšetření ejakulátu

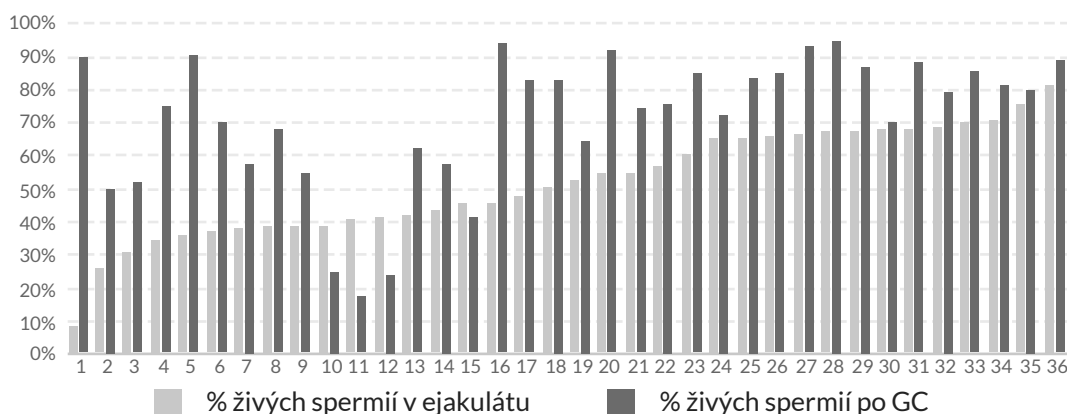
- Průměrné % živých spermií v ejakulátu klesá s rostoucím věkem mužů a pokles je statisticky signifikantní na rozdíl od parametrů spermioqramu nebo fragmentace DNA.
- Procento živých spermií statisticky významně pozitivně koreluje s koncentrací spermií, celkovým počtem spermií, % progresivně pohyblivých spermií a statisticky významně negativně koreluje s % morfologicky abnormálních spermií.
- Vyšší hodnoty fragmentace DNA ve spermiích se vyskytovaly u 30,2 % pacientů.
- Stanovení % apoptotických spermií v ejakulátu statisticky signifikantně koreluje s % spermií s fragmentací DNA.
- U ApoLow skupiny byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty koncentrace spermií, celkového počtu spermií, % progresivně pohyblivých spermií a % živých spermií než u skupiny ApoHigh. Statisticky nižší hodnoty byly zjištěny u % morfologicky abnormálních spermií a % spermií s fragmentací DNA.

6.2 Vliv gradientové centrifugace (GC) na kvalitu spermií

U pacientů bylo cytometricky vyšetřeno % živých spermií také po gradientové centrifugaci (GC) před použitím spermií na ICSI. Cílem této části práce bylo ověřit % živých spermií ve vzorku použitém k oplození oocytů a zjistit, jak účinné je separování živých spermií pomocí GC. Předpokládá se, že při gradientové separaci dochází k odstranění mrtvých spermií a ke zvýšení % živých spermií ve vzorku.

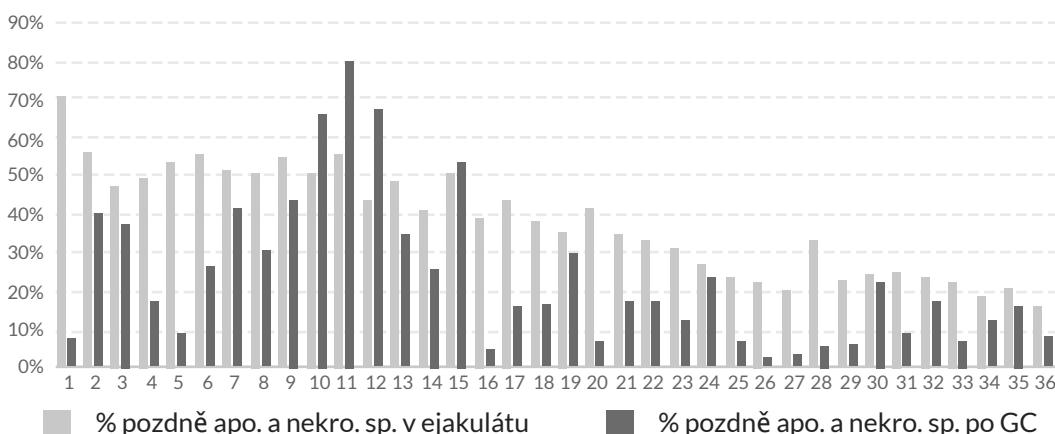
Separace pomocí GC byla provedena v embryologické laboratoři, stanovení % živých spermií bylo provedeno v imunologické laboratoři. Vzorek spermií byl do imunologické laboratoře dodán ihned po oplození oocytů.

Soubor zahrnoval 36 pacientů. V grafu 9 jsou uvedené naměřené hodnoty % živých spermií v ejakulátu před separací a po GC separaci. Za stejné hodnoty byly považovány ty, u kterých se % spermií změnilo maximálně o 5 %. U 31 pacientů (86,1 %) došlo ke zvýšení % živých spermií po separaci, naopak u 4 pacientů (11,1 %) došlo k poklesu a u 1 pacienta (2,8 %) bylo zastoupení živých spermií stejné. Průměrný nárůst % živých spermií po GC separaci byl 19,5 %.



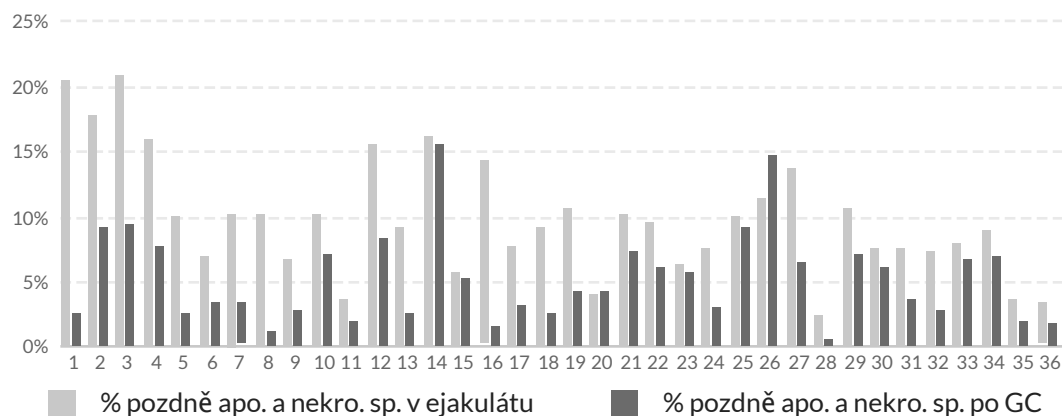
Graf 9: Procento živých spermií před a po separaci gradientovou centrifugací

Po GC separaci výrazně klesá % pozdně apoptotických a nekrotických spermií (graf 10). Jejich zastoupení po GC se snížilo v průměru o 14,7 %. U 29 pacientů (80,5 %) došlo k poklesu % pozdně apoptotických a nekrotických spermií po separaci, naopak u 4 pacientů (11,1 %) došlo ke zvýšení a u 3 pacientů (8,3 %) bylo zastoupení stejné.



Graf 10: Procento pozdně apoptotických spermií před/po separaci gradientovou centrifugací

Po gradientové centrifugaci kleslo procentuální zastoupení časně apoptotických spermií v průměru jen o 4,7 % (graf 11). Za stejnou byla považována změna o méně než 1,0 %. U 31 pacientů (86,1%) došlo k poklesu % časně apoptotických spermií po separaci, naopak u 2 pacientů (5,5 %) došlo ke zvýšení a u 3 pacientů (8,3 %) bylo zastoupení časně apoptotických spermií stejné před a po separaci.



Graf 11: Procento časně apoptotických spermií před a po separaci gradientovou centrifugací

V tabulce 6.3 je zhodnocena korelace mezi % živých spermií po gradientové centrifugaci a parametry spermiogramu nebo cytometrického vyšetření ejakulátu. Procento živých spermií po GC statisticky průkazně pozitivně koreluje s koncentrací spermií v ejakulátu, s % živých spermií v ejakulátu a s % progresivně pohyblivých spermií v ejakulátu. Statisticky průkazná je negativní korelace mezi % živých spermií po GC a % morfologicky abnormálních spermií v ejakulátu. Tedy čím kvalitnější je ejakulát, tím vyšší je koncentrace spermií po gradientové centrifugaci.

Tabulka 6.3: Korelace mezi % živých spermií po GC a parametry spermiogramu a hodnotami cytometrického vyšetření ejakulátu

	Počet vzorků $N = 27$	% živých spermií po GC Hodnota r	Statistická průkaznost Hodnota p
Koncentrace spermií v ejakulátu ($10e^6/ml$)	36	0,445	< 0,001
Celkový počet spermií v ejakulátu ($10e^6$)	36	0,106	NS
Koncentrace kulatých buněk ($10e^6/ml$)	36	-0,099	NS
Objem (ml)	36	-0,101	NS
Počet progres. pohyblivých sp. (%)	36	0,554	< 0,001
Počet morfolog. abnorm sp. (%)	36	-0,617	< 0,001
Počet živých spermií v ejakulátu (%)	36	0,592	< 0,001
Počet spermií s fragmentací DNA (%)	36	-0,312	NS

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

Cílem experimentu bylo zjistit, u kterých skupin pacientů není GC separace dostatečně účinná a snižuje % živých spermií ve vzorku. V tabulce 6.4 jsou porovnány průměrné hodnoty % živých spermií před a po GC separaci u skupin pacientů ApoLow (< 50 % apoptotických spermií v ejakulátu) a Apo High (> 50 % apoptotických spermií v ejakulátu) resp. u skupin pacientů s normálním a patologickým ejakulátem.

Tabulka 6.4: Porovnání průměrného % živých spermií v ejakulátu a vzorku po gradientové separaci u pacientů ze skupin ApoLow, ApoHigh, normozoospermiků a pacientů s patologickým ejakulátem

	Průměrné % živých sp. před GC	Průměrné % živých sp. po GC	Průměrné zvýšení % živých spermií	Počet neúspěšných GC
Všichni pacienti (n = 36)	51,7	71,2	19,5	4
ApoLow (n = 20)	63,7	79,2	15,9	1
ApoHigh (n = 16)	37,3	61,3	24,0	3
Normozoospermici (n = 26)	56,1	78,6	22,5	1
Pacienti s patol. spermiogramem (n = 10)	40,3	52,1	11,8	3

Ve skupině ApoLow byla průměrná hodnota 63,3 % živých spermií v ejakulátu a 79,2 % po separaci. Průměrné zvýšení bylo 15,9 %. K nárůstu % živých spermií po GC došlo u 19/20 pacientů. U ApoHigh skupiny byla průměrná hodnota živých spermií v ejakulátu 37,3 % a po separaci 61,3 %. Průměrné zvýšení bylo 24,0 %. K nárůstu % živých spermií došlo u 13/16 pacientů, u 3 pacientů však došlo k poklesu % živých spermií ve vzorku po GC separaci. Gradientová centrifugace tedy velmi dobře separuje živé spermie u pacientů s vyšším % živých spermií v ejakulátu. U vzorků s nižším % živých spermií může působit negativně.

U normozoospermiků byla průměrná hodnota živých spermií v ejakulátu 56,1 % a po separaci 78,6 %. Průměrný nárůst byl 22,5 %. K nárůstu % živých spermií došlo u 25/26 pacientů. U pacientů s patologickým spermiogramem byla průměrná hodnota živých spermií v ejakulátu 40,3 % a po separaci 52,1 %. Průměrný nárůst byl 11,8 %. U 3/10 pacientů však došlo k poklesu % živých spermií ve vzorku po GC separaci. Gradientová centrifugace je vhodnější metodou pro normozoospermiky, u pacientů s patologickým spermiogramem může působit negativně. Koncentrace spermií po GC separaci a % živých spermií po GC signifikantně korelují s % živých spermií v ejakulátu (tab. 6.5). Tedy čím vyšší je koncentrace spermií v ejakulátu, tím vyšší lze očekávat koncentraci spermií a % živých spermií v separovaném vzorku.

Tabulka 6.5: Korelace % živých spermií v ejakulátu s koncentrací spermií a % živých spermií po gradientové centrifugaci

	Počet vzorků $N = 27$	% živých spermií v ejakulátu Hodnota r	Statistická průkaznost Hodnota p
Koncentrace sp. po GC ($10e^6/ml$)	36	0,646	< 0,001
Počet živých sp. po GC (%)	36	0,594	< 0,001

Závěry hodnocení kvality spermií po gradientové centrifugaci

- Po separaci GC došlo ke zvýšení % živých spermií u 86,1 % vzorků. Po GC klesá zejména % pozdně apoptotických a nekrotických spermií. Pokles % časně apoptotických spermií je nízký.
- Čím vyšší je kvalita ejakulátu, tím vyšší je % živých spermií po GC. Procento živých spermií po GC statisticky průkazně pozitivně koreluje s koncentrací spermií v ejakulátu, s % živých spermií v ejakulátu a s % progresivně pohyblivých spermií v ejakulátu. Statisticky negativně koreluje s % morfologicky abnormálních spermií.
- Na základě znalosti % živých spermií v ejakulátu lze odhadnout výsledek GC. Čím nižší je % živých spermií v ejakulátu, tím nižší je i koncentrace % živých spermií po GC. Tato korelace je statisticky průkazná. Gradientová centrifugace je méně vhodnou metodou pro pacienty s patologickým spermiogramem nebo pro ejakulát s nízkým % živých spermií. Po GC došlo k poklesu % živých spermií u 4 pacientů.

6.3 Porovnání separačních metod a jejich vliv na počet živých spermií

V kapitole 6.2 bylo zjištěno, že u některých pacientů s nízkým % živých spermií v ejakulátu nebo s patologickým spermiogramem dochází po GC k poklesu % živých spermií. K separaci kvalitních spermií je možné použít i jiné metody než GC. Experimentálně byla porovnána separace spermií pomocí GC, SU, MACS a MFSS. Zastoupení živých a apoptotických spermií bylo změřeno v ejakulátu a ve vzorku získaném po různých typech separací spermií. Cílem bylo zjistit, který separační postup bude pro rizikové vzorky vhodnější, tj. po které metodě dojde ke zvýšení % živých spermií.

Původně bylo cílem porovnat i hodnoty fragmentace DNA, ale nakonec se nepodařilo provést toto vyšetření u všech vzorků. V experimentech byly použity většinou vzorky s nízkou kvalitou ejakulátu, které měly nízkou koncentraci spermií nebo nižší % živých spermií. U některých vzorků nebylo k dispozici dostatek ejakulátu nebo bylo málo spermií pro stanovení fragmentace DNA ve vzorcích získaných po separaci.

6.3.1 Porovnání metod SU a GC

V této části studie byly porovnány tradiční separační metody – gradientová centrifugace a swim-up metoda. Separace spermií byla provedena podle postupů viz kap. 5.4.2 a 5.4.3.

Do experimentu bylo zařazeno 8 pacientů, u kterých byl proveden spermioqram, a poté bylo stanoveno % živých spermií. V souboru byly 4 normozoospermici a 4 pacienti s patologickým spermioqramem. Pouze 2 pacienti měli nižší % živých spermií v ejakulátu (<50 % živých spermií). Výsledky % živých spermií po obou separacích jsou uvedeny v tabulce 6.6.

Tabulka 6.6: Porovnání GC a SU separací - charakteristika souboru a změny % živých spermií po separacích GC a SU

	SPG	% živých sp. v ejakulátu	% živých sp. po GC	% živých sp. po SU	Nárůst/pokles % živých sp. po GC	Nárůst/pokles % živých sp. po SU
Pacient č.1	OAT	37,7	12,7	19,3	-24,9	-18,3
Pacient č.2	O	39,1	25,9	20,1	-13,2	-18,9
Pacient č.3	OA	57,9	37,6	71,0	-20,4	13,1
Pacient č.4	N	65,9	49,1	91,8	-16,8	25,9
Pacient č.5	N	66,0	63,7	86,5	-2,2	20,6
Pacient č.6	A	66,3	94,0	39,1	27,8	-27,2
Pacient č.7	N	75,6	81,1	80,5	5,5	4,9
Pacient č.8	N	76,4	89,5	97,9	13,1	21,3
Průměr		60,6	56,7	63,3	-3,9	2,7

OAT - Oligoastenoteratozoospermie; O - Oligozoospermie; N - Normozoospermie; OA - Oligoastenozoospermie; A - Astenozoospermie

Po GC separaci došlo k poklesu % živých spermií u 4/8 pacientů, ke zvýšení % živých spermií došlo u 3 pacientů, u 1 pacienta byly obě hodnoty podobné. Po SU došlo ke zvýšení % živých spermií u 5/8 pacientů, k poklesu u 3 pacientů. Mezi % živých spermií v ejakulátu a ve vzorcích po GC nebo SU nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (tab. 6.7).

Tabulka 6.7: Porovnání počtu živých spermií po separaci GC a SU pomocí párového t-testu.

	Počet vzorků	Počet živých spermií v ejakulátu (%) Hodnota <i>p</i>	Počet živých spermií po GC (%) Hodnota <i>p</i>
Počet živých spermií po GC (%)	8	0,567	-
Počet živých spermií po SU (%)	8	0,730	0,555

6.3.2 Porovnání metod MACS a MFSS

Metody MACS a MFSS patří mezi nejmodernější postupy separace spermií. Vzorky byly zpracovány podle postupů uvedených viz kap 5.4.4 a 5.4.5. Do experimentu bylo zařazeno 6 pacientů s nízkým zastoupením živých spermií, u kterých byl předpoklad, že by po GC došlo k poklesu % živých spermií. U 5/6 pacientů bylo méně než 50 % živých spermií v ejakulátu, u 1 pacienta bylo % živých spermií mírně nad hranicí. Hodnoty spermioqramu a % živých spermií v ejakulátu po MACS a MFSS separacích jsou uvedeny v tabulce 6.8.

Tabulka 6.8: Porovnání MACS a MFSS separací – charakteristika souboru a % živých spermií před a po separacích

	SPG	% živých sp. v ejakulátu	% živých sp. MACS	% živých sp. MFSS	Změna % živých sp. MACS	Změna % živých sp. MFSS
Pacient č.1	O	27,8	44,1	50,2	16,6	22,4
Pacient č.2	OAT	30,1	17,4	52,7	-12,7	22,6
Pacient č.3	OAT	34,9	41,8	78,5	6,9	43,6
Pacient č.4	N	41,2	51,5	70,2	10,3	29,0
Pacient č.5	OA	44,6	33,3	84,1	-11,3	39,5
Pacient č.6	AT	52,7	41,3	51,9	-11,4	-0,9
Průměr		38,6	38,2	64,6	-0,3	26,0

OAT - Oligoastenoteratozoospermie; O - Oligozoospermie; N - Normozoospermie; OA - Oligoastenozoospermie; AT - Astenoteratozoospermie

Účinnější separací byla MFSS – u 5/6 pacientů došlo ke zvýšení % živých spermií oproti ejakulátu, u 1 pacienta zůstala hodnota po separaci stejná. Po MACS došlo ke zvýšení % živých spermií pouze u 3 pacientů, u dalších 3 naopak došlo k poklesu oproti hodnotám zjištěným v ejakulátu. Průměrné hodnoty % živých spermií byly signifikantně vyšší po MFSS v porovnání s hodnotami v ejakulátu a po MACS (tab. 6.9). Po MACS nedošlo ke statisticky významnému nárůstu % živých spermií oproti ejakulátu.

Tabulka 6.9: Porovnání počtu živých spermií po separaci MFSS a MACS pomocí párového t-testu

	Počet vzorků	Počet živých spermií v ejakulátu (%) Hodnota <i>p</i>	Počet živých spermií po MFSS (%) Hodnota <i>p</i>
Počet živých spermií po MFSS (%)	6	< 0,001	-
Počet živých spermií po MACS (%)	6	0,955	< 0,001

6.3.3 Porovnání metod MACS a GC

Separace pomocí MACS a GC byla provedena u 3 pacientů - u jednoho normozoospermika a dvou pacientů s patologickým spermiogramem. Vzorky byly separovány podle postupů viz kap. 5.4.4 a 5.4.2. V tabulce 6.10 jsou uvedeny hodnoty spermiogramu a % živých spermií v ejakulátu po GC a MACS. U normozoospermika došlo po GC i MACS ke zvýšení % živých spermií. U obou pacientů s patologickým spermiogramem došlo k poklesu % živých spermií po MACS i GC v porovnání s hodnotami v ejakulátu.

Tabulka 6.10: Porovnání GC a MACS separací – charakteristika souboru a % živých spermií před a po separacích.

	SPG	% živých sp. v ejakulátu	% živých sp. GC	% živých sp. MACS	Změna % živých sp. GC	Změna % živých sp. MACS
Pacient č.1	O	30,10	8,94	17,37	-21,16	-12,73
Pacient č.2	A	52,72	46,46	41,32	-6,26	-11,40
Pacient č.3	N	64,83	83,21	76,38	18,38	11,55
Průměr		49,22	46,20	45,02	-3,01	-4,19

OAT - Oligoastenoteratozoospermie; N - Normozoospermie; A - Astenozoospermie

Závěry porovnání separačních metod

- Gradientová centrifugace je účinnou separační metodou u normozoospermiků s vysokým % živých spermií v ejakulátu.
- Swim-up je účinnější než GC separace u normozoospermiků, ale rozdíl mezi separacemi není statisticky významný. Swim-up není vhodnou metodou u pacientů s patologickým spermiogramem, zejména pokud mají nižší pohyblivost spermií. U těchto vzorků může docházet k poklesu % živých spermií.
- Po MFSS došlo k statisticky významnému nárůstu % živých spermií u pacientů s patologickým ejakulátem. Průměrné % živých spermií bylo signifikantně vyšší po MFSS než v ejakulátu a než po MACS.
- Po MACS došlo ke zvýšení % živých spermií pouze u některých vzorků. Vzhledem k jinému mechanismu separace by mohl být MACS významný u vzorků s nízkou pohyblivostí spermií.
- Metoda MFSS je nejvhodnějším separačním postupem a je vhodná pro pacienty s nízkou kvalitou ejakulátu a s nižším zastoupením živých spermií.

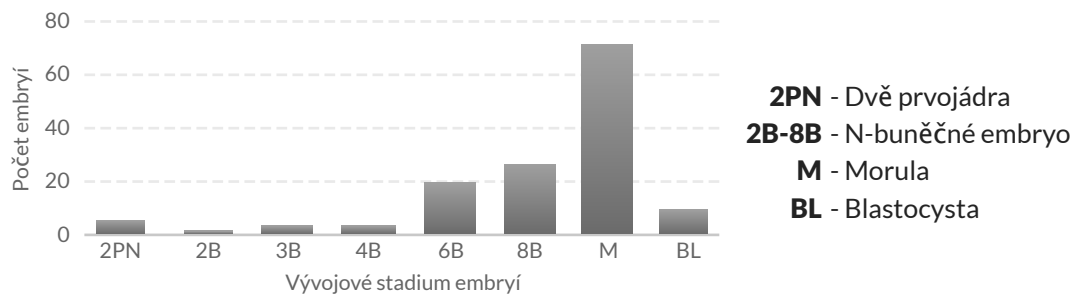
6.4 Hodnocení kvality embryí

V další části diplomové práce byla hodnocena kvalita embryí v závislosti na kvalitě spermií použitých pro ICSI. V rámci sledovaných cyklů bylo injikováno 332 darovaných oocytů. Úspěšně oplozených oocytů s dvěma prvojádry (2PN) bylo 314. Fertilization rate (podíl oplozených a všech injikovaných oocytů) byl 94,4 %.

6.4.1 Celkový přehled

Embrya byla inkubována do stádia vhodného pro ET buď v inkubátoru (76,7 % embryí) nebo v EmbryoScopu (23,3 % embryí). V průběhu kultivace se pravidelně hodnotila kvalita embryí podle kritérií viz kap. 4.4. Pouze do stádia blastocysty se dostalo 54,8 % oplozených oocytů. Utilization rate (poměr počtu blastocyst a počtu oplozených oocytů) byl 55,6 %.

V grafu 12 je uveden přehled embryí podle finálního stavu, ve kterém se zastavil jejich vývoj. Nejčastěji degenerovaly oplozené oocyty ve stádiu moruly (22,9 %).



Graf 12: Počet zaniklých embryí do stádia blastocysty

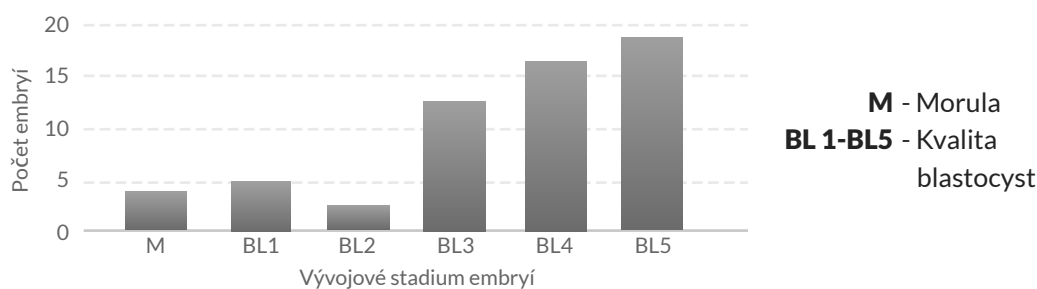
V následující tabulce 6.11 je uveden přehled kvalitních embryí, která byla buď zamrzena pro případný KET nebo byla transferovaná v tzv. „fresh“ ET. Celkem vzniklo 169 kvalitních embryí, ze kterých bylo 65,7 % kvalitních blastocyst ve stádiu BL3 až BL5.

Tabulka 6.11: Přehled kvalitních embryí

	N = 43
Morula (M)	6/169 (3,6 %)
Blastocysta 1-2 (BL1-2)	52/169 (30,8 %)
Blastocysta 3 (BL3)	34/169 (20,1 %)
Blastocysta 4 (BL4)	49/169 (29,0 %)
Blastocysta 5 (BL5)	28/169 (16,6 %)
Celkem blastocyst BL3-BL5	111/169 (65,7%)

6.4.2 Úspěšnost ET

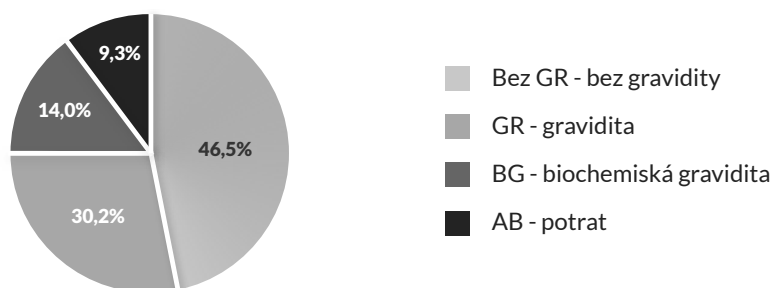
Embrya byla transferována buď třetí den (11,6 %) nebo pátý den až po tzv. prodloužené kultivaci embryí (88,4 %). K „fresh“ transferu jsou používána nejkvalitnější embrya (graf 13) - u 30,5 % pacientek to byla embrya typu BL5, u 27,1 % BL4 a u 22,0 % BL3. Pouze v několika případech byla použita méně kvalitní embrya – BL1 (8,5 %) a BL2 (5,1 %) nebo M (6,8 %).



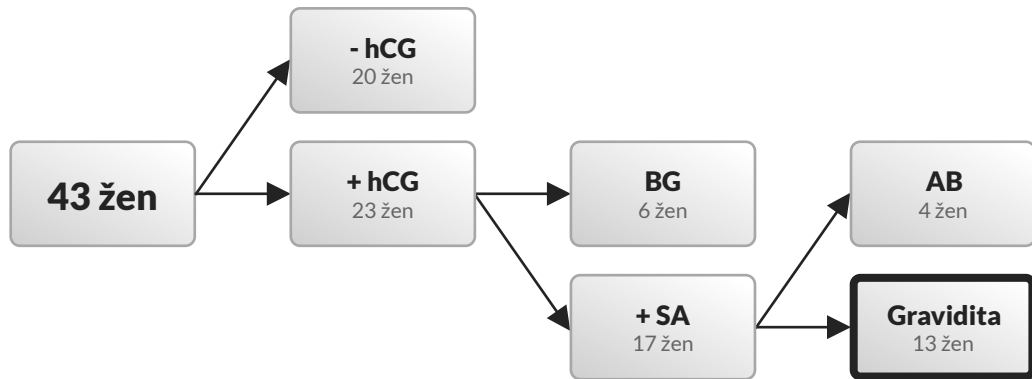
Graf 13: Přehled transferovaných embryí

Dalším významným parametrem je pregnancy rate (PR) (poměr pacientek s pozitivním hCG a počtem transferovaných embryí). Hodnota PR v souboru byla 37,2 %. Biochemická gravidita (resp. pozitivita hCG testu) ještě neznamená jistotu úspěšného těhotenství, protože poměrně často dochází v prvních týdnech těhotenství k potratům. Prosperující graviditu a úspěšnou implantaci embrya potvrzuje ultrazvukové vyšetření a zjištění srdeční akce plodu (+SA). Implantation rate (poměr pacientek se zjištěnou +SA plodu a počtu transferovaných embryí) byl 23,3 %.

Úspěšnost embryotransferů je znázorněna v grafu 14. Pozitivní těhotenský test (+hCG) byl prokázán u 23 pacientek (53,5 %). Pacientek, kterým byla potvrzena srdeční akce (+SA) plodu, bylo 13 (30,2 %). Potratilo celkem 10 pacientek (23,2 %) – u 6 pacientek se po biochemické graviditě zastavil vývoj plodu, u 4 pacientek došlo k potratu plodu později po zjištění srdeční akce plodu. V době vzniku diplomové práce ještě nebyly známy počty narozených dětí. Ve dvou případech šlo o dvojčetná těhotenství, jedno bylo prosperující, u druhého došlo k potratu.



Graf 14: Zastoupení gravidit, potratů, biochemických gravidit u pacientek



Obrázek 6.1: Schéma výsledků ET

6.4.3 Vliv věku na úspěšnost ET

Úspěšnost cyklu může ovlivnit věk partnerů. Věkové průměry +hCG žen a jejich partnerů a věkové průměry gravidních žen (+SA) a jejich partnerů jsou uvedeny v tabulce 6.12. Cílem analýzy bylo zjistit, zda se statisticky významně liší věk žen, u kterých došlo po ET k vzestupu hCG od žen, u kterých byla zjištěna +SA. Nebyl prokázán signifikantní vliv věku na úspěšnost gravidity (+hCG nebo +SA). Statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny ani při porovnání věku partnerů +hCG a +SA žen.

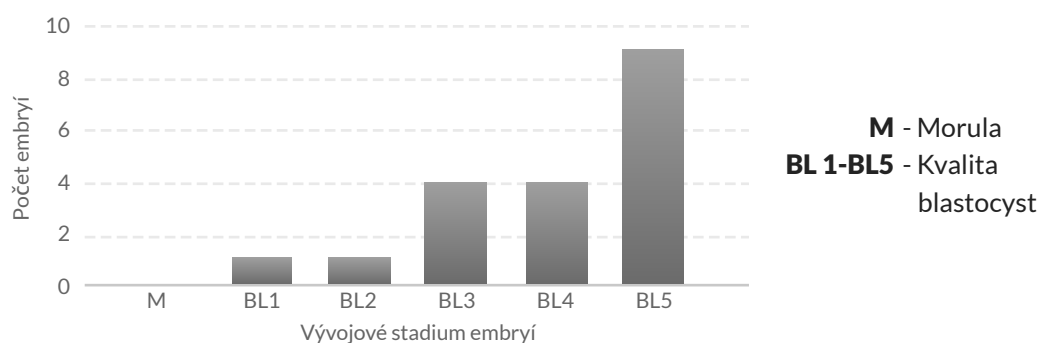
Tabulka 6.12: Vliv věku partnerů na +hCG a graviditu

	+hCG Průměr N = 23	+hCG Hodnota r	+hCG Hodnota p	Gravidita Průměr N = 13	Gravidita Hodnota r	Gravidita Hodnota p
Věk ženy (roky)	41,6	0,120	0,441	41,8	-0,153	0,326
Věk muže (roky)	42,0	0,046	0,768	40,0	0,006	0,691

6.4.4 Vliv kvality embrya na úspěšnost ET

Úspěšnost cyklu může ovlivnit kvalita transferovaných embryí. U 9/23 (39,1 %) žen s +hCG byla použita blastocysta BL5, u 4 žen (17,4 %) byla použita BL4 a u dalších 7 žen (30,4 %) BL3. Méně kvalitní blastocysty byly použity u dalších 3 žen (13,0 %). Transfer moruly (M) nebyl úspěšný (graf 15). U 7/13 žen s pozitivní srdeční akcí plodu (SA+) byla použita BL5 (53,8 %), u 3 žen (23,1 %) byla použita BL4 a u dalších 3 žen (23,1 %) BL3. Při použití méně kvalitních blastocyst nebo moruly nebyl prokázán plod se srdeční akcí.

Vliv kvality transferovaného embrya na úspěšnosti ET – tj. dosažení biochemické gravidity (+hCG) nebo gravidity (+SA bez nahlášeného potratu) je uveden v tabulce 6.13. Statisticky významně vyšší počet gravidních žen byl zjištěn pouze při transferu BL5. Výsledek u dalších typů blastocyst však může být ovlivněn malým počtem žen.



Graf 15: Přehled transferovaných embryí u gravidních partnerek

Tabulka 6.13: Vliv kvality transferovaného embrya na úspěšnosti +hCG a gravidity

	+hCG N	+hCG Hodnota r	+hCG Hodnota p	Gravidita N	Gravidita Hodnota r	Gravidita Hodnota p
M	2	-0,022	NS	0	-0,210	NS
BL 1	5	0,280	NS	1	-0,067	NS
BL 2	2	0,072	NS	1	0,018	NS
BL 3	8	0,096	NS	4	0,006	NS
BL 4	7	-0,112	NS	4	0,065	NS
BL 5	13	0,178	NS	10	0,373	< 0,001

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

Závěry hodnocení kvality embryí

- V rámci 43 cyklů s darovanými oocyty bylo úspěšně oplozeno 314 darovaných oocytů. Fertility rate (FR) byl 94,4 %.
- Celkem bylo vytvořeno 111 kvalitních embryí ve stádiu BL3-BL5. Utilization rate (UR) byl 55,6 %.
- Pozitivní těhotenský test (+hCG) byl u 23 žen (53,3 %). Poměr žen s +hCG a počtu transferovaných embryí (PR) byl 37,2 %.
- V souboru bylo 13 gravidních žen (30,2 %) s potvrzenou srdeční akcí plodu (+SA). Poměr žen s +SA a počtu transferovaných embryí (IR) byl 23,3 %.
- Kvalita blastocyst měla signifikantní vliv na úspěšnost těhotenství. Statisticky významná korelace byla zjištěna mezi transferem BL5 a počtem gravidních žen (+SA).
- Věk partnerů neměl signifikantní vliv na úspěšnost embryotransferu. Nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi věkem partnerů a graviditou.

6.5 Vliv kvality spermií na vývoj embryí a úspěšnost ET

Kvalita obou zárodečných buněk – spermií i oocytů – významně ovlivňuje vývoj embrya. Darované oocyty by měly být kvalitní, protože jde o zárodečné buňky mladých zdravých žen. Kvalita spermií může být negativně ovlivněna věkem mužů. Kvalita spermií se více projeví při použití metody *in vitro* fertilizace, kdy spermie přirozeně oplodní oocyt. Při použití metody ICSI pro oplození oocytů je významným faktorem postup embryologa a jeho zkušenosti. Ten vybírá pro oplození oocytů nejkvalitnější spermie. Na úspěšnost *in vitro* oplození má vliv také správné načasování procesu oplození, tak, aby byl oplozen skutečně zralý oocyt.

6.5.1 Vliv spermiogramu

V souboru partnerů pacientek bylo 33 normozoospermiků (skupina A) a 10 mužů s patologickým spermiogramem (skupina B). Z 23 párů s +hCG u partnerky bylo ve skupině A 16 párů (69,6 %) a ve skupině B 7 párů (30,4 %). Ve skupině A byl průměrný věk žen 40,0 let a mužů 41,1 let, naopak ve skupině B bylo ženám v průměru 42,3 let a mužům 45,0 let. Skupina B je tudíž starší než skupina A.

V tabulce 6.14 jsou uvedené průměrné hodnoty jednotlivých parametrů úspěšnosti oplození a statistická průkaznost rozdílů mezi skupinou A a B. Mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v žádném z parametrů. U skupiny A byl vyšší fertilization rate (FR) než u skupiny B, avšak parametr utilization rate (UR) byl vyšší u skupiny B. Hodnota pregnancy rate (PR) byla mírně vyšší u skupiny A, ale hodnota implantation rate (IR) byla vyšší u skupiny B.

Tabulka 6.14: Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti *in vitro* oplození u partnerek normozoospermiků a pacientů s patologickým spermiogramem

	Skupina A Normozoospermie N = 33	Skupina B Patologický spermiogram N = 10	Statistická průkaznost Hodnota <i>p</i>
FR (%) Fertilization rate	95,8	89,8	NS
UR (%) Utilization rate	54,0	61,0	NS
PR (%) Pregnancy rate	37,9	35,0	NS
IR (%) Implantation rate	22,7	25,0	NS

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

V rámci práce se porovnávalo, jakou kvalitu měla embrya u normozoospermiků a u mužů s patologickým spermiogramem. Předpokladem bylo, že kvalita embryí bude lepší u normozoospermiků než u pacientů s patologickým spermiogramem.

V tabulce 6.15 je uveden přehled zaniklých embryí u skupiny pacientů s normálním nebo patologickým spermiogramem. Do statistiky nebyly zařazeny oocyty, které v den 0 (po odběru) degenerovaly nebo byly ohodnoceny jako 0/1 PN. Větší procento embryí (45,1 %)

zaniklo u normozoospermiků než u pacientů s patologickým spermioqramem (40,0 %). Nejčastěji zanikala embrya ve stádiu moruly.

Tabulka 6.15: Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem

	Skupina A Normozoospermie N = 33	Skupina B Patologický spermioqram N = 10
Oplozený oocyt (2PN)	2/239 (0,8 %)	0/75 (0 %)
N-buněčné embryo (B)	40/239 (16,7 %)	15/75 (20,0 %)
Morula (M)	57/239 (23,8 %)	15/75 (20,0 %)
Blastocysta (BL)	9/239 (3,8 %)	0/75 (0 %)
Celkem zaniklo	108/239 (45,1 %)	30/75 (40,0 %)

V tabulce 6.16 je uveden přehled všech kvalitních embryí, která byla buď zamrazena nebo použita pro ET. Pacienti s normálním spermioqramem měli významně vyšší počet kvalitních blastocyst BL3-BL5 (68,5 %) než pacienti s patologickým spermioqramem (57,8 %), ale u pacientů s patologickým spermioqramem bylo více nejkvalitnějších blastocyst BL5.

Tabulka 6.16: Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem

	Skupina A Normozoospermie N = 33	Skupina B Patologický spermioqram N = 10
Morula (M)	4/124 (3,2 %)	2/45 (4,4 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 -BL2)	35/124 (28,2 %)	17/45 (37,8 %)
Blastocysta 3 (BL3)	29/124 (23,4 %)	5/45 (11,1 %)
Blastocysta 4 (BL4)	37/124 (29,8 %)	12/45 (26,7 %)
Blastocysta 5 (BL5)	19/124 (15,3 %)	9/45 (20,0 %)
Celkem kvalitních embryí (BL3-BL5)	85/124 (68,5 %)	26/45 (57,8 %)

V tabulce 6.17 je uveden počet a kvalita embryí použitých při ET u skupiny pacientů s normálním nebo patologickým spermioqramem. Kvalita transferovaných embryí byla obdobná u obou skupin. U skupiny s patologickým spermioqramem bylo transferováno více BL5 (34,5 %) než u skupiny s normálním spermioqramem. Úspěšnost cyklu ovlivňuje i počet transferovaných blastocyst. U 14 žen skupiny A a 6 žen u skupiny B byly transferovány dvě blastocysty. U skupiny A v osmi případech ženy otěhotněly (+SA), ale pouze jednou se ujala obě embrya, u skupiny B se u tří žen se ujalo pouze jedno embryo (+SA) a u jedné obě embrya. Transfer dvou embryí se zohledňuje při výpočtu PR i IR.

Tabulka 6.17: Přehled kvalitních embryí použitých pro ET - porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem

	Skupina A Normozoospermie N = 33	Skupina B Patologický spermioqram N = 10
Morula (M)	3/45 (7,0 %)	1/16 (6,3 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 -BL2)	6/45 (14,0 %)	2/16 (12,5 %)
Blastocysta 3 (BL3)	10/45 (23,3 %)	3/16 (18,8 %)
Blastocysta 4 (BL4)	12/45 (27,9 %)	4/16 (25,0 %)
Blastocysta 5 (BL5)	14/45 (27,9 %)	6/16 (37,5 %)

Závěry vlivu spermioqramu na vývoj embryí a úspěšnost ET

- Ve skupině žen s +hCG bylo více žen, které měly partnera s normálním spermioqramem (69,56 %) než žen, které měly partnera s patologickým spermioqramem (30,43 %).
- Vyšší počet kvalitních blastocyst byl zjištěn ve skupině pacientů s normálním spermioqramem než ve skupině pacientů s patologickým spermioqramem.
- U skupiny s normálním spermioqramem bylo k ET použito méně BL5 embryí než u skupiny s patologickým spermioqramem.
- Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl hodnot FR, UR, PR a IR mezi skupinami.

6.5.2 Vliv apoptózy spermií

V souboru bylo 27 pacientů s nízkým zastoupením apoptotických spermií (ApoLow) a 16 pacientů s vysokým zastoupením apoptotických spermií (ApoHigh). U skupiny biochemicky gravidních žen (23 žen +hCG) patřilo 12 partnerů (52,2 %) do skupiny ApoLow a 11 partnerů (47,8 %) do skupiny ApoHigh.

Ve skupině ApoLow byl průměrný věk žen 40,0 let, a mužů 41,0 let. Naopak ve skupině ApoHigh bylo ženám v průměru 42,1 let a mužům 44,0 let. Skupina ApoHigh byla tedy starší než skupina ApoLow. Předpokladem bylo, že u skupiny ApoLow s nižším zastoupením apoptotických spermií bude víc těhotných žen než u skupiny ApoHigh s vysokým zastoupením apoptotických spermií.

V tabulce 6.18 jsou uvedené hodnoty jednotlivých parametrů úspěšnosti oplození. U skupiny ApoLow byl statisticky významně vyšší FR než u ApoHigh. Ve skupině ApoHigh byly zjištěny vyšší UR a PR než u ApoLow, ale rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky průkazné. U skupiny ApoHigh byla hodnota IR statisticky významně vyšší než u ApoLow. Nepotvrdil se předpoklad, že u skupiny s nízkou apoptózou spermií budou lepší výsledky ET než u skupiny s vysokým zastoupením apoptotických spermií.

V rámci práce byla porovnána kvalita embryí u skupiny ApoLow a ApoHigh. Předpokladem bylo, že nižší zastoupení apoptotických spermií se projeví lepší kvalitou embryí. V tabulce 6.19 je uveden přehled zaniklých embryí u skupiny pacientů ApoLow a ApoHigh.

Tabulka 6.18: Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti *in vitro* oplození u partnerek pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií

	ApoLow N = 27	ApoHigh N = 16	Statistická průkaznost Hodnota <i>p</i>
FR (%) Fertilization rate	97,7	88,9	0,03
UR (%) Utilization rate	51,5	62,5	NS
PR (%) Pregnancy rate	31,5	46,9	NS
IR (%) Implantation rate	12,9	40,6	< 0,01

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

Do statistiky nejsou zařazeny oocyty, které v den 0 (po odběru) degenerovaly nebo byly ohodnoceny jako 0/1 PN. Časný vývoj embryí byl horší u skupiny ApoLow – zaniklo u nich 48,2 % embryí, kdežto u skupiny ApoHigh zaniklo jen 40,0 % embryí.

Tabulka 6.19: Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií

	ApoLow N = 27	ApoHigh N = 16
Oplozený oocyt (2PN)	6/199 (3,0 %)	0/115 (0 %)
n-buněčné embryo (B)	37/199 (18,6 %)	18/115 (15,7 %)
Morula (M)	46/199 (23,1 %)	26/115 (22,6 %)
Blastocysta (BL)	7/199 (3,5 %)	2/115 (1,7 %)
Celkem zaniklo	96/199 (48,2 %)	46/115 (40,0 %)

V tabulce 6.20 je uveden přehled všech kvalitních embryí, která byla buď zamrazena nebo použita pro ET. Ve skupině ApoLow byl zjištěn vyšší počet kvalitních blastocyst BL3-BL5 (72,2 %) než ve skupině ApoHigh (55,8 %). Tedy nižší zastoupení apoptotických spermií ve vzorku vedlo k vyššímu počtu kvalitních a pro transfer nebo zamrazení použitelných embryí.

V tabulce 6.21 je uveden přehled kvalitních embryí použitých pro fresh embryotransfer. Zatímco procento transferovaných embryí BL5 je u obou skupin obdobné, u skupiny ApoHigh byl významně vyšší počet transferovaných BL4 než u skupiny ApoLow. Transfer vyššího počtu kvalitních embryí může být příčinou vyššího PR a IR, který byl zjištěn u skupiny ApoHigh. U skupiny ApoLow byla 11x transferována 2 embrya, u skupiny ApoHigh 9x. Rozdíly mezi skupinami nejsou způsobeny častějším transferem dvou blastocyst.

Tabulka 6.20: Přehled kvalitních embryí (zamrazené + transferované) - porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií

	ApoLow N = 27	ApoHigh N = 16
Morula (M)	4/101 (3,9 %)	2/68 (2,9 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 -BL2)	24/101 (23,8 %)	28/68 (41,1 %)
Blastocysta 3 (BL3)	28/101 (27,7 %)	6/68 (8,8 %)
Blastocysta 4 (BL4)	29/101 (28,7 %)	20/68 (29,4 %)
Blastocysta 5 (BL5)	16/101 (15,8 %)	12/68 (17,6 %)
Celkem kvalitních embryí (BL3-BL5)	73/101 (72,2 %)	38/68 (55,8 %)

Tabulka 6.21: Přehled kvalitních embryí použitých pro ET - porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií

	ApoLow N = 27	ApoHigh N = 16
Morula (M)	3/37 (8,1 %)	1/24 (4,2 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 -BL2)	6/37 (16,2 %)	2/24 (8,3 %)
Blastocysta 3 (BL3)	9/37 (24,3 %)	4/24 (16,6 %)
Blastocysta 4 (BL4)	7/37 (18,9 %)	9/24 (37,5 %)
Blastocysta 5 (BL5)	12/37 (32,4 %)	8/24 (33,3 %)

Jedním z faktorů, který může ovlivnit výsledek ET je i zdravotní stav žen a jejich anamnéza. Z retrospektivní analýzy klinických dat (tab. 6.22) bylo zjištěno, že ve skupině ApoLow mají páry za sebou průměrně vyšší počet cyklů asistované reprodukce než ve skupině ApoHigh (3,3 vs. 2,4 cyklů). Dvě již dříve narozené děti byly ve skupině ApoLow, jedno dítě ve skupině ApoHigh. Tato klinická data ukazují, že pacientky léčené pomocí darovaných oocytů patří mezi obtížně léčitelnou skupinu neplodných žen.

Tabulka 6.22: Přehled klinických dat u párů ze skupin ApoLow a ApoHigh

	ApoLow Celkem N = 27	ApoHigh Celkem N = 16	ApoLow Průměr na pár (%)	ApoHigh Průměr na pár (%)
Počet cyklů ART	90	39	3,3	2,4
Počet potratů	21	29	0,8	1,8
Počet porodů	2	1	0,1	0,1

Závěry vlivu apoptózy na vývoj embryí a úspěšnost ET

- U skupiny ApoLow byl statisticky významně vyšší parametr FR než u skupiny ApoHigh.
- U skupiny ApoLow byl zjištěn vyšší počet kvalitních blastocyst (BL3-BL5) než u skupiny ApoHigh.
- U skupiny ApoHigh však byl statisticky významně vyšší implantation rate (IR) než u skupiny Apo High. Tedy počet žen s potvrzenou srdeční akcí plodu byl vyšší ve skupině s nižší kvalitou ejakulátu.
- Procento embryí kvality BL5 použitých pro ET byl u skupin ApoLow a ApoHigh obdobný, avšak u skupiny ApoHigh byl významně vyšší počet transferovaných BL4. To může být jedním z důvodů vyššího počtu gravidních žen v ApoHigh skupině.

6.5.3 Vliv fragmentace DNA spermií

V souboru bylo 30 pacientů s nízkým zastoupením spermií s fragmentovanou DNA (FragLow) a 13 pacientů s vysokým zastoupením spermií s fragmentovanou DNA (FragHigh). Fyziologický počet spermií s fragmentovanou DNA (FragLow) je méně než 20 % spermií. Ve skupině gravidních párů (tj. 23 žen s +hCG), bylo 15 partnerů (65,2 %) ze skupiny FragLow a 8 partnerů (34,8 %) ze skupiny FragHigh.

Průměrný věk žen ve skupině FragLow byl 41,3 let a mužů 41 let, naopak ve skupině FragHigh bylo ženám v průměru 40,9 let a mužům 42 let. Obě skupiny byly stejně staré. Předpokladem bylo, že u skupiny FragLow by se měly tvořit kvalitnější embrya.

V tabulce 6.23 jsou uvedené hodnoty jednotlivých parametrů úspěšnosti oplození. Hodnoty FR jsou u obou skupin srovnatelné. U skupiny FragHigh byla statisticky významně vyšší hodnota UR, a tedy vyšší procentuální zisk blastocyst z oplozených oocytů než u skupiny FragLow. Skupina FragHigh měla také vyšší hodnoty PR a IR než skupina FragLow.

Tabulka 6.23: Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti *in vitro* oplození u skupin pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA

	FragLow N = 30	FragHigh N = 13	Statistická průkaznost Hodnota <i>p</i>
FR (%) Fertilization rate	94,8	93,4	NS
UR (%) Utilization rate	51,4	65,3	< 0,01
PR (%) Pregnancy rate	35,0	42,3	NS
IR (%) Implantation rate	20,0	30,8	NS

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

V rámci práce byla porovnána kvalita embryí u skupiny FragLow a FragHigh. V tabulce 6.24 je uveden přehled zaniklých embryí u skupiny FragLow a FragHigh. Do statistiky nejsou

zařazeny oocyty, které v den 0 (po odběru) degenerovaly nebo byly ohodnoceny jako 0/1 PN. Vývoj embryí byl kvalitnější u pacientů FragHigh – zaniklo u nich pouze 35,2 % embryí, kdežto u FragLow pacientů zaniklo 49,1 % embryí.

Tabulka 6.24: Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA

	FragLow N = 30	FragHigh N = 13
Oplozený oocyt (2PN)	6/226 (2,7 %)	0/88 (0 %)
N-buněčné embryo (B)	44/226 (19,5 %)	11/88 (12,5 %)
Morula (M)	53/226 (23,5 %)	19/88 (21,6 %)
Blastocysta (BL)	8/226 (3,5 %)	1/88 (1,1 %)
Celkem zaniklo	111/226 (49,1 %)	31/88 (35,2 %)

V tabulce 6.25 je uveden přehled kvalitních embryí, která byla buď zamrazena nebo použita pro ET. Ve skupině FragLow byl srovnatelný počet kvalitních blastocyst BL3-BL5 (64,6 %) jako ve skupině FragHigh (67,8 %). Ve skupině FragHigh však bylo více BL5 než u skupiny FragLow.

Tabulka 6.25: Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA

	FragLow N = 30	FragHigh N = 13
Morula (M)	4/113 (3,5 %)	2/56 (3,6 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 - BL2)	36/113 (31,8 %)	16/56 (28,6 %)
Blastocysta 3 (BL3)	24/113 (21,2 %)	10/56 (17,8 %)
Blastocysta 4 (BL4)	36/113 (31,8 %)	13/56 (23,2 %)
Blastocysta 5 (BL5)	13/113 (11,5 %)	15/56 (26,8 %)
Celkem kvalitních embryí (BL3 - BL5)	73/113 (64,6 %)	38/56 (67,8 %)

V tabulce 6.26 je uveden přehled embryí použitých k ET u skupiny pacientů FragLow nebo FragHigh. U skupiny FragHigh bylo zjištěno významně více transferovaných blastocyst BL5 než u skupiny FragLow, což mohlo mít vliv na vyšší úspěšnost ET cyklů u FragHigh skupiny. Dvě blastocysty najednou byly transferovány u 10 párů FragLow a 8 párů FragHigh.

Jedním z faktorů, který může ovlivnit výsledek ET je i zdravotní stav žen a jejich anamnéza. Z retrospektivní analýzy klinických dat (tab. 6.27) bylo zjištěno, že ve skupině FragLow mají páry za sebou průměrně nižší počet cyklů asistované reprodukce než ve skupině FragHigh (2,4 vs. 3,0 cyklů na pár). Průměrný počet potratů mají páry ze skupiny FragHigh a FragLow srovnatelný (1,2 vs. 1,1 potratů na pár). Dvě již dříve narozené děti byly zjištěny ve skupině FragLow i FragHigh.

Tabulka 6.26: Přehled kvalitních transferovaných embryí - porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA

	FragLow N = 30	FragHigh N = 13
Morula (M)	2/40 (5,0 %)	2/21 (9,5 %)
Blastocysta 1- 2 (BL1 - BL2)	6/40 (15,0 %)	2/21 (9,5 %)
Blastocysta 3 (BL3)	10/40 (25,0 %)	3/21 (14,3 %)
Blastocysta 4 (BL4)	11/40 (27,5 %)	5/21 (23,8 %)
Blastocysta 5 (BL5)	11/40 (27,5 %)	9/21 (42,8 %)

Tabulka 6.27: Přehled klinických dat u párů ze skupin FragLow a FragHigh.

	FragLow Celkem N = 30	FragHigh Celkem N = 13	FragLow Průměr na pár (%)	FragHigh Průměr na pár (%)
Počet cyklů ART	72	39	2,4	3,0
Počet potratů	34	15	1,1	1,2
Počet porodů	2	2	0,06	0,15

Závěry vlivu fragmentace DNA spermií na vývoj embryí a úspěšnost ET

- U skupiny FragHigh byla statisticky významně vyšší hodnota UR než u skupiny FragLow.
- Ve skupině FragLow byl srovnatelný počet kvalitních blastocyst (BL3-BL5) jako ve skupině FragHigh, ale ve skupině FragHigh bylo více nejkvalitnějších BL5.
- Transfer vyššího počtu BL5 u skupiny FragHigh skupiny mohl být důvodem vyšších hodnot PR i IR než u skupiny FraLow. Rozdíly nebyly statisticky průkazné.

6.5.4 Vliv koncentrace spermií po GC

Z uvedených výsledků překvapivě vyplynulo, že počet gravidních žen byl vyšší u skupin s horší kvalitou ejakulátu. Po důkladné analýze dat bylo zjištěno, že dalším z faktorů, který ovlivnil výsledek ICSI, byla koncentrace spermií.

U všech cyklů byla použita separace spermií pomocí GC. Soubor byl rozdělen na skupinu s pacienty, u kterých byl po GC výtěžek spermií nižší než 10 mil/ml (skupina SpLow) a u kterých byl výtěžek spermií vyšší než 10 mil/ml (skupina SpHigh). V tabulce 6.28 jsou uvedeny hodnoty koncentrace spermií u skupin SpLow a SpHigh před a po GC separaci a také % spermií s fragmentací DNA v ejakulátu. U skupiny SpHigh byly zjištěny vyšší koncentrace spermií před i po GC separaci a nižší % spermií s fragmentací DNA než u skupiny SpLow. Ve skupině SpLow bylo 9 normozoospermiků a 9 pacientů s patologickým spermioqramem. Ve skupině SpHigh naopak 25 normozoospermiků a jen 2 pacienti s patologickým spermioqramem.

Tabulka 6.28: Koncentrace spermií a fragmentace DNA u skupiny s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po GC

	SpLow N = 18	SpHigh N = 27
Prům. počet živých spermií v ejakulátu (%)	40,0	62,2
Prům. počet živých spermií po GC (%)	58,4	79,8
Prům. počet spermií s fragmentací DNA (%)	23,4	14,85

Při porovnávání parametrů úspěšnosti oplození (tab. 6.29) bylo zjištěno, že skupina SpHigh má sice mírně vyšší FR než skupina SpLow, ale rozdíly nebyly statisticky průkazné. U skupiny SpLow byl signifikantně vyšší UR a hlavně signifikantně vyšší IR než u skupiny SpHigh. PR byl vyšší u SpLow, ale rozdíly nebyly statisticky průkazné.

Tabulka 6.29: Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti *in vitro* oplození u partnerek pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci

	SpLow N = 18	SpHigh N = 27	Statistická průkaznost Hodnota <i>p</i>
FR (%) Fertilization rate	90,4	97,5	NS
UR (%) Utilization rate	65,3	48,0	< 0,01
PR (%) Pregnancy rate	44,7	31,2	NS
IR (%) Implantation rate	39,5	10,4	< 0,01

NS – statisticky neprůkazný rozdíl, $p > 0,05$

Předpokladem bylo, že ve vzorcích s vyšší koncentrací spermií po GC separaci, které pocházejí zpravidla z kvalitních ejakulátů normozoospermiků, budou lepší spermie a po ICSI vzniknou lepší embrya. V tabulce 6.30 je uveden přehled zaniklých embryí u skupiny SpLow a SpHigh. Do statistiky nebyly zařazeny oocyty, které v den 0 (po odběru) degenerovaly nebo byly ohodnoceny jako 0/1 PN. Významně méně embryí zaniklo u SpLow skupiny (36,6 % embryí) než u SpHigh skupiny (51,5 % embryí).

Tabulka 6.30: Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.

	SpLow N = 18	SpHigh N = 27
Oplozený oocyt (2PN)	0/123 (0 %)	6/202 (3,0 %)
N-buněčné embryo (B)	19/123 (15,4 %)	37/202 (18,3 %)
Morula (M)	26/123 (21,1 %)	52/202 (25,7 %)
Blastocysta (BL)	0/123 (0 %)	9/202 (4,5 %)
Celkem zaniklo	45/123 (36,6 %)	104/202 (51,5 %)

V tabulce 6.31 je uveden přehled všech kvalitních embryí, která byla buď zamrazena nebo použita pro ET. Skupina SpHigh měla podobný počet kvalitních blastocyst BL3-BL5 jako skupina SpLow (69,5 % vs. 62,8 %), ale ve skupině SpLow bylo více BL5 a BL4 než ve skupině SpHigh.

Tabulka 6.31: Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.

	SpLow N = 18	SpHigh N = 27
Morula (M)	2/78 (2,6 %)	4/95 (4,2 %)
Blastocysta 1-2 (BL1-BL2)	27/78 (34,6 %)	25/95 (26,3 %)
Blastocysta 3 (BL3)	9/78 (11,5 %)	28/95 (29,5 %)
Blastocysta 4 (BL4)	25/78 (32,0 %)	24/95 (25,3 %)
Blastocysta 5 (BL5)	15/78 (19,2 %)	14/95 (14,7 %)
Celkem kvalitních embryí (BL3-BL5)	49/78 (62,8 %)	66/95 (69,5 %)

V tabulce 6.32 je uveden přehled embryí použitých k ET. U skupiny SpLow byla častěji transferována kvalitní embrya BL5 a BL4 než u skupiny SpHigh, což mohlo přispět k vyššímu počtu gravidních žen ve skupině SpLow. U 11 žen skupiny SpHigh a 9 žen skupiny SpLow byly transferovány 2 blastocysty.

Tabulka 6.32: Přehled kvalitních transferovaných embryí - porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.

	SpLow < 10 mil/ml spermií po GC N = 18	SpHigh > 10 mil/ml spermií po GC N = 27
Morula (M)	1/26 (3,8 %)	3/37 (8,1 %)
Blastocysta 1-2 (BL1-BL2)	2/26 (7,7 %)	6/37 (16,2 %)
Blastocysta 3 (BL3)	5/26 (19,2 %)	9/37 (24,3 %)
Blastocysta 4 (BL4)	9/26 (34,6 %)	7/37 (18,9 %)
Blastocysta 5 (BL5)	9/26 (34,6 %)	12/37 (32,4 %)

Závěry vlivu koncentrace spermií po GC na vývoj embryí a úspěšnost ET

- Koncentrace spermií po GC se jako významný parametr ukázala až v průběhu zpracování výsledků studie.
- U skupiny SpLow byl zjištěn statisticky průkazně vyšší parametr UR, tedy je vyšší procentuální zisk blastocyst z oplozených oocytů, než u skupiny SpHigh.
- U skupiny SpLow byl zjištěn statisticky průkazně vyšší IR, a tedy vyšší počet gravidních žen než u skupiny SpHigh.
- Počet kvalitních blastocyst BL3-BL5 byl u obou skupin srovnatelný.
- U skupiny SpLow byl transferován vyšší počet kvalitních blastocyst než u SpHigh, což se projevilo vyšším počtem gravidních pacientek.

Kapitola 7

Diskuze

Neplodnost postihuje 15 % populace v plodném věku (Sharlip et al. 2002; Agarwal et al. 2015). Neplodných mužů přibývá, ve střední Evropě postihuje 8-12 % mužů (Agarwal et al. 2015). Levine et al. (2017) zjistili pomocí metaanalýzy dat, že za posledních 40 let klesl u mužů celkový počet spermií a koncentrace spermií o 50-60 %. Příčiny tohoto poklesu nejsou známy (Levine et al. 2017). Významným negativním faktorem ovlivňujícím schopnost početí je věk obou partnerů. Děti se rodí stále starším ženám i mužům ve všech vyspělých zemích, Českou republiku nevyjímaje (Český statistický úřad 2017). Z hlediska reprodukce by bylo vhodné, aby mladí lidé měli možnost zakládat rodiny v mladším věku (tj. před 30. rokem), ale nebude snadné změnit současný trend ve společnosti. V blízké budoucnosti bude neplodnost pravděpodobně postihovat stále vyšší počet párů a bude přibývat dětí počatých pomocí metod asistované reprodukce.

Z kvalitních zárodečných buněk by mělo vzniknout i kvalitní embryo. Při metodách selekce spermií při asistované reprodukci nejsou spermie vystaveny fyziologickým bariérám (např. cervikální hlen, vaginální pH, záhyby vejcovodu, odpověď imunitního systému), které působí jako přirozený mechanismus výběru motilních spermií (Perez-Cereales et al. 2017). Úkolem pro laboratoře asistované reprodukce je nahradit tento přirozený selekční proces tak, aby se na oplození oocyty použily ty nejkvalitnější spermie také v *in vitro* podmínkách (Sakkas et al. 2015). Předpokládá se, že nejkvalitnější spermie jsou vysoce pohyblivé, morfologicky normální, obsahují nepoškozenou DNA, receptory umožňující interakci s oocytem, ale také receptory potřebné pro průchod reprodukčními cestami (Sakkas et al. 2015). Zatím nejsou k dispozici dostatečně přesné metody ani pro detekci ani pro selekci těchto nejlepších spermií.

7.1 Stanovení apoptózy a fragmentace DNA spermií

U infertilních pacientů je při vyšetření příčin neplodnosti vhodné provádět nejen spermio-gram, ale doplnit ho i některou z dostupných metod sledujících apoptózu spermií nebo fragmentaci DNA spermií.

Stanovení integrity DNA ve spermiích se považuje za velmi nadějný biomarker fertility (Sakkas et al. 2015). Vztah mezi fragmentací DNA a úspěšností metod asistované reprodukce se sledoval v desítkách klinických studií a v několika metaanalýzách, ale zatím není jednotný

názor na to, zda pouhá znalost fragmentace DNA stačí pro předpověď úspěšnosti metod asistované reprodukce (Cissen et al. 2016; Simon et al. 2017). Cissen et al. (2016) přišli s tvrzením, že v současné době není k dispozici dostatek důkazů, které by doporučovaly rutinní testování fragmentace DNA spermií pro predikci těhotenství, tak i pro volbu vhodné léčby. Naopak Simon et al. (2017) tvrdí, že poškození DNA spermií má významný vliv na těhotenství, a proto autoři doporučují zahrnutí testování fragmentace DNA do rutinních klinických vyšetření.

O vlivu fragmentace DNA spermií na úspěšnost oplození oocyty také není zatím jednotný názor. Vicari et al. (2002) a Brugnion et al. (2006) pozorovali negativní korelaci mezi vysokou fragmentací DNA a FR. Pokud je však poškození DNA vyváženo reparační schopností oocyty, je možné dosáhnout oplození i při vysoké fragmentaci DNA spermií (Muriel et al. 2006; Benchaib et al. 2007; Collins et al. 2008; Lin et al. 2008). Tento předpoklad však závisí na několika faktorech, a to stupně fragmentace, zda poškození DNA ovlivňuje kódující nebo nekódující oblasti a také rozsah poškození (Lewis et al. 2008). To je zřejmě zejména v případě použití ICSI, kde Acharyya et al. (2005) zjistili, že vysoká fragmentace DNA neměla vliv na úspěšnost FR. Jedním z vysvětlení rozdílných závěrů metaanalýz je skutečnost, že se klinické studie lišily používanými metodami stanovení fragmentace DNA (TUNEL, SCD, SCSA, Comet assay).

Stanovení počtu spermií s fragmentací DNA metodou TUNEL patří mezi prognosticky nejpřesnější metody (Cissen et al. 2016; Simon et al. 2017). Tato metoda je používána i v imunologické laboratoři GENNET. Metoda TUNEL je poměrně složitá a celé zpracování trvá 4-5 hodin, v závislosti na počtu měřených vzorků. Proto se provádí pouze ze zamrazeného ejakulátu a není možné ji provádět kdykoliv v průběhu dne. Pro rychlou analýzu apoptózy spermií je vhodnější cytometrické stanovení živých a apoptotických spermií v ejakulátu pomocí značení PI a annexinem (Oosterhuis et al. 2000). Jde o velmi rychlou a spolehlivou metodu, která zahrnuje pouze několik kroků a trvá cca 30 minut. Test apoptózy je možné na rozdíl od TUNEL testu provádět kdykoliv v průběhu dne z čerstvě odebraných vzorků ejakulátu. Limitní je pouze správné skladování ejakulátu a včasné zpracování (u ejakulátu do 4 hodin od odběru). Zatímco test apoptózy spermií zachycuje časné změny ve struktuře membrány buněk, TUNEL spíše zachycuje změny při pozdní fázi apoptózy, kdy dochází k fragmentaci DNA (Oosterhuis et al. 2000). V imunologické laboratoři GENNET test apoptózy spermií nahrazuje vyšetření vitality, které se provádí v andrologických laboratořích (WHO 2010). Výhodou testu apoptózy spermií je rozlišení živých a časně apoptotických spermií, kterých je ve zdravém ejakulátu průměrně 8,0 %, ale v případě patologií jich může být až 30,0 % (Krátká et al. 2017). V testu vitality se časně apoptotické spermie jeví jako živé.

Výsledkem diplomové práce bylo zjištění statisticky průkazné korelace mezi procentem apoptotických spermií a procentem spermií s fragmentací DNA ($r = 0,423$, $p < 0,01$). Ke stejnému výsledku došla i předchozí studie z imunologické laboratoře GENNET, kde bylo vyšetřeno 200 pacientů. Studie zatím nebyla publikována. Test apoptózy spermií tedy může být alternativní metodou k testu TUNEL. Navíc je vhodný i v případech, kdy je k dispozici jen malé množství spermií. U metody TUNEL je podle zkušeností limitem 0,5 milionů spermií.

Původním cílem diplomové práce byla retrospektivní analýza pacientů z let 2016–2017 s vyšetřením apoptózy spermií, která byla provedena jako součást základního vyšetření párů. Cílem analýzy bylo zjistit, zda vysoké zastoupení apoptotických spermií koreluje s nižší

úspěšností cyklů ICSI. Tento cíl však bohužel nebylo možné splnit z důvodu zavedení tzv. Obecného nařízení na ochranu osobních údajů neboli GDPR (General Data Protection Regulation). Pacienti musí podepsat informovaný souhlas se zpracováním klinických údajů pro potřebu studie. Toto nařízení v době stanovení cílů diplomové práce ještě nebylo platné.

7.2 Separační metody a jejich vliv na počet živých spermií

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda může být test apoptózy využit také embryology v rámci přípravy spermií pro *in vitro* oplození. Předpokladem bylo, že test apoptózy spermií je možné použít jako jedno z kritérií pro volbu vhodné metody pro separaci spermií před ICSI. Cílem práce bylo navrhnout nejvhodnější postup separace spermií u různých typů ejakulátu.

V IVF laboratoři GENNET je základní metodou používanou pro separaci spermií gradientová centrifugace. Princip GC metody spočívá v rozdělení buněk ejakulátu podle jejich hustoty při centrifugaci. Během centrifugace se nezárodečné buňky, nečistoty a nepohyblivé spermie zachytí na rozhraní dvou vrstev, zatímco zcela pohyblivé a zralé spermie mají vyšší denzitu a sedimentují na dno zkumavky (Malvezzi et al. 2014). Centrifugace však může způsobit poškození integrity spermií a zvýšit ROS (Alvarez et al. 1993).

Cílem této části práce bylo zjistit u jakých ejakulátů se snižuje počet živých spermií po separaci GC. U 36 vzorků vzorků ejakulátu bylo stanoveno procento živých spermií v nativním ejakulátu a po GC separaci. V ejakulátu bylo naměřeno v průměru 51,7 % živých spermií, ale po GC separaci bylo 71,2 % živých spermií. Po separaci došlo ke zvýšení procenta živých spermií u 32 vzorků, u 4 vzorků došlo k poklesu. Vzorky, u kterých došlo ke snížení, měly patologický spermioqram a nižší zastoupení živých spermií. S procentem živých spermií v ejakulátu statisticky významně korelovaly jak koncentrace spermií po GC separaci ($r = 0,646$, $p < 0,001$), tak procento živých spermií po GC separaci ($r = 0,594$ $p < 0,001$). Lze říci, že čím nižší bylo procento živých spermií v ejakulátu, tím nižší byl výtěžek spermií po GC separaci. Na základě těchto výsledků je možné předpokládat, že pro pacienty s vysokým zastoupením apoptotických spermií v ejakulátu, případně s patologickým spermioqramem (např. OAT), není GC nejvhodnější metodou pro separaci spermií. Tento výsledek je nutné ověřit v praxi na vyšším počtu vzorků.

Při porovnání vlivu GC na parametry spermioqramu bylo zjištěno, že procento živých spermií po GC statisticky průkazně pozitivně korelovalo s koncentrací spermií v ejakulátu, s procentem živých spermií v ejakulátu a s procentem progresivně pohyblivých spermií v ejakulátu. Statisticky negativně korelovalo s procentem morfologicky abnormálních spermií. Ricci et al. (2009) došli ke stejnému výsledku jako tato diplomová práce, a to zjištěním signifikantní korelace mezi procentem progresivně motilních spermií v ejakulátu a procentem živých spermií po GC separaci.

7.2.1 Porovnání metod SU a GC

Experiment s cílem porovnání separačních metod gradientové centrifugace a swim-up zahrnoval cytometrické stanovení procentuálního zastoupení živých spermií před a po separaci. Princip GC metody spočívá v rozdělení buněk ejakulátu podle jejich hustoty při centrifugaci.

SU je metoda založená na separaci spermií na základě jejich motility. Při této technice se využívá schopnosti pohyblivých spermií vycestovat do kultivačního média a separovat se tak od seminální plazmy.

Do experimentu bylo zařazeno 8 pacientů. Průměrný počet živých spermií byl 60,6 % v ejakulátu, 56,7 % ve vzorku po GC a 63,3 % ve vzorku po SU. Metoda GC velmi dobře separovala živé spermie u 3 pacientů s vyšším procentem živých spermií v ejakulátu, u ostatních vzorků s nižším procentem živých spermií kleslo procento živých spermií. Metoda SU byla u 5 pacientů účinnější než GC, ale nebyla vhodná u 3 pacientů s patologickým spermioqramem. Swim-up tedy není dle výsledků experimentu vhodnou metodou u pacientů s patologickým spermioqramem, zejména pokud mají nižší pohyblivost spermií. U těchto vzorků může docházet k poklesu % živých spermií.

Studii se stejným cílem provedl v roce 2009 Ricci et al. na souboru neplodných mužů. Průměrný počet živých spermií v ejakulátu byl 68,6 %, a po SU byl signifikantně vyšší (86,6 %) než po GC (81,1 %). Metoda SU měla vyšší úspěšnost i v této diplomové práci, avšak rozdíly nebyly statisticky významné kvůli malému počtu změřených vzorků. Předchozí studie Boomsma et al. (2004) ukázala vyšší koncentraci spermií a vyšší procento progresivně pohyblivých spermií po GC než po SU. Výsledky analýzy průtokové cytometrie naznačují, že GC poskytuje lepší vzorek z pohledu „množství“ a SU je preferováno z pohledu „kvality“. Nicméně obě metody přípravy spermií umožňují získání populace spermií s nízkým procentem apoptotických spermií, což potvrzují i výsledky této diplomové práce.

Autoři, kteří se snažili zjistit, která metoda separace snižuje víc fragmentaci DNA spermií, získali rozporuplné výsledky. Zini et al. (2000) prokázali po SU pokles procenta spermií s fragmentací DNA ve srovnání s nativním ejakulátem, ale mírný vzestup fragmentace DNA po GC. Ke stejnému závěru došli Oguz et al. (2018), kteří měřili fragmentaci DNA spermií pomocí Sperm Chromatin Dispersion (SCD) testu. Popsali v nativním ejakulátu infertilních mužů průměrně 41,9 % spermií s fragmentovanou DNA, po SU došlo k poklesu na 28,6 % a po GC na 38,8 %. Metoda SU tedy způsobila statisticky významnější snížení fragmentace DNA spermií. Tato studie potvrzuje předešlý výsledek Marchesi et al. (2010), kteří také označili SU za metodu, která snížila fragmentaci DNA spermií více než metoda GC. Podobně Lestarii et al. (2016) potvrdili pomocí testu SCD vyšší pokles fragmentace DNA spermií po separaci SU než po GC u patologických vzorků ejakulátu (oligozoospermie, asthenozoospermie, teratozoospermie nebo kombinace). Autoři proto doporučili metodu SU pro normozoospermiky a naopak metodu GC pro pacienty s patologickým spermioqramem. Jayaraman et al. (2012) sledovali skupinu normozoospermiků, oligozoospermiků a teratozoospermiků a detekovali fragmentaci DNA pomocí TUNEL testu. Nejistili signifikantní rozdíly mezi separacemi SU a GC.

V některých publikacích jsou naopak lepší výsledky pozorovány po GC. Amiri et al. (2012) zjistili pomocí mikroskopické metody Comet assay u zdravých mužů po SU vyšší průměrný počet apoptotických spermií než po GC. Autoři uvádí, že GC velmi kvalitně odstranila většinu apoptotických spermií. Podobně Xue et al. (2014) publikovali, že u teratozoospermických pacientů po GC a SU došlo pomocí testu SCD k výraznému poklesu fragmentace DNA ve srovnání s ejakulátem, ale signifikantně vyšší pokles byl zjištěn po GC.

Z výše uvedených nekonzistentních výsledků vyplývá, že je potřeba provést systematickou studii klasických postupů pro zpracování ejakulátu, aby se odhalily základní příčiny nesrovnalostí, optimalizovaly se tyto metody a zlepšilo se jejich využití v klinickém prostředí.

Rozdíl mezi publikacemi může být dán detaily v postupu separací, kterými se jednotlivé studie mezi sebou liší, a různými skupinami pacientů, které se porovnávají. Některé studie spermie centrifugují v rámci separace SU, kdežto jiné nikoliv. U SU musí být v ejakulátu přítomny pohyblivé spermie, tedy pro některé vzorky není vhodná. Rozdílné závěry studií mohly ovlivnit i různé metody použité ke stanovení fragmentace DNA.

Provádí se také separace oběma metodami současně. Nadallini et al. (2011) sledovali spermie normozoospermiků, které byly připraveny GC a následně separovány metodou SU nebo MACS. Fragmentaci DNA měřili pomocí metody TUNEL. Po GC+SU byla fragmentace DNA signifikantně nižší než po GC+MACS. Grunewald et al. (2010) po kombinované separaci GC+SU zjistili zlepšení progresivní motility a snížení počtu spermií s narušeným potenciálem mitochondriální membrány u oligozoospermiků, asthenozoospermiků, teratozoospermiků a u kombinací těchto patologií. Jackson et al. (2010) zjistili u normozoospermiků po GC+SU separacích pomocí testu SCD vzestup integrity DNA a motility spermií. Ke stejnému výsledku došli Yamanaka et al. (2016), kteří pozorovali po GC+SU také morfologicky lepší spermie ve srovnání s GC samotným.

7.2.2 Porovnání metod MACS a MFSS

Moderními metodami, které byly navrženy pro separaci apoptotických spermií, jsou mikrofluidní separace spermií (MFSS) a magnetická separace spermií (MACS).

Mikrofluidní systém separace je široce využíván pro různé oblasti výzkumu a pro klinické použití. Týká se to biologické a chemické analýzy (Whitesides 2006; Gurkan et al. 2012), point of care testování (Gervais et al. 2011; Tasoglu et al. 2012), klinické a forenzní analýzy (Verpoorte 2002) a v neposlední řadě molekulární a lékařské diagnostiky (Rizvi et al. 2013; Tasoglu et al. 2013b; Wang et al. 2014). Při mikrofluidní separaci spermií se využívají principy chemotaxe, termotaxe a fluidního toku. V této práci se využíval pasivní systém mikrofluidní separace FERTILE PLUS[®] Microfluidic Sperm Sorting Chip (KOEK Biotechnology), kde jediným mechanismem separace je aktivní pohyb spermií. Na český trh byl uveden v loňském roce. Skleněný čip má dvě komory propojené kanálkem se soustavou drážek a prostor horní komory je oddělený filtrem s různě velkými otvory. Spermie se napipetují do vstupního otvoru, pak musí proplavat systémem drážek a polykarbonátovým filtrem do výstupního otvoru naplněného médiem. Kvalitní živé spermie proplavou tímto členitým prostředím, nekvalitní spermie zůstanou v kanálku. Tato metoda selekce spermií se nejvíce blíží k mechanismu přirozeného výběru, protože bariéry v čipu napodobují přirozené prostředí. Podobně dochází k selekci spermií, když s putují děložním čípkem, děložní dutinou a vejcovody (Koyama et al. 2006; Xie et al. 2010). Výhodou metody je minimální pracnost pro embryologa a také rychlost separace (30 minut). Nevýhodou je vyšší cena než GC, ale vyšetření je levnější než MACS.

Při magnetické separaci apoptotických spermií (MACS Art Annexin V) se odstraňují spermie na základě struktury jejich membrány. Kovové nanočástice označené annexinem V se přidávají ke spermiím. Prostřednictvím specifické vazby annexinu V na fosfatidyserin, se na apoptotické spermie navážou kovové částice. (Vermes et al. 1995; Said et al. 2008; Said & Land 2011). Směs se napipetuje do separační kolony umístěné v magnetickém poli. Značené apoptotické buňky se zadrží v koloně, živé spermie protečou kolonou a zachytí se ve sběrné

zkumavce. Postup separace není složitý, ale je časově náročnější. Nevýhodou MACS je vysoká cena reagensů.

Cílem experimentu bylo porovnat účinnost separace živých spermií metodami MACS a MFSS. Separace byla provedena u šesti vzorků s vyšším zastoupením apoptotických spermií. Po MFSS došlo k signifikantnímu zvýšení procenta živých spermií oproti hodnotám v ejakulátu (z 38,5 % na 64,6 %). Po MACS se procento živých spermií nezměnilo (38,2 %). Procento živých spermií bylo po MFSS statisticky významně vyšší než po MACS.

MFSS je velmi moderní metoda a dosud bylo publikováno pouze několik prací s výsledky MFSS separací. MFSS umožňuje výběr klinicky využitelných vysoce pohyblivých spermií s nízkou fragmentací DNA. Schulte et al. (2007) ve svém článku uvádí, že vzorky po MFSS mají lepší průměrnou pohyblivost spermií (96,2 %) v porovnání s nezpracovaným vzorkem (52,0 %). Stejného výsledku dosáhli ve svém experimentu Quinn et al. (2018), kteří zvýšili pomocí MFSS průměrnou pohyblivost spermií z 54,0 % na 100,0 %. Tento výsledek potvrdili Thiruppathiraja et al. (2016), kteří pozorovali zároveň zlepšení morfologie spermií po separaci. Zatímco progresivní motilita je zpracováním pomocí MFSS zlepšena, snižuje se koncentrace spermií. Je to způsobené tím, že MFSS má omezenou kapacitu pro separaci spermií, která je daná objemem vstupního otvoru. Quinn et al. (2018) popisují průměrné snížení koncentrace spermií z 32,0 mil/ml v ejakulátu na 10,0 mil/ml po MFSS. Snížení koncentrace však není nežádoucí v případě použití spermií k oplození pomocí ICSI.

Autoři, kteří studují výsledky separace pomocí MFSS nejčastěji provádějí srovnávací analýzy s jinými metodami (GC a SU). V této diplomové práci se porovnávaly metody MFSS a MACS. V současné době není veřejně dostupná srovnatelná studie zabývající se touto problematikou. Schulte et al. (2007) studovali porovnání fragmentace DNA ve spermiích testem SCD po metodě MFSS a SU. V ejakulátu byla průměrná fragmentace DNA 13,3 %, po GC 14,9 %, po SU 5,7 % a po MFSS pouze 1,9 %. Pokles fragmentace DNA pomocí testu SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) po MFSS ve srovnání se separací GC a SU zjistili i Shirota et al. (2016) a Quinn et al. (2018). Autoři studie z roku 2015 Kishi et al. se zaměřili na pacienty s patologickým spermiogramem. Ve své studii porovnávali změnu fragmentace DNA (SCD test) po separaci pomocí MFSS, SU a GC u oligozoospermiků a oligoastenoospermiků. Průměrná fragmentace DNA spermií v nezpracovaném ejakulátu byla 27,7 %, po GC se výrazně nezměnila (25,8 %), ale k signifikantnímu poklesu fragmentace DNA došlo po SU (8,3 %) a po MFSS (5,9 %). Ramakrishnan et al. (2017) také zjistili pokles průměrné fragmentace DNA z 36,0 % na 15,0 % po GC separaci a na 9,6 % po MFSS. Po MFSS stoupá průměrná motilita spermií. Shirota et al. (2016) zjistili, že počet pohyblivých spermií stoupl z 52,0 % v ejakulátu na 96,2 % po MFSS. Nižší vzestup byl zjištěn po GC (73,4 %) či SU (85,8 %).

V roce 2017 proběhla první klinická studie pod vedením Ramakrishnan et al., zabývající se přípravou spermií pomocí MFSS. Kvalita embryí byla srovnatelná mezi MFSS a GC, ale ve skupině MFSS bylo více těhotných než ve skupině GC (83,3 % vs. 75,0 %), rozdíly nebyly statisticky významné. V další klinické studii Yetkinel et al. (2018) porovnávali dvě skupiny po separaci spermií pomocí MFSS a SU. U obou skupin byla srovnatelná průměrná hodnota FR, ale u MFSS byl signifikantně vyšší průměrný počet kvalitních embryí než u SU skupiny. Počet gravidních žen byl u obou skupin stejný a nebyl zjištěn rozdíl v THBR.

V IVF GENNET byla MFSS zavedena do rutinního provozu koncem roku 2018. První výsledky jak z této porovnávací studie, tak z rutinního používání naznačují, že jde o metodu,

která má šanci se stát velmi dobrou alternativou pro separaci živých spermií u pacientů s nižší kvalitou ejakulátu. Metoda je vhodná i pro normozoospermiky a může být použita místo GC. Podmínkou správné separace je přítomnost pohyblivých spermií a ejakulát nesmí být příliš viskózní. Je nutné experimentálně ověřit, zda je separace přínosná i u pacientů s nízkou pohyblivostí (astenozoospermii) nebo s vysokou koncentrací protilátek proti spermiím, které mohou omezovat pohyblivost spermií. Toto bude předmětem dalšího výzkumu.

7.2.3 Porovnání metod MACS a GC

V diplomové práci se separací ejakulátu (se sníženým zastoupením živých spermií) pomocí metody MACS a GC porovnávalo procentuální zastoupení živých spermií před a po separaci. Porovnání bylo provedeno u tří vzorků. Důvodem byla vysoká cena MACS a prioritní bylo porovnání MACS s novým MFSS. Po MACS došlo ke zvýšení procenta živých spermií pouze u normozoospermika, ale ne u pacientů s patologickým ejakulátem a vysokým počtem apoptotických spermií. Cíle práce bylo najít metodu minimálně zatěžující spermie v patologickém ejakulátu, proto byla zvolena pouze jedna krátká centrifugace ejakulátu před separací MACS. To může být důvodem, proč byla metoda MACS méně efektivní. Ventruba et al. (2018) ve své studii uvádějí, že použití ejakulátu do kolony MACS může snížit filtrační funkci a zabránit jeho schopnosti izolovat pohyblivé, živé spermie. Proto autoři doporučují provést separaci GC nebo SU jako první krok před použitím metody MACS. Tento postup je účinnější, protože zvyšuje podíl pohyblivých spermií ve vzorku a snižuje počet kulatých buňek, imotilních spermií a leukocytů (Agarwal et al. 2005; Said et al. 2006).

Metoda MACS v řadě studií způsobila pokles počtu spermií s fragmentací DNA (Winkle et al. 2006; Makker et al. 2008; Herrero et al. 2012; Losada et al. 2012), ale v některých publikacích nebyla změna počtu spermií s fragmentací DNA prokázána (Troya & Zorilla 2015). Některé studie poukazují na pokles počtu progresivně pohyblivých a morfologicky normálních spermií při použití MACS (Tavalae et al. 2012; Cakar et al. 2016) a podobné poznatky mají i embryologové v IVF GENNET. Snížení počtu pohyblivých spermií není považováno za významný problém při ICSI, ale není vhodné při IVF nebo IUI (Intrauterinní inseminace) (Ventruba et al. 2018).

Existuje několik studií srovnávajících GC a metodu MACS, nebo jejich kombinaci. Většina z nich dospěla k závěru, že zejména vzájemné kombinace GC a MACS jsou výhodné, protože zvýší viabilitu a separované vzorky mají méně apoptotických spermií (Said et al. 2005a; Said et al. 2006; De Vantéry Arrighi et al. 2009; Young et al. 2010; Romany et al. 2010; Tavalae et al. 2012). V současné metaanalýze Daneshmandpour et al. (2018) se potvrdilo, že kombinace MACS a GC je nejlepší technika separace spermií pro výběr spermií s nižší fragmentací DNA. U zdravých dárců a mužů s idiopatickou neplodností měly spermie separované nejprve metodou GC, a pak MACS (GC+MACS) o 30 % nižší fragmentaci DNA (SCD test) než po samotné GC (Said et al. 2006; Lee et al. 2010). Také u normozoospermiků a oligozoospermiků kombinace GC+MACS nebo SU+MACS vedla k statisticky nižší fragmentaci DNA (TUNEL test) ve srovnání s SU nebo GC samotným (Cakar et al. 2016). Delbes et al. (2013) zjistili u normozoospermiků, teratozoospermiků a astenoteratozoospermiků nižší fragmentaci DNA (TUNEL a SCSA test) po GC+MACS v porovnání s nativním ejakulátem a samotným GC. V současné studii Ješeta et al. (2018) nezjistili statisticky významné rozdíly v průměrné hodnotě fragmentace DNA (SCD test) mezi nativním

ejakulátem (30,5 %), MACS (28,7 %) a MACS+SU (22,7 %). Avšak když použili metodu SU před MACS, fragmentace se signifikantně snížila (13,8 %). Zároveň i samotná separace SU byla prokazatelně účinná (18,2 %). Úspěšné použití kombinace SU+MACS potvrzují i starší výsledky studií Chi et al. (2016) a Tavalae et al. (2012). V některých studiích se kombinují dokonce tři postupy. Bucar et al. (2015) zjistili nejvyšší pokles spermií s fragmentací DNA (TUNEL test) po MACS+GC+SU.

V klinických studiích několik autorů zaznamenalo zlepšení FR (Grunewald et al. 2009; Romany et al. 2010) a kvalitu embryí (Said et al. 2005a; Dirican et al. 2008; Sedó et al. 2010) se spermiemi po MACS ve srovnání s GC, zatímco jiné studie nenalezly žádné rozdíly v FR (Dirican et al. 2008; Sedó et al. 2010; Buzzi et al. 2010). Novější metaanalýza prokázala, že MACS nemá signifikantně pozitivní vliv na FR, kvalitu embryí, PR, IR, THBR ani počet potratů (Nadalini et al. 2011). V cyklech s darovanými oocyty metoda MACS nezlepšuje reprodukční výsledek (FR, kvalitu embryí, IR, PR, THBR) v porovnání s metodou SU (Romany et al. 2014). Troya a Zorrilla (2015) ve své studii porovnali metody ICSI, PICSI a samotný MACS. Do studie byli zařazeni infertilní normozoospermici. Mezi skupinami nebyl zjištěn rozdíl v FR ani v počtu embryí. U MACS byl zjištěn statisticky vyšší PR než u ostatních skupin.

Závěrem lze říci, že použitím metody MACS lze snížit fragmentaci DNA spermií avšak v klinických studiích se nepotvrdil významný rozdíl v parametrech úspěšnosti těhotenství.

7.2.4 Vlastní doporučení použití separačních metod

Na základě výsledků této práce je patrné, že pro volbu vhodné metody separace spermií je přínosné detekovat procento živých a apoptotických spermií v ejakulátu pomocí průtokové cytometrie a nerozhodovat se pouze na základě znalosti spermioqramu. Z předešlých zkušeností je zřejmé, že není nutné měřit apoptózu spermií v den oplození. Jde o poměrně stabilní parametr a je možné vycházet z hodnot naměřených v krátkém časovém odstupu (max. 1 měsíc) před dnem oplození. Výhodou toho je dostatek času, aby se embryolog, lékař a pacient vzájemně domluvili.

Při návržení vhodných metod separace bylo vycházeno z výsledků diplomové práce, poznatků embryologů a publikovaných výsledků studií.

1. Pro pacienty s normálními parametry spermioqramu a fyziologickým zastoupením apoptotických spermií je doporučována separace SU a GC. Metoda MACS je vhodná, pokud jí předchází separace SU nebo GC.
2. Pro pacienty s normálními parametry spermioqramu a vyšším zastoupením apoptotických spermií je vhodná metoda MFSS a SU. Kombinace metod GC+SU také vede ke zvýšení procenta živých spermií. Separace MACS je vhodná v kombinaci s GC nebo SU.
3. Pro pacienty s patologickým ejakulátem a vysokým zastoupením apoptotických spermií je vhodná metoda MFSS, případně SU.
4. Pro pacienty s vysokou fragmentací DNA je nejlepší volbou MFSS, SU, GC+MACS nebo SU+MACS.

7.3 Hodnocení kvality embryí a její vliv na úspěšnost ET

Studie zahrnovala 43 párů, které podepsali informovaný souhlas se zpracováním ejakulátu a analýzou klinických dat, která se týkala anamnézy, kvality embryí a průběhu gravidity. Všechny páry podstupovali *in vitro* oplození metodou ICSI s darovanými oocyty.

Oplození darovaných oocytů je považováno za nejvhodnější model pro sledování vlivu kvality spermií na vývoj embrya. Lze předpokládat, že kvalita darovaných oocytů bude vysoká, protože darovacího programu se účastní mladé, fertillní ženy. Kvalitní oocyt také umí opravit poškozenou DNA, přičemž tato schopnost klesá u oocytů starších žen (Meseguer et al. 2011). Mezi dárkyněmi oocytů však byly rozdíly, a ne vždy byla kvalita oocytů vynikající. Mezi počty oplozených oocytů a vzniklých embryí byly mezi páry významné rozdíly.

Celkem bylo oplozeno 314 oocytů a z nich se vyvinulo 169 kvalitních blastocyst, které bylo možno zamrazit nebo použít pro embryotransfer. Fertility rate (FR) (podíl oplozených a injikovaných oocytů) byl 94,4 %. Utilization rate (UR) (podíl počtu blastocyst a počtu oplozených oocytů) byl 55,6 %. Tyto parametry jsou srovnatelné s výsledky Marshall et al. (2017), kteří uvádějí u darovaných čerstvých oocytů po oplození metodou ICSI parametr FR 83 % a UR 50 %. K podobnému výsledku (FR 86,6 %) došli i Trokoudes et al. (2011).

Ze 43 žen mělo po embryotransferu 23 žen (53,5 %) pozitivní těhotenský test (+hCG). U 17 žen (39,5 %) byla potvrzena srdeční akce plodu. Celkem 13 žen (30,2 %) mělo pokračující graviditu. V době dokončování diplomové práce byly tyto ženy ve třetím trimestru, tedy „take home baby rate“ ještě nebyl známý. V průběhu studie potratilo 10 pacientek (23,2 %) – 6 žen po zjištění biochemické gravidity a 4 další ženy po potvrzení srdeční akce plodu.

Ve studii Yeh et al. (2015) byl pozorován podobný počet žen, které celkem potratily (17,4 %) jako v této diplomové práci.

Pro potřebu přesného porovnání vlivu kvality spermií na vývoj embrya a případně úspěšnost těhotenství bylo nutné zohlednit počet transferovaných embryí. Celkem u 20 pacientek byla transferována dvě embrya. PR (pregnancy rate) byl vypočítán jako poměr počtu žen s pozitivním hCG a celkového počtu transferovaných embryí a IR (implantation rate) byl vypočítán jako poměr celkového počtu plodů s potvrzenou srdeční akcí (+SA) a celkového počtu transferovaných embryí. Celkový PR byl 37,2 % a IR byl 23,3 %.

Tyto výsledky jsou srovnatelné s parametry, které ve své studii uvedli Trokoudes et al. (2011). U darovaných čerstvých oocytů oplozených metodou ICSI byl PR 48,8 % a IR 25,6 %.

Při transferu se používalo nejkvalitnější embryo, tedy ideálně blastocysta BL5. Statisticky se porovnal vliv kvality embryí na výsledek embryotransferu a zjistila se významná korelace mezi transferem BL5 a graviditou (+SA) ($r = 0,373$, $p < 0,001$). Transfer kvalitního embrya je považován za hlavní marker pro úspěšný PR a IR (della Ragione et al. 2007; Ahlstrom et al. 2011). Tento výsledek potvrzují i Oron et al. (2014), kteří zjistili hodnotu PR významně vyšší u kvalitních blastocyst (BL3-5) v porovnání s transferem méně kvalitních embryí (41,5 % vs. 19,2 %). Podobně Zhu et al. (2014) uvedli PR u kvalitních blastocyst (BL3-5) signifikantně vyšší než u méně kvalitních (48,0 % vs. 15,3 %) a IR také (33,7 % vs. 9,1 %).

Ačkoliv v publikacích (Toner et al. 2002; Soares et al. 2005; Gupta et al. 2012) je uváděna negativní závislost úspěšnosti transferu na věku žen i mužů, tak v diplomové práci nebyl vliv prokázán.

7.3.1 Vliv kvality spermií na vývoj embryí a úspěšnost ET

Cílem této diplomové práce bylo stanovit apoptózu a fragmentaci DNA spermií v ejakulátu použitém pro ICSI a sledovat úspěšnost cyklu. Průměrný počet živých spermií pacientů byl 53,9 %. Vyšší zastoupení apoptotických spermií (ApoHigh) se vyskytovalo nejen u pacientů s patologickým spermioqramem (u 90,0 %), ale i v poměrně vysokém počtu u normozoospermiků (21,21 %). Hlavním cílem bylo zjistit, zda se tvoří u skupiny pacientů s vysokou apoptózou spermií (ApoHigh) méně kvalitní embrya než u skupiny pacientů s nízkou apoptózou spermií (ApoLow). U skupiny ApoLow se zjistilo statisticky významně vyšší FR než u skupiny ApoHigh.

Tento výsledek je v souladu s výsledky klinických a experimentálních studií (Marchetti et al., 2004; Said et al., 2006; Grunewald et al., 2008; Jayaraman et al. 2012), ve kterých byla zjištěna negativní korelace mezi procentem apoptotických spermií a FR.

Vyšší PR a IR byl očekáván spíše u skupiny ApoLow než ApoHigh. Ale PR byl vyšší a IR byl dokonce statisticky průkazně vyšší u skupiny ApoHigh než ApoLow. U skupiny ApoLow bylo vytvořeno více kvalitních embryí (BL3–BL5) než u skupiny ApoHigh (72,2 % vs. 55,8 %). Čím kvalitnější embryo bylo použito pro embryotransfer, tím vyšší byla pravděpodobnost, že žena otěhotněla. Pacientky ve skupině ApoHigh dostaly více embryí BL4 nebo BL5 (70,8 %) než pacientky ve skupině ApoLow (51,3 %).

V souboru pacientů diplomové práce byl průměrný počet spermií s fragmentací DNA 18,2 %. Fyziologický počet spermií s fragmentací DNA (FragLow) mělo 69,77 % pacientů, vyšší počet spermií s fragmentací DNA (FragHigh) mělo 30,23 % pacientů. Mezi skupinami FragLow a FragHigh nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly v PR a IR. Počet kvalitních embryí BL3–BL5 byl u skupin FragLow a FragHigh podobný (64,6 % vs. 67,8 %), počet transferovaných BL4 a BL5 se také významně nelišil (55,0 % vs. 66,6 %). Také skupina s normálním spermioqramem měla vyšší FR, ale nižší UR než skupina s patologickým spermioqramem.

Protože tyto výsledky nepotvrdily vstupní hypotézy, bylo potřeba najít jiné vysvětlení, proč byla embrya kvalitnější u párů s méně kvalitními spermiemi. Po důkladné analýze dat bylo zjištěno, že dalším z faktorů, který ovlivnil výsledek ICSI, byla koncentrace spermií. Statisticky byla porovnána skupina SpLow (s nízkou koncentrací spermií po GC) a SpHigh (s vysokou koncentrací spermií po GC). Byl zjištěn signifikantně vyšší UR u skupiny SpLow než SpHigh (65,3 % vs. 48,0 %, $p < 0,01$). Tyto rozdíly byly nejvyšší ze všech porovnávaných skupin. U skupiny SpLow byl zjištěn také signifikantně vyšší IR než u skupiny SpHigh (39,5 % vs. 10,4 %). Počet kvalitních blastocyst BL3–BL5 byl sice u SpLow a SpHigh podobný (62,8 vs. 69,5 %), ale počet transferovaných BL4 a BL5 byl významně vyšší u SpLow (69,2 %) než u SpHigh (51,3 %).

Jedním z možných vysvětlení tohoto nálezu je, že se při GC používá standardně 1 ml ejakulátu, který se navrství na gradient separačních médií. V tomto kroku se nezohledňuje koncentrace spermií. Poté se vzorek centrifuguje. Je možné, že v případě použití nižší koncentrace spermií dojde k lepší separaci spermií, než když se použije hustý vzorek obsahující vysoký počet spermií. Centrifugace může způsobit poškození integrity spermií a zvýšení produkce ROS (Alvarez et al 1993). Kvalitní DNA je předpokladem pro úspěšný vývoj embrya vzniklého ať již přirozeným oplozením nebo pomocí metod asistované reprodukce (Aitken & Koppers 2011; Sakkas et al. 2015). Pokud je DNA poškozená působením ROS, pak může

dojít k zastavení vývoje embrya v časném stádiu těhotenství či může dojít později k potratu (Aitken & Koppers, 2011, Sakkas et al. 2015).

Dalším z možných vysvětlení je, že při mikroskopickém výběru spermií před ICSI snadněji zvolí embryolog vhodnou spermii při nižší koncentraci pohyblivých spermií. Při konzultaci s embryology však byla tato možnost zavržena s tím, že si embryologové standardně vzorek před výběrem ředí pro optimální počet spermií. Při snaze o vysvětlení tohoto paradoxu byla prověřena kvalita oocytů, zdroj oocytů, zda jev není ovlivněn některým embryologem, zda není častěji použit EmbryoScope či jiné přístupy zvyšující pravděpodobnost početí. Nepodařilo se však najít jiné vhodné vysvětlení.

Při hledání analogie v literatuře nebyla nalezena žádná studie, která by porovnávala vývoj embryí v závislosti na koncentraci spermií po GC. Autoři se především soustředili na závislost koncentrace spermií v ejakulátu. Hashimoto et al (2010) i Friedler et al. (2015) zjistili statisticky významně nižší FR u pacientů s koncentrací spermií nižší než 1 mil/ml než u pacientů s vyšší koncentrací spermií. V těchto případech jde o patologické ejakuláty (oligozoospermii). Nejistili však žádný vliv koncentrace na IR, PR a THBR. Ke stejným výsledkům došel také Arikan et al. (2012).

Vývoj embrya z velké části ovlivňuje kvalita oocyty a v této studii se vyskytlo několik párů s nižším počtem oplozených oocytů. Bohužel není možné u lidí zajistit „standardní oocyty“ jako by to bylo možné v případě zvířecích modelů. Na průběh těhotenství má také značný vliv zdravotní stav žen to, zda mají jiná systémová onemocnění nebo zda jsou léčeny např. imunomodulační léčbou apod.

V provozu embryologické laboratoře je třeba zavádět takové metodické postupy, které povedou k tvorbě nejkvalitnějších embryí. Velký význam může mít optimalizace metod separace spermií, a to i těch tradičních jako je GC. V rámci této práce se nepotvrdilo, že vyšší zastoupení apoptotických spermií zhoršuje kvalitu embryí, ale bylo zjištěno, že v případě nízké koncentrace spermií po GC byl vyšší zisk kvalitních embryí a vyšší počet těhotných žen. Ideální by bylo v další práci otestovat, zda nižší koncentrace spermií při GC přispívá k lepší separaci spermií a k tvorbě kvalitnějších embryí.

Kapitola 8

Závěr

V současnosti celosvětově klesá kvalita ejakulátu a přibývá tím více neplodných mužů. Jedním z možných řešení je pomoc center asistované reprodukce. Mezi nejdůležitější současné požadavky v oboru patří zpřesnění diagnostiky neplodných mužů a vyvinutí lepších metod pro selekci kvalitních spermií.

V úvodu této práce jsou formou literární rešerše shrnuty poznatky týkající se diagnostiky kvality ejakulátu, metod separace kvalitních spermií, *in vitro* oplození oocytů pomocí ICSI a hodnocení kvality embryí.

Diplomová práce je rozdělena na experimentální a klinickou část. Experimentálně byla pomocí průtokové cytometrie ověřena účinnost separací apoptotických spermií z ejakulátu u vybraných metod. Nejprve byla ověřována účinnost separace metodou gradientové centrifugace (GC). Statisticky průkazná korelace byla zjištěna mezi procentem živých spermií v ejakulátu a koncentrací spermií po GC a zároveň mezi procentem živých spermií v ejakulátu a procentem živých spermií po GC. Tedy čím nižší bylo procento živých spermií v ejakulátu, tím nižší byla kvalita vzorku po GC separaci. Tímto bylo prokázáno, že GC není vhodná separační metoda pro pacienty s vysokým zastoupením apoptotických spermií v ejakulátu. Experimentálně byly u podobných typů ejakulátů ověřeny alternativní metody separace (SU, MFSS, MACS). Nejlepší výsledky byly zjištěné po MFSS. Na základě experimentů a detailní literární rešerše byl navržen soubor doporučených separačních postupů u různých typů ejakulátů. Pro ověření těchto doporučení je třeba analýza většího počtu vzorků.

V klinické části studie byl sledován vztah mezi procentem živých spermií a kvalitou embryí. Obdobně jako v jiných publikacích, tak ani v této práci se neprokázalo, že vyšší procento apoptotických spermií nebo spermií s vysokou fragmentací DNA v ejakulátu statisticky průkazně snižuje počet kvalitních embryí nebo úspěšnost cyklu asistované reprodukce. Z výsledků vyplývá, že u skupiny s nízkým procentem apoptotických spermií (ApoLow) byl signifikantně vyšší parametr FR (fertilization rate), avšak ostatní parametry úspěšnosti cyklu byly vyšší u skupiny s vysokým procentem apoptotických spermií (ApoHigh). Možným vysvětlením byl vyšší počet transferů nejkvalitnějších blastocyst (BL5) u skupiny ApoHigh než u ApoLow.

Závěrem lze říci, že cytometrické vyšetření ejakulátu je kvalitní diagnostickou metodou. Získané informace o procentech živých spermií v ejakulátu mohou přispět k volbě vhodných postupů zpracování ejakulátu před *in vitro* oplozením.

Literatura

- Abassi YA, Foltz KR. 1994. Tyrosine phosphorylation of the egg receptor for sperm at fertilization. *Developmental Biology* **164**:430–443.
- Agarwal A, Said TM. 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international* **4(95)**:503-507.
- Ahlstrom A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. 2011. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Human Reproduction* **26**:3289–3296.
- Acharyya S, Kanjilal S, Bhattacharyya AK. 2005. Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian Journal of Experimental Biology* **43(11)**:1016–22.
- Aitken RJ, Baker MA. 2013. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contribution to infertility and impacts on development. *The International Journal of Developmental Biology* **57**:265-272.
- Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. 2005. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *International Journal of Andrology* **28(3)**:171-9.
- Aitken RJ, Clarkson JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction & Infertility* **81**:459-69.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **16**:3-13.
- Aitken RJ, Koppers AJ. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, **13**:36-42.
- Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. 1993. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reproduction* **8(7)**:1087-92.
- Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. 2012. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **6(9)**:1451–1453.

- Arikan II, Demir B, Bozdog G, Esinler I, Sokmensuer LK. 2012. ICSI cycle outcomes in oligozoospermia. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology* **39**:280-282.
- Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB. 2010. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. 2007. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility* **87**(1):93-100.
- Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. 2004. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **3**:CD004507.
- Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL. 2006. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction* **21**(3):685-93.
- Bucar S, Goncalves A, Rocha E, Barros A, Sousa M, Sa R. 2015. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **32**(1):147-54.
- Buzzi J, Valcarcel A, Lombardi E, Oses R, Rawe V, Young E. 2010. Magnetic activated cell sorting (MACS) improves oocyte donation results associated to severe male factor infertility. *Human Reproduction* **25**(1):118-52.
- Cakar Z, Cetinkaya B, Aras D, Ozkavukcu S, Kaplanoglu I, Cinar O. 2016. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **33**(8):1059-65.
- Cissen M, Vonwely M, Scholten I. 2016. Measuring Sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: a systematic review and meta-analyses. *Plos One* **11**(11):e0165125.
- Citterbart K, et al. 2001. *Gynekologie*. Galén, Praha.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. 2008. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with *in vitro* fertilization? *Fertility and Sterility* **89**(4):823-31.
- Čapková J, Kubátová A, Děd L, Teplá O, Pěkníková J. 2016. Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. *Asian Journal of Andrology* **18**(1):108-13.
- Český statistický úřad. 2017. Odbor statistiky obyvatelstva, Demografická ročenka České republiky 2016. Praha.
- Daneshmandpour Y, Pashazadeh F, Ansari F, Bahmanpour Z, Sakhinia E, Yousefi M. 2018. Comparison between sperm sorting techniques effect on DNA fragmentation and aneuploidy: a systematic review and network meta-analysis. 2nd International Congress on Biomedicine Tehran, Iran.

-
- Delbes G, Herrero MB, Troeung ET, Chan PT. 2013. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* **1(5)**:698–706.
 - della Ragione T, Verheyen G, Papanikolaou EG, Van Landuyt L, Devroey P, Van Steirteghem A. 2007. Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology* **5**:2.
 - De Vantéry Arrighi C, Hervé L, Chardonnens D, Agostini A. 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:1–12.
 - Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. 2003. Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* **35(5)**:283-287.
 - Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Ugurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. 2008. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of nonapoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **25(8)**:375–81.
 - Doherty CM, Clark MM. 2006. *Léčba neplodnosti*. Computer Press, Brno.
 - Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB. 2005. EAU Guidelines on Male Infertility. *European Urology* **48(5)**:703-711.
 - Dostál J. 2012. *Průvodce k pochopení poruch plodnosti*. Praha
 - Dunkel L, Hirvonen V, Erkkilä K. 1997. Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death & Differentiation* **4(3)**:171-9.
 - Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome:a prospective cohort study. *Human Reproduction* **17(12)**:3122–8.
 - Dvorská M, Driák D, Švadnová I. 2008. Apoptóza v gynekologii a porodnictví (část II, metody detekce). *Gynekolog* **17**:182-186.
 - Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pölz W, Tews G. 2001. Embryo fragmentation *in vitro* and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility and Sterility* **76**:281–285.
 - Eckschlager T. 1999. *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Grada Publishing, Praha.
 - Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**:495-516.

- Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez GJ, Sabanegh ES, Agarwal A. 2012. Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology* **79**:16-22.
- Evenson DP. 2016. The sperm chromatin structure assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* **169**:56–75.
- Evenson DP, Jost LK, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* **14**(4):1039–49.
- Evers JL. 2002. Female subfertility. *Lancet* **360**:151-159.
- Freund, M. 1966. Standards for the rating of human sperm morphology. *International Journal of Fertility and Sterility* **11**:97-118.
- Friedler S, Cohen O, Liberty G, Saar-Ryss B, Latzer T. 2015. The Influence of Sperm Concentration in the Ejaculate Used for ICSI on the Outcome of the ART Cycle. *Andrology* **4**:146.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G. 2004. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction* **19**(6):1409–17.
- Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R, Checa MA. 2013. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **30**:479-485.
- Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. 1992. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetics*, **89**:181-186.
- Gervais L, de Rooij N, Delamarche E. 2011. Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics. *Advanced Materials* **23**:H151–H176.
- González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. 2012. Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **13**(12):14026-14052.
- Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. 2015. Executive summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews* **36**:593–602.
- Graham JK. 2001. Assessment of Sperm Quality. *AAEP Proceedings* **47**:302-305.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. 1995. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* **21**:1465-1468.

-
- Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Sai TM, Agarwal A, Abu Hmeidan F, Glander HJ, Paasch U. 2009. Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertility and Sterility* **92(2)**:572–77.
 - Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V. 2010. Effects of post-density gradient swim-up on apoptosis signalling in human spermatozoa. *Andrologia* **42**:127–31.
 - Gupta P, Banker M, Patel P, Joshi B. 2012. A study of recipient related predictors of success in oocyte donation program. *Journal of Human Reproductive Sciences* **5(3)**: 252–257.
 - Gurkan UA, Tasoglu S, Akkaynak D, Avci O, Unluisler S, Canikyan S, Maccallum N, Demirci U. 2012. Smart interface materials integrated with microfluidics for on-demand local capture and release of cells. *Advanced Healthcare Materials* **1(5)**:661–668.
 - Hart SP, Dransfield I, Rossi AG. 2008. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods* **44**:280–285.
 - Hashimoto H, Ishikawa T, Goto S, Koikeguchi S, Fujisawa M, et al. 2010. The effects of severity of oligozoospermia on Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycle outcome. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **56**:91-95.
 - Hašlík L. 2013. Těhotenství po čtyřicítce. *Postgraduální medicína* **15(1)**:13 - 15.
 - Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* **81**:965–72.
 - Henry CM, Hollville E, Martin SJ. 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* **61**:90-97.
 - Herrero MB, Delbes G, Troueng E, Holzer H, Chan PTK. 2012. Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. *Human Reproduction* **27(2)**:121–50.
 - Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yeppez S, Livingston EH. 2007. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* **139**:143-156.
 - Charriaut-Marlangue CA, Ben-Ari Y. 1995. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* **29**:61-64.
 - Chi HJ, Kwak SJ, Kim SG, Kim YY, Park JY, Yoo ChS, Park IH, Sun HG, Kim JW, Lee KH. 2016. Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* **43(4)**:199-206.
 - Chiu YH, Gaskins AJ, Williams PL, Mendiola J, Jorgensen N, Levine H, Hauser R, Swan SH, Chavarro JE. 2016. Intake of fruits and vegetables with low-to-moderate

pesticide residues is positively associated with semen-quality parameters among young healthy men. *Journal of Nutrition* **146**:1084–1092.

- Cho BS, Schuster TG, Zhu X, Chang D, Smith GD, Takayama S. 2003. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Analytical Chemistry* **75(7)**:1671-5.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey W. 2004. A Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Sperm Concentration and Viability in Mammalian and Avian Semen. *Journal of Andrology* **25**:255-264.
- Chung Y, Zhu X, Gu W, Smith GD, Takayama S. 2006. Microscale integrated sperm sorter. *Methods in Molecular Biology* **321**:227–244.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* **21**:33-44.
- Jackson RE, Bormann CL, Pericles AH. 2010. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* **94(7)**:2626–30.
- Jayaraman V, Upadhy D, Narayan PK, Adiga SK. 2012. The sperm processing by swim-up and density gradient is effective in the elimination of the sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29(6)**:557-63.
- Jensen TK, Heitmann BL, Blomberg Jensen M, Halldorsson TI, Andersson AM, Skakkebaek NE, Joensen UN, Lauritsen MP, Christiansen P, Dalgard C. 2013. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**:411–418.
- Jeřeta M, Boženková E, Žáčková J, Ventruba P, Crha I, Lousová E, Coufalová P, Kempisty B. 2018. Magnetic-Activated Cell Sorting in Combination with Swim-Up Efficiency Improve Effectivity of Spermatozoa Separation. *Medical Journal of Cell Biology* **6(2)**:55-60.
- Jones KT. 2007. Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **34**:1084–1089.
- Joux F, Lebaron P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and infection* **2**:1523-1535.
- Katz DF, Morales P, Samuels SJ, Overstreet JW. 1990. Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertility and Sterility* **54**:513–516.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. 2012. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29**:565-572.

-
- Kishi K, Ogata H, Ogata S, Mizusawa Y, Okamoto E, Matsumoto Y. 2015. Frequency of sperm DNA fragmentation according to selection method: Comparison and relevance of a microfluidic device and a swim-up procedure. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**:QC14-6.
 - Klika E. 1985. Embryologie člověka. Obecná embryologie a teratologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
 - Konečná H. 2003. Na cestě za dítětem. Dvě malá křídla. Academica, Praha.
 - Koschin F. 2000. Demografie poprvé. VŠE, Praha.
 - Koyama S, Amarie D, Soini HA, Novotný MV, Jacobson SC. 2006. Chemotaxis assays of mouse sperm on microfluidic devices. *Analytical Chemistry* **78**(10):3354-9.
 - Krátká Z. 2017. Kvalita DNA ve spermiích je negativně ovlivněna věkem mužů a je rizikovým faktorem početí. *Česká gynekologie* **82**(6):491-495.
 - Krátká Z, Luxová Š, Vik V. 2017. Využití průtokové cytometrie pro stanovení kvality ejakulátu u mužů s poruchou reprodukce. *Česká urologie* **21**(4):277-285.
 - Kubíček V. 1998. Základy spermiologie. *Gynekolog* **51**:224-230.
 - Kubíček, V. 2010. Spermatologické vyšetření. *Urologie pro praxi* (4):204-210
 - Kubíček V. 2018. Mužská neplodnost: v Evropě jsou ignorována i doporučení WHO. Terapie. Available from: <http://terapie.digital/medicina/aktuality-z-mediciny/muzska-neplodnost-v-evrope-jsou-ignorovana-i-doporuceni-who.html> (accessed January 2019)
 - Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology* **171**:4672-4679.
 - Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, et al. 2010. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Human Reproduction* **25**(4):839-46.
 - Lestari SW, Sari T, Pujianto DA. 2016. Sperm DNA Fragmentation and Apoptosis Levels: A Comparison of the Swim up and the Density Gradient Centrifugation Methods for Sperm Preparation. *Journal of Biological Sciences* **16**(4):152-158.
 - Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R, Swan SH. 2017. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* **23**(6):646-659.
 - Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **54**:111-25.
 - Lin MH, Kuo-Kuang RL, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. 2008. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility* **90**(2):352-9.

- Losada C, Ortega I, Pacheco A, Bronet F. 2012. Can MACS as a sperm preparation technique improve clinic results in patients with Kartagener syndrome? *Human Reproduction* **27(2)**:162–205
- Madár J, Ulčová–Gallová Z. 2016. *Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce – vybrané kapitoly*. Mladá fronta, Praha.
- Machaca K. 2007. Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology* **213**:331–340.
- Makker K, Agarwal A, Sharma RK. 2008. Magnetic activated cell sorting (MACS) Utility in assisted reproduction. *Indian Journal of Experimental Biology* **46**:491–7.
- Malinský J, Lichnovský V. 2003. *Přehled Embryologie člověka v obrazech*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. 2014. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**:121.
- Mardešić T. 2013. *Diagnostika a léčba poruch plodnosti*. Grada, Praha.
- Mardešić T, Ptáček R, Bartůněk P. 2016. *Kontroverze současné medicíny – Edice celoživotního vzdělávání ČLK*. Mladá fronta, Praha.
- Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. 2010. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: Comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **151**:176–180.
- Marchetti C, Gallego MA, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. 2004. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Human Reproduction* **19**:1127–34.
- Marinov I. 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Triton, Praha.
- Marshal LA, Lamb JD, Khabani A, Khabani C, Shahine LK. 2017. Fertilization and blastulation success of vitrified donor oocytes is consistently as high as with fresh oocytes in a program which vitrifies, warms, inseminates and cultures its own donor oocytes. *Fertility and Sterility* **107(3)**:18.
- Matás C, Vieira L, García-Vázquez FA, Avilés-López K, López-Úbeda R, Carvajal JA, Gadea J. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal Reproduction Science* **127(1-2)**:62–72.
- Matsuda Y, Tobarí L. 1988. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized *in vitro* with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfate (MMS and EMS). *Mutation Research* **198**:131–144.
- McLachlan MI. 2002. Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men. *Journal of Reproductive Immunology* **57**:35–45.

-
- Meseguer M, Santiso R, Harrero S, Remohi J, Fernandez JL. 2011. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility* **95(1)**:124–128.
 - Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11(2)**:231-238.
 - Miščíková N. 2016. *In Vitro* fertilization (IVF) and the other methods of assisted reproduction [BSc. Thesis]. University of Jan Evangelista Purkyně, Ústí nad Labem.
 - Mortimer D, Leslie EE, Kelly RW, Templeton AA. 1982. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility* **64**:391–399.
 - Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* **3**:403– 439.
 - Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ. 2006. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* **85(2)**:371–83.
 - Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M, Borini A. 2014. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31(8)**:1045-51.
 - Nordkap L, Jensen TK, Hansen AM, Lassen TH, Bang AK, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Skakkebaek NE, Jorgensen N. 2016. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertility and Sterility* **105**:174–187.
 - Novotná B, Svobodová L, Čechová M. 2016. Naše první zkušenosti s využitím komotového testu při hodnocení integrity DNA ve spermích. *Česká Urologie* **20(4)**:317–325.
 - Oguz Y, Guler I, Erdem A, Mutlu MF, Gumuslu S, Oktem M, Bozkurt N, Erdem M. 2018. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **35(6)**:1083-1089.
 - Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg EK. 2000. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility* **74(2)**: 245–250.
 - Oron G, Son WY, Buckett W, Tulandi T, Holzer H. 2014. The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study. *Human Reproduction* **29(7)**:1444–1451.
 - Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H. 1987. Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Archives of Andrology* **19(1)**:85-93.

- Perez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Acuña O, Aviles M, Coy P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A. 2017. The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biology of Reproduction* **98(3)**:262-276.
- Pěkníková J, Chládek, D, Hozák, P. 2005. Monoclonal antibodies against sperm intracrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol* **53**:42-49.
- Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, Rosen MP. 2018. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human Reproduction* **33**:1388–1393.
- Ramakrishnan S, Balasubramanyam S, Amita S, Kumar P. 2017. Sperm preparation by microfluidic sperm sorter (MFSS) - Comparison of DNA fragmentation index, embryo quality, clinical pregnancy rate and implantation rates with density gradient centrifugation. 33rd Annual Meeting of ESHRE Geneva, Switzerland.
- Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S. 2009. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertility and Sterility* **91**:632–8.
- Rizvi I, Gurkan UA, Tasoglu S, Alagic N, Celli JP, Mensah LB, Mai Z, Demirci U, Hasan T. 2013. Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110(22)**:E1974-83.
- Rob L, Martan A, Citterbart K. 2008. *Gynekologie*. Galen, Praha.
- Romany L, Garrido N, Motato Y, Belén A, Remohí J, Meseguer M. 2014. Removal of annexin V - positive cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and Sterility* **102(6)**:1567-75.
- Romany L, Meseguer M, García-Herrero S, Garrido N. 2015. Magnetic activated sorting of non-apoptotic sperm result in improved embryo quality in ovum donation cycles with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* **25(1)**:8.
- Rose NR, Hjort T, Rimke P, Harper MJK, Vyazov O. 1976. Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clinical and Experimental Immunology* **23**:175-199.
- Rumpík D. 2014. Neplodnost je krize, která nemá hranice. *Lékařské listy Plus*, Praha. Available from: <https://www.ivf-zlin.cz/25908n-neplodnost-je-krize-ktera-nema-hranice> (accessed February 2019).
- Řežábek K. 2014. *Asistovaná reprodukce*. Maxdorf, Praha.
- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. 2006. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for

enhancing assisted reproduction outcomes: an *in vitro* model. *Biology of Reproduction* **74**:530–7.

- Said TM, Agarwal A, Zborowski M. 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology* **29**:134–42.
- Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. 2005a. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reproductive BioMedicine* **10**:740–6.
- Said TM, Grunewald S, Paasch U. 2005b. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertility and Sterility* **83**:1442–6.
- Said TM, Land JA. 2011. Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update* **17**:719–33.
- Saiz IC, Pons Gatell MC, Vargas MC, Mendive AD, Enedáguila NR, Solanes MM, Canal BC, López JT, Bonet AB. 2018. The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica* **5**(1):42–54.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D. 2000. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction* **15**:1112–6.
- Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. 2015. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Human Reproduction Update* **21**(6):711–726.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D. 2003. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine* **7**(4):428–32.
- Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK. 2002. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* **78**(2):313–318.
- Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M. 1999. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Human Reproduction Update* **5**:293–301.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *Journal of Biological Chemistry* **264**:13840–13847.
- Sathananthan H, Soon-Chye NG, Brongso A, Trounson A, Ratnam S. 1993. *Visual Atlas of Early Human Development for Assisted Reproductive Technology*. National University of Singapore, Singapore.

- Saymé N, Sollmann K, Maas DHA, Krebs T. 2013. The effect of hyaluronic acid coated petri dish sperm selection (PICSI) on fertilisation rate, embryo development and pregnancy rate and relationship to sperm quality in an IVF program. *Fertility and Sterility* **100**:3.
- Sedó Alvares C, Uriondo H, Lavolpe M, Noblia F, Papier S, Nodar F. 2010. Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. *Fertility and Sterility* **94**(4):S232.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, Van Wely M, Cao J, Martini AC, Eskandar M. 2013. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human Reproduction Update* **19**:221–231.
- Shai S, Roudebush W, Powers D, Dirnfeld M, Lamb DJ. 2005. A multicenter study evaluating the flowcytometric-based kit for semen analysis. *Fertility and Sterility* **83**:1034–1038.
- Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Talwar P, Sharma RK, Dhawan A. 2009. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. *Mutation Research* **665**:29–36.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ. 2002. Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility* **77**:873–82.
- Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. 2016. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization Laboratory methods for the examination of human semen. *European Urology*. **70**:635–645
- Shirota K, Yotsumoto F, Itoh H, Obama H, Hidaka N, Nakajima K. 2016. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and Sterility* **105**:315–21.
- Schenken RS, Guzick DS. 1997. Revised endometriosis classification. *Fertility and Sterility* **67**:815–816.
- Schulte RT, Chung YK, Ohl DA, Takayama S, Smith GD. 2007. Microfluidic sperm sorting device provides a novel method for selecting motile sperm with higher DNA integrity. *Fertility and Sterility* **88**:S76.
- Schultz DR, Harrington WJ. 2003. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **32**:345–369.
- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carell DT. 2017. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian Journal of Andrology* **19**:80–90.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, Jensen TK, Jorgensen N, Swan SH, Sapra KJ. 2016. Male reproductive

disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiological Reviews* **96**:55–97.

- Soares SR, Troncoso C, Bosch E. 2005. Age and uterine receptiveness: Predicting the outcome of Oocyte donation cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**:4399–404.
- SOP 001. 2017. Stanovení spermiogramu makro- a mikroskopicky. Laboratoř IVF GENNET, Praha.
- SOP 003. 2017. Odběr oocytů, *in vitro* fertilizace, kultivace embryí, embryotransfer. Laboratoř IVF GENNET, Praha.
- SOP 302. 2017. Cytometrické metody. Laboratoř Imunologie GENNET, Praha.
- Steger K, Cavalcanti MC, Schuppe HC. 2010. Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. *International Journal of Andrology* **34**(6):513-27.
- Stricker SA. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology* **211**:157–176.
- Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* **110**:1295-1302.
- Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction* **127**:431-439.
- Talbert, LM, Hammond MG, Halme J. 1987. Semen parameters and fertilization of human oocytes *in vitro*: a multivariable analysis. *Fertility and Sterility* **48**:270-277.
- Tamler R, Leroith D. 2007. *Andrology – An Issue of Endocrinology and Metabolism Clinics*. Saunders, New York.
- Tasoglu S, Gurkan UA, Wang S, Demirci U. 2013a. Manipulating biological agents and cells in micro-scale volumes for applications in medicine. *Chemical Society Reviews* **42**(13):5788-808.
- Tasoglu S, Safaee H, Zhang X, Kingsley JL, Catalano PN, Gurkan UA, Nureddin A, Kayaalp E, Anchan RM, Maas RL. 2013b. Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small* **9**:3374–3384.
- Tasoglu S, Katz DF, Szeri AJ. 2012. Transient spreading and swelling behavior of a gel deploying an anti-HIV topical microbicide. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* **187-188**:36-42.
- Tauwinklová G. 2000. Mikromanipulační techniky. *Postgraduální medicína* **2**:491-497.

- Tavalae M, Deemeh, MR, Arbabian M, Nasr-Esfahani MH. 2012. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29(1)**:31–8.
- Thiruppathiraja C, Behr B, Demirci U. 2016. Microfluidic sperm sorting device for selection of functional human sperm for IUI application. *Fertility and Sterility* **105(2)**:17–18.
- Thonneau P, Marchand S, Tallec A. 1991. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Human Reproduction* **6**:811-816.
- Toner JP, Grainger DA, Frazier LM. 2002. Clinical outcomes among recipients of donated eggs: An analysis of the U.S. national experience, 1996–1998. *Fertility and Sterility* **78**:1038–45.
- Trávník P. 1990. Oplození *in vitro* a kultivace embryí. Masarykova univerzita, Brno.
- Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. 2011. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility* **95(6)**:1996–2000.
- Troya J, Zorilla I. 2015. Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. *JBRA Assisted Reproduction* **19(2)**:66-69.
- Turley E, Moore D. 1984. Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **121**:808-814.
- Ulčová-Gallová Z, Lošan P. 2013. Neplodnosti útok imunity. Grada, Praha
- Vácha M. 2017. Asistovaná reprodukce a preimplantační diagnostika: etické problémy zůstávají a nové vznikají. *Česko-slovenská pediatrie* **72(6)**:361–367.
- Vávrová J, Stulík J, Mareková M, Vokurková D. 2002. Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. *Vojenská lékařská akademie J.E. Purkyně, Hradec Králové*.
- Veeck LL, Zaninovic N. 2003. An atlas of human blastocysts. Parthenon Publisher, New York.
- Ventruba P, Ješeta M, Žáková J, Kempisty B, Chmelíková E, Crha I. 2018. Magnet Activated Cell Sorting Method in Sperm Selection and Their Benefit in Human Assisted Reproduction. *Biomedical journal of scientific & technical research* **6(4)**:1-2.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods* **184**:39–51.

-
- Verpoorte E. 2002. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* **23(5)**:677–712.
 - Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D’Agata R, Calogero AE. 2002. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Human Reproduction* **17(8)**:2128–33.
 - Vieira M. 2013. New World Health Organization reference values for semen analysis : where do we stand?. *Einstein* **11**:263-264.
 - Wang C, Swerdloff RS. 2014. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility* **102**:1502–1507.
 - Wald, M. 2005. Male infertility: Causes and cures. *Sexuality, Reproduction and Menopause* **3**:83-87
 - Wang S, Tasoglu S, Chen PZ, Chen M, Akbas R, Wach S, Ozdemir CI, Gurkan UA, Giguel FF, Kuritzkes DR, Demirci U. 2014. Micro-a-fluidics ELISA for rapid CD4 cell count at the point-of-care. *Scientific Reports* **4**:3796.
 - Weiss P. 2010. *Sexuologie*. Grada, Praha.
 - Whitesides GM. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442(7101)**:368-73.
 - Winkle T, Ditzel N, Gagsteiger F. 2006. Possibilities of sperm isolation by the MACS-System. *Fertility and Sterility* **86(2)**:130–131.
 - Wolff H. 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility* **63**:1143-1157.
 - Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. 2010. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology* **28**:1115–1121.
 - World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination of human semen. 5th ed. Geneva.
 - WorriLOW KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J. 2013. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes—multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Human Reproduction* **28(2)**:306-14.
 - Wu DY, Patti-Diaz L, Hill CG. 2010. Development and validation of flow cytometry methods for pharmacodynamic clinical biomarkers. *Bioanalysis* **2**:1617-1626.
 - Xie L, Ma R, Han C, Su K, Zhang Q, Qiu T, Wang L, Huang G, Qiao J, Wang J, Cheng J. 2010. Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. *Clinical Chemistry* **56(8)**:1270-8.

- Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, Guo BZ, Qin Z. 2014. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31**:1161–1166.
- Yamanaka M, Tomita K, Hashimoto S, Matsumoto H, Satoh M, Kato H, Hosoi Y, Inoue M, Nakaoka Y, Morimoto Y. 2016. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *Journal of Reproduction and Development* **62(6)**:599–606.
- Yanagishita M. 1994. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *Proteoglycans* **70**:179-190.
- Yeh JS, Steward RG, Dude AM, Shah AA, Goldfarb JM, Muasher SJ. 2014. Pregnancy rates in donor oocyte cycles compared to similar autologous *in vitro* fertilization cycles: an analysis of 26,457 fresh cycles from the society for assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility* **102(2)**:399-404.
- Yerram N, Sandlow JI, Brannigan RE. 2012. Clinical Implications of the New 2010 WHO Reference Ranges for Human Semen Characteristics. *Journal of Andrology* **33**:289-290.
- Yeste M, Jones C, Amdani SN, Patel S, Coward K. 2015. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Human Reproduction Update* **22(1)**:23-47.
- Yetkinel S, Kilicdag EB, Aytac PC, Haydardedeoglu B, Erhan Simsek E, Cok T. 2018. Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **12**.
- Young Obejero E, De Caro R, Marconi G, Lomardi E, Young E, Tiveron M, Valcarcel A. 2010. Reproductive outcome using Annexin V columns for nonapoptotic sperm selection. *Human Reproduction* **25(1)**:6–9.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility* **92**:1520-1524.
- Zhang MH, Zhang AD, Shi ZD, Wang LG, Qiu Y. 2015. Changes in levels of seminal nitric oxide synthase, macrophage migration inhibitory factor, sperm DNA integrity and caspase-3 in fertile men after scrotal heat stress. *Plos One* **10**:e0141320.
- Zhang X, Khimji I, Gurkan UA, Safaee H, Catalano PN, Keles HO, Kayaalp E, Demirci U. 2011. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab on a Chip* **11**:2535–2540.
- Zhu J, Lian Y, Li M, Chen L, Liu P. 2014. Does IVF cleavage stage embryo quality affect pregnancy complications and neonatal outcomes in singleton gestations after double embryo transfers? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31(12)**:1635–164.

-
- Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. 2000. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* **56**:1081–4.

Seznam zkratek

- (A) Astenozoospermie
- (ApoHigh) Pacienti s vysokým zastoupením apoptotických spermií (<50 % živých spermií)
- (ApoLow) Pacienti s nízkým zastoupením apoptotických spermií (>50 % živých spermií)
- (AT) Astenoteratozoospermie
- (BG) Biochemická Gravidita
- (BL) Blastocysta
- (BMI) Body Mass Index
- (CMV) Cyto-Megalovirus
- (DEG) Degenerovaný
- (DNA) Deoxyribonucleic Acid
- (dUTP) 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
- (ET) Embryotransfer
- (FITC) Fluorescein Isothiokyanát
- (FR) Fertility rate
- (FragHigh) Pacienti s vysokým zastoupením spermií s fragmentací DNA (>20 %)
- (FragLow) Pacienti s nízkým zastoupením spermií s fragmentovanou DNA (<20 %)
- (FSC) Forward scatter
- (G1-4) Grade
- (GC) Gradientová centrifugace
- (GV) Germinal Vesicle
- (GVBD) Germinal vesicle breakdown
- (HA) Hyaluronan

- (HBsAg) Hepatitis B surface Antigen
- (hCG) Humánní choriový gonadotropin
- (HCV) Hepatitis C Virus
- (HIV) Human Immunodeficiency Virus
- (ICSI) Intracytoplasmic Sperm Injection
- (IBT) Immunobead test
- (IgA) Imunoglobulin A
- (IgG) Imunoglobulin G
- (IgM) Imunoglobulin M
- (IR) Implantation rate
- (IVF) *In vitro* fertilizace
- (IUI) Intrauterinní inseminace
- (KET) Kryoembryotransfer
- (M) Morula
- (MAR) Mixed Anti-immunoglobulin Reaction
- (M1) Metafáze I
- (M2) Metafáze II
- (MACS) Magnetická separace apoptotických spermií
- (MFSS) Microfluidic Sperm System
- (O) Oligozoospermie
- (OAT) Oligoastenoteratozoospermie
- (OT) Oligoteratozoospermie
- (PB) Pólové tělísko
- (PBS) Phosphate Buffered Saline
- (PI) Propidium jodid
- (PICSI) Preselected Intracytoplasmic Sperm Injection
- (PN) Prvojádro
- (PP) Perivitelinní prostor

(PR) Pregnancy rate

(PS) Fosfatidylserin

(ROS) Reaktivní formy kyslíku

(SA) Srdeční akce

(SCSA) Sperm chromatin structure assay

(SM) Sperm Medium

(SOP) Standard Operation Procedure (Standardní pracovní postup)

(SpHigh) Pacienti s koncentrací spermií po gradientové centrifugaci vyšší než 10 mil/ml

(SpLow) Pacienti s koncentrací spermií po gradientové centrifugaci nižší než 10 mil/ml

(SSC) Sideward scatter

(SU) Swim-up

(T) Teratozoospermie

(TdT) Terminální deoxynukleotidyl transferáza

(THBR) Take-home baby rate

(TUNEL) Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling

(UR) Utilization rate

(UZ) Ultrazvukové vyšetření

(WHO) World Health Organization

(ZP) Zona pellucida

Seznam obrázků

3.1	Prevalence světového výskytu primární neplodnosti žen ve věku 20-44 let (2010)	6
3.2	Prevalence světového výskytu sekundární neplodnosti žen ve věku 20-44 let (2010)	6
3.3	Průměrný věk matky při narození dítěte v krajích v roce 2017 (ČSÚ)	7
3.4	Prevalence světového výskytu mužské neplodnosti (2017)	8
3.5	Základní morfologické znaky a rozměry spermie	12
3.6	Princip fluidního systému průtokového cytometru	14
3.7	Princip stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií pomocí Annexin V/ PI assay	15
3.8	Princip metody stanovení fragmentace DNA - TUNEL	17
4.1	Stádia zrání: A - GV; B - M1 oocyt (metafáze I); C - M2 oocyt (metafáze II)	22
4.2	ICSI - Intracytoplasmic Sperm Injection	23
4.3	Dekondenzace hlavičky spermie a tvorba prvojader	25
4.4	Vývoj embrya: A - 2-bun.; B - 4-bun.; C - 8-bun.; D - morula; E - blastocysta	30
5.1	Design experimentu	32
5.2	Metoda gradientové centrifugace	35
5.3	Swim-up metoda separace spermií	36
5.4	Metoda magnetická separace apoptotických spermií (MACS)	37
5.5	Metoda Microfluidic Sperm Sorting (MFSS)	38
5.6	Reprezentativní graf z analýzy stanovení živých, apoptotických a mrtvých spermií pomocí Annexin V/ PI assay	39
5.7	Reprezentativní graf z analýzy stanovení fragmentace DNA TUNEL	40
6.1	Schéma výsledků ET	55

Seznam grafů

1	Celkový počet porodů dle věkových skupin otců v letech 2007-2017 (ČSÚ) . . .	7
2	Věkové zastoupení žen	33
3	Věkové zastoupení mužů	34
4	Výsledky spermogramů	41
5	Průměrné procentuální zastoupení živých spermií v různých věkových skupinách	42
6	Zastoupení vzorků s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) počtem apoptotických spermií u normozoospermiků a pacientů s patologickým spermogramem	42
7	Průměrný počet spermií s fragmentací DNA v různých věkových skupinách .	43
8	Závislost počtu spermií s fragmentací DNA na počtu apoptotických spermií .	44
9	Procento živých spermií před a po separaci gradientovou centrifugací	46
10	Procento pozdně apoptotických spermií před/po separaci gradientovou centrifugací	46
11	Procento časně apoptotických spermií před a po separaci gradientovou centrifugací	47
12	Počet zaniklých embryí do stádia blastocysty	53
13	Přehled transferovaných embryí	54
14	Zastoupení gravidit, potratů, biochemických gravidit u pacientek	54
15	Přehled transferovaných embryí u gravidních partnerek	56

Seznam tabulek

3.1	Vývoj referenčních hodnot parametrů spermogramu podle WHO	9
3.2	Závěry hodnocení spermogramu (WHO 2010)	13
4.1	Vyhodnocení oplozených oocytů v den 1	25
4.2	Hodnocení kvality embryí	26
4.3	Hodnocení moruly	26
4.4	Hodnocení blastocysty	27
4.5	Hodnocení embryoblastu a trofoblastu u blastocysty	27
6.1	Korelace % živých spermií v ejakulátu s parametry spermogramu	43
6.2	Porovnání hodnot spermogramu a cytometrického vyšetření spermií u skupin s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením spermií v ejakulátu	45
6.3	Korelace mezi % živých spermií po GC a parametry spermogramu a hodnotami cytometrického vyšetření ejakulátu	47
6.4	Porovnání průměrného % živých spermií v ejakulátu a vzorku po gradientové separaci u pacientů ze skupin ApoLow, ApoHigh, normozoospermiků a pacientů s patologickým ejakulátem	48
6.5	Korelace % živých spermií v ejakulátu s koncentrací spermií a % živých spermií po gradientové centrifugaci	49
6.6	Porovnání GC a SU separací - charakteristika souboru a změny % živých spermií po separacích GC a SU	50
6.7	Porovnání počtu živých spermií po separaci GC a SU pomocí párového t-testu.	50
6.8	Porovnání MACS a MFSS separací – charakteristika souboru a % živých spermií před a po separacích	51
6.9	Porovnání počtu živých spermií po separaci MFSS a MACS pomocí párového t-testu	51
6.10	Porovnání GC a MACS separací – charakteristika souboru a % živých spermií před a po separacích.	52
6.11	Přehled kvalitních embryí	53
6.12	Vliv věku partnerů na +hCG a graviditu	55
6.13	Vliv kvality transferovaného embrya na úspěšnosti +hCG a gravidity	56
6.14	Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti <i>in vitro</i> oplození u partnerek normozoospermiků a pacientů s patologickým spermogramem	57

6.15	Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem	58
6.16	Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem	58
6.17	Přehled kvalitních embryí použitých pro ET - porovnání pacientů s normálním a patologickým spermioqramem	59
6.18	Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti <i>in vitro</i> oplození u partnerek pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií	60
6.19	Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií	60
6.20	Přehled kvalitních embryí (zamrazené + transferované) - porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií	61
6.21	Přehled kvalitních embryí použitých pro ET - porovnání pacientů s nízkým (ApoLow) a vysokým (ApoHigh) zastoupením apoptotických spermií	61
6.22	Přehled klinických dat u párů ze skupin ApoLow a ApoHigh	61
6.23	Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti <i>in vitro</i> oplození u skupin pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA	62
6.24	Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA	63
6.25	Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA	63
6.26	Přehled kvalitních transferovaných embryí - porovnání pacientů s nízkým (FragLow) a vysokým (FragHigh) zastoupením spermií s fragmentovanou DNA	64
6.27	Přehled klinických dat u párů ze skupin FragLow a FragHigh.	64
6.28	Koncentrace spermií a fragmentace DNA u skupiny s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po GC	65
6.29	Průměrné hodnoty parametrů úspěšnosti <i>in vitro</i> oplození u partnerek pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci	65
6.30	Přehled zaniklých embryí – porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.	65
6.31	Přehled kvalitních embryí (zamrazených + transferovaných) - porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.	66
6.32	Přehled kvalitních transferovaných embryí - porovnání pacientů s nízkou (SpLow) a vysokou (SpHigh) koncentrací spermií po gradientové centrifugaci.	66