

VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO STANOVENÍ KVALITY EJAKULÁTU U MUŽŮ S PORUCHOU REPRODUKCE

Flow cytometry analysis of sperm quality in sub-fertile men

Zuzana Krátká¹, Štěpánka Luxová¹, Viktor Vik²

¹Imunologická laboratoř GENNET, s. r. o., Praha

²Andrologie a urologie GENNET, s. r. o., Praha

Došlo: 25. 10. 2017

Přijato: 16. 11. 2017

Kontaktní adresa:

RNDr. Zuzana Krátká, Ph.D.

Imunologická laboratoř GENNET, s. r. o.

Na Poříčí 26, 110 00 Praha 1

e-mail: zuzana.kratka@gennet.cz

Střet zájmů: žádný

Prohlášení o podpoře:

Autor prohlašuje, že zpracování článku nebylo podpořeno farmaceutickou firmou.

SOUHRN

Krátká Z, Luxová S, Vik V. Využití průtokové cytometrie pro stanovení kvality ejakulátu u mužů s poruchou reprodukce.

Hlavní stanovisko: Vyšetření spermiogramem neposkytuje dostatek informací o kvalitě spermií. Pomocí průtokové cytometrie je možné stanovit zastoupení apoptotických spermií v ejakulátu, fragmentaci jejich DNA a integritu akrozomu. Tyto testy umožňují diagnostikovat pacienty s rizikem nižší fertility, kteří by měli být vyšetřeni andrologem.

Cíl: Přehled výsledků vyšetření kvality spermií pomocí průtokové cytometrie

Soubor pacientů a metody: Vyšetření ejakulátu bylo provedeno u 800 mužů (ve věku 21–66 let) léčených v Centrech asistované reprodukce GENNET. Soubor zahrnoval 366 normozoospermiků a 434 pacientů s patologickým spermiogramem. Pomocí průtokové cytometrie byl u všech pacientů stanoven počet živých a apoptotických spermií, u 213 pacientů byl stanoven počet spermií s nízkou integritou akrozomu a u 65 pacientů byl stanoven počet spermií s fragmentací DNA metodou TUNEL. Pacienti byli rozděleni do skupiny ApoHigh s vysokým zastoupením apoptotických spermií (>50 % apoptotických spermií) a ApoLow s nízkým zastoupením apoptotických spermií (<50 % apoptotických spermií).

Výsledky: U normozoospermiků bylo zjištěno 16,9 % ApoHigh vzorků, u pacientů s patologickým spermiogramem 53,9 % ApoHigh vzorků. Čím více je apoptotických spermií v ejakulátu, tím vyšší je výskyt fragmentace DNA a nízké integrity akrozomu. Průměrná hodnota fragmentace DNA byla vyšší u vzorků ApoHigh než u ApoLow jak u normozoospermiků (24,0 % vs. 13,5 %), tak u pacientů s patologickým spermiogramem (33,3 % vs. 18,0 %). Vyšší průměrný počet spermií s nízkou integritou akrozomu byl zjištěn u ApoHigh vzorků než u ApoLow jak u normozoospermiků (40,2 % vs. 23,9 %),

tak u pacientů s patologickým spermiogramem (53,1 % vs. 35,2 %).

Závěr: Vyšší zastoupení apoptotických spermií v ejakulátu snižuje jeho kvalitu. Test apoptózy spermií, fragmentace DNA a stanovení integrity akrozomu doplňují informace získané ze spermiogramu a umožňují vytipovat rizikové subfertilní pacienty, pro které je vhodné podrobné andrologické vyšetření.

KLÍČOVÁ SLOVA

Apoptóza, integrita DNA, fertilita, muži, kvalita spermií.

SUMMARY

Kratka Z, Luxova S, Vik V. Flow cytometry analysis of sperm quality in sub-fertile men.

Semen analysis does not provide enough information about sperm quality. Flow cytometry tests allow us to analyse percentage of apoptotic sperm, DNA fragmentation and acrosome integrity. Sub-fertile patients are better diagnosed using these tests.

Objective: Overview of sperm quality data measured by flow cytometry.

Material and method: 800 sub-fertile men (aged 21–66 years) were treated at GENNET – assisted reproduction centres. 366 patients had normal results and 434 patients had pathological parameters of semen analysis. Flow cytometry analyses of apoptotic sperm were done in all patients. DNA fragmentation rate was measured by TUNEL assay in 65 samples. The acrosome integrity was measured in 213 samples. Two groups of patients were set according to the number of apoptotic sperm in the semen samples – ApoHigh group included samples with > 50 % of apoptotic sperm and ApoLow group included samples with < 50 % of apoptotic sperm.

Results: 16.9 % of normal semen samples were ApoHigh as well as 53.9 % pathological semen. Higher average values of DNA fragmentation were detected in the ApoHigh group than in the ApoLow group both in normal semen (24.0 % vs. 13.5 %) and in pathologic semen too (33.3 % vs. 18.0 %). Higher average values of the acrosome

integrity were detected in the ApoHigh group than in the ApoLow group both in normal semen (40.2 % vs. 23.9 %) and in the pathologic samples as well (53.1 % vs. 35.2 %).

Conclusion: The presence of apoptotic sperm decreases the semen quality. The examination of apoptosis, DNA fragmentation and acrosome integrity together with microscopic semen analyses provide a better diagnostic tool how to identify sub-fertile men, than simple semen analysis. These tests might be helpful for selection of patients for further uro-andrological examination and treatment.

KEY WORDS

Apoptosis, DNA integrity, fertility, men, sperm quality.

.....

ÚVOD

Infertilita postihuje 15 % párů v plodném věku, přibližně 48,5 milionů párů na celém světě (1, 2). U poloviny infertilních párů je příčina infertility zjištěna u mužů (2). Standardním vyšetřením kvality ejakulátu je spermiogram (3). Nicméně prediktivní význam spermiogramu, jako metody potvrzující fertilitu muže, je sporný (4, 5). Spermiogram hodnotí zejména koncentraci, pohyblivost a základní morfologii spermií (3). Ale fertilní spermie musí mít také kvalitní membránu s potřebnými receptory, nepoškozenou DNA, dostatek energie, musí obsahovat potřebné enzymy v akrozomu atd. (5)

Kvalitní DNA je nutná pro úspěšný vývoj embrya vzniklého přirozeným oplozením nebo při oplození pomocí metod asistované reprodukce (5, 6). Stanovení integrity DNA ve spermiích se považuje za velmi nadějný biomarker fertility, ale samo o sobě není dostatečně přesné pro spolehlivou predikci úspěšnosti přirozeného či in vitro provedeného oplození (7). Proto se doporučuje využívat další diagnostické postupy (5, 7). Jaká vyšetření jsou v současnosti dostupná

v klinické diagnostice? A mají přínos pro klinickou praxi?

V tomto článku se zaměříme na analýzu kvality ejakulátu pomocí průtokové cytometrie. Základním cytometrickým vyšetřením je stanovení koncentrace spermií a přítomnosti leukocytů v ejakulátu. Pomocí specifického značení spermií je možné zjistit zastoupení živých a apoptotických spermií v ejakulátu, ověřit integritu akrozomu nebo stanovit fragmentaci DNA ve spermiích. Kombinací těchto metod získáme mnoho informací o kvalitě ejakulátu a na základě výsledků můžeme doporučit andrologickou léčbu pacientům s méně kvalitními spermiemi nebo zvolit nejvhodnější metodu in vitro reprodukce (5, 6).

MATERIÁL A METODY

Soubor pacientů

Vyšetřili jsme 800 mužů z párů s poruchou plodnosti ve věku 21–66 let léčených v Centrech asistované reprodukce GENNET, s. r. o. Ejakulát byl v odběrových místnostech odebrán masturbací do označené sterilní nádoby po doporučené tří až pětidenní pohlavní abstinenci. U všech vzorků byl proveden spermiogram v Laboratoři IVF GENNET Archa nebo Laboratoři IVF GENNET Kostelní, poté následovalo vyšetření průtokovou cytometrií v Imunologické laboratoři GENNET.

Metody

Spermiogram

Vyšetření spermiogramu bylo provedeno podle doporučení WHO 2010. Soubor pacientů zahrnoval 366 normozoospermiků a 434 pacientů s patologickým spermiogramem (tabulka 1).

Cytometrické vyšetření

Zpracování ejakulátů bylo zahájeno v Imunologické laboratoři zpravidla do jedné hodiny, maximálně do čtyř hodin od odběru. Ke vzorkům byly přidány specifické fluorescenční reagensie a poté byly vzorky změřeny na průtokovém cytometru Navios Beckman Coulter. Hodnocení naměřených dat bylo provedeno softwarem Kaluza, verze 1.5.

Stanovení počtu živých a apoptotických spermií

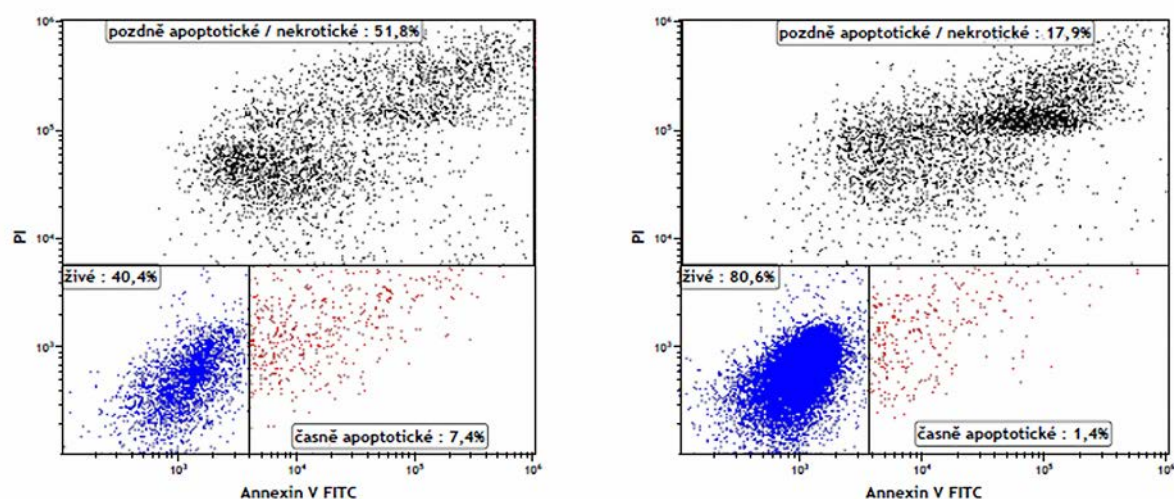
Vzorek čerstvého ejakulátu jsme zpracovali podle instrukcí uvedených v soupravě ApoFlowEx[®]FITC kit (Exbio Praha, a. s.). Ke značení buněk jsme použili Annexin V – FITC (AN), který se váže na fosfatidylserin na povrchu apoptotických buněk, a propidium jodid (PI), který prostupuje do mrtvých buněk.

Na obrázku č. 1 jsou zřejmé tři základní populace buněk: živé spermie (AN- PI-), časně apoptotické spermie (AN+ PI-), mrtvé a pozdně apoptotické spermie (AN- PI+ a AN+ PI+). Uvedený postup zna-

Tab. 1. Přehled vzorků ejakulátu rozdělený podle výsledků spermiogramu a apoptózy spermií. ApoHigh vzorky obsahují >50 % apoptotických spermií v ejakulátu

Tab. 1. Samples' overview of the number of semen samples divided according to the semen analyses results and the number of samples with increased apoptotic sperm frequency (ApoHigh). ApoHigh samples contain more than 50 % of apoptotic sperm

Hodnocení spermiogramu	Počet	Počet a procentuální zastoupení ApoHigh vzorků
Normozoospermie	366	62 (16,9 %)
Oligozoospermie	89	32 (36,0 %)
Asthenozoospermie	120	52 (43,3 %)
Oligoteratozoospermie	20	10 (50,0 %)
Asthenoteratozoospermie	39	24 (61,5 %)
Oligoasthenozoospermie	40	26 (65,0 %)
Oligoasthenoteratozoospermie	126	95 (75,3 %)
Celkem	800	301 (37,6 %)



Obr. 1. Stanovení apoptotických spermií průtokovou cytometrií v ejakulátu normozoospermiků. Annexin V–FITC (AN) a propidium jodid (PI) byly použity k rozdělení buněk na živé spermie (AN–PI–), časně apoptotické spermie (AN+ PI–), mrtvé a pozdně apoptotické spermie (PI+). Fyziologická hodnota je >50 % živých spermií v ejakulátu. Vlevo – ApoHigh vzorek, Vpravo – ApoLow vzorek

Fig. 1. Flow cytometry analysis of apoptotic sperm in normozoospermic semen. Annexin V-FITC (AN) and propidium iodide (PI) were used to discriminate the viable sperm (AN+ PI–), early apoptotic sperm (AN– PI–) and necrotic plus late apoptotic sperm (PI+) in flow cytometry analysis. The physiological value is >50 % viable sperm in semen. Left – ApoHigh sample, right – ApoLow sample

čení apoptotických spermií byl použit v různých publikacích (8, 9, 10), ale nebyla v nich navržena fyziologická hranice.

Fyziologická hodnota životnosti (tj. počet PI– buněk) odpovídá normě nastavené např. pro histologické barvení eosinem tj. >58 % (PI–) spermií (3). Při použití dvou reagentů současně (AN a PI) však rozlišujeme dvě populace buněk v rámci PI– spermií. Pro živé a časně apoptotické spermie bylo nutné nastavit hraniční hodnotu. Nejprve jsme spočítali průměrnou hodnotu časně apoptotických spermií u skupiny 20 mužů normozoospermiků (s vitalitou vyšší než 58 %, fragmentací DNA nižší než 20 %, ve věku 26–50 let). Průměrný počet časně apoptotických spermií (AN+ PI–) byl 8 % (rozmezí hodnot 2,5–15,6). Tuto hodnotu jsme odečetli od 58 % (životnost značená pouze PI). Fyziologická hodnota pro živé spermie (AN– PI–) byla nastavena na >50 %.

Stanovení integrity akrozomu

Vzorek ejakulátu jsme zpracovali podle instrukcí uvedených ve SpermFlowEx® kitu (Exbio Pra-

ha, a. s.). Principem metody je vazba intra-akrozomální protilátky Hs-8-FITC na proteiny přítomné v akrozomu. Vazba protilátky proběhne, pokud je akrozom propustný (má nízkou integritu membrány). Fyziologická hodnota je <30 % spermií.

Stanovení počtu spermií s fragmentovanou DNA metodou TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

Ejakulát jsme zpracovali dle postupu uvedeném v soupravě Apo Direct™ (Phoenix Flow Systems). Principem metody je specifická vazba fluorescenčně značeného deoxyuridine trifosfátu (f-dUTP) na 3'-OH konce jednovláknové i dvouvláknové DNA (11, 12). Specifickou vazbu f-dUTP na fragmenty DNA katalyzuje enzym terminální deoxynukleotidyltransferáza. Po změření vzorku v průtokovém cytometru jsme hodnotili zastoupení spermií s navázaným f-dUTP. Fyziologická norma pro fragmentaci DNA stanovená metodou TUNEL je <20 % spermií (11, 12).

VÝSLEDKY

Stanovení apoptózy spermií

U všech pacientů jsme provedli vyšetření apoptózy spermií. Na základě počtu živých (AN- PI-) spermií jsme rozdělili vzorky na skupinu ApoLow s nízkým zastoupením apoptotických spermií (<50 % spermií) a ApoHigh s vysokým zastoupením apoptotických spermií (>50 % spermií). 37,1 % vyšetřených vzorků ejakulátu mělo vyšší zastoupení apoptotických spermií (byly označeny jako ApoHigh) (tab. 1). Ve skupině normozoospermiků bylo zjištěno 16,9 % ApoHigh vzorků, ve skupině pacientů s patologickým spermiogramem bylo 53,9 % ApoHigh vzorků. Průměrné hodnoty procenta živých spermií u normozoospermiků a pacientů s patologickým spermiogramem jsou uvedeny v tabulce 2. V ní jsou obě skupiny pacientů rozdělené na ApoHigh a ApoLow podskupiny.

Výsledky spermiogramu u pacientů s vysokým a nízkým počtem apoptotických spermií

Průměrné hodnoty celkového počtu spermií, koncentrace spermií, progresivní pohyblivosti

a abnormální morfologie u skupiny normozoospermiků a skupiny pacientů s patologickým spermiogramem jsou uvedeny v tabulce 2. V těchto parametrech jsme nezjistili významné rozdíly mezi ApoHigh a ApoLow podskupinami ani u normozoospermiků, ani u pacientů s patologickým spermiogramem.

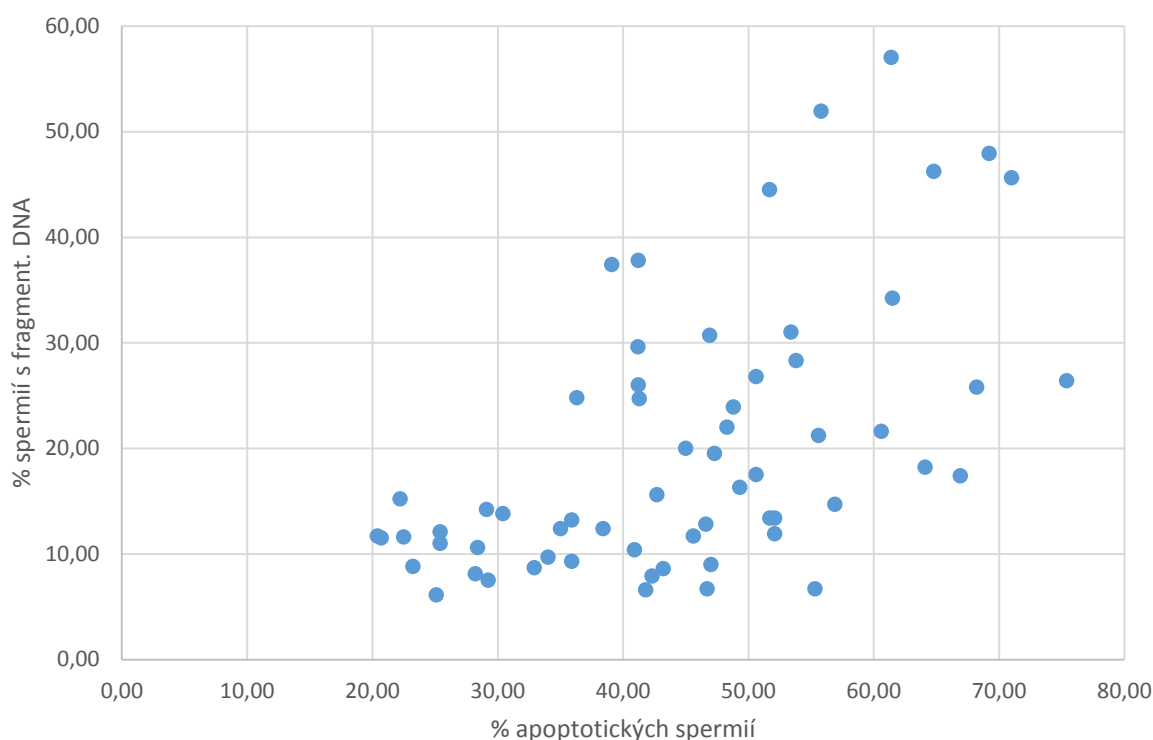
Stanovení spermií s DNA fragmentací

Vzhledem k časové a finanční náročnosti je vyšetření fragmentace DNA ve spermiích zavedeno jako doplňkový test kvality spermií. Vyšetřili jsme proto jen 65 pacientů. U 40,0 % pacientů jsme zjistili patologické hodnoty fragmentace DNA. Vzorky z podskupiny ApoHigh měly vyšší průměrnou hodnotu počtu spermií s fragmentací DNA než vzorky ApoLow (tabulka 2) jak u normozoospermiků (24,0 % vs. 13,5 %), tak u pacientů s patologickým spermiogramem (33,4 % vs. 18,1 %). Závislost počtu spermií s fragmentací DNA na počtu apoptotických spermií je uvedena v grafu 1. U pacientů s méně než 30 % apoptotických spermií byla fragmentace DNA v normě.

Tab. 2. Průměrné hodnoty parametrů spermiogramu a cytometrických vyšetření u pacientů s normozoospermii a u pacientů s patologickým spermiogramem. ApoHigh: >50 % apoptotických spermií. ApoLow: <50 % apoptotických spermií. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty +/- směrodatné odchylky

Tab. 2. Average values of semen analyses and flow cytometer parameters in normozoospermic and pathological semen samples. ApoHigh group: >50 % apoptotic sperm. ApoLow group: <50 % apoptotic sperm. Average value +/- SD

	Počet vyšetřených pacientů	Normozoospermie ApoHigh	Normozoospermie ApoLow	Patologický spermiogram ApoHigh	Patologický spermiogram ApoLow
Celkový počet spermií (mil. spermií)	800	153,4 ± 107,9	159,7 ± 99,5	46,6 ± 65,1	78,0 ± 92,2
Koncentrace spermií (mil. spermií /ml)	800	43,5 ± 27,6	50,0 ± 29,4	14,3 ± 19,3	23,1 ± 26,3
Počet progresivně pohyblivých spermií (%)	800	47,8 ± 10,8	52,1 ± 12,1	21,2 ± 14,6	30,3 ± 14,0
Počet spermií s abnormální morfologií (%)	800	78,4 ± 9,2	79,1 ± 9,6	93,5 ± 8,7	90,8 ± 6,1
Počet živých spermií (%)	800	41,9 ± 7,3	66,8 ± 9,4	36,7 ± 9,7	60,8 ± 8,2
Počet spermií s fragment. DNA (%)	65	24,0 ± 14,5	13,5 ± 8,1	33,3 ± 13,6	18,1 ± 8,9
Počet spermií s nízkou integritou akrozomu (%)	213	40,2 ± 9,7	23,9 ± 9,6	53,1 ± 15,3	35,2 ± 10,2



Graf 1. Závislost počtu spermií s fragmentací DNA na počtu apoptotických spermií. Počet spermií s fragmentací DNA se zvyšuje s rostoucím počtem apoptotických spermií v ejakulátu. Apoptotické spermie byly stanoveny použitím annexinu V – FITC a propidium jodidu. Fragmentace DNA ve spermiích byla zjištěna pomocí metody TUNEL. Fyziologické hodnoty: <20 % spermií s fragmentací DNA, <50 % apoptotických spermií v ejakulátu

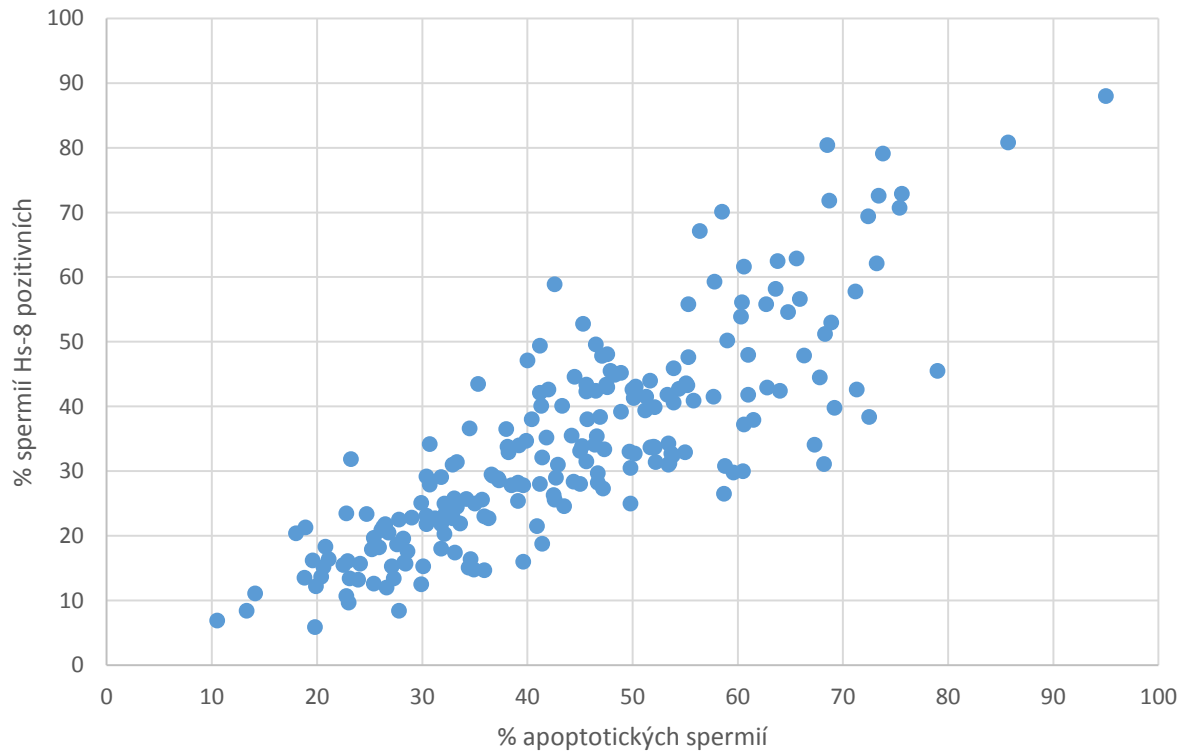
Graph 1. The number of sperm with DNA fragmentation depends on the percentage of apoptotic sperm. The number of sperm with fragmented DNA increases with the number of apoptotic sperm in semen. Annexin V – FITC and propidium iodide were used to mark apoptotic sperm. TUNEL assay was used for DNA fragmentation analysis. Physiological values: <20 % sperm with DNA fragmentation, <50 % of apoptotic sperm

Stanovení integrity akrozomu

Vyšetření integrity akrozomu jsme provedli u 213 pacientů. U 54,4 % byl vyšší počet spermií s narušenou integritou akrozomu. Významně vyšší průměrné počty spermií s narušenou integritou akrozomu jsme zjistili u podskupin ApoHigh v porovnání s ApoLow (tab. 2) jak u normozoospermiků (40,2 % vs. 23,9 %), tak u pacientů s patologickým spermiogramem (53,1 % vs. 35,3 %). Závislost počtu spermií s nízkou integritou akrozomu na počtu apoptotických spermií v ejakulátu je uvedena v grafu 2. U pacientů s méně než 30 % apoptotických spermií byla kvalita akrozomu v normě s výjimkou jediného pacienta.

DISKUZE

Spermie velmi citlivě reagují na zdravotní stav muže. Jejich kvalita je ovlivněna věkem, probíhajícími infekcemi, hormonální nerovnováhou, varikokélou, nedostatečnou výživou, některými systémovými onemocněními apod. (13, 14). Vyšší apoptóza spermií souvisí s kouřením, obezitou nebo častou expozicí spermií vysokým teplotám např. při saunování. Na spermie negativně působí užívání drog, anabolik a některých léků (15) nebo radiace, přítomnost toxických látek a těžkých kovů v prostředí (16). Apoptóza ovlivňuje produkci zárodečných buněk muže od časného vývoje až po fertilizaci (14). V časném embryonálním vývoji se prostřednictvím apoptózy reguluje ideální poměr spermatogonií a Sertoliho buněk v testes. V dospělosti jsou apoptózou eliminovány



Graf 2. Závislost počtu spermií s nízkou integritou akrozomu na počtu apoptotických spermií. Počet spermií s nízkou integritou akrozomu (Hs-8 pozitivních) se zvyšuje s rostoucím počtem apoptotických spermií v ejakulátu. Annexin V – FITC a propidium jodid byly použity k označení apoptotických spermií. Fyziologické hodnoty: <30 % spermií s nízkou integritou akrozomu (Hs-8 poz.), <50 % apoptotických spermií v ejakulátu

Graph 2. Number of sperm with low integrity of acrosome depends on the percentage of apoptotic sperm. The percentage of sperm with low acrosome integrity (Hs-8 antibody positive sperm) increases with the percentage of apoptotic sperm in semen. Annexin V – FITC and propidium iodide were used to mark apoptotic sperm. Physiological values: <30 % sperm with low integrity of acrosome, <50 % of apoptotic sperm

poškozené zárodečné buňky, čímž se snižuje riziko vytváření spermií s nekvalitní DNA. Smrt apoptózou je osudem všech spermií, které se po ejakulaci dostaly do pohlavních cest ženy a nebyly natolik úspěšné, aby oplodnily vajíčko. Apoptotické spermie jsou bezpečně odklizeny imunitním systémem bez vyvolání zánětlivé reakce. Z pohledu fertility není problém apoptóza samotná, ale spíše její načasování a poměr živých a apoptotických spermií v ejakulátu.

Jedním z prvních znaků apoptózy je aktivace tvorby ROS (reaktivních forem kyslíku) mitochondriemi spermií, při níž dochází ke změnám v membránovém potenciálu mitochondrií, postupné ztrátě pohyblivosti spermií, aktivaci kaspáz, endonukleáz a změnám ve složení membrány buněk (14, 17). Působením oxidačního stresu dochází ve spermiích k poškození DNA a na povrchu apoptotických sper-

mií se objeví fosfatidylserin, který využíváme při detekci apoptotických spermií. Cytometrické vyšetření apoptotických spermií pomocí AN a PI je velmi rychlé a metodicky jednoduché. Na našem pracovišti bylo vyšetření apoptózy spermií zařazeno společně se spermiogramem do standardního vyšetřovacího schématu mužů z párů se sníženou fertilitou.

Vyšší zastoupení apoptotických spermií (>50 % apoptotických spermií) bylo zjištěno u 37,6 % vzorků získaných od 800 pacientů. Velmi přínosné je toto stanovení u normozoospermiků. Zjistili jsme, že 16,9 % normozoospermiků mělo vysoké zastoupení apoptotických spermií, což u nich zvyšovalo riziko vyšší fragmentace DNA. Tato hodnota odpovídá údajům uvedeným v publikaci Agarwal et al. (2), která uvádí, že 15 % normozoospermiků má sníženou fertilitu, která se projeví nízkou kvalitou

embryí. Cytometrické vyšetření apoptózy spermií tak umožňuje včas odhalit a léčit normozoospermiky s rizikem nižší fertility.

K vyšetření fragmentace DNA ve spermiích jsme použili metodu TUNEL (11, 12). Stanovení fragmentace DNA metodou TUNEL patří mezi prognosticky nejpresnější metodu (7), nicméně je výrazně časově i finančně náročnější v porovnání se stanovením apoptózy spermií. Vyšetřili jsme proto pouze část pacientů – 65 mužů – a u 40 % z nich jsme zjistili vyšší hodnoty fragmentace DNA. Doporučujeme vyšetřovat fragmentaci DNA společně s apoptózou spermií, pokud je dodán čerstvý ejakulát, protože se oba testy vzájemně informačně potvrzují. U pacientů s méně než 30 % apoptotických spermií jsme nezjistili překročení fyziologické hranice fragmentace DNA.

Vztah mezi fragmentací DNA a úspěšností metod asistované reprodukce se sledoval v desítkách klinických studií a v několika metaanalýzách (7, 18). V případě vysoké fragmentace DNA byl zjištěn nižší počet těhotenství, ale publikace se neshodují v tom, zda pouhá znalost fragmentace DNA stačí pro předpověď úspěšnosti metod asistované reprodukce (7, 18). Jednou z příčin rozdílných závěrů metaanalýz je fakt, že existují různé postupy v diagnostice fragmentace DNA. Kromě metody TUNEL se používá i cytometrická metoda SCSA (sperm chromatin structure assay) (4). Existují i mikroskopické metody stanovení fragmentace jako Comet assay nebo Halo Sperm Assay (19).

Fertilní lidské spermie použitelné pro přirozené oplození vajíčka potřebují mít kvalitní akrozom. K detekci integrity akrozomu jsme použili protilátku proti intraakrozomálnímu proteinu označovanou jako Hs-8 (20). Vyšší průměrný počet spermií s narušenou integritou akrozomu se vyskytoval u ApoHigh podskupin než u ApoLow podskupin jak u normozoospermiků (40,2 % vs. 23,9 %), tak u pacientů s patologickým spermioqramem (53,1 % vs. 35,2 %). Podobně vyšší průměrný počet spermií s nízkou integritou akrozomu stanovený průtokovou cytometrií byl zjištěn u pacientů s asthenozoospermii než u normozoospermiků také v práci Čapková et al. (21).

Nízká integrita akrozomu se může vyskytovat u poškozených spermií, apoptotických spermií nebo

u živých spermií, u kterých došlo k předčasné kapacitaci. Kapacitace spermií se standardně odehrává až v reprodukčním traktu ženy a je aktivována vyšší koncentrací ROS (14). Stimulátorem kapacitace mohou být také estrogeny, které aktivují estrogenové receptory na hlavičce spermií (22). Zpravidla jde o endogenní estrogeny produkované v organizmu ženy. Ale spermie mohou být aktivovány také exogenními estrogeny, které jsou přítomné v prostředí, např. v pitné vodě kontaminované hormonální antikoncepcí. Negativní efekt exogenních estrogenů na kapacitaci spermií byl potvrzen na myším modelu. Jejich působením došlo k předčasné aktivaci myších spermií již v nadvarleti a zvířata vystavená exogenním estrogenům byla méně fertilní než kontrolní. Předpokládá se, že exogenní estrogeny mohou ovlivnit také fertilitu spermií mužů.

Jaký je klinický přínos cytometrického vyšetření spermií? Test apoptózy spermií je používán na našem pracovišti jako screeningový test doplňující spermioqram. Při opakovaně patologických výsledcích apoptózy spermií doporučujeme pacientovi andrologické vyšetření. Příčin vysoké koncentrace apoptotických spermií může být několik např. anatomická či funkční abnormalita, infekce, hormonální nerovnováha, genetická abnormalita nebo porucha imunity (6). Cílená specifická léčba, podpurná léčba antioxidanty a změna životního stylu mohou přispět ke zlepšení kvality spermií, i když jsou současné možnosti léčby omezené.

Doporučujeme také sledování dynamiky procesu – opakovaným vyšetřením apoptózy spermií můžeme zachytit pokles počtu apoptotických spermií v případě pozitivního efektu léčby. Naopak při vzestupu počtu apoptotických spermií stoupá např. riziko přítomnosti mikrobiální infekce.

Stanovení apoptotických spermií může pomoci i při výběru metody asistované reprodukce. Časné apoptotické spermie jsou špatně mikroskopicky rozeznatelné od živých a mohou být omylem použity na in vitro oplození (5). Kvalitní oocyt umí opravit poškozenou DNA, nicméně tato schopnost klesá u oocytů starších žen (23). Pro potřeby asistované reprodukce jsou vyvíjeny metody umožňující selekci spermií s kvalitní DNA. Jednou z možností je magnetická separace apoptotických spermií

(MACS). Kovové kuličky s navázaným annexinem V jsou přidány ke spermiím a naváží se na apoptotické spermie. Pomocí separační kolony umístěné v magnetickém poli se suspenze buněk rozdělí – v koloně se zadrží apoptotické spermie a do zkumavky protečou živé spermie. Ty je možné použít na metody asistované reprodukce (17, 28).

ZÁVĚR

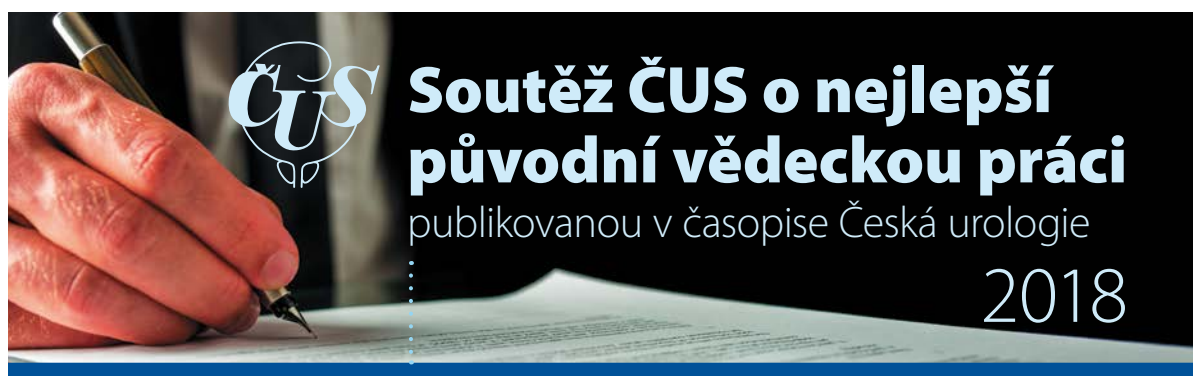
Kvalita spermií výraznou měrou ovlivňuje výsledek oplození oocyty. Vyšší výskyt apoptotických

spermií s fragmentovanou DNA v ejakulátu je jednou z příčin nekvalitního vývoje embryí in vitro. Vyšetření spermií pomocí průtokové cytometrie poskytuje informace o zastoupení živých a apoptotických spermií, fragmentaci DNA a integritě akrozomu. U mužů s vyšším zastoupením apoptotických spermií doporučujeme provést andrologické vyšetření. Získané informace o kvalitě spermií mohou přispět také k volbě vhodných postupů zpracování ejakulátu před in vitro oplozením vajíčka. Zvláště u starších párů může být tento přístup přínosný pro zvýšení úspěšnosti cyklů asistované reprodukce.

LITERATURA

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002; 77: 873–882.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1
3. WHO World health organization laboratory manual for examination of human semen. 5th ed. Geneva: WHO press 2010.
4. Evenson DP. The sperm chromatin structure assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci* 2016; 169: 56–75.
5. Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: what can we learn from mother nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update* 2015; 21(6): 711–726.
6. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl* 2011; 13: 36–42.
7. Cissen M, Wely MV, Scholten I, et al. Measuring Sperm DNA fragmentation and clinical outcomes of medically assisted reproduction: a systematic review and meta-analyses. *PLoS One* 2016; 11(11): e0165125. doi: 10.1371/journal.pone.0165125.
8. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg EK, et al. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74(2): 245–250.
9. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(2): 109–115.
10. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39–51.
11. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm fragmentation: treashold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20(12): 3446–3451.
12. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, et al. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010; 76(6): 1380–1386.
13. Krátká Z. Kvalita DNA ve spermiích je negativně ovlivněna věkem mužů a je rizikovým faktorem početí. *Ces. Gynek.* 2017; 82 (6): 490–494.
14. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol* 2013; 57: 265–272.

15. Semet M, Paci M, Saïas-Magnan J, et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology* 2017; 5(4): 640–663.
16. Vecoli C, Montano L, Andreassi MG. Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells. *Environ Sci Pollut Res* 2016; 23: 23339–23348.
17. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; 22(5): 1413–1419.
18. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017; 19: 80–90.
19. Novotná B, Svobodová L, Čechová M, et al. Naše první zkušenosti s využitím kometového testu při hodnocení integrity DNA ve spermiích. *Ces Urol* 2016; 20(4): 317–325.
20. Peknicova J, Chladek D, Hozak P. Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *AJRI* 2005; 53: 42–49.
21. Capkova J, Kubatova A, Ded L, Tepla O, Peknicova J. Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. *Asian J Androl* 2016; 18(1): 108–113.
22. Sebkova N, Cerna M, Ded L, Peknicova J, Dvorakova-Hortova K. The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction* 2012; 143: 297–307.
23. Meseguer M, Santiso R, Harrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2011; 95(1): 124–128.
24. Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R, Checa MA. Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 479–485.



Soutěž ČUS



Všechny původní vědecké práce publikované v časopise Česká urologie v roce 2018 budou do soutěže zařazeny automaticky.
Podmínkou zařazení je, že první autor bude urolog.

Vítězné práce budou vyhlášeny na Výroční konferenci ČUS 2019.

Následně budou výsledky zveřejněny v časopisu Česká urologie a na webových stránkách ČUS.