

Kvalitativní a kvantitativní parametry spermatu ve světle posledního vydání WHO manuálu pro vyšetření a zpracování lidského spermatu

Qualitative and quantitative semen parameters in the light of the latest edition of the WHO manual for the examination and processing of human semen

Marcel Drlík¹, Zuzana Krátká², Jan Novák³

¹Urologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

²Imunologická laboratoř Gennet, Praha

³Klinik für Urologie, Kinderurologie und roboterassistierte minimalinvasive Urologie, Sozialstiftung Bamberg, Německo

Došlo: 6. 5. 2024

Přijato: 11. 6. 2024

Kontaktní adresa:

MUDr. Marcel Drlík, FEAPU

Odd. dětské urologie, Urologická klinika VFN a 1. LF UK, Ke Karlovu 6, 128 00 Praha 2

e-mail: marcel.drlik@vfn.cz

Střet zájmů: Žádný.

Prohlášení o podpoře: Článek podpořen MZ ČR – RVO-VFN64165 a GA UK 14692.

Hlavní stanovisko práce: Vyšetření spermatu představuje základní metodu pro stanovení plodnosti muže. Je standardizováno v Manuálu WHO, který byl naposledy aktualizován v roce 2021. Cílem přehledového článku je stručně shrnout současné možnosti vyšetření plodnosti muže a současně poukázat na některé změny, které poslední vydání přineslo.

Major statement: Semen examination is the basic method for determining male fertility. It is standardized in the WHO Manual, which was last updated in 2021. The aim of this review article is to briefly summarize the current options for male fertility testing while highlighting some of the changes brought by the latest edition.

SOUHRN

Drlík M, Krátká Z, Novák J. Kvalitativní a kvantitativní parametry spermatu ve světle posledního vydání WHO manuálu pro vyšetření a zpracování lidského spermatu.

Posouzení plodnosti muže je založeno na vyšetření spermatu. Neexistuje univerzální ukazatel, o plodnosti vypovídá až komplex kvantitativních a kvalitativních parametrů. Metody ke stanovení těchto parametrů se stále vyvíjejí a zpřesňují. Jsou standardizovány v Manuálu WHO, který je pravidelně aktualizován. Poslední, šesté vydání je z roku 2021. Cílem přehledového článku je stručně shrnout současné možnosti vyšetření plodnosti

muže a současně poukázat na některé změny, které přineslo poslední vydání manuálu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mužská plodnost, WHO laboratorní manuál, sperma, spermie.

SUMMARY

Drlík M, Krátká Z, Novák J. Qualitative and quantitative semen parameters in the light of the latest edition of the WHO manual for the examination and processing of human semen.

The assessment of fertility in a man is based on the semen examination. There isn't any single universal indicator, fertility is determined by a complex of quantitative and qualitative parameters. Methods for determining these parameters are evolving and becoming more precise. They are standardised in the WHO Manual, which is regularly updated. The latest is the sixth edition of 2021. The aim of this review article is to summarize the current options for male fertility testing and to highlight some of the changes brought by the latest edition of the manual.

KEY WORDS

Male fertility, WHO laboratory manual, semen, sperm.

.....

ÚVOD

Neplodnost představuje závažný celosvětový problém. Je definována jako stav, kdy pár není schopen dosáhnout koncepce v průběhu jednoho roku při pravidelném nechráněném pohlavním styku.

Ve vyspělých zemích postihuje jeden z osmi párů v reprodukčním věku (1). Odhaduje se, že muž odpovídá plně za 20 % a přispívá v dalších 30 % případů neplodnosti (2). Nejčastějšími známými příčinami mužské neplodnosti jsou varikokéla (15 %), kryptorchismus (8,4 %), hypogonadismus (např. Klinefelterův syndrom, Kallmannův syndrom, hypogonadotropní hypogonadismus) (10,1 %) a přítomnost

antispermatických protilátek (3,9 %). Téměř v polovině případů příčinu neplodnosti nenalezneme a hovoříme o tzv. idiopatické infertilitě (3). Celosvětově klesající koncentrace spermií u mužů je dávana do souvislosti s častější obezitou, narůstajícím věkem otců a expozicí environmentálním a profesním endokrinním disruptorům (4). Doporučení Evropské urologické společnosti (EAU guidelines on Sexual and Reproductive Health, dále jen Doporučení EAU) požadují při vyšetření infertilního muže odebrat anamnézu, provést fyzikální a endokrinologické vyšetření a stanovit spermiogram, který je považován za klíčové vyšetření. Celosvětově uznávaným a rovněž Evropskou urologickou společností doporučovaným standardem pro hodnocení spermiogramu je WHO manuál pro vyšetření a zpracování lidského spermatu (dále jen Manuál) (5).

Manuál byl poprvé vydán v roce 1980 s cílem sjednotit vyšetřovací postupy a zajistit standardizaci vyšetření v klinických a výzkumných laboratořích na celém světě. Během let byl přibližně v desetiletých intervalech aktualizován, poslední vydání pochází z července 2021. Manuál obsahuje šest částí: Část dříve označovaná jako „Standardní vyšetření“ je nyní nově označena jako „Základní vyšetření“, část „Volitelné vyšetření“ jako „Rozšířené vyšetření“, „Výzkumné metody“ jako „Pokročilé vyšetření“. Manuál se dále věnuje postupům používaným při přípravě a separaci spermií, kryoprezervaci semene a na závěr obsahuje i postupy používané k nastavení standardizace postupů a kontroly kvality zpracování v laboratořích. Změny označení jednotlivých skupin metod však nejsou tím podstatným, co přináší poslední vydání Manuálu. V reakci na kritiku 5. vydání z roku 2010 byly některé kapitoly podstatně rozšířeny a upraveny. Následující text přináší přehled nejvýznamnějších změn.

ZÁKLADNÍ VYŠETŘENÍ – KONCENTRACE, POHYBLIVOST A MORFOLOGIE SPERMIÍ

Kapitola se soustředí na správné provedení a hodnocení spermiogramu. Spermiogram je doporučo-

ván jako nástroj k průkazu fertility resp. infertility, jako vyšetření sloužící k posouzení reprodukční funkce a pro stanovení vhodné metody asistované reprodukce (ART – Assisted Reproductive Technology), dále jako metoda vhodná k monitoraci odpovědi na léčbu infertility a k průkazu účinnosti mužské kontracepce. Stanovení spermiogramu je též doporučováno před poskytnutím dárcovského spermatu či před rozhodnutím o kryoprezervaci spermatu před potenciálně gonadotoxickou léčbou.

Referenční hodnoty spermiogramu byly ve vydání z roku 2010 stanoveny jako 5. dolní percentil hodnot získaných ze souboru 1 800 mužů z 8 zemí Evropy, Severní Ameriky a Oceánie. Plodní muži byli definováni jako ti, jejichž partnerka otěhotněla do 12 měsíců přirozené koncepce. Kritici vyčítali této metodě jednak nedostatečné geografické pokrytí světové populace (6), tak skutečnost, že arbitrárně stanovená hodnota 5. dolního percentilu nutně neznamená, že muž bude infertilní. Stejně tak jako normální hodnoty spermiogramu (normozoospermia) automaticky neznamenají, že spermie jsou kvalitní a muž bude fertilní. Poslední vydání Manuálu se proto zaměřilo na lepší geografické pokrytí vstupních dat. K původnímu souboru přidalo data nová, získaná v letech 2010–2020. Celkem autoři vycházeli z datového souboru, který zahrnuje 3 589 mužů z Ameriky, Afriky, Asie, Evropy i Austrálie. Téměř 1 300 mužů (35,9 %) pochází z evropských států (Dánsko, Finsko, Norsko, Velká Británie, Francie, Řecko a Itálie). Bohužel k dispozici nejsou podrobnější informace o těchto souborech mužů, chybí např. informace o jejich věku nebo zdravotním stavu.

Autoři Manuálu dále zdůrazňují, že parametry spermiogramu samy o sobě nejsou dostatečnou informací o fertilitě muže a je nutné je posuzovat komplexně s dalšími parametry, a to především s andrologickým vyšetřením. Proto opouští pojem zdůrazňovaných „referenčních hodnot (reference thresholds)“ a navrhuje je nahradit pojmem „rozhodovací hranice (decision limits)“. Manuál také přináší změny do struktury hodnocení spermiogramu a aktualizuje původní referenční hodnoty (nově rozhodovací hranice).

Stejně jako všechna předchozí vydání i toto podrobně rozebírá postup zpracování spermií a hodnocení spermiogramu. Odběr ejakulátu se provádí masturbací do k tomuto účelu určené nádoby. Zachycen musí být celý objem ejakulátu. Ideální je, pokud k odběru dochází v místnosti k tomu určené přímo na pracovišti, kde je ejakulát zpracováván. Je nutné, aby byl vzorek uchován v teplotě 20–37 °C a zpracován ideálně do 30 min., maximálně do 60 min. od odběru. Pokud odběr probíhá jinde, pak je nutné vzorek přepravit co nejrychleji do laboratoře a udržet jej při teplotě lidského těla. Je důležité, aby muž před odběrem dodržel minimálně 2 dny a maximálně 7 dní sexuální (koitální) abstinence.

Ejakulát se zpracovává po ztekucení, ke kterému dochází za normální situace během 30 minut. Pokud k němu nedojde do hodiny, měla by být tato informace sdělena ve zprávě lékaři. Vizuálně se zhodnotí barva semene, tekutost a viskozita. Stanoví se objem semene (nejčastěji se zváží nádoba nebo se změří přímo objem tekutiny). Barva semene může být ovlivněna přítomností erytrocytů (haemospermie způsobí zbarvení do červena), nebo užíváním léků (nejčastěji vede ke zbarvení do žluta). Odor semene se liší vzorek od vzorku, přesto v něm zkušený pracovník pozná přítomnost moči či hnisu. Tato informace by také měla být zaznamenána. Posuzuje se i viskozita, za extrémní se považuje tvorba vazkých vláken delších než 2 cm, což velmi znesnadňuje i práci s materiálem a přesnost měření. Velmi viskózní, bezbarvý ejakulát obsahuje tekutinu, která pochází pouze z Cowperovy žlázy (pre-ejakulační tekutina). Stanovení pH není nezbytné, má nízkou informační hodnotu.

Stanovení koncentrace spermií, jejich morfologie a pohyblivosti se provádí pomocí mikroskopické analýzy, která je častěji prováděná „manuálně“ zaškoleným pracovníkem, i když je již možné použít automatické systémy označované jako CASA (computer-aided sperm analysis) (7). Velkou výhodou automatického systému je redukce subjektivity, která nutně manuální odečet provází. Nevýhodou je zejména vysoká pořizovací cena. Manuál zahrnuje jak postupy pro správnou přípravu vzorku pro manuální odečet, ale i pro technicky správné provedení analýzy systémem CASA.

Tab. 1. Hodnoty dolního 5. percentilu jednotlivých parametrů spermiogramu u plodných mužů, které jsou uvedené v předchozím pátém (2010) a v současném šestém (2021) vydání WHO Manuálu

Tab. 1. Values of the lower 5th percentile of individual spermogram parameters in fertile men, as reported in the previous fifth (2010) and current sixth (2021) editions of the WHO Manual

	WHO 2010 (5. vydání)	WHO 2021 (6. vydání)
Objem spermatu (ml)	1,5 (1,4–1,7)	1,4 (1,3–1,5)
Celkový počet spermií (10 ⁶ na ejakulát)	39 (33–46)	39 (35–40)
Celková pohyblivost (%)	40 (38–42)	42 (40–43)
Progresivní pohyblivost (%)	32 (31–34)	30 (29–31)
Neprogresivní pohyblivost (%)	1	1 (1–1)
Nepohyblivost (%)	22	20 (19–20)
Životnost (%)	58 (55–63)	54 (50–56)
Normální morfologie (%)	4 (3–4)	4 (3,9–4)

Standardní manuální odečet se provádí ideálně 30 minut po odběru materiálu. Koncentrace spermií by měla být počítána ze dvou náběrů ředěného ejakulátu, v případě velkých rozdílů mezi dvěma vzorky by se měl provést třetí. Spermie se počítají pomocí kalibrované počítací komůrky. Pokud nebyla detekována přítomnost spermií ve vzorku, pak se doporučuje vzorek zcentrifugovat a zjistit, zda jsou v sedimentu po centrifugaci přítomné aspoň nějaké spermie nebo žádné.

Další hodnocenou kategorií je pohyblivost spermií. U tohoto vyšetření se autoři vrací ke staršímu typu rozlišení pohyblivosti na čtyři kategorie – rychlou progresivní motilitu, pomalou progresivní motilitu, neprogresivní motilitu a nepohyblivost (stupně a, b, c, d). Za nejvýznamnější kinetický parametr je stále považována rychlá progresivní motilita. Motilita spermií se sleduje přibližně u 200 spermií ve vzorku. Pokud je celková motilita nižší než 40 %, doporučuje se stanovit i životnost spermií. Pro její stanovení se používá barvení eosinem a nigrosinem (8).

Stanovení morfologie spermií se provádí po histologickém obarvení preparátu podle Papanicolaou a hodnotí se morfologie hlavičky, krčku a bičiku přibližně u 100 spermií. Kromě spermií lze v ejakulátu odlišit i jiná buněčná stadia spermatogeneze (spermatidy, spermatocyty), leukocyty (polymorfonukleární buňky, makrofágy, lymfocyty) apod. Autoři Manuálu uvádějí podrobný návod k hodnocení jednotlivých typů buněk včetně detailních fotografií a nákrešů napomáhajících správ-

nému posouzení morfologických znaků. Doporučují hodnotit také přítomnost shluků spermií ve vzorku – tzv. agregátů či aglutinací, což jsou shluky spermií, které se k sobě lepí např. hlavičkami nebo bičíky. Tyto útvary nejčastěji naznačují možnou přítomnost antispermatických protilátek v ejakulátu.

SKONČÍ POUŽÍVÁNÍ KATEGORIZACE SPERMIOGRAMU?

Zavedení hodnocení mikroskopického nálezu pomocí řeckých předpon oligo- (nízká koncentrace spermií), astheno- (nízká progresivní pohyblivost spermií) a terato- (nízký počet spermií s normální morfologií) následovaných koncovkou -zoospermia se autoři posledního vydání Manuálu úmyslně vyhýbají s poukazem na to, že stanovení striktních hranic jednotlivých vybraných parametrů nemá samo o sobě bez komplexního zhodnocení dalších parametrů smysl. Domníváme se, že stávající široce zavedené řecké označení bylo praktické a z klinické praxe nejspíše nezmizí, přesto je to pochopitelné, protože toto celkové hodnocení zahrnuje jen nejzákladnější vyšetření a už ne nové metody. Jak už jsme zmínili, kvůli nárůstu počtu dat došlo též k aktualizaci rozhodovacích hranic (dříve referenčních hodnot). V tabulce 1 jsou uvedené hodnoty dolního 5. percentilu jednotlivých parametrů spermiogramu u plodných mužů, které jsou uvedené v předcho-

zím pátém (2010) a v současném šestém (2021) vydání Manuálu. V klinické praxi je nutné tyto hodnoty posuzovat s vědomím, že mohou i u zdravých mužů v průběhu opakovaných vyšetření v čase významně kolísat. Proto se doporučuje spermioqram s časovým odstupem, obvykle 2–3 měsíců, minimálně jednou zopakovat (1).

ROZŠÍŘENÉ VYŠETŘENÍ – DALŠÍ MOŽNOSTI POSOUZENÍ KVALITY SPERMIÍ

I u normozoospermiků se může stát, že kvalita spermií není dostatečná a po oplození oocyty se netvoří kvalitní embrya nebo se nedaří ženám otěhotnět, ať už přirozenou cestou nebo pomocí technik asistované reprodukce. Jednou z možných příčin nezdaru může být vyšší fragmentace DNA ve spermiích. Autoři do Manuálu zahrnuli několik metod vyšetření fragmentace DNA spermií (SDF-Sperm DNA Fragmentation) a také genetické vyšetření spermií metodou FISH (fluorescence in situ hybridization), které zjišťuje přítomnost mutací a chromozomálních aberací (především aneuploidií chromozomů 13, 18, 21, X a Y).

Míra zastoupení spermií s poškozenou DNA významně narůstá u mužů s hormonálními onemocněními, varikokélou, chronickými infekcemi a u kuřáků. K fragmentaci DNA může docházet během zrání spermií. Bylo prokázáno, že fragmentace DNA spermií odebraných přímo z varlete (metodou TESE) je nižší než u spermií v ejakulátu (9). Existuje více metod k posouzení integrity DNA. Metody TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) a COMET test využívají přímého značení zlomů DNA, zatímco u tzv. nepřímých metod, jako jsou SCSA (sperm chromatin structure assay) a SCD (sperm chromatic dispersion test) se k označení poškozené DNA používá nespecifické značení. Některé metody využívají průtokovou cytometrii pro analýzu výsledků, jiné jsou analyzovány mikroskopicky. Vyšetření fragmentace se liší i hodnocením. U TUNEL se přímo uvádí % spermií s fragmento-

vanou DNA a laboratoř stanoví hraniční hodnotu, pro kterou je vyšší pravděpodobnost nízké fertility. U SCSA se používá DFI (DNA fragmentation index). Hodnoty DFI nad 30 % jsou spojeny s častějším výskytem spontánních potratů a chybným vývojem embryí, jak po přirozeném oplodnění, tak po intrauterinní inseminaci. Hodnoty DFI nad 50 % mohou souviset s horšími výsledky po in vitro oplození (10, 11, 12). I zde nejsou hraniční hodnoty striktně dány. Manuál doporučuje, aby si je každá laboratoř určila sama.

Výskyt genetických příčin mužské neplodnosti významně roste s klesající koncentrací spermií v ejakulátu. Proto je dle Doporučení EAU genetické vyšetření indikováno u mužů s azoospermií a oligospermií (koncentrací spermií pod 10 mil/ml) (13). Standardně je vyšetřován karyotyp ke zjištění numerických a strukturálních anomálií chromozomů, mutace genu pro cystickou fibrózu (CFTR) a mikrolece chromozomu Y, protože některé typy mikrolece tohoto chromozomu (AZFa, AZFb) spermatogenezi vylučují. Muži s výrazně nízkou koncentrací spermií (pod 1 mil/ml) mají až 10násobný nárůst incidence (4 %) autozomálních strukturálních poruch ve srovnání s normální populací. Muži s neobstrukční azoospermií mají vyšší riziko genetických poruch, zvláště anomálií pohlavních chromozomů (gonozomů), jako je např. Klinefelterův syndrom (14). Autoři Manuálu se věnují pouze genetickému vyšetření spermií, ostatní genetické metody týkající se somatických buněk nezmiňují. Podrobně je popsána metoda fluorescenční hybridizace in situ (FISH), která je vhodná k průkazu aneuploidie spermií. Standardně se touto metodou vyšetřují autozomy 13 (Patauův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom), 21 (Downův syndrom) a oba gonozomy (Turnerův a Klinefelterův syndrom). Zvláště gonozomální aneuploidie jsou často spojeny se závažnou poruchou spermatogeneze, selháním implantace vajíčka a opakovanými potraty (15). Proto je tento test doporučován jako screeningový nástroj u neplodných párů s poruchami vývoje vajíčka/plodu, méně často pak u těžkých oligozoospermiků.

Mezi další metody používané pro detailnější vyšetření ejakulátu patří i stanovení přítomnosti

leukocytů a to buď mikroskopicky po specifickém obarvení, při kterém se používá orthotoluidin ke značení peroxidázy neutrofilů nebo se leukocyty značí monoklonální protilátkou anti CD45, což je specifický znak leukocytů. Ačkoliv se tento typ analýzy již běžně provádí cytometricky, autoři Manuálu zmiňují pouze mikroskopickou analýzu. Probíhající zánět je možné zjistit stanovením koncentrace prozánětlivých cytokinů (nejčastěji IL-8) v seminální tekutině ELISA metodou. Dalším znakem imunitní reakce je přítomnost protilátek proti spermiím. V Manuálu je zařazený průkaz antispermatických protilátek pomocí metody MAR (mixed antiglobulin reaction), při které se na spermie, pokud jsou na nich navázané protilátky, specificky naváží kuličky značené protilátkami proti IgA či IgG protilátkám. Obdobně se ke stanovení protilátek používají i tzv. immunobeads. Ve stejné sekci jsou zmíněné i biochemické testy zaměřené na produkty sekrečních žláz, např. spektrofotometrické testy stanovující přítomnost zinku v ejakulátu, který souvisí se sekreční aktivitou prostaty, měření koncentrace fruktózy odrážející sekreci semenných váčků a stanovení α -glukosidázy, která souvisí se sekreční aktivitou epididymis.

VYŠETŘENÍ SPERMIÍ PRO POKROČILÉ (ADVANCED EXAMINATION)

Převážně funkční testy spermií zahrnuté do této kapitoly Manuálu jsou v současnosti většinou dostupné i v českých laboratořích reprodukční imunologie nebo v IVF laboratořích. Životnost spermií negativně ovlivňují kyslíkové radikály. Koncepce oxidačního stresu byla poprvé popsána Helmutem Siesem v roce 1985 (16). Radikály se zvýšeně tvoří u obézních pacientů, kuřáků, diabetiků, pacientů s leukospermií či varikokélou. Vyšší oxidační stres je dáván do souvislosti s nárůstem fragmentace DNA, nevysvětlenými potraty a idiopatickou infertilitou. K měření oxidačního stresu byla vyvinuta celá řada metod. Manuál zahrnuje stanovení oxidoredukčního potenciálu (ORP) pomocí systému MiOXSYS

(male infertility oxidative system) a celkové anti-oxidační kapacity spermatu. Novější metody stanovení oxidačního stresu, jako je luminometrie či stanovení pufrovací kapacity spermatu, zmíněny nejsou (18). Rutinní vyšetřování oxidačního stresu zatím není v Doporučeních EAU doporučováno. Kyslíkové radikály navozují stav apoptózy (řízené buněčné smrti), která se projevuje mimo jiné změnou struktury membrány a fragmentací DNA. Při kapacitaci spermií a později při apoptóze dochází též k permeabilizaci akrozomu. Ke stanovení podílu spermií s permeabilizovaným akrozomem je možné použít fluorescenčně značené protilátky proti intraakrozomálním proteinům a tyto spermie je poté možné detekovat buď mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií. První způsob se používá více v embryologických laboratořích a je uveden v Manuálu, druhý spíše v imunologických laboratořích a v Manuálu chybí.

PŘÍPRAVA, SEPARACE A KRYOPREZERVACE SPERMIÍ

Manuál zahrnuje také postupy separace spermií před použitím k in vitro oplození. Kromě starších technik (swim-up) nově zmiňuje i techniku MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting), při které jsou ze vzorku spermií odstraněny z ejakulátu apoptotické spermie. Ke vzorku spermií se přidají ferromagnetické kuličky s navázaným annexinem, který se váže na povrch apoptotických spermií. V magnetickém poli jsou tyto apoptotické spermie zachyceny a živé spermie (obsahující ve větší míře neporušenou DNA) jsou separovány do jiné zkumavky. Dle výsledků analýzy Cochrane institutu však nebyla prokázána vyšší úspěšnost cyklů IVF po použití tohoto typu separace v porovnání s jinými technikami (19). Předpokládá se však, že by z těchto metod mohli profitovat muži s vysokým DFI.

V kapitole věnované zamrazování spermií je popsán nejen postup zamražení v různých typech médií či pomocí vitrifikace (20). Podstatou této metody je ultrarychlé zamražení malého objemu spermatu s využitím tekutého dusíku s cílem dosáhnout minimalizace tvorby ledových krystalů a osmo-

tické destrukce spermií. Velká pozornost je také věnována správné laboratorní praxi při ověřování přítomnosti infekcí v ejakulátu, ale třeba i řádnému skladování zamražených vzorků a správnému transportu vzorků. Je třeba si uvědomit, že žijeme v době, kdy jsou stále častěji používány dárcovské spermie a je třeba se vyvarovat přenosu infekce či jejich znehodnocení nekvalitním skladováním.

V poslední kapitole jsou podrobně popsány postupy, které by měly pomoci zajistit kvalitní a standardizovaný provoz andrologické laboratoře, jejíž činnost je do značné míry postavená na kvalitní „manuální práci“ dobře proškolených pracovníků.

ZÁVĚR

Vyšetření ejakulátu představuje základ pro andrologické posouzení mužské infertility. Na rozdíl od

dřívějších vydání přináší poslední verze WHO Manuálu pro vyšetření a zpracování lidského spermatu mnohem širší pohled na spermie. Méně se soustřeďí hraniční hodnoty spermiogramu a správně zdůrazňuje, že jejich hodnocení bez kontextu s dalšími funkčními parametry spermií má samo sobě nízkou predikční hodnotu jak pro přirozené početí, tak pro úspěšnost metod asistované reprodukce. Manuál se proto více než dříve věnuje nejběžnějším laboratorním metodám zaměřeným na kvalitu spermií, jako je stanovení fragmentace DNA, genetické vyšetření spermií metodou FISH, posouzení oxidačního stresu aj. Tyto kvalitativní parametry spermií poskytují další, na spermiogramu nezávislé informace o potenciálu spermií pro oplodnění vajíčka, jeho implantaci a následný správný vývoj embrya. Hodnotu Manuálu také zvyšuje skutečnost, že se opírá o statisticky mnohem robustnější data než předchozí vydání.

LITERATURA

1. Novák J. Reprodukční medicína nejen pro urology. 1. ed. Praha: Maxdorf 2024; 162. ISBN 978-80-7345-768-6.
2. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al. Male infertility. *Lancet*. 2021 Jan 23; 397(10271): 319–333.
3. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2023. ISBN 978-94-92671-19-6.
4. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1; 23(6): 646–659.
5. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed., Geneva: WHO Press 2021.
6. Esteves SC, Zini A, Aziz N, et al. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology*. 2012 Jan; 79(1): 16–22.
7. Vantman D, Bands SM, Koukoulis G, et al. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertil Steril*. 1989 Jan; 51(1): 156–61.
8. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, et al. World Health Organization grade „a” motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod*. 2005 Oct; 20(10): 2769–75.
9. Esteves SC, Roque M, Bradley CK, Garrido N. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2017 Sep; 108(3): 456–467.e1.
10. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002 Jan-Feb; 23(1): 25–43.
11. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003 Jul-Aug; 9(4): 331–345.

12. **Shamsi MB, Imam SN, Dada R.** Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Nov; 28(11): 1073–1085.
13. **Dul EC, Groen H, van Ravenswaaij-Arts CM, et al.** The prevalence of chromosomal abnormalities in subgroups of infertile men. *Hum Reprod.* 2012 Jan; 27(1): 36–43.
14. **Deebel NA, Galdon G, Zarandi NP, et al.** Age-related presence of spermatogonia in patients with Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2020 Jan 1; 26(1): 58–72.
15. **Rodrigo L, Meseguer M, Mateu E, et al.** Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biol Reprod.* 2019; 101(6): 1091–1101.
16. **Sies H.** Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie.* 1986; 98(12): 1061–1075.
17. **Agarwal A, Said TM.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 2005 Mar; 95(4): 503–507.
18. **Rhemrev JP, Menkveld R, Roseboom TJ, et al.** The acrosome index, radical buffer capacity and number of isolated progressively motile spermatozoa predict IVF results. *Hum Reprod.* 2001 Sep; 16(9): 1885–1892.
19. **McDowell S, Kroon B, Ford E, et al.** Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014; 7: CD010461.
20. **Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, et al.** Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology.* 2017; 5(6): 1055–1063.