ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024 **Dominika Bouzková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B0914

Dominika Bouzková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

POSOUZENÍ VLIVU OXIDATIVNÍHO STRESU NA PARAMETRY SPERMIOGRAMU

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Gold

PLZEŇ 2024

Na této straně se v tištěné verzi vkládá zadání bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024

……

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Bouzková Dominika

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Posouzení vlivu oxidativního stresu na parametry spermiogramu

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Gold

Počet stran – číslované: 64

Počet stran – nečíslované: 15

Počet příloh: 6

Počet titulů použité literatury: 74

Klíčová slova: spermie, oxidativní stres, spermiogram, volné radikály

Souhrn:

Mezi jednu z největších překážek při početí patří kvalita spermatu, která je ovlivňována celou řadou faktorů. Téměř všechny mají spojitost s ROS a dalšími radikály, které se významně podílí na fertilizační schopnosti muže. V této práci se zabývám otázkou, jaký vliv má oxidativní stres na spermie a co se s touto skutečností pojí nejvíce.

Při vyhodnocování výsledků měření jsem měla k dispozici vzorky 83 mužů u nichž jsme míru oxidativního stresu měřili metodou MiOXSYS v rámci rozšířeného spermiogramu na klinice IVF fertility Pilsen. Pacienti byli na základě výsledku spermiogramu separováni do dvou skupin – kontrolní (normozoospermie) a sledovaní (abnormální spermie). Analýza byla stanovena na základě doporučení stanovených WHO z roku 2021.

V rámci standartního vyšetření byla stanovena mimo jiné i koncentrace spermií v ejakulátu v Maklerově komůrce a systému DynaMed, dále pak motilita a morfologie pohlavních buněk spolu s leukocyty.

Z výsledků naší práce lze s jistotou říci, že míra oxidativního stresu je pro spermie zcela klíčová. Jakmile dojde ke zvýšenému působení volných radikálů, dojde k narušení spermatické motility, morfologie i metabolismům. Tudíž redoxní potenciál nad 1,36 mV/ml spermií/ml má statistický význam na viabilitu a fertilitu spermie. Zároveň nelze však opomenout, že nízká míra oxidativního stresu je podmínkou správného vývoje zralých spermií.

Abstract

Surname and name: Dominika Bouzková

Department: Department of paramedic science, medical diagnostics studies and public health

Title of thesis: Assessment of the effect of oxidative stress on spermiogram parameters

Consultant: Mgr. Lukáš Gold

Number of pages – numbered: 64

Number of pages – unnumbered: 15

Number of appendices: 6

Number of literature items used: 74

Keywords: sperm, oxidative stress, spermiogram, free radicals

Summary:

One of the biggest obstacles to conception is sperm quality, which is influenced by a variety of factors. Almost all of them are related to ROS and other radicals, which are significantly involved in a man's fertilization ability. In this paper, I address the question of what effect oxidative stress has on sperm and what is most associated with this fact.

In evaluating the results of the measurements, I had samples of 83 men in whom the level of oxidative stress was measured by the MiOXSYS method within the framework of an extended spermiogram at the IVF fertility clinic Pilsen. The patients were separated into two groups based on the spermiogram results - control (normal sperm) and follow-up (abnormal sperm). The analysis was based on the recommendations set by the WHO in 2021.

The standard examination included determination of sperm concentration in the ejaculate in Makler's chamber and DynaMed system, as well as motility and morphology of sex cells along with leukocytes.

From the results of our work it can be said with certainty that the degree of oxidative stress is quite crucial for sperm. Once the exposure to free radicals is increased, sperm motility, morphology and metabolism are impaired. Thus, a redox potential above 1.36 mV/ml sperm/ml has statistical significance on sperm viability and fertility. At the same time, it cannot be forgotten that a low level of oxidative stress is a prerequisite for proper development of mature spermatozoa.

Předmluva

Pro tuto svou bakalářskou práci jsem se rozhodla z důvodu, že problematika přirozeného početí se dotýká velké části dnešní populace a osobně mě toto téma oslovilo už v dřívější době. Lidé si často nedovedou pod pojmem oxidativní stres představit konkrétní hrozbu či problém, který by se jich přímo dotýkal. Chtěla jsem se do této problematiky hlouběji ponořit a ověřit si do jaké míry ovlivňuje plodnost.

Poděkování

Děkuji panu Mgr. Lukáši Goldovi za vedení této bakalářské práce, ochotnou komunikaci a možnost využívat odborné materiály a prostory Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ 14
SEZNAM TABULEK 15
SEZNAM ZKRATEK 16
ÚVOD 18
TEORETICKÁ ČÁST 19
1 FYZIOLOGIE SPERMIE 19
1.1 Morfologie spermie 19
1.1.1 WHO klasifikace 19
1.1.2 Hlavička 22
1.1.3 Krček 23
1.1.4 Bičík 23
1.2 Vývoj spermií 24
1.2.1 Spermatogeneze 24
1.2.2 Spermiogeneze 25
1.2.3 Posttestikulární zrání 26
1.2.4 Hormonální regulace spermatogeneze 27
1.3 Složení ejakulátu 27
1.4 Seminální plazma 28
1.4.1 Bílé krvinky 29
1.5 Antioxidanty ve spermatu 29
1.5.1 Zinek 29
1.5.2 Vitamin E 30
1.5.3 Vitamin C 30
1.5.4 Koenzym Q10 30
2 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU 31
2.1 Role kyslíku v organismu 31
2.1.1 Typy ROS 31
2.1.2 Peroxid vodíku 32
2.1.3 Superoxid 32
2.1.4 Hydroxylový radikál 32
2.1.5 RNS 33
2.1.6 RNS v eukaryotických organismech 33
2.2 Produkce ROS 33
2.3 Chemický proces přeměny kyslíku 34
3 VLIV ROS NA SPERMIE (LIPOVÁ PEROXIDACE, FRAGMENTACE DNA, APOPTÓZA) 35

3.1. ROS scavengers ... 36
3.1.1 Superoxiddismutáza (SOD) ... 36
3.1.2 Glutathionperoxidáza (GPX) ... 37
3.1.3 Kataláza (CAT) ... 37
3.2 Vliv ROS na spermie – lipoperoxidace ... 38
3.3 Vliv ROS na spermie – fragmentace DNA spermií (SDF) ... 39
3.4 Vliv ROS na spermie – apoptóza ... 40
4 ROS A OXIDATIVNÍ STRES SPERMIE ... 41
4.1 Mužská neplodnost ... 41
4.2 Oxidativní stres ... 41
4.3 ROS ve spermatu a cAMP ... 42
4.3.1 cAMP ... 42
4.3.2 Endogenní ROS ... 42
4.3.3 Exogenní ROS ... 43
PRAKTICKÁ ČÁST ... 46
4.4 Spermiogram – jeho typy a parametry ... 46
4.4.1 Parametry spermiogramu ... 47
5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE ... 52
5.1 Hlavní cíl ... 52
6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY ... 53
7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU ... 54
8 METODIKA PRÁCE ... 55
8.1 Vyšetření spermiogramu ... 55
8.1.1 Použité média a materiály ... 55
8.1.2 Kapalnění a viskozita ... 55
8.1.3 Objem a vzhled ejakulátu ... 55
8.1.4 Koncentrace, motilita, morfologie spermií a koncentrace kulatých buněk ... 56
8.2 Vyšetření sORP systémem MiOXSYS ... 57
8.2.1 Použité média, materiály a přístroje ... 57
8.2.2 Princip metody ... 57
8.2.3 Postup měření ... 57
9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ... 59
DISKUZE ... 62
ZÁVĚR ... 65
10 SEZNAM LITERATURY ... 66
SEZNAM PŘÍLOH ... 76
PŘÍLOHY ... 77

Příloha A – fotografie laboratorních zařízení a pomůcek 77
Příloha B – zdrojová data 80

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Morfologické odchylky spermie 22
Obrázek 2: Detailní popis struktury spermie 23
Obrázek 3: Maklerova komůrka pod mikroskopem 77
Obrázek 4: Maklerova komůrka 77
Obrázek 5: IMSI 78
Obrázek 6: Kalibrační čip 78
Obrázek 7: MiOXSYS s výsledky měření 79

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty spermiogramu dle standartů WHO 2021: Hodnoty spermiogramu dle standardů WHO 2021 20
Tabulka 2: Jednotlivé varianty spermiogramů na pracovišti 47
Tabulka 3: Hodnocení DNA fragmentačních testů a jejich vliv na plodnost 51
Tabulka 4: Rozdělení mužů na kontrolní a sledovanou skupinu 59
Tabulka 5: Rozdělení mužů dle výsledku spermiogramu a sORP 59
Tabulka 6: Zhodnocení vlivu sORP na koncentraci spermií 60
Tabulka 7: Zhodnocení vlivu oxidativního stresu na pohyblivost spermií 60
Tabulka 8: Zhodnocení vlivu zvýšené koncentrace sORP na morfologii spermií 61
Tabulka 9: Zhodnocení vlivu sORP na koncentraci spermií v kategorii spermiogramů, kde se odchylky kombinují 61

SEZNAM ZKRATEK

ROS ..... Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)

RNS ..... Reaktivní formy dusíku (Reactive nitrogen species)

WHO ..... Mezinárodní zdravotnická organizace (World Health Organization)

IVF ..... In-vitro fertilizace

SDF ..... Fragmentace DNA spermií

RNE ..... Reduce nuclear envelope

NPC ..... Nuclear pore complexes

PT ..... Perinukleární théka

DFI ..... Index fragmentace DNA

AMH ..... Anti-mülleriánský hormon

cAMP ..... Cyklická forma adenosinmonofosfátu

PKA ..... Proteinkináza A

EDS ..... Ethan dimethansulfonat

LH ..... Luteinizační hormon

FSH ..... Folikulostimulační hormon

SOD ..... Superoxid dismutáza

ER ..... Endoplazmatické retikulum

ATP ..... Adenosintrifosfát

G6PD Glukoza-6-fosfátdehydrogenáza

8OHG 8-hydroxy-guaninu

8OHdG ..... 8-OH-2'-deoxyguanosinu

GnRH ..... Gonadotropin releasing hormon

WBC ..... Leukocyty (White blood cell)

VMK ..... Vyšší mastné kyseliny

LPO ..... Laktoperoxidáza

GPX ..... Gluthation peroxidáza

IDO ..... Indoleamin dioxigenáza

CAT ..... Kataláza

PUFA ..... Polynenasycené mastné kyseliny

DHA ..... Dokosahexanová kyselina

EPA ..... Eikosapentanová kyselina

AA ..... Arachidonová kyselina

MDA ..... Malondialdehyd

4-HNE 4-hydroxynonenal

TBAR ..... Spektrofotometrická reakce s kyselinou thiobarbiturátovou

PAE ..... Estery kyseliny ftalátové

PVC ..... Polyvinylchlorid

ÚVOD

O dnešní době se velmi často mluví jako o uspěchané, rychlé a hektické. Lidé nemají čas na pravidelný pohyb, péči o sebe sama ani zamyšlení se nad původy svých zdravotních neduhů. Velmi často se také setkáváme se skutečností, že lidé v našem okolí, ať už rodina či přátelé, mají problém založit rodinu. Čím dál tím více lidí využívá služeb reprodukčních klinik a genetických laboratoří. Má bakalářská práce se věnuje jednomu z těchto problémů, a to poruše schopnosti spermie oplodnit vajíčko. Těchto poruch však existuje celá řada a já si zde budu klást otázku do jaké míry volné radikály poškozují spermie a jaká je statistická souvislost s mužskou neplodností.

Lze s jistotou říci, že převážná část těchto problémů pramení právě z dnešního životního stylu mladých mužů. Oxidativní stres má původ v mnoha rovinách našeho každodenního života a v míře se kterou se s ním nyní často setkáváme je schopen překonat obranné a reparační mechanismy organismu a působit závažné problémy v rozsahu celého organismu.

Oxidativní stres se stanovuje s rámci rozšířeného vyšetření spermií v ejakulátu – spermiogramu. Využívá se stanovení redoxního potenciálu v rámci sORP testu, který dokáže odlišit normozoospermiky od abnormálních pacientů.

TEORETICKÁ ČÁST

1 FYZIOLOGIE SPERMIE

1.1 Morfologie spermie

Kvalita ejakulátu není důležitá pouze pro oplození vajíčka a fyziologický vývoj plodu a narození zdravého potomka. Kvalita spermatu nám může odhalit mnohé o samotném klientovi. Dokáže nám poskytnout informace o tom, zda ve varlatech a nadvarlatech neprobíhá určitá patologie, může odhalit zneužívání návykových látek, endokrinní disruptory i tumorové markery. Často díky tomu dojde k odhalení infertility vlivem kvantitativní analýzy, při níž je zjištěna nedostatečná sekrece semenných váčku a varlat. Díky tomu, že při vyšetření spermií se udržuje jejich kompaktnost, lze z těchto buněk vyčíst informace o procesech v těle klienta a odkrýt celotělovou patologii.

1.1.1 WHO klasifikace

Spermie má tři majoritní části – hlavičku, spojovací oddíl (krček) a bičík. Tyto struktury jsou obaleny jednou kontinuální cytoplazmatickou membránou. Jak je již výše napsáno, její morfologie je zcela klíčová pro celý proces diagnostiky. Avšak pro správné vyšetření vzorku je nedílnou součástí i klasifikace. Dnes existují dvě klasifikační schémata opírající se o tzv. Tygerbergova přísná kritéria (Tygerberg strict criteria), jedná se o klasifikační systém dle WHO a ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) (Mortimer, 2018).

Dle WHO doporučení z roku 2021 je za normozoospermii považován ejakulát, pokud má koncentraci spermií větší než 16 x 10^6 spermií/ml, s progresivní pohyblivostí nad 30 % a s celkovou pohyblivostí více jak 42 %. Víc než 4 % jich musí vykazovat fyziologický morfologický nález. Všechny tyto údaje byly zjištěny při teplotách 37 stupňů celsia (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 1992). Je již známo, že pohyblivost spermie je ve velké míře ovlivněna teplotou prostředí, v němž se nachází. Morfologie spermií se vyšetřuje ze zkapalněného ejakulátu, kdy je vzorek nanesen na podložní sklíčko a ponechán na vzduchu při pokojové teplotě. Po zaschnutí je vzorek obarven Giemsou a následně vyhodnocen. Dle dalších WHO kritérií má mít normospermie oválnou hlavičku, která je ze 40–70 % překryta akrozomem. Dále se u ní nevyskytují žádné deformity bičíku, středního spojovacího oddílu, krčku ani

cytoplazmatické kapičky (cytoplasmic droplets) větší než 50 % hlavičky spermie. (Cipak, 2009) V případě překročení těchto norem se jedná o patologický nález.

Tabulka 1: Hodnoty spermiogramu dle standartů WHO 2021: Hodnoty spermiogramu dle standardů WHO 2021

Parametry	**Fyziologické hodnoty SPG**
Barva	Opaleskující
Objem	> 1,5ml
Morfologie	≥ 4 % normálních morfologie
Aglutinace (0 až 4)	0 až 1
Koncentrace spermií	≥ 16 x 10^6/ ml
Celková motilita	≥ 42 %
PR motilita	≥ 30 %
pH	7,2
Leukocyty	<1 x 10^6/ ml

Zdroj: World Health Organization, 6. edice z roku 2021

Cytoplazmatické kapičky jsou dvojího významu. Jedná se buďto o zadržení většího množství cytoplazmy, které vznikly po vystavení vzduchu při přípravě preparátu. Stejně tak se může jednat o fyziologicky přítomné vezikuly citlivé na osmózu (Cooper, 2004).

Již na konci dvacátého století byly popsány očité souvislosti mezi životním stylem a prostředím, genetickými faktory a abnormalitou spermií. (Wyrobek, 1983)

Dle šestého vydání WHO příručky pro vyšetření spermatu se o případné abnormalitě rozhoduje na základě posouzení všech jejích částí – hlavičky, spojovacího oddílu, bičíku a cytoplazmatických reziduí.

Normospermie musí mít hladkou hlavičku pravidelného tvaru, která je ze 40–70% pokrytá akrozomální oblastí. V případě překročení těchto limitů je spermie považována za abnormální. Akrozomální část (neboli čepička) nesmí obsahovat žádné velké vakuoly, přípustné jsou nanejvýš dvě malé vakuoly s podmínkou, že nezabírají více než ⅕ hlavičky. Ta část hlavičky, která není pokryta akrozomem – tzv. postakrozomální, nesmí obsahovat žádné vakuoly. Důraz je kladen i na poměr šířky a délky hlavičky, který nesmí překračovat hodnotu 1,5. Pakliže ano, jedná se o buňku kulatou nebo prodlouženou, což má vliv na schopnost spermie proniknout oocytem. Mezi tvarové odchylky hlavičky patří pyriformní,

asymetrický, amorfní nebo i tzv. non-oval týkající se vrchní části hlavičky a v neposlední řadě makrocefalie a tzv. „špendlíková“ mikrocefálie. Nejsou výjimkou ani spermie se dvěma hlavičkami.

Spojovací oddíl neboli krček („midpiece“) musí mít délku odpovídající hlavičce. Nesmí být ztluštělý, zahnutý ani příliš zasunutý do hlavičky spermie. Za abnormální je považována i přítomnost cytoplazmatických kapek. Většina tvarových odchylek je zapříčiněna poruchou struktur tvořících krček – a to mikrotubuly a mitochondrie.

Bičík lze považovat za nejvýraznější část celé této pohlavní buňky, jelikož tvoří její převážnou část. Jeho průměrná délka se udává jako 45 μm, což je desetinásobek délky hlavičky. Bičík musí být hladký bez jakýchkoliv ohybů, stočení, zlomů nebo nepravidelností.

Výše již bylo zmíněno že maximální množství pro obsah cytoplazmatických kapiček (cytoplasmic droplets) je 50% velikosti hlavičky. Normospermie se běžně pohybují kolem ⅓, pak už je klasifikována jako anomálie (Campbell, 2021). Není však pravidlem, že fertilní muž musí produkovat pouze normospermie. Uvádí se, že ve spermatu plodného muže se běžně nachází velká část morfologicky odlišných spermií (Schwartz, 1984).

Jednou z typických početních odchylek je azoospermie a oligospermie. Azoospermie čili absence spermií v ejakulátu, má dvojí typ klasifikace – obstrukční a neobstrukční. Oba typy se pojí s odlišnými léčebnými postupy a diagnostikou. Pro jejich jednotlivé rozlišení se využívá anamnézy klienta spolu s fyzikálním, laboratorním a genetickým vyšetřením.

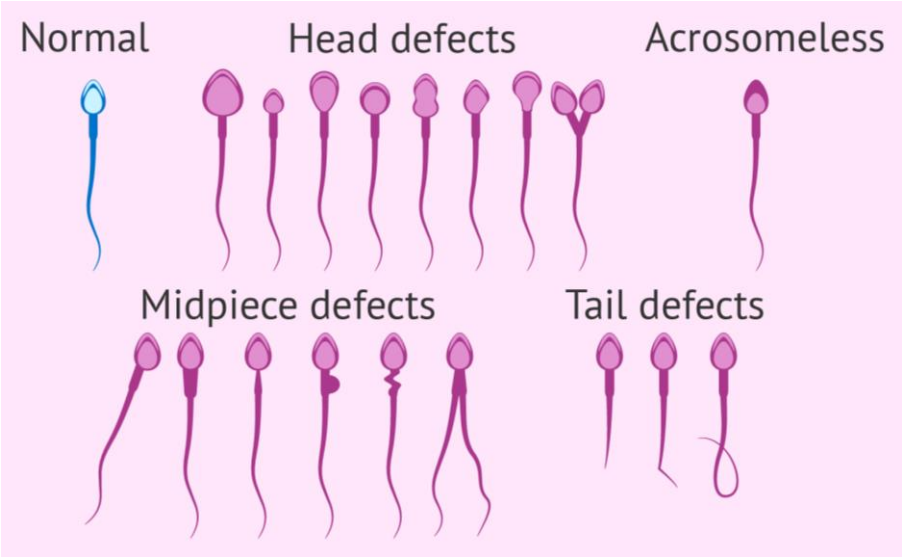
Obstrukční azoospermie má tzv. sekundární vznik díky obstrukci urogenitálního traktu. Vrozená forma obstrukční azoospermie je typická pro pacienty trpící cystickou fibrózou.

Neobstrukční typ azoospermie vzniká selháním varlat – primární týkající se varlat, sekundární týkající se hypothalamu a hypofýzy. Její diagnostikování je komplexnější než už předchozího typu. Zahrnuje cytogenetická vyšetření a léčba spočívá v chirurgické rekonstituci a léčbu primárního problému. Podíl azoospermie na infertilitě činí 15 % všech případů. Statistiky převládá neobstrukční typ (60 %) (Wosnitzer, 2014).

Termín oligospermie lze definovat dvěma hodnotami – pod 15 mil./ml ejakulátu a pod 5 mil./ml ejakulátu, toto se nazývá oligospermia gravis (těžká oligospermie). Příčina

této abnormalita může být různé povahy, od vystavením vnějším vlivům, přes hormony až po poruchy varlat (Skinner, 2018).

Obrázek 1: Morfologické odchylky spermie



Zdroj: ZERMIANI M.D., PH.D., Marta, Sara SALGADO B.SC., M.SC., Silvia Azaña GUTIÉRREZ B.SC., M.SC. a Cristina Algarra GOOSMAN B.SC., M.SC. What Is Sperm Morphology? – Meaning & Normal Range. In: InviTRA [online]. 2022 [cit. 2024-03-16]. Dostupné z: https://www.invitra.com/en/wp-content/uploads/2014/07/Sperm-morphology_en-780x332.png.webp¨

1.1.2 Hlavička

Hlavička spermie je tvořena dvěma základními kameny – DNA a histony. Avšak histony jsou během spermiogeneze z větší části nahrazeny protaminy. Tyto látky nesou klasný náboj a díky tomu je zajištěna hyperkondenzace jádra. Tento proces je klíčový pro vznik typicky hydrodynamického tvaru hlavičky, který umožňuje správnou motilitu spermie, i její průnik do oocytu. Jádro je na svém povrchu obaleno redukovaným jaderným obalem (reduced nuclear envelope – RNE) bez komplexu jaderných pórů (nuclear pore complexes – NPC). Dále se přes jádro pne bílkovinná perinukleární théka (PT), která má za úkol chránit jádro. Její pevnost a stabilitu zajišťují disulfidické vazby mezi proteiny (Sutovsky, Manandhar, 2017). Hlavičku z vnějšku pokrývá z velké části akrozom, který při splynutí spermie a oocytu uvolňuje enzymy, které naruší obal oocytu. Jedná se zejména o fosfatázu, která uvolňuje fosfátovou skupinu $(PO_4)^{3-}$, dále pak proteázu a glykohydrolázu (Abou-Haila, 2000).

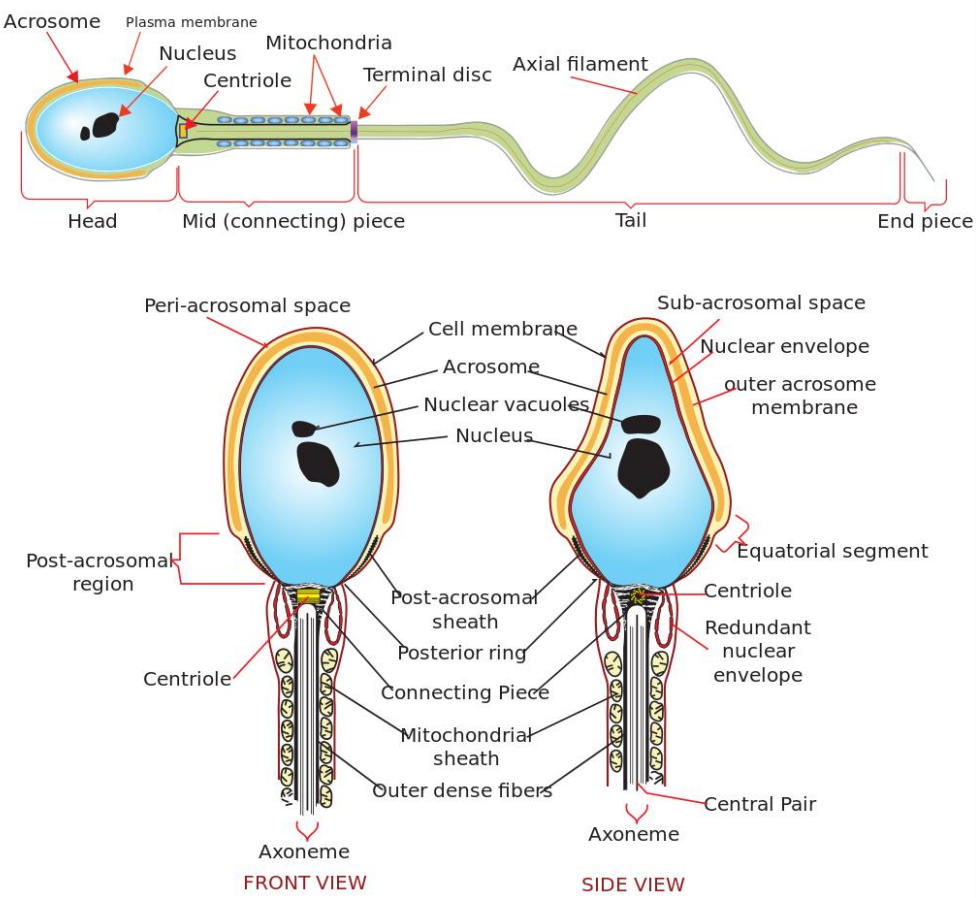
1.1.3 Krček

Krček je ovinut šroubovitým obalem mitochondrií, které mají za úkol generovat energii potřebnou pro pohyb spermie. Na každé spermii se nachází přibližně 75 až 100 mitochondrií (Sutovsky, Manandhar, 2017).

1.1.4 Bičík

Neodmyslitelnou funkcí bičíku je pohyb. Jak již bylo výše popsáno, bičík musí být tenký a hladký, aby byl schopen zajistit doputování spermie k oocytu ve vejcovodu. Pohyb, který vykonává je zprostředkován specifickým uspořádáním mikrotubulů 9 + 2, které bičík utváří. Jedná se o devět periferních symetricky uspořádaných mikrotubulových doubletů, které jsou vzájemně propojené motorickým proteinem dyneinem (Sutovsky, Manandhar, 2017).

Obrázek 2: Detailní popis struktury spermie



Zdroj: Diagram of a human sperm cell. In: Wikipedia [online]. 15.3. 2024 [cit. 2024-03-16]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_en.svg

1.2 Vývoj spermií

1.2.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je jeden z mnoha komplexních systému v těle muže. Počíná pohlavní dospělostí a probíhá ve varlatech – konkrétně v tubuli seminerfrini. Na celém procesu spermatogeneze se však podílí mnoho jednotlivých struktur varlete a udávají tak výslednou kvantitu a zároveň i kvalitu, které v procesu fertilizace hrají zásadní roli. Uvádí se, že celý proces tvorby spermie trvá zhruba 74 dní. Avšak jedny z novějších studií dokazují (Misell, 2006), že spermatogeneze může u zdravého muže trvat v rozmezí 42–76 dní, přičemž za pouhý jeden den je dospělý jedinec schopen vytvořit 150–275 milionů zralých spermií. (Goldstein, 2016)

Spermatogonie je kmenovou a zároveň i zárodečnou buňkou a má tak nepopiratelně nezastupitelnou úlohu v procesu reprodukce. Spermatogonie lze dělit do tří skupin dle funkce. Jako první máme kmenovou buňku, dále diferenciační a jako poslední proliferační spermatogonii.

Základní funkcí kmenové buňky je schopnost sebeobnovy – ať už z důvodu spotřebení nebo poškození (Van der Kooy, 2000). Díky ní mohou spermatogonie neustále obnovovat své kmenové buňky a dochází tak ke správné spermatogenezi. Z jedné spermatogonie vzniknou meiotickým dělením I a II čtyři zralé spermie s poloviční – haploidní, sadou chromozómů. Ze spermatogonie vznikne za pomoci mitotického dělení primární spermatocyt – toto se označuje jako konec proliferativní fáze spermatogeneze.

Diploidní primární spermatocyt 46, XY je následně připraven na první meiotické dělení – čili meiózu I, které je zakončeno sekundárním spermatocytem. Během poslední fáze profáze I, pachytene, dochází k rekombinaci DNA a vzniknou dva haploidní spermatocyty: 23, X a 23, Y. V průběhu dělení buňky prochází mnoha kontrolními body (tzv. checkpoints), které se nachází ve všech fázích (profáze I, metafáze I, anafáze I, telofáze I). Mimo ně se však na regulaci meiotického dělení I podílí rovněž i poměrně nedávno objevený gen TEX11. Tento gen je charakteristický čistě pro mužskou zárodečnou buňku a je vázán na X chromozomu. Úloha genu TEX11 spočívá v kódování proteinu, jež reguluje především opravy dvouřetězcových zlomů v DNA. Mutací tohoto genu byla u řady pacientů objasněna idiopatická neplodnost s dalšími poruchami spermatogeneze. (Goldstein, 2016)

Druhé meiotické dělení je obdobou toho prvního, na jeho konci vzniknou čtyři haploidní spermatidy: dvě s označením 23,X a dvě 23,Y. Spermatidy se od sekundárních spermatocytů liší pouze ve velikosti jádra, které se pouze mírně zmenšilo. Tímto je ukončen proces spermatogeneze a nastává spermiogeneze. (Creasy, 2013)

1.2.2 Spermiogeneze

Během této fáze vývoje dochází k velkému množství morfologických změn, které postihují především jádro a cytoplazmu, jež vedou k diferenciaci ve zralé spermie. Zpočátku má buňka kulatý tvar díky jaderným histonů. Zhruba po týdnu histony nahradí protaminy, které jsou charakteristické pro spermatidy.

Protaminy jsou jaderné proteiny bohaté na arginin. Jejich funkcí je nahradit histony a tím pozitivně přispět k vývoji hlavičky spermie. Dále zajišťují efektivnější kondenzaci DNA. Histony však úplně nevymizí.

Spermie díky tomu i prochází změnou tvaru, která jim posléze usnadní a zároveň umožní nalézt vajíčko. Jednou z dalších morfologických změn je tvorba akrozomu, který zaujímá více než polovinu jádra. Paralelně s akrozomem se vyvíjí i Golgiho aparát a formují se chromatidy v jádře. Chromatin je ve formě těsně sbaleného heterochromatinu, jehož rozvolnění a aktivace probíhá až při oplození oocytu a dělí se na dvě centrioly. Vývoj je nadále směřován především do mimojaderné oblasti, kde se postupně vyvíjí mitochondrie, cytoplazma a bičík.

Vývoj spermatidy by se dal rovněž rozdělit do specifických fází dle dané struktury – Golgiho, čepičková (čili “cap”), akrozomová a zrání. První fázi lze shrnout jako přeměnu pro-akrozomálních granul v akrozomální v oblasti Golgiho aparátu. Druhá fáze vyúsťuje v akrozomální čepičku zaujímající přes polovinu obvodu jádra, která se vyvinula z tzv. akrozomálního měchýřku neboli vezikuly (acrosomal vesicle). V Akrozomální fázi se jádro postupně prodlužuje a kondenzuje – tvoří se hlavička spermie. Dochází k redistribuci cytoplazmy směrem od jádra, což podpoří podlouhlý vzhled a vytváří tzv. cytoplazmatický ocas – bičík. Krček a samotný ocas spermie prochází vývojem z distální centrioly. Jako poslední v této fázi je přesun mitochondrií do oblasti tzv. midpeice. Tato oblast je na pomezí hlavičky a ocasu a kumulují se v ní prstencovité mitochondrie. Závěrečná vývojová fáze je zrání a zahrnuje redukci množství cytoplazmy ve spermatidě, které nastává díky kondenzaci a následnému vypuzení cytoplazmy ve spermatidě. Mezi závěr vývoje se řadí i remodelace

spermatidy a vznik nadbytečných organel a molekul mRNA, které se neapoptují, ale nýbrž ukládají do Sertoliho buněk. Tomuto procesu se říká spermiace (Creasy, 2013).

Spermiace probíhá v závěru spermatogeneze a má za následek prodloužení spermatidy a je označována za konec remodelace. Spermatidy jsou uvolňovány v lumenu tubuli seminefrini před jejich přechodem do nadvarlat (O'Donnell, 2018).

Ve zralé zdravé spermii probíhá několik metabolických procesů vyžadujících energii. Tu zajišťují mitochondrie soustředěné ve střední části bičíku. Tímto se zajišťuje natolik potřebná motilita spermie, která je zcela klíčová pro oplození oocytu. Další strukturou zajišťující správný vývoj a dostatek výživy pro spermie jsou Sertoliho buňky (Creasy, 2013).

4.3.2.1. Sertoliho buňky

Sertoliho buňky jsou lokalizovány přímo ve varleti a jak již bylo výše zmíněno, zprostředkovávají fyziologický vývoj spermií, jejich výživu, fagocytózu patogenních částic s potencionální schopností narušit vývoj a funkce spermie, a neméně důležitou produkci Anti-Mülleriánského hormonu (AMH). Tyto buňky tvoří zárodečný epitel tubuli seminiferi a zasahují do všech vývojových stádií (Griswold, 1998).

4.3.2.2. Leydigovy buňky

Leydigovy buňky postnatálního tzv. „adultálního typu" s vyšší produkcí testosteronu se tvoří ve varleti z původních prekurzorových buněk. Obecně se Leydigovy buňky dělí do tří vývojových fází: progenitorová, nezralá a zralá. Vývoj adultálních Leydigových buněk je dokončen v období puberty. Jejich funkcí je vytvářet testosteron, který dává vzniku sekundárním pohlavním znakům muže a udržuje fyziologický průběh spermatogeneze. Jednou z jejich vlastností je, že tyto buňky nemají schopnost proliferace, ale v případě poškození se mohou regenerovat pomocí látky ethan dimethansulfonat (EDS) (Benton, 1995).

1.2.3 Posttestikulární zrání

Zralé spermie opouští varlata, pokládají se za morfologicky vyzrálé. Avšak ještě nenabyli schopnosti fertilizace. Tuto schopnost získávají v průběhu posttestikulárního zrání. První fáze, známá jako epididymální maturace, zahrnuje aktivaci signálních drah, epididymální epitel secernuje proteiny, které se zabudovávají do reprodukčního ústrojí muže. Během toho složitého procesu spermie získá schopnost pohyblivosti. Dalším krokem

je kapacitace (zmíněna v kap. 4.3.1). Již v padesátých letech minulého století výzkumníci Chang (1951) a Austin (1952) přišli na to, že spermie by v ženském pohlavním traktu měla být určitou dobu, aby získala schopnost fertilizace během procesu kapacitace. Tento proces se nazývá hyperaktivace spermií. Díky jejich výzkumu je kapacitace dnes považována za nezbytný proces pro fertilizaci (Buffone, 2014).

1.2.4 Hormonální regulace spermatogeneze

Tvorba spermií je složitý a komplexní proces, který musí podléhat řádné hormonální regulaci, která je poskytována endokrinní a parakrinní cestou. Ústředními hormony tu jsou luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH) a mimo jiné i Leydigovými buňkami tvořený testosteron. Sertoliho buňky disponují transmembránovými receptory pro FSH a Leydigovy buňky pro LH. Nejvíce se na regulaci spermatogeneze podílí právě testosteron a FSH (Sofikitis, 2008).

Celý proces regulace začíná v hypotalamu, kde je utvářen gonadoliberin (GnRH – gonadotropin-releasing hormone). Ten je pomocí nervových drah transportován do adenohypofýzy, kde stimuluje tvorbu glykoproteinů LH a FSH, které mají přímý účinek na funkci varlat. Hlavní úlohou FSH je podpora proliferace Sertoliho buněk u chlapců v prepubertálním věku mezi 6. až 11. rokem života. Množství Sertoliho buněk pak ovlivňuje v pubertě vývoj varlat, množství vytvořených spermií a v rané fázi intrauterinního vývoje zajišťují i vývoj primárních mužských pohlavních znaků prostřednictvím sekrece AMH čímž se potlačí znaky ženského pohlaví. Přestože i muži pro fyziologické procesy vyžadují nízké koncentrace typicky ženského hormonu estradiolu, v rozmezí 40–161 pmol/l. Na druhou stranu luteinizační hormon (LH) má převážně pouze za úkol regulovat syntézu testosteronu a sestup varlat (Holdcraft, 2004, Sharpe, 2003).

1.3 Složení ejakulátu

Ejakulát se skládá ze dvou základních komponent – spermií (10%) a seminální plazmy (90%). Jak je již na předchozích stranách řečeno, spermie jsou produkovány v semenotvorných kanálcích varlat (tubuli seminiferi). Druhou složku představuje směs celé řady sekretů z prostaty, bulbouretrálních žláz, semenných váčků, prostaty, Littrého uretrálních žláz, varlat a nadvarlat. Nejvíce se na objemu podílí sekret semenných váčků (cca 65–75%), dalších 15-30% vyprodukuje prostata a zbývajících 1–5% vytvoří Littrého a bulbouretrální žlázy.

Množství ejakulátu se odvíjí od mnoha faktorů jako je činnost Sertoliho buněk, zdravotní stav a předešlá sexuální aktivita. V průměru se uvádí 2–5 ml, což činí 40–600 milionů spermií v daném objemu. Z toho tedy vyplívá že na 1 ml spermatu připadá 20–120 milionů spermií.

Heterogenita ejakulátu je zapříčiněna nemožností rovnoměrného promíchání všech sekretů pohlavních žláz v urogenitálním traktu, a proto lze ejakulát rozdělit na tři části (podíly). První obsahuje výměšky z bulbouretrálních a Littrého žláz (tzv. parauretrální). Druhá část je tvořena z prostatické tekutiny a malého množství tekutiny z ampuli přívodných kanálků a nadvarlat. Poslední částí je sekret ze semenných váčků, který tvoří převážnou většinu ejakulátu (Puppo, 2016).

1.4 Seminální plazma

Jako seminální plazma se označuje tekuté prostředí, ve kterém se spermie nachází. Jedná se o acelulární směs tekutin z nadvarlat a přídatných pohlavních žláz jako je prostata, bulbouretrální žlázy a seminální váčky (Ulčová-Gallová, DrSc., 2013, Rodríguez-Martínez, 2011). Všechny tyto sekrety se nerovnoměrně promíchají během ejakulace, z čehož vyplívá, že ejakulát není homogenního složení (Puppo, 2016). Z biochemického hlediska se tato tekutina skládá z velké části z proteinů, cukrů a tukových kapének, přičemž výměšky z jednotlivých žláz mají různý podíl těchto složek. Řádově se jedná o 100 až 200 jednotlivých proteinů či peptidů. To činní 25–55 g/l bílkovin v lidském ejakulátu. Seminální plazma nepředstavuje jen místo pro pohyb spermií, ale plní i ochranné imunologické funkce. Vyšší výskyt buněk specifické i nespecifické imunity (lymfocyt, makrofág, monocyt) má často za následek mužskou infertilitu. Stejně tak fertilizaci značně snižuje přítomnost složky komplementu C3, alfa 1 – antitrypsin a lyzozym. Dále seminální plazma přirozeně obsahuje jednoduchý cukr fruktózu, která je primárním zdrojem energie pro spermie a umožňuje jim správnou motilitu a enzymatické funkce při procesu oplození.

Jednou z nejdůležitějších žláz je však prostata a její prostatická seminální plazma, která je důležitá pro následné zkapalnění spermatu, které nastává 30–60 minut po ejakulaci. Tento sekret má ve svém objemu řadu antioxidantů a biogenní prvky – Ca, Zn, Mg.

V seminální plazmě lze laboratorně stanovit určité markery. Pro prostatu se nejčastěji stanovuje zinek, kyselina citrónová a kyselá fosfatáza. U nadvarlat se stanovuje neutrální alfa-glukoronidáza a volný L-karnitin. U semenných váčků je typické stanovení fruktózy

spolu s prostaglandiny. Snížená sekrece těchto markerů je nejčastěji spojována s infekčním průběhem, a tedy i vyšším podílem bílých krvinek.

Uvádí se, že seminální plazma má mnohem více funkcí, než by se mohlo zdát, krom zajištění viabilita a motility spermií také napomáhá integraci do ženského pohlavního sekretu (Ulčová-Gallová, DrSc., 2013, Rodríguez-Martínez, 2011).

1.4.1 Bílé krvinky

Peroxidázovou barvící metodou nebo imunocytologicky lze zjistit zastoupení bílé krevní řady v seminální plazmě. Za upřednostňovanou metodu je považována imunocytologie, protože dokáže odhalit všechny typy bílých krvinek. Nejzastoupenějšími buňkami jsou granulocyty (50-60%), dále jsou makrofágy (20-30%) a T-lymfocyty (2-5%). Pokud však počet bílých krvinek překročí hranici 10^6 WBC/ml spermatu, jedná se o leukocytospermii, která se významně podílí na mužské infertilitě (10–20% všech případů). Snižuje počet a motilitu pohlavních buněk a snižuje schopnost spermií proniknout do oocytu. Za hlavní zdroje těchto buněk se považují nadvarlata spolu s prostatou – nezánětlivý původ. Důkazem pro to je, že muži po vasektomii mají v ejakulátu nižší počet WBC. U mužů s prostatitidou je výrazně snížena kyselina citrónová díky nadbytku bílých krvinek pocházejících ze zánětu – zánětlivý původ. Avšak statisticky je až 80% leukocytospermatických vzorků negativní na mikrobiologické vyšetření. Mnohem větší podíl na tom mají reaktivní formy kyslíku, které mají dlouhodobý efekt, na rozdíl od infekcí mužského urogenitálního, se kterým se seminální plazma dokáže díky svým komponentám relativně rychle vypořádat.

Mimo zánětlivé a nezánětlivé příčiny zvýšených hodnot WBC existuje ještě vliv užívání alkoholu, kouření cigaret a marihuany (Wallach, 1995).

1.5 Antioxidanty ve spermatu

1.5.1 Zinek

Zinek je pro člověka důležitým biogenním prvkem přijímaným v potravě. V celém těle se ho nachází okolo 2–3 gramů. Mezi jeho hlavní funkce řadíme: syntézu DNA, proteosyntézu, genovou expresi, metabolismus vitamínů a mastných kyselin, syntézu hormonů, apoptózu a fertilitu. Tento antioxidant zajišťuje funkci více než 300 enzymů, jedná se o zcela univerzální látku, jejíž deficit má dopad na celý organismus. Dochází k poruše membránové signalizace, narušení biosyntézy steroidních hormonů v Leydigových buňkách

(testosteron) protože tyto buňky už hůře reagují na působení gonadotropního hormonu, a reaktivní formy kyslíku snáze působí na vývoj spermií. Mimo jiné jeho deficit způsobuje atrofii semenných kanálků, což vede k poruše spermatogeneze. Oxidativní stres je brzkým ukazatelem deficitu zinku. Díky citlivosti spermatogeneze se jeho vliv projeví dříve a snáze než na jiných tkáních. Nedostatek zinku se samozřejmě projevuje i na kvalitě kůže a jejích derivátů spolu se zažíváním, ale to už není předmětem této práce (Nair, 2005).

1.5.2 Vitamin E

Jedná se o nepostradatelnou složku potravy, která spolu s dalšími esenciálními látkami zajišťuje správné funkce organismu. Patří mezi v tucích rozpustné vitaminy a nese v sobě dvě skupiny aktivních látek – tokoferoly a tokotrienoly. Z potravy můžeme získat jeho nejvíce aktivní formu a to d-alfa-tokoferol. Je to výborný antioxidant, který v první řadě chrání membránu spermii před působením ROS a oxidačním stresem, který v době infekce vyvolávají bílé krvinky.

Již na konci minulého století doktorka Eli Geva během svých experimentů dokázala, že pouze jednoměsíční léčba suplementací vitaminem E měla za následek snížení míry lipoperoxidace a tím i zlepšení fertility mužů v tomto experimentu. V původním plánu byla dávka 200 mg alfa-tokoferolu stanovena na dobu tří měsíců (Geva, 1996).

1.5.3 Vitamin C

Vitamin C je jedním z nejvíce popularizovaných vitaminů vůbec. Jeho efekt sahá od imunity přes onkologii, proces stárnutí až po spermie. Je to ve vodě rozpustný vitamin a s jeho koncentrací je spjatá motilita, morfologie i koncentrace spermií v ejakulátu. Na základě studií doktora E. B. Dawsona, při níž kuřákům podával suplementy vitaminu C, bylo zjištěno že pouhé týdenní užívání doporučené denní dávky (DDD) stačí pro zlepšení celkové kvality spermií. Vitamin C poskytuje ochranu membránovým lipoproteinům a úzce spolupracuje s vitaminem E (Dawson, 1992). Bylo rovněž dokázáno, že se zvyšující se koncentrací ROS ve spermatu výrazně klesá i hladina vitaminu C (Lewis, 1997).

1.5.4 Koenzym Q10

Jako vitamin C i tato sloučenina je v našem těle všestrannou molekulou. Představuje nedílnou část buněčného dýchacího řetězce a její koncentrace v seminální plazmě odráží i kvalitu spermií a rovněž je chrání před negativními účinky volných radikálů (Mancini, 1994). Používá se i pro posouzení míry poškození oxidačním stresem jako poměr ubiquiolu a ubiquinonu, kdy se jedná se o jeho redukovanou a oxidovanou formu (Alleva, 1997).

2 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

2.1 Role kyslíku v organismu

Kyslík je základní životní podmínkou pro člověka a nelze jej nijak nahradit. Dříve nebylo předpokládáno, že by kyslík mohl mít jakýkoliv negativní vliv na živý organismus či jej dokonce usmrtit. V průběhu evoluce jsme se, spolu s dalšími živočichy, naučili využívat molekulární kyslík jako konečný produkt v oxidativní respiraci. Tímto náš organismus získává potřebné množství energie, které by nám anaerobní oxidace nebyla schopna poskytnout. S odlišným pohledem na věc přišla trojce mužů, kteří se již předtím zásadně prosadili na poli přírodních věd – Joseph Priestley a Carl W. Scheele, objevitelé kyslíku, a Antoine L. de Lavoisier, objevitel oxidace. Přišli se zjištěním, že kyslík není čistě jen nezbytnou komoditou pro naše tělo, ale zároveň látka vysoce toxická. Je schopný zahájit kaskádu redoxních reakcí, které pak mají za následek poškození buněčných struktur, celých buněk i samotných organismů (Gilbert, 1981).

Zlom nastal až v roce 1959, kdy k plnému pochopení této problematiky pomohla doktorka Rebeca Gerschman, která popsala a experimentálně ověřila mechanismus toxicity kyslíku na molekulární úrovni. Dospěla k závěru, že kyslík je škodlivý díky produkci volných radikálů – čili reaktivních forem kyslíku (ROS) (Datta, 2000). Pod pojmem volné radikály je nejznámější právě kyslík, ten však tvoří další funkční skupiny, které patří do této skupiny látek. Je to skupina atomů či dokonce samotný atom, který má volný, nespárovaný, elektron ve valenční vrstvě. Právě ta interaguje s dalšími atomy a zajišťuje chemické reakce.

Nesmíme však zapomínat na proces peroxidace lipidů, která je rovněž zapříčiněna ROS. Tento proces, známý také jako lipoperoxidace, působí konkrétně na nenasycené vyšší mastné kyseliny (VMK), které se nachází v lipidové membráně. Mechanismus tohoto procesu lze popsat jako vytržení atomu vodíku z řetězce metylenové skupiny mastných kyselin. Velkým problémem této reakce je skutečnost, že jedna narušená molekula působí jako volný radikál na další a strhne se tak řetězová reakce. Radikály, které se tohoto procesu nejvíce účastní jsou hydroxylové, peroxylové a alkoxylové (Girotti, 1985).

2.1.1 Typy ROS

Mezi ROS zahrnujeme radikály hydroxylové (OH•), peroxylové (ROO•), dusíku, oxidu dusnatého (NO•) a dusičnanu (NO_2•), alkoxylové (RO•), peroxynitritu (ONOO•), singletový kyslík, superoxidu (•O^{2-}), a ozon (O_3). Všechny tyto radikály disponují

nepárovým elektronem, avšak do skupiny ROS řadíme i dvojici látek, které mají ve své vrstvě spárovaný elektron, a tudíž nejsou volnými radikály, jedná se o peroxid vodíku a peroxid lipidu. Plní funkci zásobárny reaktivních radikálů OH•, ROO• a RO•.

Mechanismus přeměny molekulárního kyslíku z užitečného na škodlivý až destruktivní byl popsán jako jednosměrná redukce kyslíku. Oxidační síla molekulového kyslíku je korigována kinetikou, kterou disponuje díky dvěma nepárovým, spinově paralelním elektronům. K jednosměrné redukci dochází přijetím čtyř elektronů od donoru za vzniku vody, a tím procesem vzniknou hydroxylové radikály, superoxid a peroxid vodíku. K nejreaktivnějším radikálům se řadí právě radikál hydroxylu (Datta, 2000).

Mimo tyto hlavní skupiny sem patří neméně důležitá skupina, a to reaktivní formy dusíku (RNS), jako subtyp ROS. Tuto skupin představují především oxid dusnatý (NO•), oxid dusičitý (NO_2•) a peroxidnitrit ($ONOO^-$) (Takeshima, 2021).

2.1.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku nepatří mezi nejreaktivnější molekuly, je řazen mezi tzv. neradikály. Tato skutečnost se však změní v reakci s endogenními ionty kovů. Společně tak vyprodukují hydroxylové radikály, které se vyznačují vysokou reaktivitou. Díky této skutečnosti je peroxid vodíku jednou z molekul, které ve velké míře zapříčiňují oxidační stres ve spermatu. Poškozují DNA v hlavičce spermie a enzym laktoperoxidázu (LPO) zajišťující nespecifickou humorální imunitní odpověď ve spermatu (Arnoult, 1996).

2.1.3 Superoxid

Tento aniont vzniká pouhým přidáním nadbytečného elektronu k původní molekule kyslíku (O_2). Superoxidový aniont (O_2•$^-$) produkuje, po dismutaci katalyzované pomocí SOD, peroxid vodíku (H_2O_2). Dále je schopen změnit svou formu a stát se peroxylovým (ROO•) či hydroxylovým (•OH) radikálem. Jednou z mála chemických sloučenin, které jsou schopny přímým způsobem anulovávat toxický vliv superoxidu a z něj dalších vznikajících radikálů je vitamin E.

2.1.4 Hydroxylový radikál

Jak již bylo zmíněno, tento radikál vzniká primárně díky peroxidu vodíku. Sloučenina reaguje ve většině případech s přechodným kovem za vzniku hydroxylového aniontu a hydroxylového radikálu. Tomuto procesu se říká Fentonova reakce. Tento radikál se řadí k toxickým oxidačním látkám. Jeho proces poškození spermií je obdobný jako u

jiných sloučenin, napadá strukturu lipidových membrán spermií a tím ji zcela degeneruje (Cadet, 1999).

2.1.5 RNS

Jak již bylo popsáno, obecně ROS lze klasifikovat do těchto dvou hlavních skupin – volné radikály (hydroxylové radikály, superoxidový aniont, peroxylové radikály) a tzv. neradikály (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Mimo tyto hlavní skupiny sem však patří neméně důležité látky, a to reaktivní formy dusíku (RNS), jako subtyp ROS. Tuto skupin představují především oxid dusnatý (NO•), oxid dusičitý (NO_2•) a peroxidnitrit ($ONOO^-$).

Dále se sem také jako u ROS řadí tzv. neradikály dusíku jako kupříkladu kyselina dusičná (HNO_2), dinitrogen tetraoxid (N_2O_4). Výzkumy bylo zjištěno, že tyto molekuly jsou nedílnou součástí metabolismu a života rostlin. Je to určitá varianta našich ROS, plní funkci signálních molekul v rámci odpovědi na stres působící na rostliny. Konkrétně oxid dusnatý (NO•) ve spojení s ROS je klíčový mediátor v obrané reakci vůči patogenům. Korelace ROS a RNS má však přesah až k živočichům a jejich účinek je uplatňován v moderní medicíně.

2.1.6 RNS v eukaryotických organismech

Molekula oxidu dusnatého (NO•) má v živočišném organismu funkci intracelulárního posla, který se podílí na udržení správné funkce svalového, nervového a imunitního systému. Není tedy divu, že mu byl časopisem Science udělen v roce 1992 titul "molekula roku" (Del Río, 2015).

2.2 Produkce ROS

Z dříve uvedených skutečností by se dalo říci, že ROS nemají pro naše tělo žádný pozitivní vliv a jsou pro lidský organismus nepřirozené. Opak je však pravdou, existuje určitá skupina buněk, pro které je proces tvorby ROS zcela zásadní – makrofágy, leukocyty i samotné spermie. Fagocyty zajišťují obranou reakci organismu za pomocí tzv. oxidačního vzplanutí (Datta, 2000). Avšak i tato zdánlivě fyziologická reakce může být přehnaná až nadbytečná a může člověku uškodit. Pokud aktivované granulocyty vyprodukují nadmíru ROS, může dojít k poškození nejen patogenních agens, ale i lidské tkáně (Wallach, 1995). ROS je ve velice malém množství prospěšný například pro maturaci spermie i splynutí oocytu a spemie. Dále ROS obvykle zprostředkovává buněčnou proliferaci a apoptotické dráhy, které regulují buněčný cyklus a programovanou buněčnou smrt (Takeshima, 2021).

Tato skupina tvoří však jen malou část produkce volných kyslíkových radikálů v buňce, většinově se na ní podílí elektrony. Jedná se o elektrony, které se uvolnily z elektronového transportního řetězce v mitochondriích a endoplazmatického retikula (ER) (Datta, 2000).

2.3 Chemický proces přeměny kyslíku

Mechanismus přeměny molekulárního kyslíku z užitečného na škodlivý až destruktivní byla popsána jako jednosměrná redukce kyslíku. Oxidační síla molekulového kyslíku je korigována kinetikou, kterou disponuje díky dvěma nepárovým, spinově paralelními elektrony. K jednosměrné redukci dochází přijetím čtyř elektronů od donoru za vzniku vody, a tím procesem vzniknou hydroxylové radikály, superoxid a peroxid vodíku. K nejreaktivnějším radikálům se řadí právě radikál hydroxylu (Datta, 2000).

3 VLIV ROS NA SPERMIE (LIPOVÁ PEROXIDACE, FRAGMENTACE DNA, APOPTÓZA)

Na základě studií Jonese (Jones, 1979), Aitkena (Aitken, 1989) a Alvareze (Alvarez, 1987) bylo prokázáno, že ROS skutečně poškozují kvalitu ejakulátu, a to konkrétně narušením membrány spermie nasycenými mastnými kyselinami. To má za následek pokles fluidní schopnosti membrány. Dále u spermie dojde ke ztrátě pohyblivosti a umírá.

Toto potvrzuje i laboratorní výzkum prováděný na pohlavních buňkách křečků během penetračního testu. Ejakulát s vysokým podílem ROS, produkovaných aktivovanými granulocyty, potlačily oplozovací schopnost spermií (Wallach, 1995).

Ejakulát se dá rozčlenit na dvě složky – seminální plazma a spermie. Seminální plazma je podstatná část ejakulátu, zajišťuje výživu spermiím a zajišťuje jejich viabilitu (Crha, 2011).

Jednou z dalších úloh seminální plazmy je schopnost inhibovat oxidativní účinky ROS a předcházet tak poškození spermií. Ochranou roli dále plní v jejím objemu antioxidanty. Mezi nejznámější se řadí: albumin, transferin, laktoferin, vitamin C, superoxiddismutáza, zinek a kyselina močová. Na základě výzkumů se zjistilo, že každý muž disponuje odlišnou schopností seminální plazmy chránit spermie před účinky volných kyslíkových radikál. Bylo zjištěno, že pro jedince s počtem granulocytů ve spermatu 0,6 x 10^6/ml, jejichž seminální plazma neplní ochranou funkci, je tato koncentrace schopna poškodit gamety. Naopak u mužů s vyšší schopností seminální plazmy chránit kvalitu spermatu je tato koncentrace zanedbatelná. Z tohoto důvodu je diagnostika mužské neplodnosti problematická. Rovněž se uvádí, že k poškození ROS dochází převážně v nadvarleti a varleti díky prodlouženého kontaktu gamet s krevními buňkami (Wallach, 1995).

Typickým rozborem ejakulátu, který je znehodnocen působením ROS a peroxidací lipidů je vysoká hladina polynenasycené mastné kyseliny (PUFAs), nízká koncentrace antioxidantů a porucha mechanismů opravující membránu poškozených spermií. Stejně tak jako ejakulát, tak i tkáň mužského reprodukčního systému je vysoce senzitivní vůči účinku ROS, což se odráží i na tvorbě a vývoji spermií.

Již na konci minulého století bylo zjištěno, že celková koncentrace volných kyslíkových radikálů ve spermatu je vyšší u případu oligospermií a u mužů s morfologickou odchylkou pohlavních buněk na rozdíl od pacinetů s morfologicky normálními spermiemi.

Přestože působení ROS na spermie je z hlediska fertility převážně nepříznivé, existuje i výjimka. Určitá nízká koncentrace ROS je potřebná pro fyziologický vývoj spermií, stejnak jako ROS produkované fagocyty pro potřeby obrany proti patogenních agens. Proto je tolik důležité, aby produkce ROS byla v mezích, které umožňují vývoj a maturaci zralých zdravých spermií. Další důležitou složkou zajišťující ochranu pro normální vývoj spermií je tzv. vychytávač volných radikálů (ROS scavenger). Do této skupiny řadíme enzymy superoxiddismutázu (SOD), glutathion peroxidázu (GPX), indoleamin dioxygenázu (IDO) a katalázu (CAT). Další neenzymatické látky jsou například glutathion, vitamin E a vitamin D. Enzymy CAT, GPX a SOD jsou velmi známou triádou a mají úzce spjaté působení i účinek. Nachází se ve velkém počtu ve všech aerobních buňkách, ať už eukaryotických či prokaryotických.

Výzkumy bylo zjištěno, že nadměrná produkce ROS ve tkání varlete velmi často může výrazně zpomalit vývoj a zrání spermií nebo poškodit tkáň zajišťující jejich vývoj, narušit jejich morfologii i funkci (Alleva, 1997).

3.1. ROS scavengers

3.1.1 Superoxiddismutáza (SOD)

Jak již bylo zmíněno, řadí se do triády enzymů významných pro vychytání ROS. Její konkrétní účinek je takový, že katalyzuje proces dismutace superoxidového aniontu. Tímto vzniká stabilní molekula peroxidu vodíku a kyslík (Drevet, 2006). Tento proces zajišťuje v buňce endogenní obranou schopnost proti oxidačnímu stresu. Mimo tuto funkci zajišťuje superoxiddismutáza ještě i obranu proti zánětu a apoptóze. Výzkumy bylo zjištěno, že přestože se SOD v těle vyskytuje zcela přirozeně a jeho funkce je pro nás velice důležitá, jeho koncentrace se vlivem zvyšujícího se věku a genetických dispozic klesá. SOD je na základě schopnosti vázat kovy dělen do několika tříd. Dále se v tomto dělení uplatňuje citlivost na chemická činidla, a i distribuce kovů v buňce. Rozlišujeme SOD vázající měď a zinek (Cu / Zn – SOD) a dále SOD sloučen s manganem (Mn – SOD). První typ převážně chrání intracelulární prostor – cytoplazmu. Účinek druhého typu SOD se zaměřuje převážně na ochranu mitochondrií. U tohoto enzymu a rovněž antioxidantu by se dalo popsat mnohé,

jeho terapeutické využití, vedlejší účinky i genetika. To však není cílem této práce (Noor, 2002).

3.1.2 Glutathionperoxidáza (GPX)

Stejnak jako SOD i glutathionperoxidáza má více funkcí než jen antioxidativní, avšak v rozsahu této práce se budeme věnovat jen tomuto odvětví. I zde rozlišujeme více typů GPX v závislosti na jejich konkrétní funkci, a to GPX1 až GPX8. Obecně udržují obranu proti oxidačnímu stresu i rovnováhu v redoxních reakcích. GPX1 – 4 a GPX6 jsou funkčně spřaženy s aminokyselinou selenocystein, který využívají jako své aktivní centrum. Ke snížení toxicity ROS dojde díky následné redukci peroxidu vodíku či organických hydroperoxidů na vodu nebo příslušné alkoholy. Katalyzátorem této reakce je právě glutathion.

GPX1 je označována za typicky cytoplazmatickou, z části se však nachází i v mitochondriích. Právě tato glutathionperoxidáza byla jako první objevena a je nejvíce exprimovanou GPX. Její hlavní funkcí je katalyzovat glutathion a podpořit tak redukci ROS.

Za poněkud výjimečný by se dala považovat glutathionperoxidáza 4, která jako jediná z rodiny GPX dokáže přímou redukci lipidových hydroperoxidů.

Další skupinou glutathionperoxidáz tvoří GPX5 a GPX7 – 8. Aktivní centrum těchto látek netvoří selenocystein, nýbrž zbytky aminokyseliny cystein. GPX8 i 7 jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu (ER) a jsou součástí procesu tzv. oxidativního skládání proteinů v dané organele a GPX8 rovněž koriguje hladinu dvojmocných vápenatých kationtů. Pro naše účely je však podstatnější hladina GPX5. Ta je převážně exprimována v nadvarleti a chrání spermie před působením oxidativního stresu.

Mechanismus účinku GPX funguje tak, že GPX spolupracuje s enzymem katalázou a tímto společně vytváří enzymatický antioxidační systém. Tento systém následně slouží ke snížení negativního vlivu ROS a snižuje jejich toxicitu (Pei, 2023).

3.1.3 Kataláza (CAT)

Patří k jednomu z nejzastoupenějších antioxidantů ve tkáních. Tato látka jako svůj kofaktor využívá dva kovy – mangan či železo. Nejčetnější místo lokalizace jsou peroxizómy v buňkách, výjimkou jsou mitochondrie, které tímto enzymem nedisponují. Kov katalyzuje redukci peroxidu vodíku zprostředkovanou CAT na vodu a kyslík. Bylo zjištěno,

že kataláza je natolik účinná, že dokáže za jednu sekundu zredukovat miliony molekul peroxidu vodíku (Ighodaro, 2018).

3.2 Vliv ROS na spermie – lipoperoxidace

Plazmatickou membránu spermie tvoří lipidy, zejména polynenasycené mastné kyseliny, tzv. PUFAs. Tyto sloučeniny, i jejich metabolity, jsou naneštěstí velmi citlivé k oxidaci (Takeshima, 2021). To je zapříčiněno skutečností, že přestože při správných podmínkách má muž optimální hladinu antioxidantů, díky omezenému objemu a omezenému cytoplazmatickému prostoru v těle spermie je snížená dostupnost intracelulárních antioxidantů, které by toto poškození potlačily (Koppers, 2008). Platí zde přímá úměra, že čím více dvojných vazeb, tím snazší peroxidace. Mezi nejznámější zástupce řadíme kyselinu dokosahexanovou (DHA), eikosapentanovou (EPA) a arachidonová (AA).

Lipoperoxidace v hojné míře poškozuje membrány buněk, lipoproteiny a další složky buněk. Dochází zejména k peroxidaci složek buněčné membrány, jakou jsou nenasycené mastné kyseliny, glykolipidy i cholesterol. Tento proces může být vyvolán několika činiteli, mezi první se řadí volné radikály - např. peroxylové a hydroxylové radikály. Tyto sloučeniny nejčastěji pochází z redukce peroxidu vodíku za přítomnosti atomů železa. Druhou skupinu vyvolavatelů lipoperoxidace tvoří tzv. neradikálové sloučeniny (viz kapitola 2.1.5 RNS), jako jsou singletový kyslík, ozon a peroxynitrit, tvořené reakcí oxidu dusnatého a superoxidu.

Lipoperoxidace má tři stěžejní fáze: iniciaci, propagaci, terminaci. Jedná se o řetězovou reakci, která vyústí ve ztrátu fluidity pro oplození a viability spermií. Během iniciace se atomy vodíku vyvážou z dvojné vazby uhlíku na uhlík v nenasycené mastné kyselině. Tyto volné atomy vodíku pak slouží jako pohon pro volné radikály. Druhá fáze, propagace, zahrnuje tvorbu lipidových radikálů. Tyto radikály posléze reagují s kyslíkem za vzniku peroxylových radikálů. Pokud nastane situace, že v reakci jsou přítomny atomy kovů jako je měď či železo, atomy vodíku jsou jimi extrahovány z nenasycených mastných kyselin k produkci dalších lipidových radikálů a lipidového peroxidu vodíku. Terminace je poslední fáze celého procesu a nově vzniklé radikály zde reagují s molekulami lipidů za vzniku převážně cytotoxických aldehydů.

K hlavním produktům lipoperoxidace patří: 4-hydroxynonenal (4-HNE), malondialdehyd (MDA) a akrolein. MDA je hlavní biomarker pro sledování PUFA peroxidace v buňkách, zatímco 4-HNE je považován za hlavní produkt peroxidace PUFA.

Často byly jeho vysoké koncentrace zjištěny v plazmě a orgánech po vystavení oxidativnímu stresu. Většinou se uvádí jako tzv. byproducts, protože jejich vznik není primárním cílem lipoperoxidace. Uvádí se, že množství těchto naměřených produktů odpovídá tzv. Indexu peroxidace lipidů, jak in vitro, tak in vivo. Všechny tyto produkty mají společné nejen to, že narušují membránu mužských pohlavních buněk, rovněž se vážou a rozrušují mitochondriální proteiny elektronového transportního řetězce. To vyústí v únik elektronů a tím se sníží potenciál mitochondriální membrány, produkce ATP a na to navazující pohyblivost spermií.

Jednou z metod měření je kvantifikace MDA za pomocí TBAR – spektrofotometrická reakce s kyselinou thiobarbiturátovou (Takeshima, 2021).

3.3 Vliv ROS na spermie – fragmentace DNA spermií (SDF)

Deoxyribonukleové kyselina se nejčastěji znázorňuje ve své "B formě" a má dvouvláknovou strukturu. Její fragmentace může být jednovláknová (ss-) či dvouvláknová (ds-).

Existují dva hlavní faktory vedoucí k fragmentaci spermiální DNA – snížené množství antioxidantů a nadbytek ROS. Tyto dva činitelé jsou alfou a omegou celé problematiky oxidativního stresu. Otázkou zůstává, proč je DNA spermie, tak citlivá k poškození, i přes veškeré ochranné mechanismy, kterými naše tělo disponuje. Je to důsledkem chyby při kompakci chromatinu během spermiogeneze, kdy se chromatin stlačuje, aby byla zajištěna pevná struktura jaderné hmoty. Tato konkrétní chyba zapříčiní poruchu substituce histonu za protamin. Když protaminy nahrazují v chromatinové struktuře histony, dochází ke stabilizace DNA spermie tím, že se navážou na fosfátovou část nukleotidu tvořící tzv. kostru DNA molekuly. Toto poškození ROS nejběžněji nastává během migrace spermií ze semenných kanálků do nadvarlete. Všechny tyto procesy vedou k vysoké tvorbě a koncentraci dvou podstatných nukleosidů: 8-hydroxy-guaninu (8-OHG) a 8-OH-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG). Zvýšená koncentrace druhého zmíněného produktu je typická pro SDF (Takeshima, 2021).

Oprava takto fragmentované DNA (ss-DNA) není snadná a může probíhat jen ve specifických fázích spermiogeneze. Jakmile se spermie dostanou do oblasti nadvarlat, opravné mechanismy během kondenzace tam nejsou funkční. Druhou, a poněkud riskantní, příležitostí k opravě SDF je právě oocyt. Práce Dr. Wellse zjistila, že s rostoucím věkem matky, klesá schopnost jejího oocytu reparovat poškozené DNA spermie (Wells, 2005).

Výskyt ds-DNA zlomů bez zajištění opravy má za následek kritickou nestabilitu genomu a apoptózu (Sakkas, 2010).

Existuje termín “late paternal effect”, který se vyznačuje zvýšeným množstvím SDF v ejakulátu. Tento jev má škodlivý vliv na vývoj embrya (Tesarik, 2004). Diagnóza zmíněného efektu spočívá ve vyšetření DNA integrity pohlavní buňky. K tomu se přistupuje v případě, že i po opakovaných cyklech umělého oplodnění nedošlo ke graviditě. Takováto embrya vzniklá spojením zdravého oocytu a spermie s vysokou mírou SDF jsou morfologicky nepostihnutá, a proto je nelze při fertilizaci v laboratoři nijak eliminovat (Tesarik, 2005). Během prvních dní gravidity závisí vývoj embrya na jeho vlastní genomové stabilitě, tu ovlivňují právě poškozené spermie. Proto spermie postihnuté SDF mají negativní účinky nejen na oplodnění a průběh těhotenství, ale i na blastulaci embrya a implantaci (Takeshima, 2021).

3.4 Vliv ROS na spermie – apoptóza

Apoptóza je definována jako fyziologická programovaná smrt buňky. Předejde se tím zánětlivým stavům i odumření další buněk a struktur. Je založena na principu signálních a regulačních drah, které v našem případě spouští fragmentace DNA. Jak jsem již zmínila v předchozí podkapitole, ds-DNA zapříčiněné ROS vedou k apoptóze. Mechanismus aktivace apoptózy je takový, že ROS rozrušují mitochondriální membrány, a tím se z mitochondrií uvolňuje cytochrom C. Tento klíčový cytochrom aktivuje apoptotické kaspázy. Diagnosticky u neplodných mužů funguje zvýšený cytochrom C v semenné plazmě jako indikátor poškozených mitochondrií v důsledku oxidativního stresu (Takeshima, 2021).

4 ROS A OXIDATIVNÍ STRES SPERMIE

4.1 Mužská neplodnost

Oxidativní stres je v dnešní době jedna z nejčastějších příčin mužské neplodnosti. Statistka udává, že neplodnost postihuje jeden z pěti páru po celém světe. Ale otázka vyvstává, kdy vlastně nastává neplodnost (Takeshima, 2021). Dle Mezinárodního výboru pro monitorování technologií asistované reprodukce se neplodnost definuje jako neschopnost početí dítěte po minimálně jednom roce pravidelného a nechráněného pohlavního styku (Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss, 2013).

Na základě studií vyplynulo, že neplodnost párů je z 50 % mužského charakteru. Avšak tento problém je ve většině případů multifaktoriální povahy a velmi často i bez zjevné příčiny (přibližně 15 % všech případů). Studie Yumura a spol. z roku 2018 zjistila, že v Japonsku počet idiopatické mužské neplodnosti vystoupal ke 40 % (Yumura, 2018).

4.2 Oxidativní stres

Homeostatická rovnováha je pro naše zdraví i samotný život důležitou komponentou, a právě její narušení co se týče rovnováhy mezi ROS a antioxidanty, je viníkem rozvoje oxidativního stresu ve spermatu a na to navazující poruchy mužské plodnosti. Na předchozích stranách bylo již zmíněno, že oxidativní stres je v malé míře prospěšný pro vývoj a fyziologii spermií, zajišťuje schopnosti spermie oplodnit oocyt a mnohé další. Avšak při nadměrné generaci ROS dochází k nespočtu negativních procesů. V buněčných membránách spermií i epididymálních tkáních dochází k peroxidaci lipidů, která je popsaná v kapitole 2.1. Role kyslíku v organismu. Dále dochází k fragmentaci jaderné DNA a mimojaderné maternální DNA v mitochondriích a to může vyústit v apoptózu.

Dalším důležitým faktorem je skutečnost, že za vznikem oxidativního stresu nestojí pouze ROS, ale do jisté míry i nízká antioxidační kapacita. Funkce antioxidantů v semenné plazmě je ochrana spermií prostřednictvím tří hlavních mechanismů – prevence, záchyt a oprava. Celá problematika byla popsána v kapitole 1.5 Antioxidanty ve spermatu.

Během IVF léčby embryolog není schopen rozpoznat spermii poškozenou oxidativním stresem, pokud nemá viditelné morfologické odchylky. K tomuto odlišení dnes slouží moderní přístroje (dále rozebrané v kapitole 8 Metodika práce). Klinickými výzkumy bylo zjištěno, že použití takto poškozených spermií nejen, jak již bylo popsáno, snižuje samotnou schopnost fertilizace, ale rovněž v případě úspěšného oplození negativně ovlivní

či zastaví vývoj embrya. Často selže implantace, avšak v případě, že je implantace úspěšná často dochází ke spontánním abortům v rané fázi gravidity (Takeshima, 2021).

Jak bylo v kapitole 4.1. uvedeno, většina mužské neplodnosti byla klasifikována jako idiopatická, převážně v Japonsku. V roce 2019 byl panem Agarwalem a spol. zaveden termín MOSI (male oxidative stress infertility) (Agarwal, 2019). Tímto bylo zjištěno, že valné části mužů byla chybně přiřazena diagnóza idiopatické neplodnosti.

4.3 ROS ve spermatu a cAMP

4.3.1 cAMP

Z výzkumu z roku 2015 vyplývá, že i samotné spermie produkují mnoha způsoby ROS. Tyto konkrétní molekuly mají za úkol indukovat cyklickou formu adenosinmonofosfátu (cAMP), aktivují tyrozin kinázu a zvyšují úroveň fosforylace ve spermatu (Takeshima, 2021).

Molekula cAMP funguje jako tzv. Druhý intracelulární posel, který následuje po signální molekule. Tento cyklický derivát ATP pak posléze aktivuje proteinkinázu A (PKA), která spouští kaskádu dalších procesů fosforylace důležitých pro správnou funkci spermie.

Cyklický AMP (cAMP) má vliv na mnohé aspekty funkce spermií a samotného oplodnění. Zajišťuje regulaci kapacitace spermií a akrozomální reakci. Akrozomální reakce je podstatným faktorem pro celý proces oplození, uvolní se při něm enzymy rozpouštějící zonu pellucidu, čímž spermie může proniknout do oocytu. Kapacitací spermie se rozumí kontakt mužské pohlavní buňky a epitelu vejcovodu. Díky této interakci spermie přijde o ochranný akrozomální glykokalyx. Tyto dva procesy jsou vzájemně neoddělitelné. Cyklický cAMP je zásadní složkou pro hyperaktivaci motility, aby mohlo dojít k akrozomální reakci. Na kapacitaci navazuje další jev, a to hyperpolarizace. Ta ovlivňuje kanály pro vápenaté ionty, ty se otevřou při styku s oocytem po předešlé kapacitaci.

Jednou z funkcí je regulace pH a hladiny Ca^{2+} uvnitř spermie, které ovlivňují další pochody v procesu fertilizace (Buffone, 2014).

4.3.2 Endogenní ROS

Dle hlediska původu se ROS dají dělit na endogenní a exogenní. Endogenní ROS jsou produkovány samotným ejakulátem, konkrétně leukocyty (extrinsic ROS) a nezralými spermiemi (intrinsic ROS – tzv. vnitřní). Takové spermie mají v četných případech

abnormální tvar hlavičky spjatou s retencí cytoplazmy. ROS tvořené leukocyty hrají důležitou roli v obraně proti patogenům, kdy leukocyty aktivují systém myeloperoxidázy v rámci oxidačního vzplanutí, kdy zvyšují tvorbu NADPH prostřednictvím hexózomonofosfátového zkratu. Takové leukocyty produkují až stokrát více ROS než neaktivované leukocyty. Nežádoucím účinkem je však rozvinutí oxidativního stresu v semenné plazmě (Takeshima, 2021).

4.3.2.3. Vnitřní ROS

Jak již bylo výše zmíněno, vnitřní (intrinsic) ROS jsou vyprodukovávány nezralými, často i morfologicky abnormálními, spermiemi. Během fyziologického vývoje spermie je pohlavní buňka prodlužována odpadáváním jednotlivých organel cytoplazmy. Při nesprávném vývoji tam tato depozita přetrvávají. To výrazně zvyšuje koncentraci enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD), rovněž dochází k tvorbě NADPH. Tento dinukleotid posléze díky enzymu NADPH oxidázy NOX5 produkuje ROS. Pro následnou léčbu pacienta je důležité rozlišit, zda se jedná o ROS z leukocytů či abnormálních spermií.

Pro odlišení se používá technika barvení myeloperoxidázou zvýrazňující granulocyty produkující nadbytečné množství ROS. Takové buňky při laboratorním vyšetření získají hnědé zabarvení.

Pro zvýraznění spermií produkující ROS se využívá metoda barvení nitroblue tetrazoliem (NBT). Tato látka reaguje se superoxidovými anionty. Dané pohlavní buňky získají modrou barvu, kdy platí, že čím intenzivnější zabarvení, tím vyšší podíl ROS.

4.3.3 Exogenní ROS

Exogenní ROS jsou zapříčeny vnějšími vlivy, jinými slovy to jsou takové vlivy, které můžeme do jisté míry sami ovlivnit. Řadíme sem: kouření, nevhodné stravování a následná obezita, nadměrné pití alkoholu, vyšší věk, znečistěné prostředí, intoxikace těžkými kovy, návykové látky, infekce a varikokéla varlat.

4.3.2.4. Kouření a alkohol

Často jsou tyto problémy spjaty s nedostatečným příjmem všech živin, a z toho vyplívající minimální množství získaných antioxidantů. Těžcí alkoholici často přehlížejí nároky těla na živiny a přijímají převážně sacharidy a nasycené tuky. Studie potvrdily, že alkoholismus rapidně snižuje šanci na úspěšné IVF a navyšuje procento spontánních potratů. U alkoholiků a kuřáků se projevuje zvýšená produkce ROS než u abstinentů či

příležitostných konzumentů. Studie z let 2002 (Saleh, Agarwal) a 2009 (Elshal, El-Sayed) uvedly, že dlouhodobí kuřáci mají zvýšené hladiny prozánětlivých leukocytů v seminální plazmě a sekundárně na to vzniklý nárůst ROS. Bylo zjištěno, že kuřáci měli o 48 % vyšší hladinu bílých krvinek a hladina ROS vykázala nárůst o 107 %. Dalším zkoumaným parametrem byl DFI – index fragmentace DNA, který se vyšetřuje u neplodných mužů. Neplodný kuřák měl hodnoty 37,66 % a neplodný nekuřák 19,34 %. A jak bylo na řádcích výše zmíněno, s těmito faktory nezdravého životního stylu se často pojí nedostatek až absence antioxidantů, vlivem nevyvážené stravy. Výzkum dokázal, že hladiny vitaminu E a vitaminu C byly pod fyziologickou hranicí, tudíž nejenže dochází k navyšování ROS, ale zároveň nám i slábne ochrana proti jejich vzniku.

4.3.2.5. Obezita a teplotní změny

Obezita se ve spojitosti se spermatogenezí pojí s dvěma hlavními problémy. Adipózní fibroblasty ve své molekule nesou enzym aromatázu, jejíž přítomnost přetváří testosteron v estradiol. Muži tento převážně ženský hormon tvoří v malém množství ve tkáni varlete. Při zvýšení sérové koncentrace estradiolu hrozí u mužů gynekomastie. Pro ženy je aromatáza zcela klíčová, zajišťuje dostatek estrogenů během fertilního období života přeměnou testosteron na estradiol. Při jejím poklesu, běžně v období menopauzy, dochází z nadbytku testosteronu k rozvoji spíše mužských sekundárních pohlavních znaků jako jsou například tmavší vousy nad horním rtem. Druhým problémem, který je více spjatý s tématem této práce, je skutečnost, že tuková tkáň přirozeně vytváří určité množství cytokinů. Problém nastává při nadbytku tohoto typu tkáně. Zvýšené množství cytokinů vede k navýšení počtu prozánětlivých leukocytů, na což sekundárně navazuje i vyšší aktivita NADPH oxidázy a ta indukuje oxidativní stres.

Je všeobecně známo, že varlata vyžadují pro správný proces spermatogeneze o 2–3 stupně Celsia nižší teplotu, než je fyziologicky v těle. Proto jsou také varlata umístěna v šourku, kde je regulace teploty snazší. Výzkumy potvrdily, že nošení těsného spodního prádla, pravidelné saunování apod. zvyšuje teplo působící na varlata a nepřímo se tím muž vystavuje oxidativnímu stresu. Kontinuální tepelný stres je však reverzibilního charakteru.

4.3.2.6. Znečištění prostředí

Jedním asi z nejvíce diskutovaných zdrojů exogenního oxidativní stresu je právě kvalita prostředí, ve které žijeme. V této práci již byl zmíněn vliv těžkých kovů na produkci oxidativního stresu, proto se nyní zaměřím na chemické látky v prostředí. Mezi takové se

řadí primárně ftaláty neboli estery kyseliny ftalové (PAE). Ftalátové estery působí jako peroxizomové proliferátory a zapříčiňují produkci peroxidu vodíku. Tato skupina látek se běžně nachází v PVC (obalové materiály, lahve, hračky), dekorativní kosmetice, i jako změkčovadlo pro PVC a insekticidy. Studie odhalily, že ftaláty nepříznivě ovlivňují hormonální a reprodukční systém (Takeshima, 2021). Ftaláty byly v roce 2002 WHO označeny za endokrinní disruptory. Takové sloučeniny mění fungování endokrinního systému a mají přesah i na další generaci (Evropská komise, 2016).

Ftaláty mají schopnost blokovat androgeny a tím zásadně ovlivňují intrauterinní vývoj chlapců. Dochází pak k fenoménu demaskulinizace, kdy jsou poškozovány pohlavní znaky mužů. Gravidní ženy s vysokým obsahem ftalátů porodily chlapce často s nesestouplými varlaty a sníženou anogenitální vzdáleností, výjimkou nebyly ani vrozené vývojové vady prostaty a penisu a nižší spermatogeneze. Tyto informace pochází ze studie z roku 2005 Dr. Shanny Swan, která popsala souvislost koncentrace ftalátů u gravidních žen a feminizace chlapců během vývoje (ARNIKA, 2022, Swan, 2005).

PRAKTICKÁ ČÁST

4.4 Spermiogram – jeho typy a parametry

V praktické části své bakalářské práce je nezbytné představit co to vlastně spermiogram je, protože právě na základě tohoto vyšetření lze posuzovat poškození spermií oxidačním stresem.

V andrologických laboratořích se můžeme setkat se třemi druhy spermiogramu. Jedná se buď o variantu podle standardu WHO dle aktuálních doporučení, s IMSI technologií (viz Obr. 5) pro pokročilé vyšetření morfologie spermie, a s rozšířenou analýzou. Na dalších řádcích si jednotlivé typy popíšeme.

Prvním typem je spermiogram dle WHO standardů. K indikaci tohoto vyšetření dochází při potížích s koncepcí nebo při IVF / IUI / ICSI. Jedná se o základní vyšetření (koncentrace, morfologie a pohyblivosti) standardizovanými metodami, které udává WHO.

Dalším typem je detailní morfologická analýza pomocí IMSI technologie, kterou využívá pracoviště Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o., kde jsem čerpala informace při tvorbě této práce. K indikaci dochází při sníženém počtu morfologicky zdravých spermií (teratozoospemie) a při absenci akrozomu na hlavičce spermie (globozoospemie). Klasický WHO spermiogram je tak obohacen o detailní analýzu všech živých spermií. Při 6000x zvětšení se posuzuje tvar a struktura všech částí spermie. Výhoda oproti prvnímu typu je že zde můžeme trojrozměrně a v reálném čase posuzovat a třídit spermie dle jejich tvaru, struktury a celkového vzhledu. Detailní analýza hlavičky umožňuje zhodnotit integritu kondenzované DNA v jádře, přítomnost vakuol a membrány spermie.

Doplňkovým typem je rozšířená analýza spermatu. Toto vyšetření se provádí při předchozích neúspěšných cyklech IVF, IUI nebo ICSI nebo špatného vývoje embrya; při četných spontánních abortech; idiopatické sterilitě, asthenozoospermii (snížené zastoupení pohyblivých spermií pod 40%) či vyšším výskytu rizikových faktorů. Tento typ spermiogramu, mimo základní morfologickou analýzu, dokáže stanovit vitalitu spermií, fragmentaci DNA a tzv. test zralosti (analýza chromatinu) a pro nás nejpodstatnější oxidativní stres.

Tabulka 2: Jednotlivé varianty spermiogramů na pracovišti

		Kritéria WHO	Spermiogram Standard / WHO	Spermiogram s detailní morfologickou analýzou (IMSI-technika)	Molekulární diagnostika spermatu
1	Objem ejakulátu	✓	✓	✓	✓
2	Koncentrace spermií	✓	✓	✓	✓
3	Celkové množství spermií	✓	✓	✓	✓
4	Zápach	✓	✓	✓	✓
5	Barva	✓	✓	✓	✓
6	Kapalnění	✓	✓	✓	✓
7	Viskozita	✓	✓	✓	✓
8	Aglutinace	✓	✓	✓	✓
9	Kulaté buňky	✓	✓	✓	✓
10	pH	✓	✓	✓	✓
11	Vitalita (podíl živých spermií dle WHO)	✓	✓	✓	✓
12	Motilita (pohyblivost spermií dle WHO)	✓	✓	✓	✓
13	Morfologie spermií dle WHO	✓	✓	✓	✓
14	Morfologie spermií (dle vanderzwalmen 2008, MSOME kritéria)		✗	✓	✓
15	Peroxidáza pozitivní leukocyty		✗	✗	✓
16	Redoxní potenciál / oxidativní stress		✗	✗	✓
17	Dna-fragmentace		✗	✗	✓
18	Stav chromatinu (zralost spermií)		✗	✗	✓

Zdroj: Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen, s.r.o.

4.4.1 Parametry spermiogramu

- ***Objem ejakulátu***

Tento údaj je podstatný pro výpočet celkového množství spermií, které pak odráží stav přídatných pohlavních žláz. Měření je dvojího typu – injekční stříkačkou nebo pomocí

pipety. WHO udává normu tohoto parametru větší než 1,5 ml. Na základě praxe kliniky Next Fertility IVF Prof. Zech se průměr pohybuje v rozmezí 2 – 2,5 ml.

- ***Koncentrace spermií***

Jiným výrazem "total sperm count" je jedním ze základních údajů pro správné vyhodnocení spermiogramu a je jedním ze dvou klíčových faktorů pro vznik těhotenství. Zjišťujeme počet spermií na 1 mililitr spermatu odečtem v čítací komůrce pod mikroskopem (viz Obr 3). Výsledky tohoto vyšetření jsou trojího typu – normozoospermie (16 mil/ml), oligozoospermie (pod 16 mil/ml) a azoospermie, kdy v ejakulátu není žádná pohlavní buňka.

- ***Celkový počet spermií***

Funkci varlat lze dobře odvodit z celkového počtu spermií a objemu ejakulátu. Jedná se o výsledek násobení koncentrace a objemu daného materiálu. Normou je dle WHO hodnota nad 39 milionů, pokud je výsledek nižší než 16 milionů vypovídá to o oligozoospermii.

- ***Zápach***

Toto specifické vyšetření je založeno na individuálním pracovníkovi. Rozlišuje se pouze jako buďto standartní zápach připomínající kaštanový květ nebo jiný zápach značící možnou infekci. Na základě toho může lékař nařídit mikrobiologické vyšetření.

- ***Barva***

Makroskopicky se hodnotí celková barva vzorku. Často je příčinou infekce mikroorganismy, ale i jiné systémové choroby. K normálním nálezům se řadí mléčně zkalené až šedě opaleskující až lehce nažloutlý vzorek. Ejakulát má být po zkapalnění světle šedý a neprůhledný. K patologickým nálezům řadíme sperma žluté, které značí hepatitidu či bakteriální infekt. Dále červeno-hnědá vypovídá o hematospermii. Nazelenalý ejakulát bývá zapříčiněn zánětem prostaty. Pokud je vzorek zcela průhledný, čirý, pacient má velmi nízkou až nulovou koncentraci pohlavních buněk.

- ***Kapalnění***

Tento proces je klíčový pro možnost spermií se vyvázat z rosolovité tekutiny, která je po erekci obklopuje, což má zásadní vliv na schopnost oplození. Mimo to nezkapalněný materiál se obtížně hodnotí a nevypovídá o motilitě spermií. Fyziologicky zkapalnění trvá 30 až 60 minut. Jakákoliv časová odchylka může být zapříčiněna pouhou dehydratací, ale i infekcí urogenitálního traktu.

- ***Viskozita***

Tímto vyšetřením se makroskopicky za pomocí pipety zkouší vazkost, táhlost ejakulátu. Pokud se vzorek táhne ve formě vláken, jedná se o normální nález. Vlákno má mít dle norem délku 1 centimetru a má vydržet v rozmezí 10–15 sekund. Při abnormalitě jako je hyperviskozita, obdobně jako u poruchy zkapalnění, se spermie nemohou vyvázat z husté tekutiny, která jim brání v oplodnění oocytu.

- ***Aglutinace***

Během tohoto vyšetření se v mikroskopu sleduje přítomnost shluků spermií. Shluky vznikají přítomností imunoglobulinů ve spermatu. Spermie jsou tzv. slepené různými částmi. Aglutinace se určuje ve stupnici od 0 do 4, kdy se za normální nález považuje 0. Při vyhodnocení stupně 4 se ve vzorku nenachází žádné volné pohlavní buňky.

- ***Kulaté buňky***

Jedná se buňky dvojího typu – leukocyty nebo různá vývojová stádia spermie (spermatidy, spermatocyty). Pro první případ lze použít indikační proužky, které enzymaticky reagují na přítomnost imunitních buněk. Právě u neutrofilů dochází k uvolnění peroxidu vodíku, který v ejakulátu zvyšuje oxidační stres, který má již negativní vliv na spermie a plodnost. Pro druhý typ buněk postačí pouze mikroskop. Fyziologická hodnota kulatých buněk, tzv. kulatobuněčných elementů, nesmí překročit 1 milion na mililitr.

- ***pH***

Obecná norma pro pH pacientského ejakulátu je 7,2 a více, přičemž maximum se uvádí jako hodnota 9. Vyšší hodnoty jsou považovány za patologické, kdy prostata není schopna okyselovat ejakulát. Mužská rozmnožovací soustava se skládá ze žláz secernující buďto kyselý nebo zásaditý sekret. Zásaditý sekret bohatý na fruktózu produkují semenné váčky. Funkcí zásaditého sekretu je právě obsah fruktózy, která zajišťuje energii a tím i motilitu spermií. Kyselý sekret je, jak je výše zmíněno, produktem prostaty. Její úlohou je snižovat viskozitu spermatu spolu s včasným zkapalněním. Dá se říci, že funkce prostaty spočívá v zajištění jakéhosi vyvázání spermií z doprovodných tekutin a umožnění cestu pohlavním ústrojím ženy. Jakékoliv vrozené či získané poruchy přídatných žláz se odráží na celkovém pH spermatu i fertilitě jedince. K určení pH dochází do 60 minut od ejakulace za pomocí pH proužků.

- ***Vitalita***

Uvedené vyšetření slouží k rozlišení živých (vitálních) a mrtvých spermií ve vzorku. To se provádí zkoumáním integrity spermatické membrány. Minimální normou vitality spermií je dnes 58 %. Při výskytu nekrozoospermie (imobilní mrtvé spermie) se předpokládá onemocnění či poruchy nadvarlete.

- ***Motilita***

V rámci vyšetření rozlišujeme tři typy motilit: progresivní, neprogresivní a imotilita. Rozlišení těchto typů provádíme mikroskopicky a téměř ihned po zkapalnění vzorku. Progresivní motilita (PR) je klíčová pro vznik těhotenství. Jedná se o na rychlosti nezávislý aktivní pohyb dopředu buďto ve velkém kruhu nebo napřímo. Neprogresivní typ (NP) je skupina ostatních pohybů, které zřídkavě vedou k oplození oocytu. Posledním typem je imotilita (IM), kdy spermie nevykazují žádný pohyb. Jako minimální PR se označuje hodnota nad 30 % a celková pohyblivost bez ohledu na typ má minimální hodnotu 42 %.

- ***Morfologie dle WHO***

WHO stanovuje referenční hodnoty, včetně struktury pohlavních buněk. U mužů je normální morfologie udávána v rozmezí 4–100%, kdy posuzujeme jednotlivé části spermie – hlavička, krček (střední oddíl) a bičík. Toto vyšetření je stěžejní pro IVF cykly, kdy množství fyziologických spermií přímo souvisí s úspěšností početí. Analýza vzorku je probíhá na obarveném nátěru pod mikroskopem. Pokud je počet morfologicky vhodných spermií pod 4%, jedná se o již zmíněnou teratozoospermii.

- ***Morfologie dle Vanderzwalmena v Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o.***

Rozdílem oproti klasické WHO morfologii je zahrnutí i detailnější analýzy vitálních spermií při zvětšení až 6300x v reálném čase IMSI technologií. Tato analýza už není součástí klasického spermiogramu a opět jsou minimem 4%.

- ***Leukocyty pozitivní na peroxidázu***

Toto vyšetření koreluje s výše zmíněným vyšetřením kulatých buněk, kdy sledujeme aktivitu peroxidázy v bílých krvinkách. Enzymatickým testem se pod mikroskopem projeví barevná změna za přítomnosti peroxidázy ve vzorku, tzv. Leukoscreen test. Pokud test vyjde jako peroxidáza pozitivní, značí to o infekci a jelikož peroxidáza katalyzuje redukci peroxidů, vytváří se ROS. Fyziologicky je hodnota v rozsahu 0–1 milion na mililitr.

- ***Redoxní potenciál***

V rozsahu mé práce je toto asi nejrelevantnější vyšetření. Měří se zde redoxní potenciál neboli celková oxido-redukční situace v ejakulátu. Využívá se měření za pomoci senzorů s měřícími a referenčními elektrodami. Z oblasti elektrochemie je známo, že měřící elektroda přijímá nebo odevzdává elektrony. To se odvíjí od toho, zda ve vzorku dohází k redukční či oxidační situaci. Výsledek je měřen v milivoltech (mV). Redoxní potenciál je pak vyjádřen jako mV na milion pro mililitr. Obvyklou normou je při vyšetření hodnota menší než 1,36 mV/mil pro ml a maximální 35 mV/mil pro ml.

- ***Fragmentace DNA***

Porušení struktury DNA má rozličnou etiologii – oxidativní stres, životní styl, chemoterapie, záněty, infekce atd. Hodnota fragmentace DNA má přímou spojitost s problémovým početím i aborty. Pacienti s vysokou mírou fragmentace spermatické DNA mají rovněž nižší úspěšnost IVF i IUI cyklů. Metoda se provádí SCD testem (sperm chromatin dispersion test), kdy jsou pacientovi spermie v agarózovém gelu vystaveny kyselině, která denaturuje genetickou informaci u spermií s poškozenou DNA. Během tohoto testu se okolo hlavičky nepoškozených spermií vytvoří zář, tzv halo. Tento jev je zapříčiněn rozštěpenou a rozvolněnou DNA. U spermií s fragmentací DNA se tento jev nevyskytuje. Platí tedy, že čím větší halo, tím zdravější spermie. Fyziologické hodnoty fragmentace jsou v rozmezí 0–15 %.

Tabulka 3: Hodnocení DNA fragmentačních testů a jejich vliv na plodnost

DFI ≤15%	Nízká fragmentace DNA	Normální plodnost
15% < DFI < 30%	Zvýšená fragmentace DNA	Omezená plodnost
DFI ≥ 30%	Závažně zvýšená fragmentace DNA	Závažně omezená plodnost

Zdroj: Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen, s.r.o.

Někdy je také označován jako zralost spermií. Stav chromatinu totiž výměnou histonů za protaminy vyjadřuje jeho zralost. Veškeré poruchy struktury chromatinu negativně ovlivňují funkci spermií a přispívají ke spontánním abortům. Chromatin je v tomto případě analyzován barvením anilinovou modří, která má afinitu k lyzinovým zbytkům nahrazených histonů. Pokud u spermie nedošlo k úplné obměně za protaminy, dojde k jejímu výraznému zbarvení. U zdravých zralých spermií, kde ve většině došlo k výměně histonů je zbarvení velmi světlé. Jako fyziologické hodnotíme vzorky pod 25% nezralých spermií (Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o., 2018).

5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit, zda koncentrace kyslíkových radikálů, vyšetřovaných systémem MioXSYS na klinice asistované reprodukce Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o. (dále jen IVF centrum) ovlivňuje základní parametry spermiogramu dle WHO z roku 2021.

6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

V rámci své bakalářské práce si kladu otázku, zdali oxidativní stres skutečně ovlivňuje fyziologický vývoj spermie a na jaké její konkrétní aspekty má statisticky největší vliv. V průběhu práce jsem rovněž narazila na otázku, která není součástí metodiky, zda je oxidativní stres pouze negativní činitel v celém komplexním procesu spermatogeneze, nebo má i pozitivní vliv. Tato otázka je však zodpovězena již v teoretické části.

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Hodnocený soubor srovnávací studie zahrnuje skupinu 83 mužů, kteří v IVF centru podstoupili základní analýzu ejakulátu – vyšetření spermiogramu rozšířenou o stanovení míry oxidativního stresu v období od dubna 2023 do ledna 2024.

Na základě výsledků spermiogramu jsme vytvořili kontrolní skupinu (výsledek spermiogramu byl normozoospermie a hodnota statického oxidačně redoxního potenciálu (sORP) byla < 1,36 mV/mil spermií/ml) a sledovanou skupinu (odchylka v některém z parametrů spermiogramu nebo v hodnotě sORP).

Analýzu získaných výsledků jsme provedli v programu MS excel 2010 s využitím Fisherova exaktního testu. Konečné výsledy jsou prezentovány jako rozdíl mezi jednotlivými skupinami. Hladina statistické významnosti byla stanovena $p < 0,05$.

8 METODIKA PRÁCE

Mezi použitý biologický materiál patří ejakulát, který byl získán masturbací v odběrové místnosti v IVF centru. Vzorky ejakulát, které byly odebraný mimo IVF centrum nejsou do této práce zařazeny. V této části práce je popsána analýza ejakulátu dle doporučení WHO z roku 2021 a vyšetření oxidativního stresu systémem MiOXSYS.

8.1 Vyšetření spermiogramu

8.1.1 Použité média a materiály

- pH papírky s rozmezím 7,2-9,7
- Maklerova komůrka (viz Obr. 4)
- sterilní/nesterilní Pasteurovy pipety
- pipeta a sterilní/nesterilní pipetovací špičky
- informační systém IVF centra – Dynamed

8.1.2 Kapalnění a viskozita

Zaměstnanec laboratoře převezme vzorek ejakulátu a ponechá jej po dobu 20-30 min při pokojové teplotě, kdy dojde ke správnému zkapalnění (liquifikaci) vzorku. Pokud po této době nedojde k úplnému zkapalnění vzorku, je tato skutečnost zaznamenána do výsledkového listu. V případě špatné liquifikace může být vzorek pro správné vyhodnocení zhomogenizován opakovaným protahováním vzorku ejakulátu pasteurovou pipetou.

Následně je viskozita zkapalněného ejakulátu hodnocena s použitím pasteurovy pipety. Ejakulát tvoří při vytlačování z ústí pipety jednotlivé separované kapky. Při tvorbě vlákna je viskozita hodnocena jako zvýšená a tato skutečnost je zaznamenána do výsledku.

8.1.3 Objem a vzhled ejakulátu

Objem ejakulátu je rovněž hodnocen s použitím Pasteurovy pipety. Za standardní se považuje objem 1,5 ml a více. Naměřený objem je zaznamenán s ostatními údaji do výsledku vyšetření.

Vzhled vzorku je hodnocen po úplném zkapalnění, maximálně však do hodiny po ejakulaci. Jak bylo již v kapitole Barva zmíněno, za standardní se považuje homogenní vzorek s šedě opaleskující barvou. Abnormální zbarvení signalizuje absenci spermií (světlé až průhledné zbarvení) či přítomnost krve (červené zabarvení).

8.1.4 Koncentrace, motilita, morfologie spermií a koncentrace kulatých buněk

Koncentrace motilita a morfologie spermií se měří na Maklerově komůrce. Vzorek ejakulátu je odebírán za použití pipetovací špičky. Standardně je po zkapalnění ze vzorku ejakulátu odebráno cca 10 µl, které se nanesou na připravenou Maklerovu komůrku. Počítáni spermií je vždy zopakováno pro potvrzení správnosti, v případě rozdílných hodnot je proces opět opakován, číselné hodnoty pro výpočet jsou zaneseny do konkrétních polí v protokolu spermiogramu v systému DynaMed.

Spermie jsou počítány ve čtvercích tak, aby bylo vždy spočítáno minimálně 50-200 buněk. U diagnostických spermiogramů jsou výsledky průměrem dvou hodnocení. V případě, že nelze napočítat ve vzorku příslušný počet spermií, je vzorek ejakulátu centrifugován a hodnota spermiogramu je vyjádřena jako počet spermií na zorné pole po centrifugaci, což systém DynaMed umožňuje. Vyhodnocení spermiogramu je automaticky provedeno systémem DynaMed.

- ***Motilita spermií*** je orientační určení procenta spermií s určitým typem pohybu:
  - Progresivně pohyblivé (PR) – aktivní pohyb směrem kupředu, lineární (typ A) nebo po kružnici (typ B), nezávisle na rychlosti
  - Neprogresivně pohyblivé (NP) – pohyb na místě, nebo v malých kruzích, je pozorován pohyb bičíku
  - Nemotilní (IM) – nepohyblivé spermie, bez pohybu bičíku
- ***Morfologie spermií*** je určení převládajících defektů spermií. Je hodnoceno v nativním preparátu pod fázovým kontrastem s využitím IMSI objektivu. Normální morfologie je daná parametry:
  - Hlavička je oválná, akrozom má tvořit 40-70 % plochy hlavičky. Vakuoly nemají přesahovat 20 % plochy hlavičky.
  - Střední část má nasedat na hlavičku ve směru její podélné osy, cytoplazmatická kapénka má být menší než třetina normální hlavičky.
  - Bičík má být tenčí než střední část, nezkroucený, nezalomený a nezdvojený.

- ***Koncentrace kulatých buněk (leukocytů)*** je udávána v mil/ml. Počet leukocytů nemá přesáhnout 3 mil/ml. Výsledná koncentrace je zaznamenána do formuláře spermiogramu v systému DynaMed.

8.2 Vyšetření sORP systémem MiOXSYS

8.2.1 Použité média, materiály a přístroje

- MiOXSYS senzor
- Pipetovací špičky
- Centrifugační zkumavky 1ml
- MiOXSYS analyzátor

8.2.2 Princip metody

Systém MiOXSYS využívá test statického redox-potenciálu (sORP), kterým lze stanovit míru oxidativního a redukčního stresu v ejakulátu, jinak řečeno redoxní rovnováhu. Redoxní potenciál lze chápat jako přenos elektronů z redukčního činidla (donora) na oxidační činidlo (akceptora). Pokud nastává oxidativní stres, znamená to, že míra ROS v ejakulátu je nad fyziologickým limitem, a to se odráží na stavu metabolismu. Jako integrační měřící metoda je zde využit sORP, kdy se určuje rovnováha mezi celkovou oxidační aktivitou a celkovou redukční aktivitou.

8.2.3 Postup měření

Analýza je doporučována do 30 minut od obdržení vzorku. I u této metody je nutná předchozí kalibrace, která spočívá ve vložení kalibračního čipu (viz Obr 6) s sORP elektrodami. Poté se na reakční plochu snímače MiOXSYS pipetou aplikuje 30µl spermatu. Sperma může být čerstvé nebo zmražené (kryo-ejakulát), které však v době aplikace musí mít pokojovou teplotu. Pokud vložení vzorku řádně proběhlo, dojde k modré signalizaci na LED kontrolce a dochází ke zpracování vzorku. Na displeji je výsledek sORP zobrazen v milivoltech, což je jednotka pro elektrický potenciál. Normální hodnoty v ejakulátu jsou nižší než 1,36 mV/mil spermií/ml. Pro tuto analýzu jsou nevhodné hypervizkózní vzorky, kdy nedojde k analýze.

9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Ze získaných výsledků základního spermiogramu jsme vytvořili kontrolní a sledovanou skupinu mužů. Kontrolní skupinu tvořilo 45 normozoospermiků, tedy mužů, jejichž spermiogram splňoval všechny vyšetřované parametry podle WHO, 6. edice a hodnota sORP byla < 1,36 mV/mil spermií/ml. Do sledované skupiny bylo zařazeno 39 mužů, jejichž SPG dosahoval ve sledovaných parametrech abnormálních hodnot a hodnota sORP byla > 1,36 mV/mil spermií/ml (viz. Tabulka 4), zároveň do sledované skupiny byli zařazeni i 2 muži, jejichž výsledek základního spermiogramu byl normozoospermie, ale měli zvýšenou hodnotu sORP.

Tabulka 4: Rozdělení mužů na kontrolní a sledovanou skupinu

	Počet mužů
Kontrolní skupina	45
Sledovaná skupina	39

Tabulka 5: Rozdělení mužů dle výsledku spermiogramu a sORP

			Sledovaný parametr			
Výsledek SPG a sORP [mV/mil spermií/ml]	Zkratka	Počet mužů	Koncentrace	Motilita	Morfologie	sORP
Normozoospermie	NSP	45	0	0	0	0
Normozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	NSP+	2	0	0	0	✓
Oligozoospermie	OSP	8	✓	0	0	0
Oligozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	OSP+	4	✓	0	0	✓
Asthenozoospermie	ASP	4	0	✓	0	0
Asthenozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	ASP+	4	0	✓	0	✓
Teratozoospermie	TSP	2	0	0	✓	0
Teratozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	TSP+	2	0	0	✓	✓
Oligoteratozoospermie	OTSP	4	✓	0	✓	0
Oligoteratozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	OTSP+	7	✓	0	✓	✓
Oligoasthenozoospermie	OASP	0				
Oligoasthenozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	OASP+	1	✓	✓	0	✓
Asthenoteratozoospermie	ATSP	0				
Asthenoteratozoospermie a sORP > 1,36 mV/mil spermií/ml	ATSP+	1	0	✓	✓	✓

0: neprokázaná abnormalita; ✓ prokázaná abnormalita

Tabulka 5 ukazuje, že u 45 mužů byl spermiogram hodnocený dle parametrů WHO v normálních hodnotách a hodnota sORP byla ve fyziologických koncentracích. Ve dvou případech NSP byla hodnota sORP vyšší, než je horní mez doporučených hodnot. Tento případ nebudeme dále sledovat, protože pacienti uvedli v dotazníku pro laboratoř užívání antibiotik v posledních 3 měsících před odběrem vzorku. U 12 mužů byla diagnostikována OSP, přičemž u 4 z nich byla zvýšena koncentrace sORP. Dále byla u 8 mužů prokázaná ASP s abnormální motilitou a 4 z nich měli zvýšené sORP. Celkem u 4 mužů došlo k nálezu TSP, kdy všichni měli abnormalitu v morfologii spermií a u poloviny z nich i vyšší sORP. OTSP se změnou v morfologii byla nalezena u 11 pacientů a u 7 sedmi z nich byla změřena vyšší hladina sORP. Pouze jeden muž vykazoval OASP, opět se zvýšeným sORP a odchylkou v motilitě. Rovněž u ATSP s vyšším sORP se jednalo pouze o 1 pacienta, avšak u něj byly nalezeny morfologické a motilitní abnormality.

Nejvíce měření, kde hodnota sORP byla nad horní referenční hodnotou jsme zaznamenali v případech, kde se jednotlivé odchylky ve spermiogramu kombinují. Nejčastěji se jednalo o případ oligoteratozoospermie.

Tabulka 6: Zhodnocení vlivu sORP na koncentraci spermií

	Koncentrace spermií [mil/ml]	**sORP [mV/mil spermií/ml]**
Kontrolní skupina	50,2	0,79
Sledovaná skupina	7,37	1,74
Rozdíl	42,8	0,95
	0,0561	p-hodnota

Koncentrace spermií v kontrolní skupině byla 50,2 mil/ml oproti sledované kde byla koncentrace spermií pouze 7,37 mil/ml. Rozdíl v hodnotě sORP byl 0,95 mV/mil spermií/ml. Tento rozdíl nedosahuje statistické významnosti a lze tedy usuzovat, že zvýšená koncentrace sORP nemá vliv na množství spermií v ejakulátu. Lze předpokládat, že při vyšším rozdílu v koncentraci spermií by došlo k potvrzení statistické signifikace.

Tabulka 7: Zhodnocení vlivu oxidativního stresu na pohyblivost spermií

	Celková motilita spermií [%]	**sORP [mV/mil spermií/ml]**
Kontrolní skupina	66,76	0,79
Sledovaná skupina	26,31	2,09
Rozdíl	40,45	1,30
	0,2028	p-hodnota

Rozdíl v parametru celková motilita byl mezi kontrolní skupinou normozoospermiků a sledovanou skupinou asthenozoospermiků 40,45 %. Z tabulky 7 lez usuzovat, že zvýšená koncentrace sORP má vliv na motilitu spermií. Spermie sledované skupiny vykazovaly výrazně nižší míru pohyblivosti oproti normě a kontrolní skupině.

Tabulka 8: Zhodnocení vlivu zvýšené koncentrace sORP na morfologii spermií

	Morfologie spermií [%]	**sORP [mV/mil spermií/ml]**
Kontrolní skupina	10,25	0,79
Sledovaná skupina	1,50	1,54
Rozdíl	8,75	0,75
	0,0934	p-hodnota

Dle závěrů z tabulky 8 lze vyloučit vliv zvýšené koncentrace volných radikálů na abnormální morfologii spermií. Rozdíl mezi kontrolní a sledovanou skupinou nenabývá statistické významnosti. Abnormální morfologie v těchto případech není způsobena vysokým sORP, ale může být způsobena např. prodlouženou dobou pohlavní abstinence.

Tabulka 9: Zhodnocení vlivu sORP na koncentraci spermií v kategorii spermiogramů, kde se odchylky kombinují

	Koncentrace spermií [%]	**sORP [mV/mil spermií/ml]**
Kontrolní skupina	50,2	0,79
Sledovaná skupina	5,16	2,54
Rozdíl	45,04	1,75
	0,0064	p-hodnota

Ve spermiogramech, kde se odchylky kombinují, nejčastěji odchylky v morfologii a koncentraci spermií, byl stanovený rozdíl mezi kontrolní skupinou mužů a mužů s diagnózou oligoteratozoospermie (7 případů) v parametru sORP 1,17 mV/mil spermií/ml. Diagnóza oligoteratospermie se často objevuje u pacientů, s poruchou spermatogeneze nebo s onemocněním – varikokéla. Tento rozdíl nabyl statistické významnosti a potvrdil, že vhledem k vysoké koncentraci volných radikálů dochází k poškození spermií. Ovšem o vlivu na jejich fertilizační schopnosti tento výsledek nenaznačuje a ani tato úvaha není předmětem této práce.

DISKUZE

V rámci praktické části své bakalářské práce jsem hledala odpověď na otázku, zda ROS mají vliv na základní parametry spermiogramu pomocí přístroje MiOXSYS. Jednalo se o morfologii, motilitu a koncentraci.

V současné době se problematikou mužské plodnosti a detailního vyšetření spermiogramu zabývá většina center asistované reprodukce. Jednou ze součástí vyšetření detailního spermiogramu je i vyšetření oxidativního stresu. Spermie jsou velice citlivé k vlivům vnějšího prostředí např. působení vysoké teploty, léčiv, infekční onemocnění a jiné procesy, při kterých vznikají volné radikály. Oxidativní stres se spolupodílí na řadě patologických stavů v organismu. Proto jsem v této práci sledovala, zda míra volných radikálů v ejakulátu ovlivňuje základní parametry spermiogramu – koncentraci, pohyblivost a morfologii spermií.

Do této práce bylo zařazeno 84 vzorků ejakulátu, které byly odebrány a vyšetřeny na klinice asistované reprodukce Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o. Soubor těchto mužů byl rozdělen na kontrolní a sledovanou skupinu. Kontrolní skupina zahrnovala 43 mužů u kterých dosahoval spermiogram vyšetřený dle normy WHO 6. edice z roku 2021 normálních hodnot a hodnota sORP byla v normě. Sledovaná skupina byla složena z 39 mužů s odchylko ve spermiogramu a hodnota sORP byla vyšší než doporučené hranice. Ze studie byly vyloučeny 2 vzorky, které byly uzavřeny jako normozoospermie, ale hodnota sORP byla nad 1,36 mV/mil spermií/ml.

Naše práce nepotvrzuje vliv ROS na koncentraci spermií, rozdíl v koncentraci spermií mezi kontrolní a sledovanou skupinou (42,8 mil/ml spermií) nedosahoval statistické významnosti. Ve studii Andrea Lenzi z roku 2004 bylo potvrzeno, že vysoká koncentrace ROS má vliv na koncentraci spermií. V této studii bylo potvrzeno, že u mužů s koncentrací spermií pod 4 mil/ml, byla koncentrace ROS signifikantně vyšší než u mužů, kde se koncentrace spermií pohybovala v rozmezí 10–40 mil/ml. V naší práci, byla koncentrace spermií u sledované skupiny 7,37 mil/mil. Tato hodnota se nachází mezi hodnotami citované studie a lze předpokládat, že při vyšším množství získaných dat, by výsledek potvrdil závěry této studie. (Lenzi. 2004).

Rozdíl mezi kontrolní a sledovanou skupinou v parametru celková motilita spermií nedosahoval statistické významnosti. Vzorky z kontrolní skupiny obsahovaly 66,76 %

celkově motilních spermií a 26,31 % celkově motilních spermií bylo detekováno u mužů ve sledované skupině. Ve studii o účinku koenzymu Q_{10} se zabýval v roce 2009 doktor G. Balercia, kdy během šestiměsíční terapie aplikoval 60 idiopaticky infertilním asthenozoospermikům ve věku 27-39 let preparáty s koenzymem Q_{10}. Jejich výchozí hodnota celkové motility pod 50 %. Po skončení terapie došlo k nárůstu koncentrace koenzymu Q_{10} jak v seminální plazmě, tak v samotných spermiích, spolu se zlepšením jejich motility. Lze tedy předpokládat, že ROS poškozují pohyblivost spermií, ale vzhledem k nízkému počtu případů v naší práci (4) tento fakt není potvrzen. (Balercia, 2009).

V naší práci se nám nepodařilo potvrdit vliv vysoké koncentrace ROS na morfologii spermií, v kontrolní skupině bylo stanoveno 10,75 % spermií s normální morfologií, ve sledovaná skupina obsahovala 1,5 % morfologicky normálních spermií. Rozdíl mezi kontrolní a sledovanou skupinou nenabyl statistické významnosti.

Stejně jako ve výzkumu dr. Abada se nám podařilo potvrdit korelaci mezi vysokou koncentrací ROS a diagnózou spermiogramu oligoteratozoospermie. Rozdíl v koncentraci spermií v této skupině nabyl statistické významnosti. Toto zjištění potvrzuje fakt, že u mužů s abnormálními hodnotami spermiogramu v kombinaci, jsou spermie poškozeny vysokou koncentrací sORP. Další výzkum dr. Abada podával mužům antioxidační terapii. Terapie zahrnovala užívání přípravků s vitamínem C, koenzymem Q_{10}, vitamínem E, vitamínem B9 (kyselina listová), zinkem, vitamínem B12 a selenem. (Abad, 2013).

V centrech asistované reprodukce se u mužů také antioxidační terapie provádí, ale ne v takové míře, aby mohl být sledován její vliv. V centru Next Fertility IVF Prof. Zech Pilsen s.r.o. se spermie určené pro techniky in vitro fertilizace zpracovávají a separují ze seminální plazmy pomocí mikrofluidních čipů, které brání aditivnímu vzniku ROS, jak tomu bývalo běžným zpracováním. To ovšem nebylo předmětem této práce.

Lze tedy s jistotou říci, že volné radikály mohou ovlivňovat parametry spermiogramu u kombinovaných abnormalitách. Avšak záleží na rozsahu a diagnózách sledovaných mužů, abychom mohli s určitostí potvrdit statisticky signifikantní výsledky.

ZÁVĚR

Volné radikály detekované jako hodnota statického oxidačně redukčního potenciálu (sORP) systémem MiOXSYS mají prokazatelný vliv na základní parametry spermiogramu v kombinaci abnormalit základních parametrů, kdy přístroj MiOXSYS měřil koncentrace sORP v jednotlivých vzorcích ejakulátu.

Výsledky mé bakalářské práce dokázaly, že vliv ROS na koncentraci a morfologii (nejčastěji v kombinaci) nabývají statistické významnosti, na rozdíl od parametru motility. Dále se potvrdilo, že muži s nízkým sORP (pod 1,36 mV/mil spermií/ml) mají veškeré základní parametry spermiogramu v normě.

Porovnáním dat a výsledků z analýz provedených v období od dubna 2023 do ledna 2024 došlo k zodpovězení mé vědecké otázky, zdali mají volné radikály kyslíku vliv na parametry spermiogramu. Statisticky největší vliv mají ROS na morfologii a pohyblivost. Tento fakt zapříčiňuje skutečnost, že valná část dospělých mužů má v rámci početí problémy především s množstvím spermií. Dále přichází na řadu i morfologické změny, které nemusí být viditelné, a tudíž na první pohled zcela zdravé spermie, nejsou schopny proniknout do oocytu. Mužská infertilita je multifaktoriální problém, který vyžaduje komplexní léčbu a zejména i určitou prevenci v rámci životosprávy jedince. Právě největší vliv na to, jestli muž bude odolný vůči ROS má koncentrace antioxidantů spolu s imunitními mechanismy.

10 SEZNAM LITERATURY

MISELL, L.M., D. HOLOCHWOST, D. BOBAN, N. SANTI, S. SHEFI, M.K. HELLERSTEIN a P.J. TUREK, 2006. A Stable Isotope-Mass Spectrometric Method for Measuring Human Spermatogenesis Kinetics In Vivo. Journal of Urology [online]. 175(1), 242-246 [cit. 2023-11-20]. ISSN 0022-5347. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-5347(05)00053-4

GOLDSTEIN, Marc, Bobby B. NAJARI, Filipe Tenorio Lira NETO a Phil Vu BACH, 2016. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Seminars in Cell & Developmental Biology. (59), Pages 10-26. ISSN ISSN 1084-9521

CREASY, Dianne M. a Robert E. CHAPIN, 2013. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology: Chapter 59 - Male Reproductive System [online]. III. Academic Press [cit. 2023-09-08]. ISBN 978-0-12-415759-0. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00059-5

O'DONNELL, Liza a Peter G. STANTON. Encyclopedia of Reproduction [online]. In: . Academic Press, 2018, s. 145-151 [cit. 2023-09-12]. ISBN 978-0-12-815145-7.

BENTON, Lauri, Li-Xin SHAN a Matthew P. HARDY, 1995. Differentiation of adult Leydig cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology [online]. 53(1-6), 61-68 [cit. 2023-11-20]. ISSN 09600760. Dostupné z: doi:10.1016/0960-0760(95)00022-R

GRISWOLD, Michael D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology [online]. 9(4), 411-416 [cit. 2023-09-18]. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1006/scdb.1998.0203

BUFFONE, Mariano G., Eva V. WERTHEIMER, Pablo E. VISCONTI a Dario KRAPF, 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease [online]. 1842(12), 2610-2620 [cit. 2023-10-10]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.013

GILBERT DL. Perspective on the history of oxygen and life. In: Gilbert DL (ed). Oxygen and living processes: An interdisciplinary approach. Berlin.Springer- Verlag, 1981: 1-43.

DATTA, K., S. SINHA a P. CHATTOPADHYAY, 2000. Reactive oxygen species in health and disease. THE NATIONAL MEDICAL JOURNAL OF INDIA. (13), 304-310.

GIROTTI, Albert W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation [online]. 1(2), 87-95 [cit. 2023-09-20]. ISSN 07485514. Dostupné z: doi:10.1016/0748-5514(85)90011-X

TAKESHIMA, Teppei, Kimitsugu USUI, Kohei MORI, Takuo ASAI, Kengo YASUDA, Shinnosuke KURODA a Yasushi YUMURA, 2021. Oxidative stress and male infertility. Reproductive Medicine and Biology [online]. 20(1), 41-52 [cit. 2023-09-26]. ISSN 1445-5781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12353

DEL RÍO, Luis A., 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. Journal of Experimental Botany [online]. 2015-5-01, 66(10), 2827-2837 [cit. 2023-10-10]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erv099

WALLACH, Edward E. a Hans WOLFF, 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. Fertility and Sterility [online]. 63(6), 1143-1157 [cit. 2023-09-20]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)57588-8

JONES, Roy, Thaddeus MANN a Richard SHERINS, 1979. Peroxidative Breakdown of Phospholipids in Human Spermatozoa, Spermicidal Properties of Fatty Acid Peroxides, and Protective Action of Seminal Plasma. Fertility and Sterility [online]. 31(5), 531-537 [cit. 2023-09-20]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)43999-3

JOHN AITKEN, R., Jane S. CLARKSON a Simon FISHEL, 1989. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. Biology of Reproduction [online]. 1989-07-01, 41(1), 183-197 [cit. 2023-09-20]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod41.1.183

ALVAREZ, JUAN G., JOSEPH C. TOUCHSTONE, LUIS BLASCO a BAYARD T. STOREY, 1987. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant Against Oxygen Toxicity. Journal of Andrology [online]. 1987-09-10, 8(5), 338-348 [cit. 2023-09-20]. ISSN 01963635. Dostupné z: doi:10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x

CRHA, Igor, Hana KONEČNÁ, Jana ŽÁKOVÁ, Jana BURŠÍKOVÁ, Zbyněk ZDRÁHAL, E. LOUSOVÁ, Pavel VENTRUBA and Michal POHANKA. Proteom seminální plazmy u mužů s azoospermií (Seminal plasma proteome in men with azoospermia). Praktická gynekologie. 2011, vol. 15, No 2, p. 60-63. ISSN 1211-6645.

ALLEVA, Renata, Alessandra SCARARMUCCI, Franco MANTERO, Stefano BOMPADRE, Luciana LEONI a G.P. LITTARRU, 1997. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. Molecular Aspects of Medicine [online]. 18, 221-228 [cit. 2023-09-20]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/S0098-2997(97)00040-X

DREVET, Joël R., 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. Molecular and Cellular Endocrinology [online]. 250(1-2), 70-79 [cit. 2023-09-25]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2005.12.027

NOOR, Rana, Sonali MITTAL a Jawaid IQBAL, 2002. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research [online]. Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim Unviersity, India, (8(9), 210-215 [cit. 2023-09-25]. Dostupné z: https://medscimonit.com/abstract/index/idArt/13511)

PEI, Jun, Xingyu PAN, Guanghui WEI a Yi HUA, 2023. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. Frontiers in Pharmacology [online]. 2023-3-2, 14, 1-14 [cit. 2023-09-25]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2023.1147414

IGHODARO, O.M. a O.A. AKINLOYE, 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine [online]. 2018-12-01, 54(4), 287-293 [cit. 2023-09-26]. ISSN 2090-5068. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001

WELLS, D., M.G. BERMUDEZ, N. STEUERWALD, A.R. THORNHILL, D.L. WALKER, H. MALTER, J.D.A. DELHANTY a J. COHEN, 2005. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. Human Reproduction [online]. 2005-05-01, 20(5), 1339-1348 [cit. 2023-10-13]. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deh778

SAKKAS, Denny a Juan G. ALVAREZ, 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertility and Sterility [online]. 93(4), 1027-1036 [cit. 2023-10-13]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.046

TESARIK, J., 2004. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. Human Reproduction [online]. 2004-01-29, 19(3), 611-615 [cit. 2023-10-13]. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deh127

TESARIK, Jan, 2005. Paternal effects on cell division in the preimplantation embryo. Reproductive BioMedicine Online [online]. 10(3), 370-375 [cit. 2023-10-13]. ISSN 14726483. Dostupné z: doi:10.1016/S1472-6483(10)61798-1

Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion, 2013. Fertility and Sterility [online]. 99(1), 63 [cit. 2023-09-26]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.023

YUMURA, Yasushi, Akira TSUJIMURA, Takashi IMAMOTO, et al., 2018. Nationwide survey of urological specialists regarding male infertility: results from a 2015 questionnaire in Japan. Reproductive Medicine and Biology [online]. 17(1), 44-51 [cit. 2023-09-26]. ISSN 14455781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12065

AGARWAL, Ashok, Neel PAREKH, Manesh Kumar PANNER SELVAM, et al., 2019. The World Journal of Men's Health [online]. 37(3) [cit. 2023-09-26]. ISSN 2287-4208. Dostupné z: doi:10.5534/wjmh.190055

EVROPSKÁ KOMISE, 2016. Ec.europa.eu - Endokrinní disruptory: často kladené otázky. Ec.europa.eu [online]. [cit. 2023-10-11]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/cs/MEMO_16_2151

ARNIKA, 2022. Ftaláty. Arnika.org [online]. 31. 08. 2022 [cit. 2023-10-23]. Dostupné z: https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/ftalaty

ARNOULT, C, Y ZENG a H M FLORMAN, 1996a. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. Journal of Cell Biology [online]. 134(3), 637–645. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.134.3.637

ELIASSON, Rune, 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. Asian Journal of Andrology [online]. 12(1), 26-32 [cit. 2023-10-23]. ISSN 1008-682X. Dostupné z: doi:10.1038/aja.2008.58

MORTIMER, David, 2018. The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. MHR: Basic science of reproductive medicine [online]. 2018-09-12, 24(12), 567–592 [cit. 2023-10-23]. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gay040

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.

CIPAK, Andrea, Patrik STANIC, Koraljka DURIC, Tihana SERDAR a Ernest SUCHANEK, 2009. Sperm morphology assessment according to WHO and strict criteria: method comparison and intra-laboratory variability: method comparison and intra-laboratory variability. Biochemia Medica [online]. 19(1), 87-94 [cit. 2023-10-23]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2009.009

COOPER, Trevor G., Ching-Hei YEUNG, Sabina FETIC, Aligholi SOBHANI a Eberhard NIESCHLAG, 2004. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. Human Reproduction [online]. 2004-10-01, 19(10), 2283-2288 [cit. 2023-10-23]. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/deh410

SWAN, Shanna H., Katharina M. MAIN, Fan LIU, et al., 2005. Environmental Health Perspectives [online]. 113(8) [cit. 2023-11-20]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.8100

WYROBEK, Andrew J., Laurie A. GORDON, James G. BURKHART, et al., 1983. An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology [online]. 115(1), 73-148 [cit. 2023-11-23]. ISSN 01651110. Dostupné z: doi:10.1016/0165-1110(83)90015-5

CAMPBELL, Martin J., Francesco LOTTI, Elisabetta BALDI, Stefan SCHLATT, Mario P. R. FESTIN, Lars BJÖRNDAHL, Igor TOSKIN a Christopher L. R. BARRATT, 2021. Distribution of semen examination results 2020 – A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. Andrology [online]. 9(3), 817-822 [cit. 2023-11-23]. ISSN 2047-2919. Dostupné z: doi:10.1111/andr.12983

SCHWARTZ, D., M.J. MAYAUX, M.L. GUIHARD-MOSCATO, A. SPIRA, P. JOUANNET, F. CZYGLIK a G. DAVID, 1984. Study of Sperm Morphologic Characteristics in a Group of 833 Fertile Men. Andrologia [online]. 1984-09-10, 16(5), 423-428 [cit. 2023-12-01]. ISSN 03034569. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0272.1984.tb00389.x

ABOU-HAILA, Aida a Daulat R.P. TULSIANI, 2000. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. Archives of Biochemistry and Biophysics [online]. 379(2), 173-182 [cit. 2023-12-01]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.2000.1880

SUTOVSKY, Peter, Ryuzo YANAGIMACHI, Christopher J. DE JONGE a Christopher L. R. BARRATT, MANANDHAR, Gaurishankar, ed., 2017. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration [online]. 2nd Edition. Cambridge University Press, s. 1-30 [cit. 2023-12-09]. ISBN 9781107126329.

SOFIKITIS, Nikolaos, Nikolaos GIOTITSAS, Panagiota TSOUNAPI, Dimitrios BALTOGIANNIS, Dimitrios GIANNAKIS a Nikolaos PARDALIDIS, 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology [online]. 109(3-5), 323-330 [cit. 2023-12-09]. ISSN 09600760. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2008.03.004

HOLDCRAFT, Robert W. a Robert E. BRAUN, 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. International Journal of Andrology [online]. 27(6), 335-342 [cit. 2023-12-09]. ISSN 0105-6263. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2004.00502.x

SHARPE, RM, C MCKINNELL, C KIVLIN a JS FISHER, 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction [online]. 2003-06-1, 125(6), 769-784 [cit. 2023-12-10]. ISSN 1470-1626. Dostupné z: doi:10.1530/rep.0.1250769

PUPPO, Vincenzo a Giulia PUPPO, 2016. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease. Clinical Anatomy [online]. 29(1), 111-119 [cit. 2023-12-10]. ISSN 0897-3806. Dostupné z: doi:10.1002/ca.22655

ULČOVÁ-GALLOVÁ, DRSC., prof. MUDr. Zdenka a MUDr. Petr LOŠAN, 2013. Neplodnost - Útok imunity [online]. 2. Praha 7: Grada Publishing [cit. 2023-12-19]. ISBN ISBN 978-80-247-8532-5. Dostupné z: https://docplayer.cz/107594105-Neplodnost-utok-imunity-2-aktualizovane-a-doplnene-vydani-zdenka-ulcova-gallova-petr-losan.html

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Heriberto, Ulrik KVIST, Jan ERNERUDH, Libia SANZ a Juan J. CALVETE, 2011. Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? American Journal of Reproductive Immunology [online]. 66(s1), 11-22 [cit. 2023-12-19]. ISSN 1046-7408. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x

WALLACH, Edward E. a Hans WOLFF, 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. Fertility and Sterility [online]. 63(6), 1143-1157 [cit. 2023-12-19]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)57588-8

NAIR, N. a S. BEDWAL, 2005. Short-term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymis of rats. Indian Journal of experimental Biology [online]. 43(9), 786-794 [cit. 2023-12-19]. 16187529.

WOSNITZER, Matthew, Marc GOLDSTEIN a Matthew P HARDY, 2014. Review of Azoospermia. Spermatogenesis [online]. 4(1) [cit. 2023-12-19]. ISSN 2156-5562. Dostupné z: doi:10.4161/spmg.28218

SKINNER, Michael K., ed., 2018. Encyclopedia of Reproduction [online]. 2. Academic Press [cit. 2023-12-19]. ISBN 9780128151457.

VAN DER KOOY, Derek a and Samuel WEISS, 2000. Why Stem Cells? Science [online]. 2000-02-25, 287(5457), 1439-1441 [cit. 2023-12-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5457.1439

KOPPERS, Adam J., Geoffry N. DE IULIIS, Jane M. FINNIE, Eileen A. MCLAUGHLIN a R. John AITKEN, 2008. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism [online]. 2008-08-01, 93(8), 3199-3207 [cit. 2023-12-20]. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2007-2616

GEVA, Eli, Benjamin BARTOOV, Natalia ZABLUDOVSKY, Joseph B. LESSING, Liat LERNER-GEVA a Ami AMIT, 1996. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. Fertility and

Sterility [online]. 66(3), 430-434 [cit. 2024-01-06]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)58514-8

DAWSON, Earl B., William A. HARRIS, Melvin C. TETER a Leslie C. POWELL, 1992. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertility and Sterility [online]. 58(5), 1034-1039 [cit. 2024-01-06]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)55456-9

LEWIS, Sheena E.M., E. Samantha L. STERLING, Ian S. YOUNG a William THOMPSON, 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and Sterility [online]. 67(1), 142-147 [cit. 2024-01-06]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(97)81871-7

MANCINI, A., B. CONTE, L. DE MARINIS, M.E. HALLGASS, D. POZZA, A. ORADEI a G.P. LITTARRU, 1994. Coenzyme Q10 levels in human seminal fluid: Diagnostic and clinical implications. Molecular Aspects of Medicine [online]. 15, s249-s255 [cit. 2024-01-06]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/0098-2997(94)90035-3

CADET, Jean, Thierry DELATOUR, Thierry DOUKI, Didier GASPARUTTO, Jean-Pierre POUGET, Jean-Luc RAVANAT a Sylvie SAUVAIGO, 1999. Hydroxyl radicals and DNA base damage. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis [online]. 424(1-2), 9-21 [cit. 2024-01-06]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/S0027-5107(99)00004-4

IVF ZENTREN PROF. ZECH a NEXT FERTILITY PILSEN. Spermiogram: Informace a detaily k jednotlivým testům a variantám spermiogramu. 2018. F PIV-B 0124 002.

LENZI, Andrea, Paolo SGRÒ, Pietro SALACONE, et al., 2004. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. Fertility and Sterility [online]. 81(6), 1578-1584 [cit. 2024-03-20]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2003.10.034

BALERCIA, Giancarlo, Francesco REGOLI, Tatiana ARMENI, Aleardo KOVERECH, Franco MANTERO a Marco BOSCARO, 2005. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of l-carnitine, l-acetylcarnitine, or combined l-carnitine and l-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. Fertility and

Sterility [online]. 84(3), 662-671 [cit. 2024-03-20]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2005.03.064

GRECO, Ermanno, Marcello IACOBELLI, Laura RIENZI, Filippo UBALDI, Susanna FERRERO a Jan TESARIK, 2005. Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. Journal of Andrology [online]. 2005-05-06, 26(3), 349-353 [cit. 2024-03-20]. ISSN 0196-3635. Dostupné z: doi:10.2164/jandrol.04146

EBISCH, I. M. W., F. H. PIERIK, F. H. DE JONG, C. M. G. THOMAS a R. P. M. STEEGERS-THEUNISSEN, 2006. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? International Journal of Andrology [online]. 29(2), 339-345 [cit. 2024-03-20]. ISSN 0105-6263. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00598.x

SIGMAN, Mark, Stacy GLASS, Janice CAMPAGNONE a Jon L. PRYOR, 2006. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Fertility and Sterility [online]. 85(5), 1409-1414 [cit. 2024-03-20]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2005.10.055

PARADISO GALATIOTO, Giuseppe, Giovanni Luca GRAVINA, Giovanni ANGELOZZI, Antonia SACCHETTI, Pier Ferdinando INNOMINATO, Gianna PACE, Guido RANIERI a Carlo VICENTINI, 2008. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? World Journal of Urology [online]. 26(1), 97-102 [cit. 2024-03-21]. ISSN 0724-4983. Dostupné z: doi:10.1007/s00345-007-0218-z

BALERCIA, Giancarlo, Eddi BULDREGHINI, Arianna VIGNINI, et al., 2009. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. Fertility and Sterility [online]. 91(5), 1785-1792 [cit. 2024-03-21]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/j.fertnstert.2008.02.119

SAFARINEJAD, Mohammad Reza a Shiva SAFARINEJAD, 2009. Efficacy of Selenium and/or N-Acetyl-Cysteine for Improving Semen Parameters in Infertile Men: A Double-Blind, Placebo Controlled, Randomized Study. Journal of Urology [online]. 181(2), 741-751 [cit. 2024-03-21]. ISSN 0022-5347. Dostupné z: doi:10.1016/j.juro.2008.10.015

NADJARZADEH, A., F. SHIDFAR, N. AMIRJANNATI, et al., 2014. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. Andrologia [online]. 46(2), 177-183 [cit. 2024-03-21]. ISSN 03034569. Dostupné z: doi:10.1111/and.12062

HADWAN, Mahmoud Hussein, Lamia A ALMASHHEDY a Abdul Razzaq S ALSALMAN, 2012. Oral zinc supplementation restore high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men. BMC Urology [online]. 12(1) [cit. 2024-03-22]. ISSN 1471-2490. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2490-12-32

MOSLEMI, Mohammad K. a Samaneh TAVANBAKHSH, 2011. Selenium–vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. International Journal of General Medicine [online]. 4, 99-104 [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: doi:10.2147/IJGM.S16275

RAIGANI, M., B. YAGHMAEI, N. AMIRJANNTI, N. LAKPOUR, M. M. AKHONDI, H. ZERAATI, M. HAJIHOSSEINAL a M. R. SADEGHI, 2014. The micronutrient supplements, zinc sulphate and folic acid, did not ameliorate sperm functional parameters in oligoasthenoteratozoospermic men. Andrologia [online]. 46(9), 956-962 [cit. 2024-03-22]. ISSN 03034569. Dostupné z: doi:10.1111/and.12180

ABAD, C., M. J. AMENGUAL, J. GOSÁLVEZ, K. COWARD, N. HANNAOUI, J. BENET, A. GARCÍA-PEIRÓ a J. PRATS, 2013. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. Andrologia [online]. 45(3), 211-216 [cit. 2024-03-22]. ISSN 03034569. Dostupné z: doi:10.1111/and.12003

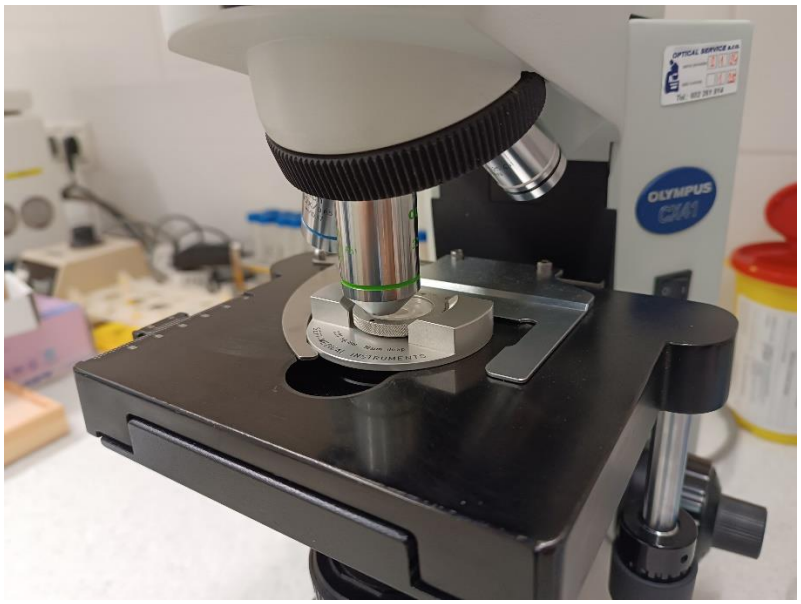
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – fotografie laboratorních zařízení a pomůcek
- Příloha B – zdrojová data

PŘÍLOHY

Příloha A – fotografie laboratorních zařízení a pomůcek

Obrázek 3: Maklerova komůrka pod mikroskopem

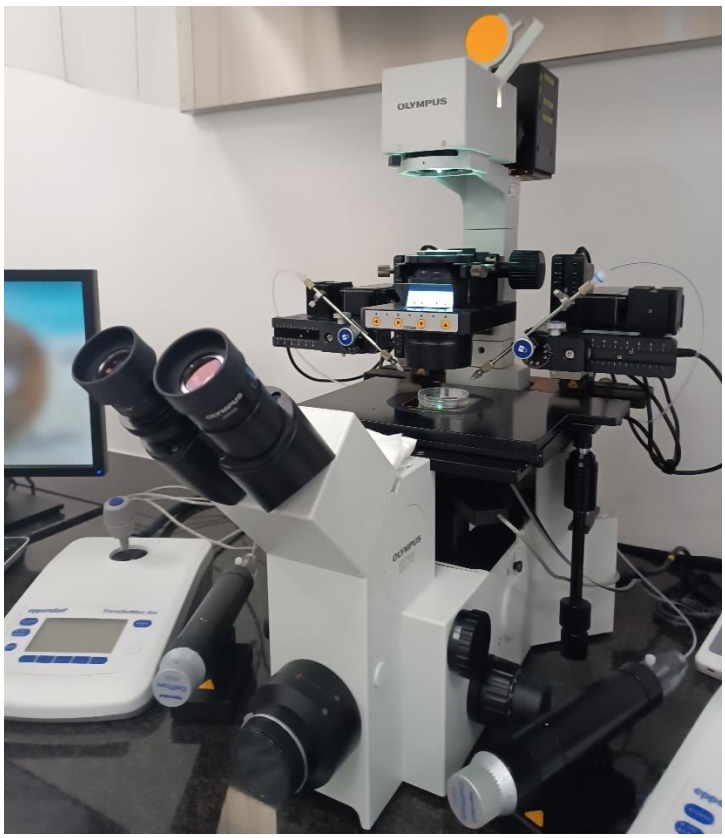


Zdroj: vlastní

Obrázek 4: Maklerova komůrka

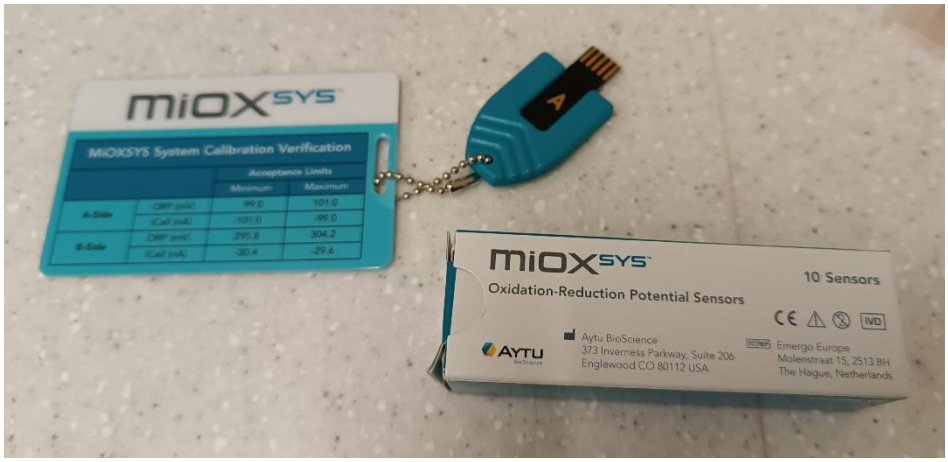
Zdroj: vlastní

Obrázek 5: Mikroskopická a mikromanipulační jednotka pro IMSI



Zdroj: vlastní

Obrázek 6: Kalibrační čip



Zdroj: vlastní

Obrázek 7: MiOXSYS s výsledky měření

Zdroj: vlastní

Příloha B – zdrojová data

	SPERMIOGRAM											OXIDATIVNÍ STRES	
Poř. čís	Objem ejakulátu (m	Koncentrace spermií (mil/m	Motilita A	Motilita	PR	Motilita	Celková	Imotilní	% Patologických forem	Kulaté buňky (mil/ml	Viskozita	sORP (mV/mil/m	Závěr SPG dle WHO 2021
1	1,6	54	29	24	53	5	58	42	88	1	1	0,00	Normozoospermie
2	2,2	49	15	27	42	4	46	54	92	2	1	0,76	Normozoospermie
3	2,6	55	31	27	58	8	66	34	89	0	0	0,20	Normozoospermie
4	1,3	10	33	11	44	9	53	47	93	1	1	1,45	Oligozoospermie
5	9,6	6	15	43	58	4	62	38	99	1	0	1,69	Oligoteratozoospermie
6	1,9	55	0	10	10	15	25	75	88	0	0	0,20	Asthenozoospermie
7	2,5	155	0	5	5	5	10	90	91	2	1	1,23	Asthenozoospermie
8	3,2	39	42	22	64	5	69	31	96	1	2	1,30	Normozoospermie
9	2,2	89	42	43	85	11	96	4	78	2	1	1,11	Normozoospermie
10	4,2	62	24	13	37	6	43	57	95	10	2	1,90	Normozoospermie
11	1,5	45	39	17	56	7	63	37	88	0	0	0,35	Normozoospermie
12	3,2	78	23	32	55	5	60	40	90	0	1	0,00	Normozoospermie
13	2,6	12	21	22	43	11	54	46	98	2	1	1,69	Oligoteratozoospermie
14	2	33	32	35	67	7	74	26	91	0	1	1,02	Normozoospermie
15	0,9	78	49	27	76	11	87	13	78	0	0	0,95	Normozoospermie
16	1,9	43	20	30	50	25	75	25	89	1	1	0,55	Normozoospermie
17	5,3	49	10	30	40	20	60	40	93	2	1	1,20	Normozoospermie
18	1,9	63	15	30	45	5	50	50	90	0	2	0,65	Normozoospermie
19	2,9	52	10	15	25	15	40	60	82	0	2	0,98	Asthenozoospermie
20	1,8	5	34	33	67	5	72	28	100	2	0	2,02	Oligoteratozoospermie
21	3,6	38	27	27	54	6	60	40	96	0	0	1,01	Normozoospermie
22	4,2	26	19	26	45	22	67	33	81	0	0	0,00	Normozoospermie
23	1,9	13	18	26	44	3	47	53	94	0	0	1,40	Oligozoospermie
24	0,8	9	32	16	48	9	57	43	90	0	0	1,37	Oligozoospermie
25	2	53	54	23	77	5	82	18	88	0	0	1,02	Normozoospermie
26	2,3	8	16	26	42	27	69	31	100	0	0	1,50	Oligoteratozoospermie
27	1,9	0,001	25	37	62	12	74	26	93	0	0	1,96	Oligozoospermie
28	2,5	37	32	26	58	11	69	31	85	0	0	0,00	Normozoospermie
29	1,6	84	33	33	66	6	72	28	89	0	0	1,00	Normozoospermie
30	4,9	17	19	29	48	28	76	24	90	0	1	0,99	Normozoospermie
31	3,1	42	38	21	59	10	69	31	87	0	2	1,00	Normozoospermie
32	3,3	44	41	27	68	8	76	24	91	0	0	0,00	Normozoospermie
33	2,4	31	0	0	0	0	0	100	95	0	0	2,30	Asthenozoospermie
34	2,3	67	0	3	3	0	3	97	97	1	2	1,69	Asthenoteratozoospermie
35	3,8	97	43	40	83	7	90	10	96	2	2	1,10	Asthenozoospermie
36	1,5	0,25	28	20	48	6	54	46	100	0	1	3,6	Oligoteratozoospermie
37	3,5	25	35	55	90	5	95	5	87	1	1	1,20	Normozoospermie
38	3	0,03	53	22	75	6	81	19	99	0	1	3,60	Oligoteratozoospermie
39	2,4	0,02	7	31	38	5	43	57	90	0	1	4,50	Oligozoospermie
40	3	91	10	25	35	7	42	58	85	0	1	1,30	Normozoospermie
41	2	14	39	21	60	7	67	33	97	0	1	0,00	Oligoteratozoospermie
42	0,5	12	27	33	60	13	73	27	98	2	1	1,20	Oligoteratozoospermie
43	1,5	38	30	10	40	10	50	50	89	0	2	1,00	Normozoospermie
44	2,6	35	18	29	47	30	77	23	89	0	1	0,90	Normozoospermie
45	2,5	67	0	20	20	10	30	70	93	0	1	1,55	Asthenozoospermie
46	4	12	15	23	38	31	69	31	90	0	0	0,89	Oligozoospermie
47	1,5	16	30	42	72	9	81	19	96	0	0	1,10	Normozoospermie
48	3	55	6	23	29	29	58	42	91	0	1	1,30	Normozoospermie
49	3	18	12	24	36	6	42	58	90	0	0	1,00	Normozoospermie
50	3,2	98	18	33	51	9	60	40	76	0	1	0,00	Normozoospermie
51	3	31	34	22	56	9	65	35	88	0	1	0,90	Normozoospermie
52	1,8	37	37	53	90	6	96	4	90	0	1	0,25	Normozoospermie
53	2	0,03	30	23	53	9	62	38	100	1	1	1,3	Oligoteratozoospermie
54	3,2	2	13	18	31	22	53	47	88	2	1	1,40	Oligozoospermie
55	1,6	120	8	27	35	12	47	53	96	0	1	1,20	Normozoospermie
56	3,5	79	48	17	65	3	68	32	98	0	1	1,69	Teratozoospermie
57	3,2	120	12	37	49	11	60	40	88	0	1	1,10	Normozoospermie
58	3,6	32	0	21	21	29	50	50	97	0	1	1,90	Teratozoospermie
59	2	67	5	19	24	5	29	71	94	0	1	2,30	Asthenozoospermie
60	2,4	20	15	25	40	25	65	35	95	0	1	1,20	Normozoospermie
61	7,5	43	25	25	50	0	50	50	95	0	1	1,19	Normozoospermie
62	3,2	15	8	23	31	16	47	53	86	0	0	1,20	Oligozoospermie
63	2	12	28	21	49	7	56	44	88	1	0	1,60	Oligozoospermie
64	2	66	25	33	58	28	86	14	93	2	0	1,40	Normozoospermie
65	3	0,5	19	22	41	26	67	33	92	0	0	1,35	Oligozoospermie
66	2,2	13	34	19	53	6	59	41	97	0	1	0,00	Oligoteratozoospermie
67	3,5	27	11	37	48	22	70	30	96	10	0	0,50	Normozoospermie
68	5	62	19	39	58	21	79	21	94	0	0	1,20	Normozoospermie
69	2	17	2	6	8	2	10	90	95	2	1	5,20	Asthenozoospermie
70	0,5	47	49	19	68	8	76	24	91	0	0	0,00	Normozoospermie
71	5	23	31	30	61	26	87	13	100	0	0	1,00	Teratozoospermie
72	4	64	16	29	45	8	53	47	88	3	0	0,89	Normozoospermie
73	4	47	8	22	30	32	62	38	95	1	1	1,30	Normozoospermie
74	3	24	21	12	33	8	41	59	90	0	0	1,23	Normozoospermie
75	5,2	26	26	21	47	6	53	47	99	0	2	0,30	Teratozoospermie
76	1,5	64	45	39	84	6	90	10	96	1	2	0,56	Normozoospermie
77	2	16	36	32	68	15	83	17	83	0	1	0,69	Normozoospermie
78	3	48	19	23	42	24	66	34	89	0	1	0,52	Normozoospermie
79	1,4	6	5	21	26	15	41	59	88	0	1	4,30	Oligoasthenozoospermie
80	3,3	1	12	23	35	18	53	47	90	0	2	2,60	Oligozoospermie
81	1,9	4	48	18	66	7	73	27	97	2	1	1,50	Oligoteratozoospermie
82	2,1	18	19	22	41	26	67	33	89	0	1	1,10	Normozoospermie
83	2,5	14	6	32	38	17	55	45	90	6	1	1,20	Oligozoospermie
84	2	81	16	32	48	11	59	41	95	0	0	0,78	Normozoospermie