

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

## VYŠETŘENÍ SPERMIÍ PRO POKROČILÉ (ADVANCED EXAMINATION)

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

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

## PŘÍPRAVA, SEPARACE A KRYOPREZERVACE SPERMIÍ

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

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