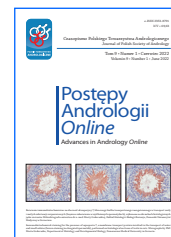




Czasopismo Polskiego Towarzystwa Andrologicznego
Journal of Polish Society of Andrology

Postępy Andrologii Online
Advances in Andrology Online

<http://www.postepyandrologii.pl>



NOWE, SZÓSTE WYDANIE REKOMENDACJI WHO Z 2021 ROKU DOTYCZĄCE BADANIA NASIENIA – JAKIE ZMIANY I NOWOŚCI DLA LABORATORIÓW SEMINOLOGICZNYCH?

THE NEW, SIXTH EDITION OF THE WHO RECOMMENDATION FROM 2021 ON SEMEN EXAMINATION – WHAT CHANGES AND NOVELTIES FOR THE SEMINOLOGY LABORATORIES?

Renata Walczak-Jędrzejowska 

Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Autor do korespondencji/corresponding author: Renata Walczak-Jędrzejowska, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

tel.: +48 42 272 53 91, e-mail: renata.walczak-jedrzejowska@umed.lodz.pl

Otrzymano/received: 29.07.2022 r. • Zaakceptowano/accepted: 05.09.2022 r.

DOI: [10.26404/PAO_2353-8791.2022.01](https://doi.org/10.26404/PAO_2353-8791.2022.01)



Renata Walczak-Jędrzejowska – dr hab. n. med., absolwentka Uniwersytetu Łódzkiego oraz Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, biolog, specjalność biologia molekularna, diagnosta laboratoryjny. Nauczyciel akademicki w Zakładzie Endokrynologii Płodności Katedry Andrologii i Endokrynologii Płodności Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Współwykonawca polskich i europejskich projektów badawczych. Pierwszy autor i współautor 93 publikacji naukowych. Członek Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Andrologicznego, członek Międzynarodowego Towarzystwa Andrologicznego. Praca zawodowa i naukowa autorki związana jest z badaniami nad czynnością męskiego układu płciowego i jego zaburzeniami, diagnostyką andrologiczną oraz wpływem czynników środowiskowych na męską płodność.

Renata Walczak-Jędrzejowska – PhD, DSc, graduate of the University of Lodz and Medical University of Lublin, biologist, specializing in molecular biology and laboratory diagnostician. Academic teacher at the Division of Reproductive Endocrinology, Department of Andrology and Reproductive Endocrinology, Medical University of Lodz. Researcher of Polish and European research projects. The first author and co-author of 93 scientific publications. Member of the Main Board of the Polish Society of Andrology, member of the International Society of Andrology. The author's research interest is focused on the function of the male reproductive system and its disorders, andrological diagnostics as well as on the effect of environmental factors on male fertility.



Access to articles is based on the License Creative Commons BY NC ND 3.0 Polska:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.pl>

Streszczenie

Badanie nasienia stanowi pierwszy etap diagnostyki u mężczyzny z niepłodnej pary. Wynik badania ukierunkowuje dalsze działania diagnostyczne w celu wyjaśnienia przyczyn niepłodności pary i ewentualnego podjęcia leczenia przyczynowego. Wydawane od przeszło 40 lat podręczniki Światowej Organizacji Zdrowia, stanowią podstawę standaryzacji procedur wykonywanych podczas badania oraz stosowanych wartości referencyjnych w laboratoriach seminologicznych na całym świecie. W roku 2021, po 11 latach od ostatniego wydania, opublikowana została najnowsza 6. już edycja tego podręcznika. W poniższym artykule zaprezentowane zostaną najistotniejsze zmiany dotyczące procedur podstawowego badania nasienia w porównaniu do poprzednich wytycznych z roku 2010. Przedstawione zostaną także dodatkowe testy seminologiczne, które zostały zamieszczone w dwóch oddzielnych rozdziałach, jako testy stanowiące rozszerzoną lub zaawansowaną ocenę nasienia, czynności i jakości plemników. Omówione zostaną także zalecenia i zmiany dotyczące interpretacji wyniku badania nasienia z wykorzystaniem tzw. „wartości referencyjnych”.

Słowa kluczowe: niepłodność męska, diagnostyka, badanie nasienia

Abstract

Semen examination is the first step of diagnosis of a man from an infertile couple. The obtained result directs further diagnostic work-up in order to clarify the causes of the couple's infertility and to implement treatment. The manuals of the World Health Organization, which have been published for over 40 years, are the basis for the standardization of procedures performed during examination and the reference values used in seminology laboratories all around the world. In 2021, 11 years after the last edition, the latest 6th edition of this manual was published. The following article presents the most significant changes to the basic semen examination procedures compared to the previous guidelines from 2010. Additional seminological tests, which have been included in two separate chapters, as an extended or advanced evaluation of semen, sperm function and quality, are also presented. Recommendations and changes regarding the interpretation of the semen examination result using the so-called "reference values" are discussed.

Keywords: male infertility, diagnostics, semen examination

Skróty / Abbreviations

CASA – analiza nasienia wspomagana komputerowo (ang. *computer assisted sperm analysis*); ELISA – enzymatyczny test immunosorbentowy (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*); EQC – zewnętrzna kontrola jakości (ang. *external quality control*); FISH – fluorescencyjna hybrydizacja *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*); IQC – wewnętrzna kontrola jakości (ang. *internal quality control*); ISO – Międzynarodowa Organizacja Normalizacji (ang. *International Organization for Standardization*); MACS – magnetycznie aktywowane sortowanie plemników (ang. *magnetic activating cell sorting*); MiOXSYS – system do oceny potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w nasieniu (ang. *male infertility oxidative system*); SCD – test dyspersji chromatyny plemnika (ang. *sperm chromatin dispersion test*); TEAC – ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia w oparciu ekwiwalent potencjału przeciwutleniającego troloksu w reakcji z rodnikiem ABTS+ (ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*); TMPC – całkowita liczba plemników o ruchu postępowym (ang. *total progressive motile sperm count*); TUNEL – znakowanie końców nacięć nici DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*); TZI – wskaźnik teratozoospermii (ang. *teratozoospermia index*); WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Wstęp

Niepłodność wg definicji Światowej Organizacji zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) to niemożność uzyskania ciąży przez okres 12. miesięcy, mimo regularnych stosunków płciowych (2–4-krotnie/tydzień), bez stosowania metod antykoncepcyjnych (Zegers-Hochschild i wsp., 2017). Szacuje się, że dotyka ona obecnie od 8 nawet do 16% par w wieku rozrodczym na całym świecie (Inhorn i Patrizio, 2015; Vander Borgh i Wyns, 2018; Agarwal i wsp., 2020; Minhas i wsp., 2021). Według raportu Sekcji Płodności i Niepłodności Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w Polsce boryka się z nią około miliona par, z czego większość nie pozostaje pod opieką specjalistycznych ośrodków zajmujących się kompleksową

diagnostyką i leczeniem zaburzeń płodności (Janicka i wsp., 2015). Jednak warto zaznaczyć, że ze względu na brak rzetelnych rejestrów i statystyk dotyczących niepłodności, skala problemu może być w naszym kraju niedoszacowana. Według danych międzynarodowego projektu *Global Burden of Disease* w latach 1990–2017 częstość występowania niepłodności wzrastała rocznie o 0,291% wśród mężczyzn i o 0,370% wśród kobiet (Sun i wsp., 2017).

Czynnik męski, jako jedyna przyczyna niepłodności lub w połączeniu z czynnikiem żeńskim, odpowiedzialny jest za około 50% przypadków zaburzeń płodności pary (Thonneau i wsp., 1991; Anderson i wsp., 2009; Agarwal i wsp., 2021). Szacuje się, że co najmniej 30 milionów mężczyzn na całym świecie boryka się z problemem niepłodności, przy czym wyższy odsetek zaburzeń występuje

w Europie Wschodniej (8–12%) w porównaniu na przykład z Australią (8–9%) czy Ameryką Północną (4,5–6%) (*Agarwal i wsp.*, 2015).

Pierwszym etapem diagnostyki zaburzeń męskiej płodności jest badanie nasienia. Jego wynik ukierunkowuje dalsze działania diagnostyczne w celu wyjaśnienia przyczyn niepłodności pary i ewentualnego podjęcia leczenia przyczynowego. Od przeszło 40 już lat ocena parametrów nasienia opiera się na standardach zawartych w podręczniku WHO, którego pierwsza edycja opublikowana była w roku 1980 (*WHO*, 1980). W ciągu kolejnych 30 lat pojawiły się jego cztery zaktualizowane wersje – w roku 1987 (*WHO*, 1987), 1992 (*WHO*, 1992), 1999 (*WHO*, 1999) i 2010 (*WHO*, 2010). W lipcu 2021 roku, po prawie 11 latach od ostatniego 5. wydania podręcznika, ukazała się jego ostatnia, 6. edycja (*WHO*, 2021).

W poniższym artykule omówione zostaną najistotniejsze zmiany dotyczące procedur podstawowego badania nasienia jakie zostały wprowadzone w 6. wydaniu podręcznika w porównaniu z jego poprzednią wersją z roku 2010. Przedstawione zostaną także dodatkowe testy seminologiczne, które zostały zamieszczone w dwóch oddzielnych rozdziałach jako testy stanowiące rozszerzoną lub zaawansowaną ocenę nasienia, głównie dotyczące oceny czynności i jakości plemników. Omówione zostaną także zalecenia i zmiany dotyczące interpretacji wyniku badania nasienia z wykorzystaniem tzw. „wartości referencyjnych”.

Podręcznik WHO 2021 – jakie zmiany i nowości?

Podobnie jak w poprzedniej, 5. edycji podręcznika z roku 2010 także w aktualnym wydaniu, w rozdziale dotyczącym podstawowej analizy nasienia, przedstawione są w sposób szczegółowy, krok po kroku, wszystkie procedury wykorzystywane przy ocenie poszczególnych parametrów. Niektóre z nich uległy modyfikacji związanej z wykonywaniem samej procedury i prezentacją wyników (ocena koncentracji, ruchliwości, morfologii). W przeciwieństwie do wcześniejszych wydań podręcznika, obecnie WHO rekomenduje wykorzystywanie tylko jednej metody do oceny danego parametru nasienia np. metody barwienia próbek do oceny żywotności czy morfologii plemników, lub metody pomiarowej do oceny objętości próbki. Autorzy podkreślają wagę zliczania odpowiedniej liczby plemników przy wykonywaniu oceny poszczególnych parametrów nasienia – co najmniej po 200 plemników w dwóch powtórzeniach (razem co najmniej 400). Wszystko powyższe ma na celu uzyskanie jak najwyższego stopnia standaryzacji wykonywanych procedur oraz poprawę dokładności i precyzji a tym samym wiarygodności wyniku. Niewątpliwie ścisłe stosowanie rekomendowanych procedur przez diagnostów skutkować będzie możliwością porównywania wyników uzyskanych z różnych laboratoriów czy to w celach diagnostycznych czy naukowych. Możliwe jest używanie innych metod, niż

rekomendowane, w danym laboratorium (inna komora zliczeniowa, inna metoda barwienia), jednakże, w takich sytuacjach należałoby dokonać wewnętrznej walidacji pod względem spójności wyników z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem metody rekomendowanej.

Najważniejszą zmianą i nowością przedstawioną w 6. wydaniu podręcznika jest rezygnacja z pojęcia tzw. „wartości referencyjnych”, które były do tej pory zawsze prezentowane w poprzednich jego edycjach.

Kolejną istotną aktualizacją jest dodanie dwóch rozdziałów dotyczących uzupełniających testów seminologicznych mających na celu m.in. ocenę jakości i czynności plemników, ocenę innych komórek znajdujących się w nasieniu, czy też ocenę markerów stanów zapalnych w męskim układzie płciowym. Wśród testów tych znalazły się zarówno niektóre testy prezentowane już w poprzedniej, 5. edycji podręcznika jako tzw. „testy opcjonalne” lub „procedury naukowe”, jak i zupełnie nowe testy, które zostały wprowadzone do aktualnego podręcznika po raz pierwszy. W rozdziałach tych, podobnie jak w rozdziale dotyczącym podstawowego badania nasienia, przedstawiono krok po kroku procedury wykonywania większości zaprezentowanych testów oraz interpretację ich wyników. Usunięte zostały przestarzałe testy takie jak testy penetracji plemników do śluzu szyjkowego czy też testy interakcji plemnika z komórką jajową.

Rozdziały dotyczące przygotowywania plemników do procedur wspomaganego rozrodu lub krioprezerwacji zostały uaktualnione o bardziej szczegółowy opis stosowanych protokołów oraz wprowadzenie po raz pierwszy opisu procedury magnetycznego aktywowanego sortowania plemników (MACS, ang. *magnetic activating cell sorting*)¹ czy też procedury witrifikacji. Rozdziały dotyczące kontroli jakości w laboratorium seminologicznym zostały wzbogacone o praktyczne przykłady i bardziej szczegółowe wyjaśnienia, jak zminimalizować błędy przy wykonywaniu badania.

Zmiany w procedurze podstawowego badania nasienia

Ocena makroskopowa

Ocena makroskopowa obejmuje szereg obserwacji związanych z cechami fizyko-chemicznymi ejakulatu (plazmy nasienia) i nie ulega wątpliwości, że nieprawidłowości obserwowane w analizowanych parametrach, tj.: objętość ejakulatu, lepkość, czas upłynięcia, pH czy barwa, dostarczają istotnych klinicznie informacji, przede wszystkim o czynności dodatkowych gruczołów płciowych. Ocena tych parametrów nie ulegała istotnym zmianom w nowej edycji podręcznika.

¹ Jest to metoda magnetycznej separacji plemników wykazujących cechy apoptotyczne. Komórki nieprawidłowe mające na powierzchni swojej błony komórkowej fosfatydyloserynę są zdolne do wiązania się z aneksyną V opłatającą kulki magnetyczne, które są zatrzymywane na kolumnie. W ten sposób plemniki niezwiązane, przechodzące przez kolumnę stanowią populację komórek prawidłowych o potencjalnie integralnym genomie (przypr. red.).

Nowością w ocenie makroskopowej próbki jest dodanie oceny zapachu nasienia i odnotowywanie na wyniku stanu, kiedy wyczuwalny jest silny zapach moczu lub gnicia co może mieć znaczenie kliniczne (np. wskazywać na infekcje bakteryjne i stany zapalne). Należy jednak wziąć pod uwagę, że ocena zapachu jest oceną wysoce subiektywną, tym samym standaryzacja tego parametru jest utrudniona.

Jedyną rekomendowaną obecnie metodą oceny objętości nasienia jest metoda wagowa, dająca najwyższą dokładność pomiaru (*Cooper i wsp., 2007*). Metoda bezpośrednia – oddanie próbki do specjalnego wykalibrowanego cylindra o szerokim ujściu – przedstawiana jako metoda alternatywna w 5. wydaniu podręcznika została usunięta. Precyzyjna ocena objętości ejakulatu jest bardzo istotna, gdyż odzwierciedla ona aktywność wydzielniczą gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego (najądrzy, pęcherzyków nasiennych, gruczołu krokowego, gruczołów Cowpera) oraz wydajność skurczową mięśni gładkich. Wykorzystywana jest ona także do wyliczania całkowitej liczby plemników, czy też innych komórek oraz całkowitej ilości markerów biochemicznych w ejakulacie.

Ocena mikroskopowa

Ruchliwość plemników

Jedna z najbardziej znaczących zmian w ocenie mikroskopowej ejakulatu dotyczy ruchliwości plemników. Przywrócony został podział na 4 kategorie ruchu: 1) ruch postępowy szybki, 2) ruch postępowy wolny, 3) ruch w miejscu oraz 4) brak ruchu. Podział ten obowiązywał w 3. i 4. wydaniu, a został pominięty w wydaniu 5. podręcznika, w którym wyróżniono tylko jeden typ ruchu postępowego, bez względu na szybkość z jaką plemnik się poruszał. Autorzy 5. wydania podręcznika argumentowali wprowadzenie tej zmiany faktem, że dokładna ocena szybkości ruchu plemników może stanowić problem dla pracowników laboratoriów, co z kolei będzie prowadzić do błędnej klasyfikacji plemników do danej kategorii ruchu postępowego, i tym samym uzyskiwania niewiarygodnych wyników przeprowadzonej analizy (*Cooper i Yeung, 2006*). Jednakże, decyzja ta spotkała się z falą krytyki skierowaną do Autorów podręcznika, głównie przez środowisko klinicystów, którzy wskazywali na istnienie badań, z których jednoznacznie wynika, że identyfikacja plemników wykazujących szybki ruch postępowy jest istotna klinicznie (*Aitken i wsp., 1985; Irvine i Aitken, 1986; Mortimer i wsp., 1986; Comhaire i wsp., 1988; Barratt i wsp., 1992; Bollendorf i wsp., 1996; Van den Bergh i wsp., 1998; Sifer i wsp., 2005; Björndahl, 2010; Eliasson, 2010; Barratt i wsp., 2011*).

Tak więc, powyższa krytyka została uwzględniona w aktualnym wydaniu podręcznika, a kwalifikacja plemników do danej kategorii ruchu opiera się o następujące kryteria:

- 1) *ruch postępowy szybki* ($\geq 25 \mu\text{m/s}$) – plemnik poruszający się ruchem postępowym zarówno liniowo, jak i po dużym okręgu, pokonujący w ciągu sekundy

dystans co najmniej $25 \mu\text{m}$ – czyli odległość odpowiadającą co najmniej 1/2 długości witki;

- 2) *ruch postępowy wolny* (od 5 do $<25 \mu\text{m/s}$) – plemnik poruszający się ruchem postępowym zarówno liniowo, jak i po dużym okręgu, pokonujący w ciągu sekundy dystans od 5 do $<25 \mu\text{m}$ – czyli odległość odpowiadającą zakresowi od co najmniej jednej długości główki do mniej niż 1/2 długości witki;
- 3) *ruch w miejscu* ($<5 \mu\text{m/s}$) – wszystkie inne typy ruchu plemnika, bez oznak ruchu postępowego, np. poruszanie się plemnika po małym okręgu, przy czym dystans pokonany w ciągu sekundy przez główkę plemnika wynosi $<5 \mu\text{m}$ – czyli odległość mniejszą od długości główki;
- 4) *brak ruchu* – brak jakiegokolwiek aktywnego ruchu witki plemnika.

Ponieważ szybkość z jaką plemniki poruszają się jest w dużym stopniu zależna od temperatury, to rekomenduje się aby analiza ta była wykonywana w warunkach wystandaryzowanej temperatury, najlepiej w 37°C , co uzyskuje się poprzez pre-inkubację samej próbki jak i szkiełek podstawowych i nakrywkowych w cieplarni, a następnie ocenę ruchu w mikroskopie zaopatrzonym w podgrzewany stolik z regulacją temperatury. Wykonywanie oceny ruchliwości plemników w temperaturze pokojowej jest bardziej problematyczne. Według definicji zakres temperatury pokojowej jest dość szeroki ($15\text{--}25^\circ\text{C}$), tym samym temperatura ta może różnić się znacznie w poszczególnych laboratoriach, co utrudnia jej standaryzację.

Podobnie jak w poprzednich wydaniach, w celu ułatwienia analizy, WHO rekomenduje użycie okularu z siatką, w szczególności przy próbkach z dużą liczbą plemników.

Autorzy podręcznika podkreślają biologiczne znaczenie wyliczonej całkowitej liczby plemników o ruchu postępowym (TMPC, ang. *total progressive motile sperm count*). Rzeczywiście, wiele badań wskazuje, że TMPC wydaje się być lepszym predyktorem uzyskania ciąży (w sposób naturalny lub z wykorzystaniem metod rozrodu wspomaganego medycznie), czy też oszacowania czasu do uzyskania ciąży, niż pojedyncze parametry nasienia (*Hamilton i wsp., 2015; Borges i wsp., 2016a, Borges, 2016b, Keihani i wsp., 2021, Madbouly i wsp., 2017*).

Pojawiły się już głosy krytyczne odnośnie powrotu do rozróżniania w badaniu manualnym dwóch kategorii ruchu postępowego w zależności od szybkości poruszania się plemników. Uważa się, że mniej podatnym na błędy w analizie, i bardziej przydatnym w ocenie potencjału płodności mężczyzny mogłoby być jakościowe zróżnicowanie ruchu postępowego na: liniowy i nieliniowy (*Paoli i wsp., 2011; Paoli i wsp., 2021*).

Żywotność plemników

Obecnie testem rekomendowanym do oceny żywotności plemników jest test eozyna-nigrozyna, który ocenia integralność błony komórkowej plemnika. W aktualnej edycji podręcznika poprawiono kryteria klasyfikacji plemników

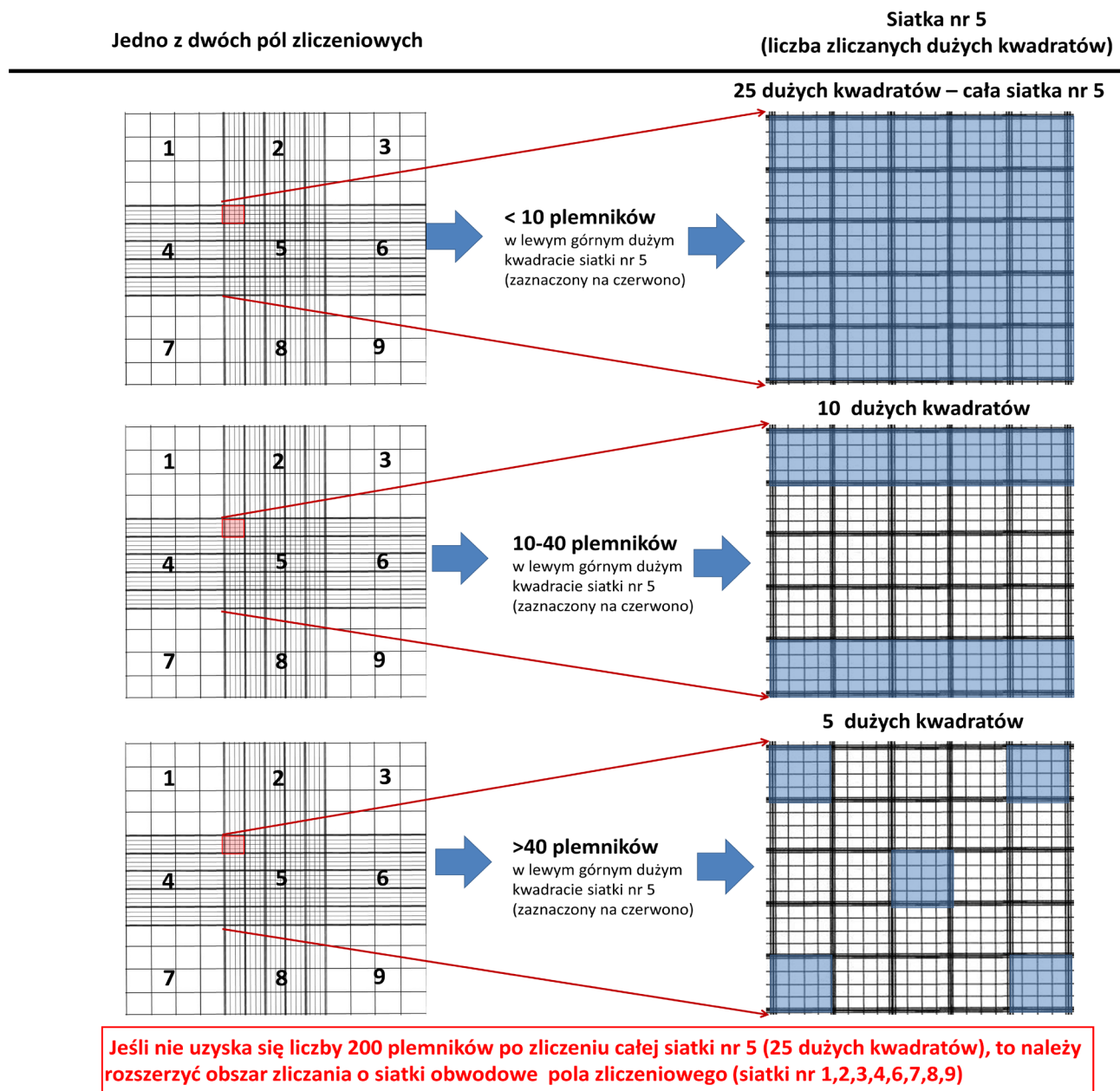
jako martwych i żywych w oparciu o powyższy test. I tak, do żywych zaliczamy tylko plemniki o główkach niezabarwionych eozyną, natomiast plemniki o główkach czerwonych, różowych lub bladoróżowych klasyfikowane są jako nieżywe. Dodatkowo, do żywych zaliczane są także plemniki wykazujące tylko nieznaczne podbarwienie eozyną w regionie szyjki (tzw. nieszczelna, przeciekająca błona szyjki), podczas gdy reszta główki pozostaje niezabarwiona. W 5. edycji podręcznika plemniki o główkach bladoróżowych były mylnie zaliczane do plemników żywych (*Björndahl i wsp., 2003*).

Choć ocena żywotności może być wykonywana rutynowo dla każdej próbki, to nie jest ona konieczna jeśli odsetek plemników wykazujących ruch wynosi powyżej

40% (ruch całkowity). Z kolei, przy próbkach z niskim odsetkiem ruchliwych plemników lub przy braku ruchliwych plemników, istotne klinicznie może być wyliczenie odsetka żywych i nieruchomych plemników. Autorzy podręcznika sugerują, że jeśli w próbce takiej odsetek plemników żywych i nieruchomych wynosi ponad 25–30% to może to wskazywać na występowanie zaburzeń genetycznych budowy witki. W takiej sytuacji ma być możliwość poprawy ruchliwości plemników poprzez leczenie.

Koncentracja plemników

Podobnie jak w poprzednich edycjach podręcznika rekomendowaną komorą zliczeniową do oceny koncentracji



Ryc. 1. Schemat postępowania przy ocenie koncentracji plemników z wykorzystaniem udoskonalonej komory Neubera. Lewy panel – jedno z pól zliczeniowych komory z 9-cio siatkami. Prawy panel – siatka środkowa (nr 5), składająca się z 25 dużych kwadratów otoczonych potrójną linią. W lewym panelu, w siatce środkowej nr 5, zaznaczony jest na czerwono lewy, górny duży kwadrat. Ilość plemników zliczonych w tym kwadracie determinuje ilość dużych kwadratów, z których zliczane są plemniki w siatce nr 5. Jeśli nie uzyska się liczby 200 plemników po zliczeniu całej siatki nr 5 (25 dużych kwadratów), to należy rozszerzyć obszar zliczania o kolejne siatki obwodowe pola zliczeniowego (siatki nr 1,2,3,4,6,7,8,9)

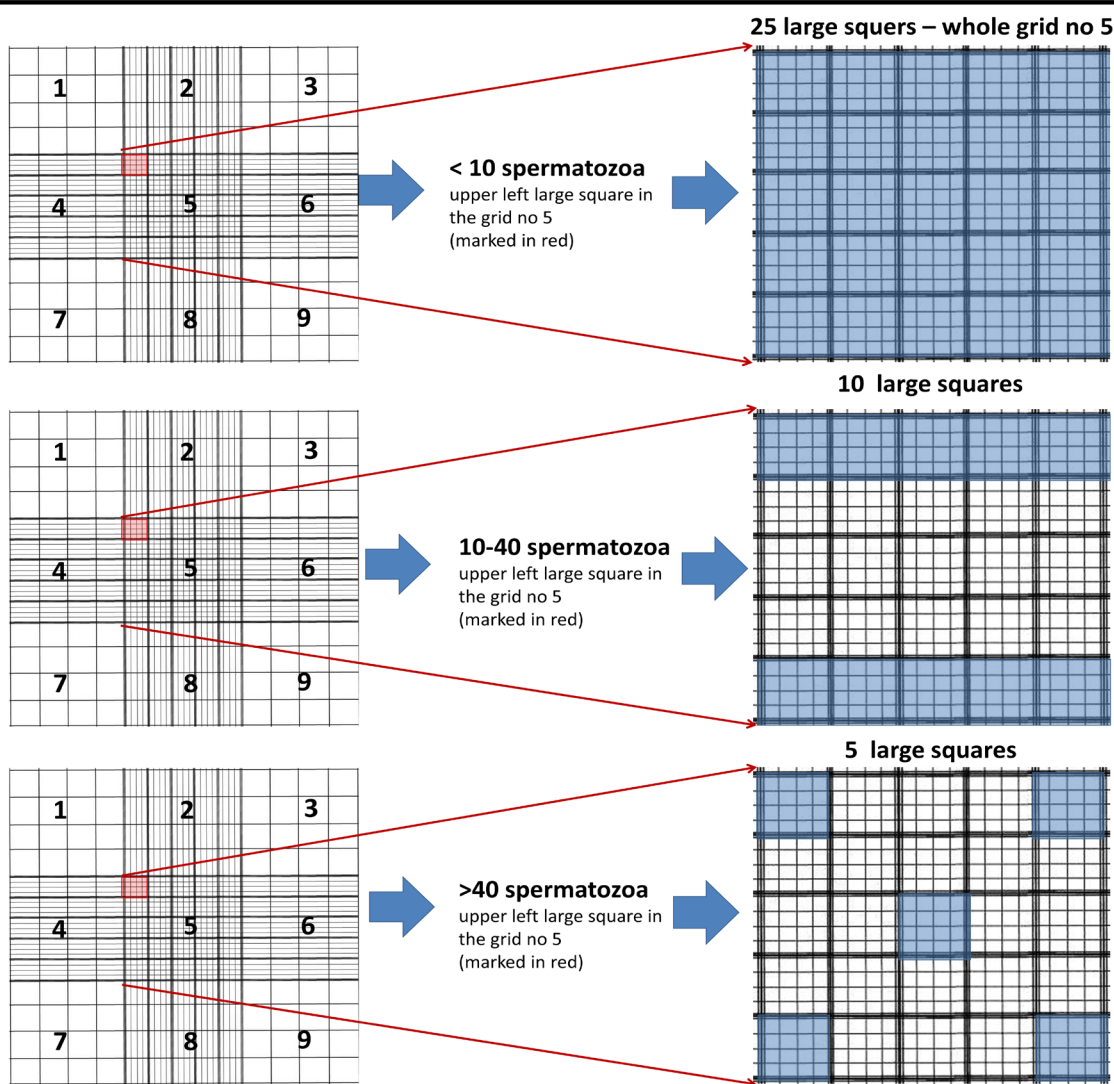
plemników pozostała udoskonalona komora Neubauera (Rycina 1), jednakże sama procedura zliczania plemników została uproszczona. Wprowadzono dodatkowe rozcieńczenie dla próbek, w których w preparacie przyżyciowym w polu widzenia pod powiększeniem 400× obserwuje się więcej niż 200 plemników lub pod powiększeniem 200× obserwuje się więcej niż 800 plemników. Wprowadzone rozcieńczenie wynosi 1:50.

Pierwszym etapem procedury zliczania w komorze jest ustalenie w ilu kwadratach środkowej siatki (siatka nr 5; Rycina 1), w jednym z pól zliczeniowych komory, trzeba będzie zliczać plemniki aby osiągnąć liczbę co najmniej 200. Etap ten opiera się na obserwacji ile plemników znajduje się w lewym górnym dużym kwadracie

środkowej siatki. Jeśli jest ich <10 – to w dalszej kolejności należy zliczyć plemniki z całej środkowej siatki (25 dużych kwadratów), jeśli jest ich 10–40 – to należy zliczyć plemniki z 10 dużych kwadratów, a jeśli jest ich >40 – to należy zliczyć plemniki z 5 dużych kwadratów (najlepiej środkowy i 4 znajdujące się w rogach siatki) (Rycina 1). Jeśli w z góry określonej liczbie dużych kwadratów (5 lub 10) nie uda się zliczyć 200 plemników, należy rozszerzyć zliczanie o kolejne kwadraty (odpowiednio 10 lub 25). Jeśli oceniono wszystkie 25 dużych kwadratów w środkowej siatce i nie zliczono przynajmniej 200 plemników, należy rozszerzyć obszar zliczania o kolejne siatki obwodowe pola zliczeniowego (siatki nr 1,2,3,4,6,7,8,9; Rycina 1). Zliczanie zawsze należy

One of the two sides of the chamber

Grid no 5
number of large squares counted



If the number of 200 sperm is not obtained after counting the grid no. 5 (25 large squares), then the counting area should be extended to the peripheral grids of the counting field (grids No. 1,2,3,4,6,7,8,9)

Fig. 1. Scheme of the assessment of sperm concentration using the improved Neubauer chamber. Left panel – one of the counting fields of the chamber with 9 grids. Right panel – central grid (No. 5), consisting of 25 large squares surrounded by a triple line. In the left panel, in the grid No. 5, the upper left square is marked in red. The number of spermatozoa counted in this square determines the number of large squares from which the sperm are counted in grid 5. If the number of 200 spermatozoa is not obtained after counting the entire grid no. 5 (25 large squares), then the counting area should be extended with another peripheral grid of the counting field (grids no. 1,2,3,4,6,7,8,9)

kontynuować do osiągnięcia liczby przynajmniej 200 plemników, i po osiągnięciu tej liczby dokończyć zliczany kwadrat/siatkę.

Po zliczeniu plemników w pierwszym polu zliczeniowym komory, należy dokonać zliczenia z tej samej liczby siatek/kwadratów w drugim polu zliczeniowym. W celu wyliczenia koncentracji należy podzielić sumę plemników uzyskaną z obu pól zliczeniowych komory przez odpowiedni współczynnik korekcji.

$$\text{Koncentracja plemników mln/mL} = \frac{\text{suma zliczonych plemników}}{\text{współczynnik korekcji}}$$

Współczynnik korekcji uzależniony jest od zastosowanego rozcieńczenia próbki oraz ilości zliczanych kwadratów/siatek (Tabela 1).

Jeśli w każdym z pól zliczeniowych rozszerzonej komory Neubauera zliczono mniej niż 25 plemników, przy współczynniku rozcieńczenia 1:2, to koncentracja plemników w tej próbce wynosi <55 555/mL, a szacunkowy błąd próby jest >14% (Cooper i wsp., 2006). W takim wypadku na wyniku raportuje się liczbę zliczonych plemników z następującym komentarzem: „Zbyt mało zliczonych plemników aby możliwe było dokładne określenie koncentracji (<56 000/mL)”.

W obecnym podręczniku podkreślona zostaje także potrzeba wyliczania i raportowania na wyniku całkowitej liczby plemników w ejakulacie, jako że parametr ten stanowi miarę wydajności procesu spermatogenezy, tym samym liczby plemników przeniesionych

do żeńskich dróg rozrodczych podczas stosunku płciowego.

Dodatkową zmianą jest rekomendacja dotycząca przeprowadzania dokładniejszej oceny niskich koncentracji plemników (<2 mln/mL), i raportowania ich na wyniku. Przedstawiono kilka metod (mniej lub bardziej szacunkowych np. z wykorzystaniem jednorazowych komór o dużej objętości), które zwiększają dokładność i precyzję przeprowadzanej analizy. Należy jednak pamiętać, że w takich przypadkach błąd szacunkowy próby może być wysoki (wyższy niż rekomendowanych 5%), i w tej sytuacji powinien być zaraportowany na wyniku.

Morfologia plemników

Barwieniem rekomendowanym do oceny morfologii plemników jest metoda Papanicolaou, które daje najlepsze efekty, jeśli chodzi o uwidocznienie poszczególnych elementów budowy plemników oraz występujących w nich zaburzeń. Przy użyciu tego barwienia opracowywano także kryteria oceny plemników - ścisłe kryteria Tygerber (inaczej ścisłe kryteria Krugera) (Kruger i wsp., 1988; Menkveld i wsp., 1990; Zollner i wsp., 1996; Franken i wsp., 2000; Menkveld i wsp., 2003), które wykorzystywane są do oceny morfologii począwszy od 5. wydania podręcznika. Autorzy aktualnego podręcznika podkreślają, że termin „prawidłowy plemnik” jest pod pewnym względem niejednoznaczny, gdyż powszechnie przyjmuje się, że określenie to wyklucza obecność zaburzenia. W przypadku męskich gamet ich prawidłowa morfologia

Tabela 1. Wartości współczynnika korekcji do wyliczenia koncentracji plemników w zależności od zastosowanego rozcieńczenia oraz liczby zliczonych dużych kwadratów siatki nr 5 lub zliczonych siatek w każdym z pól zaliczeniowych (WHO, 2021)

	Liczba zliczonych dużych kwadratów w każdym z pól zliczeniowych			Liczba zliczonych siatek w każdym z pól zaliczeniowych							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
Rozcieńczenie	Wartość współczynnika korekcji										
1:2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900
1:5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1:10	4	8	20	40	60	60	100	120	140	160	180
1:20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1:50	0,8	1,6	4	8	12	16	20	24	28	32	36

Table 1. Values of correction factor for calculation of sperm concentration depending on dilution used and the number of large squares from grid no 5 or number of grids counted in each fields of improved Neubauer chamber (WHO, 2021)

	Number of large squares counted in each chamber			Number of grids counted in each chamber							
	5	10	25	2	3	4	5	6	7	8	9
Dilution	Correction factor values										
1:2	20	40	100	200	300	400	500	600	700	800	900
1:5	8	16	40	80	120	160	200	240	280	320	360
1:10	4	8	20	40	60	60	100	120	140	160	180
1:20	2	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1:50	0.8	1.6	4	8	12	16	20	24	28	32	36

nie oznacza, że plemnik nie może mieć innego zaburzenia np. nieruchomej witki lub uszkodzonego DNA. Wydaje się, że lepszym sformułowaniem jest „plemnik typowy” lub „plemnik idealny”. W tabeli 2 zamieszczono aktualne kryteria opisujące plemnik „typowy”, przedstawione w podręczniku WHO z roku 2021.

Co jeszcze jest podkreślane w aktualnym wydaniu podręcznika to fakt, że ocena morfologii plemnika dostarcza istotnych informacji dotyczących czynności męskich narządów płciowych – przede wszystkim jąder i najądrzy. Zwiększony odsetek plemników o nieprawidłowym kształcie (głównie główki) może wskazywać

Tabela 2. Kryteria oceny budowy plemnika (WHO, 2021)

Element budowy plemnika	Cechy plemnika prawidłowego (typowego/idealnego)	Nieprawidłowości w budowie plemnika
Główka	– regularna w zarysie, owalna – akrosom dobrze widoczny, regularny w zarysie, zajmujący 40–70% powierzchni główki – dopuszcza się obecność nie więcej niż 2 małe wakuole zajmujące $\leq 1/5$ powierzchni główki – część postakrosomalna nie powinna zawierać żadnych wakuoli	– akrosom $<40\%$ lub $>70\%$ powierzchni główki, lub – stosunek długości do szerokości $<1,5$ (główka okrągła) lub >2 (główka wydłużona), lub – kształt główki: gruszkowaty, amorficzny, asymetryczny, nieowalny w części apikalnej, lub – obecne wakuole – zajmujące $>1/5$ powierzchni główki lub wakuole obecne w części postakrosomalnej główki, lub – podwójne główki, lub – kombinacje powyższych zaburzeń
Wstawka	– wysmukła, regularna w zarysie – o podobnej długości co główka plemnika – z prawidłową pozycją – oś długa wstawki stanowi przedłużenie osi długiej główki	– nieregularny kształt, lub – zbyt gruba lub zbyt cienka, lub – asymetryczna, lub połączona z główką pod kątem, lub – zgięta pod kątem ostrym, lub – kombinacje powyższych zaburzeń
Witka	– jednolita na całej długości, cieńsza niż wstawka, prosta lub łagodnie zgięta ale nie pod kątem ostrym – długość około 45 μm (ok. 10 długości główek) – może być, zgięta w kształcie litery „U”, ale nie złamana	– zgięta pod kątem ostrym, lub – zgięta w postaci wsuwki do włosów, lub – zwinięta, lub – krótka/ złamana, lub – nieregularna w zarysie, lub – wielokrotna, lub – kombinacje powyższych zaburzeń
Resztkowa cytoplazma	– kropla cytoplazmatyczna $<1/3$ wielkości główki prawidłowego plemnika uznawana jest za prawidłowość	– resztkowa cytoplazma $>1/3$ wielkości główki prawidłowego plemnika (nadmiar resztkowej cytoplazmy)

Table 2. Criteria for the evaluation of sperm morphology (WHO, 2021)

Element of the sperm structure	Features of normal sperm (typical/ideal)	Abnormalities in the sperm
Head	– smooth, regularly contoured and generally oval in shape – well-defined acrosomal region comprising 40–70% of the head – area – the acrosomal region should contain no large vacuoles, and not more than two small vacuoles, which should not occupy more than one fifth of the sperm head – the post-acrosomal region should not contain any vacuoles	– acrosome less than 40% or larger than 70% of a normal head area, or – length-to-width ratio less than 1.5 (round) or larger than 2 (elongated), or – shape: pyriform (pear shaped), amorphous, asymmetrical, or non-oval shape in the apical part, or – vacuoles constitute more than one fifth of the head area or located in the post-acrosomal area, or – double heads, or – any combinations
Midpiece	– slender, regular – about the same length as the sperm head – the major axis of the midpiece should be aligned with the major axis of the sperm head	– irregular shape, or – thin or thick, or – asymmetrical or angled insertion at head, or – sharply bent, or – any combinations
Tail	– uniform calibre along its length, thinner than the midpiece – approximately 45 μm long (about 10 times the head length) – may be looped back on itself, but without sharp angulation indicative of a broken flagellum	– sharply angulated bends, or – smooth hairpin bends, or – coiled, or – short (broken), or – irregular width, or – multiple tails, or – any combinations
Cytoplasmic residue	– cytoplasmic droplets - less than one third of a normal sperm head size are normal	– residual cytoplasm - an anomaly only when it exceeds one third of normal sperm head size

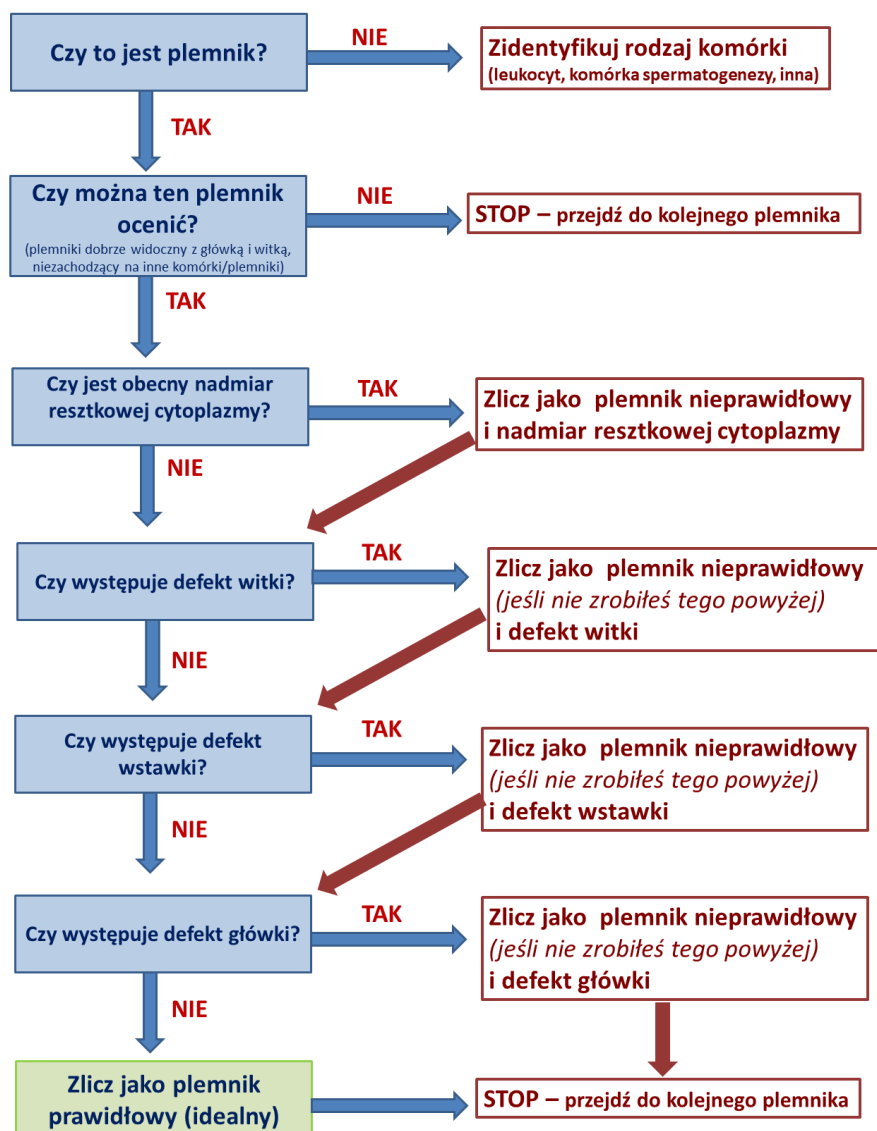
na nieprawidłowy przebieg spermatogenezy, a także zaburzenie czynności najądrzy. Plemniki o nieprawidłowej budowie główki wykazują niższy potencjał do zapłodnienia, mogą mieć zwiększoną fragmentację DNA (*Gandini i wsp.*, 2000; *Mehdi i wsp.*, 2009; *Perrin i wsp.*, 2011; *Le i wsp.*, 2019; *Jakubik-Uljasz i wsp.*, 2020), zwiększoną częstość występowania strukturalnych aberracji chromosomalnych i aneuploidii (*Devillard i wsp.*, 2002; *Templado i wsp.*, 2002; *Martin i wsp.*, 2003; *Machev i wsp.*, 2005; *Brahem i wsp.*, 2011) oraz niedojrzałą chromatynę (*Dadoune i wsp.*, 1988; *Brahm i wsp.*, 2019; *Ma i wsp.*, 2019). Obecność plemników ze zwiniętymi witkami wskazuje na zaburzenie czynności najądrza (*Pelfrey i wsp.*, 1982; *Yeung i wsp.*, 2009). Szczególnym typem zaburzenia budowy plemnika jest obecność nadmiaru resztkowej cytoplazmy, która może świadczyć o nieprawidłowym przebiegu procesu spermiacji (*Cooper*, 2005; *Rengan i wsp.*, 2012).

Dlatego też istotne jest aby, w trakcie prowadzonej analizy, oceniany był oddzielnie każdy z elementów

budowy plemnika (główka, szyjka/wstawka, witka i obecność resztkowej cytoplazmy). W związku z powyższym, rekomenduje się rozszerzenie raportowania oceny morfologii plemników o poniższe parametry:

- odsetek plemników wykazujących zaburzenia w obrębie poszczególnych elementów jego budowy (główki, szyjki/wstawki, witki) i plemników z nadmiarem resztkowej cytoplazmy,
- wskaźnik teratozoospermii (TZI, ang. *teratozoospermia index*).

W obecnym wydaniu podręcznika zamieszczono lepszej jakości mikrofotografie plemników wybarwionych metodą Papanicolaou (z nasienia natywnego) wraz ze szczegółowym opisem ich klasyfikacji (ocena każdego z elementów budowy). Dodatkowo, po raz pierwszy w podręczniku przedstawiono usystematyzowany sposób postępowania przy ocenie pojedynczego plemnika (algorytm), stosowanie którego z pewnością ułatwi wykonanie oceny oraz raportowanie wyników (*Rycina 2*) (*Rothmann i wsp.*, 2013).



Ryc. 2. Algorytm postępowania przy ocenie morfologii plemników ludzkich wg WHO, 2021

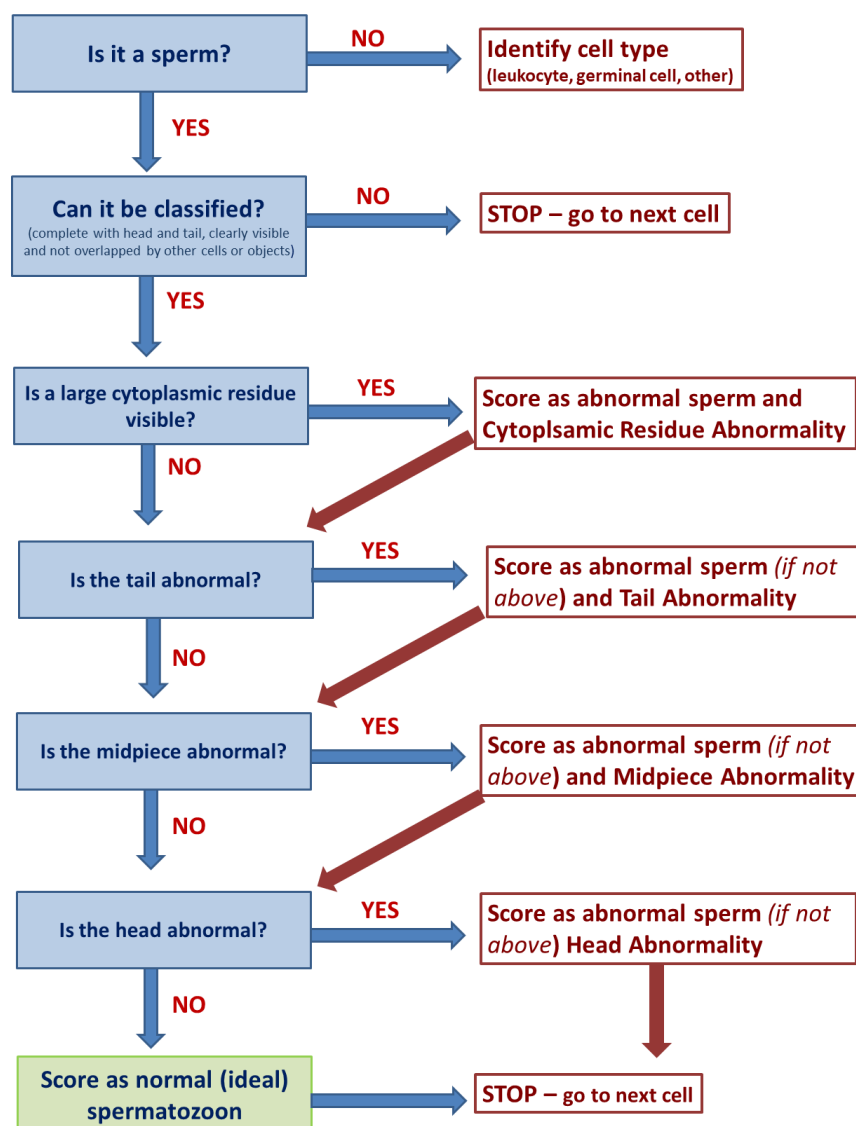


Fig. 2. Algorithm for the assessment of human sperm morphology according to WHO, 2021

Interpretacja wyniku badania – zmiany dotyczące „wartości referencyjnych”

Wartości dolnej granicy referencyjnej dla parametrów badania nasienia (oparte na konsensusie środowiska klinicznego i naukowego) pojawiły się po raz pierwszy w 2. wydaniu podręcznika, następnie z niewielkimi modyfikacjami (przede wszystkim dotyczącymi morfologii plemnika) pojawiały się w jego 3. i 4. wydaniu. Dopiero w 5. wydaniu po raz pierwszy wprowadzono dolne wartości referencyjne opracowane w oparciu o wyniki badań populacyjnych. Wartości te prezentowały 5. centyl rozkładu wyników badania nasienia uzyskanych od ponad 1800 mężczyzn, u których partnerek uzyskano ciążę (w sposób naturalny) w okresie krótszym niż 12 m-cy (mężczyźni płodni) (Cooper i wsp., 2010). Wprowadzenie tych wartości spotkało się z krytyką przede wszystkim w związku z faktem, że wykorzystane w analizie badania pochodziły tylko z kilku regionów świata (Australia, Ameryka Północna, Europa Północna), głównie państw wysoko rozwiniętych. Tak więc brak było badań reprezentujących mężczyzn

z krajów np. Afryki, Azji czy Ameryki Południowej. Przedstawione w 6. edycji podręcznika wartości dla 5. centyla rozkładu wyników badania nasienia mężczyzn płodnych, stanowią kompilację wyników prezentowanych w wydaniu 5., które zostały uzupełnione o wyniki badań kolejnych 1800 mężczyzn, które pojawiły się w artykułach w latach 2010–2020 (Campbell i wsp., 2021). Badania te pochodziły z krajów Europy południowej (Włochy, Grecja), Afryki (Egipt) i Azji (Chiny, Iran). Choć nadal niektóre rejony świata nie są w ogóle reprezentowane w tej analizie (Ameryka Południowa), to jednak zwiększenie analizowanych danych do ponad 3500 stanowi istotny krok naprzód, gdyż zmniejsza potencjalne błędy/ograniczenia przeprowadzonej analizy i zapewnia bardziej „globalną” reprezentację parametrów nasienia. Co istotne wyniki przedstawione w 6. wydaniu podręcznika, po zwiększeniu badanej populacji mężczyzn płodnych, różnią się minimalnie od tych z 5. wydania (Tabela 3).

Najistotniejszą zmianą 6. wydania podręcznika jest rezygnacja z określenia „wartość referencyjna”,

Tabela 3. Wartość 5. centyla dla parametrów nasienia opracowana na podstawie wyników badania nasienia mężczyzn, których partnerki uzyskały ciążę w czasie krótszym niż 12 miesięcy zamieszczone w 5. i 6. edycji podręcznika WHO (WHO, 2010; WHO, 2021)

Parametr nasienia	Wartość odniesienia – 5. centyl (95% przedział ufności)	
	WHO 2010 (5. edycja)	WHO 2021 (6. edycja)
Objętość (mL)	1,5 (1,4–1,7)	1,4 (1,3–1,5)
Koncentracja plemników (mln/mL)	15 (12–16)	16 (15–18)
Całkowita liczba plemników (mln/ ejakulat)	39 (33–46)	39 (35–40)
Ruchliwość plemników (%)		
ruch postępowy (A+B)	32 (31–34)	30 (29–31)
ruch całkowity (A+B+C)	40 (38–42)	42 (40–43)
Żywotność plemników (%)	58 (55–63)	54 (50–56)
Morfologia plemników (%)	4 (3,0–4,0)	4 (3,9–4,0)

Table 3. The value of the 5th percentile for semen parameters based on the results of semen analysis of men whose partners achieved pregnancy in less than 12 months, included in the 5th and 6th editions of the WHO manual (WHO, 2010; WHO, 2021)

Semen parameter	Reference value – 5 th percentile (95% confidence interval)	
	WHO 2010 (5 th edition)	WHO 2021 (6 th edition)
Semen volume (mL)	1.5 (1.4–1.7)	1.4 (1.3–1.5)
Sperm concentration (mln/mL)	15 (12–16)	16 (15–18)
Total sperm number (mln/ ejaculate)	39 (33–46)	39 (35–40)
Sperm motility (%)		
progressive motility (A+B)	32 (31–34)	30 (29–31)
total motility (A+B+C)	40 (38–42)	42 (40–43)
Vitality (%)	58 (55–63)	54 (50–56)
Normal forms (%)	4 (3.0–4.0)	4 (3.9–4.0)

co związane jest z faktem, że wartości 5. centyla rozkładu dla wyników badania nasienia mężczyzn płodnych z poprzedniego wydania podręcznika, były w wielu przypadkach traktowane jako wartości rozgraniczające mężczyzn płodnych od niepłodnych, co stanowi mylne podejście przy interpretacji wyniku. Należy pamiętać, że wyniki badania nasienia uzyskane od mężczyzn płodnych i niepłodnych w dużym zakresie pokrywają się (MacLeod i Gold, 1951; Guzick i wsp., 2001; Boyd, 2010; Björndahl, 2011), co uniemożliwia zastosowanie prostego podziału dychotomicznego, i jednoznaczne określenie wartości granicznych dla tych dwóch populacji mężczyzn. Należy także mieć na uwadze, że poza jakością nasienia na proces zapłodnienia, zarówno naturalny, jak i przy wykorzystaniu technik wspomaganego rozrodu, wpływa wiele różnych czynników m.in. stan zdrowia i płodności partnerki. Autorzy podręcznika podkreślają, że zaprezentowane wartości 5 centyla powinny stanowić tylko wskazówkę (wartość odniesienia) przy interpretacji wyników badania nasienia konkretnego pacjenta.

Uważa się także, że interpretacja wyniku podstawowego badania nasienia powinna być interpretacją multiparametryczną, co wydaje się mieć wyższą wartość prognostyczną w uzyskaniu ciąży u partnerki niż oddzielna interpretacja poszczególnych parametrów (Guzick i wsp., 2001; Jędrzejczak i wsp., 2008; Boyd, 2010; Barratt i wsp., 2017). Jednakże, jak na razie nie ma opracowanych „połączonych” wartości odniesienia dla takiej interpretacji.

Kolejną możliwością interpretacji wyników badania nasienia mogą być tzw. „granice decyzyjne” (ang. *decision limits*). Jak wskazują Autorzy podręcznika, określenie tych wartości może być w przyszłości przydatne w opracowaniu algorytmów dotyczących podejmowania decyzji co do dalszego postępowania diagnostycznego i ewentualnego leczenia w konkretnych klinicznych przypadkach np. przy podejrzeniu zaburzeń endokrynologicznych, genetycznych czy też przy zylakach powrózków nasennych, a także przy podejmowaniu decyzji o wyborze danej procedury rozrodu wspomaganego medycznie.

W świetle powyższych zmian dotyczących rezygnacji z tzw. „wartości referencyjnych” wydaje się, że w obecnej sytuacji przy interpretacji wyniku badania, problematyczne staje się używanie dotychczasowej nomenklatury dotyczącej obniżonych wartości poszczególnych parametrów (tzw. kategorie seminologiczne), czyli oligozoospermia (koncentracja plemników poniżej wartości referencyjnej), asthenozoospermia (odsetek plemników z ruchliwością postępową poniżej wartości referencyjnej), teratozoospermia (odsetek plemników z prawidłową budową poniżej wartości referencyjnej). W obecnej edycji podręcznika Autorzy nie przedstawiają definicji tych terminów, jak to miało miejsce w jego poprzednich edycjach. Tak więc, można wnioskować, że w opisie wyniku powinna znaleźć się tylko informacja, że uzyskany wynik dla danego parametru jest poniżej wartości 5. centyla rozkładu dla wyników badania nasienia mężczyzn płodnych.

Dodatkowe testy seminologiczne

W obecnej edycji podręcznika wprowadzone zostały dwa rozdziały dotyczące dodatkowych testów seminologicznych. W pierwszym z rozdziałów przedstawione są testy stanowiące tzw. rozszerzoną ocenę nasienia (ang. *extended semen evaluation*), a w drugim – zaawansowaną (ang. *advanced semen evaluation*). Zastąpiły one rozdziały z 5. edycji, które prezentowały tzw. opcjonalne i badawcze procedury seminologiczne. W tabeli 4 zaprezentowano testy znajdujące się w aktualnym podręczniku w każdym z wymienionych powyżej rozdziałów. Z niewielkimi wyjątkami, w podręczniku przedstawione

zostały także szczegółowe procedury wykonywania omawianych testów w celu ich standaryzacji oraz wskazówki dotyczące interpretacji uzyskanych wyników. Autorzy podręcznika podkreślają, że obecnie, dla większości przedstawionych testów, nie ma opracowanych wartości referencyjnych. Dlatego też, rekomenduje się aby każde laboratorium opracowało swoje własne wartości referencyjne (zakresy referencyjne) przeprowadzając testy na wystarczająco licznej grupie mężczyzn płodnych.

Rozszerzona ocena nasienia

W rozdziale tym przedstawiono testy, które mogą być wykonywane w określonych sytuacjach w celach

Tabela 4. Dodatkowe testy seminologiczne stanowiące rozszerzoną i zaawansowaną ocenę nasienia (WHO, 2021)

Rozszerzona ocena nasienia	
1. Wskaźniki wielokrotnych defektów plemnika	
– wskaźnik teratozoospermii (TZI)	
– wskaźnik zniekształcenia plemnika (SDI)	
– wskaźnik anomalii wielokrotnych (MAI)	
2. Testy oceniające fragmentację DNA plemników	
– metoda TUNEL (znakowanie końców nacięć nici DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydowej)	
– test dyspersji chromatyny plemnika (SCD)	
– test kometkowy	
– test z oranżem akrydyny przy użyciu cytometru przepływowego	
3. Testy genetyczne i genomowe	
– ocena częstości występowania liczbowych aberracji chromosomowych (aneuploidii) z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> (FISH)	
4. Testy związane z immunologią nasienia	
– ocena leukocytów w nasieniu (barwienie cytochemiczne na obecność peroksydazy; barwienie immunocytochemiczne na obecność antygenu CD45)	
– ocena stężenia interleukin w nasieniu (enzymatyczny test immunosorbentowy – metoda ELISA)	
5. Ocena niedojrzałych komórek plemnikotwórczych	
6. Testy wykrywające przeciwciała przeciwplemnikowe w nasieniu	
– testy bezpośrednie – wykrywające przeciwciała na plemnikach (mieszany test antyglobulinowy – MAR test; test wiązania immunologicznego)	
– test pośredni – wykrywający przeciwciała przeciwplemnikowe płynach ustrojowych np. w płazmie nasienia, surowicy krwi	
7. Analiza biochemiczna plazmy nasienia	
– stężenie cynku	
– stężenie fruktozy	
– aktywność α -glukozydazy obojętnej	
8. Analiza poszczególnych frakcji ejakulatu – ocenie poddaje się:	
– objętość każdej z frakcji	
– liczbę plemników	
– ruchliwość plemników	
– stężenie cynku (markera prostaty) i fruktozy (markera pęcherzyków nasiennych)	
Zaawansowana ocena nasienia	
1. Testy oceniające stres oksydacyjny oraz reaktywnych form tlenu w nasieniu	
– chemiluminescencja (z luminolem)	
– ocena potencjału oksydo-redukcyjnego	
– metoda TEAC – ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia	
2. Testy oceniające status akrosomu oraz jego zdolność do odbicia reakcji akrosomalnej	
3. Testy oceniające status chromatyny plemnika	
– test z błękitem aniliny	
– test z fluorochromem chromomycyną A3	
4. Testy oceniające czynności kanałów jonowych w błonie komórkowej plemnika	
– kanał wapniowy (CatSper)	
– kanał potasowy (Slo3)	
5. Wspomagana komputerowo analiza nasienia (CASA)	
6. Nowe technologie	
– obliczeniowe (rozwój algorytmów)	
– technologiczne (nowe urządzenia lub testy czynnościowe)	

Table 4. Additional seminological tests for extended and advanced semen examination (WHO, 2021)

Extended examination	
1. Indices of multiple sperm defects	– the teratozoospermia index (TZI) – the sperm deformity index (SDI) – the multiple anomalies index (MAI)
2. Assessment of sperm DNA fragmentation	– TUNEL assay – sperm chromatin dispersion test (SCD) – comet assay – acridine orange flow cytometry
3. Genetic and genomic tests	– assessment of frequencies of chromosomal abnormalities (aneuploidies) utilising fluorescent in situ hybridization
4. Tests related to immunology and immunological methods	– assessment of leukocytes in semen (cytochemical staining of cellular peroxidase; panleukocyte – CD45-immunocytochemical staining) – assessment of interleukins in semen (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay)
5. Assessment of immature germ cells in the ejaculate	
6. Testing for antibody coating of spermatozoa	– direct tests – detecting antibodies on spermatozoa (the mixed antiglobulin reaction test-MAR test; the immunobead test) – indirect test – detecting antibodies in sperm-free fluids i.e. serum, seminal plasma (the indirect immunobead test)
7. Biochemical assays for accessory sex gland function	– measurement of zinc – measurement of fructose – measurement of neutral α-glucosidase
8. Assessment of sequence of ejaculation – evaluated are:	– volume – sperm count – sperm motility – zinc (prostatic marker) and fructose (marker for seminal vesicles)
Advanced examination	
1. Seminal oxidative stress and reactive oxygen species testing	– Chemiluminescence (with luminol) – oxidation-reduction potential – TEAC method (trolox equivalent antioxidant capacity)
2. Assessment of the acrosome status and induced acrosome reaction	
3. Assessment of sperm chromatin	– aniline blue assessment – chromomycin A3 assessment
4. Transmembrane ion flux and transport in sperm	– calcium channel (CatSper) – potassium channel (Slo3)
5. Computer-assisted sperm analysis (CASA)	
6. Emerging technologies	– computational advances (algorithmic developments) – technological advances (new devices or functional tests)

diagnostycznych lub badawczych. Co ciekawe, z jednej strony znalazły się tutaj testy, które w poprzednim wydaniu podręcznika znajdowały się w rozdziale „Badanie podstawowe”: czyli ocena leukocytów w nasieniu, ocena niedojrzałych komórek plemnikotwórczych, testy wykrywające obecność przeciwciał przeciwplemnikowych. Z drugiej strony, po raz pierwszy w sposób szczegółowy omówiono testy oceniające fragmentację DNA plemników, co stanowi jedną z najbardziej oczekiwanych zmian tej edycji podręcznika, a także podkreślono znaczenie badań genetycznych i genomowych w diagnostyce zaburzeń męskiej płodności (aberracje

chromosomowe – liczbowe, strukturalne w tym mikrodelecje i mikroduplikacje, czy mutacje genów).

Większość badań genetycznych czy genomowych, w diagnostyce zaburzeń męskiej płodności, wykonywana jest w genetycznych laboratoriach diagnostycznych, przy wykorzystaniu standardowych technik biologii molekularnej. Jedynym testem genetycznym związanym z zaburzeniami płodności u mężczyzn, w którym wykorzystywana metodyka jest unikalna, jest test wykrywający aneuploidie w plemnikach. Zwiększona częstość liczbowych aberracji chromosomowych w plemnikach występuje m.in. u nieplodnych mężczyzn, często przy

niewydolności procesu spermatogenezy objawiających się oligozoospermia lub oligoastenoospermia, także w przypadku zwiększonego poziomu fragmentacji DNA plemników, translokacji (Robertsonowskich i zrównoważonych), czy też u partnerów z par z historią nawracających poronień (często reprezentujących normozoospermie w nasieniu) (*Encisco i wsp., 2013; Godo i wsp., 2015; Ramasamy i wsp., 2015; Kohn i wsp., 2016; Wang i wsp., 2017; Magli i wsp., 2020*). Dlatego też, po raz pierwszy w obecnym podręczniku WHO przedstawiona została szczegółowa procedura testu do oceny częstości występowania liczbowych aberracji chromosomowych techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*).

Ocena fragmentacji DNA plemników, w kontekście jej użyteczności klinicznej, była intensywnie badana przez ponad 20 lat. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że zakres uszkodzeń DNA plemnika ma bezpośrednie przełożenie na rozwój zarodka, jego implantację oraz utrzymanie ciąży zarówno przy koncepcji naturalnej jak i wspomaganej medycznie (*Robinson i wsp., 2012; Cissen i wsp., 2016; Simon i wsp., 2017; Tan i wsp., 2019; Gill i wsp., 2020*). Autorzy obecnej edycji podręcznika podkreślają, że fragmentacja DNA plemników jest jednym z najbardziej dyskutowanych i obiecujących biomarkerów w andrologii podstawowej i klinicznej. Według literatury, przykłady sytuacji, w których testy te mogą dostarczyć istotnych informacji mających wpływ na podejmowanie dalszych decyzji klinicznych obejmują m.in. mężczyźni z żylakami powrózków nasiennych, męską niepłodność idiopatyczną/niewyjaśnioną, mężczyzn ze zwiększonym narażeniem na czynniki ryzyka (czynniki środowiskowe i związane ze stylem życia, zaawansowany wiek ojca), historię nawracających poronień u partnerki, powtarzający się brak powodzenia uzyskania ciąży przy wykorzystaniu metod wspomaganego medycznie rozrodu (*Esteves i wsp., 2021; Minhas i wsp., 2021; Agarwal i wsp., 2022*). W podręczniku zostały szczegółowo opisane najczęściej wykorzystywane metody do oceny fragmentacji DNA plemników: znakowanie końców nacięć nici DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydowej (TUNEL, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*), test dyspersji chromatyny plemnika (SCD, ang. *sperm chromatin dispersion test*), test kometkowy (ang. *comet assay*) oraz test z oranżem akrydyny przy użyciu cytometru przepływowego. To na co należy zwrócić uwagę, to fakt, że testy te różnią się stosowaną metodyką, a także rodzajem wykrywanych uszkodzeń. Test kometkowy i TUNEL są testami bezpośrednimi oceniającymi obecność pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA. Z kolei testy SCD oraz test z oranżem akrydyny z wykorzystaniem cytometru przepływowego, są testami pośrednimi, oceniającymi podatność DNA na denaturację, która zachodzi znacznie łatwiej w pofragmentowanej nici DNA niż w nici prawidłowej. Dlatego też tzw. progi odcięcia będą specyficzne dla każdej z tych metod, a wyniki uzyskane

różnymi metodami nie mogą być traktowane wymiennie. Autorzy podręcznika rekomendują opracowanie przez każde z laboratoriów swoich własnych wartości progowych, w zależności od stosowanego testu i metodyki.

Do innych testów, wprowadzonych po raz pierwszy w obecnej edycji podręcznika w omawianym rozdziale należą: ocena stężenia interleukin w nasieniu jako markera przewlekłych stanów zapalnych męskiego układu płciowego przy wykorzystaniu enzymatycznego testu immunosorbentowego (ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), czy analiza poszczególnych frakcji ejakulatu. Ten ostatni test ma na celu wykrycie nieprawidłowej ekspozycji plemników na wydzielinę z pęcherzyków nasiennych przy równoczesnym ograniczeniu ich ekspozycji na wydzielinę prostaty, co może mieć negatywny wpływ na ich czynność. W prawidłowych warunkach, większość plemników jest wydalana w pierwszej frakcji ejakulatu wraz z wydzieliną prostaty. Kolejne frakcje zdominowane są przez wydzielinę pęcherzyków nasiennych. Ruchliwość plemników, ich przeżywalność jak i stabilizacja chromatyny zależą od ich pierwszego kontaktu z bogatą w cynk wydzieliną prostaty (*Lindholmer, 1973; Björndahl i Kvist, 1990; Kvist i wsp., 1990; Björndahl i wsp., 1991; Björndahl i Kvist, 2003*). Procesy zapalne gruczołu krokowego lub wady wrodzone mogą powodować zwężenie (lub niedrożność) przy lub w pobliżu ujścia przewodów wytryskowych do cewki moczowej (*Turek i wsp., 1996; Beiswanger i wsp., 1998; Nagler i wsp., 2002; Smith i wsp., 2008; Lotti i wsp., 2018*). Skutkiem takiego zwężenia może być ograniczony (opóźniony) przepływ pierwszej frakcji plemników do cewki moczowej, do momentu skurczu pęcherzyków nasiennych i sekrecji ich wydzieliny, z którą mieszają się plemniki.

Zaawansowana ocena nasienia

W rozdziale tym zamieszczone są testy, które zostały sklasyfikowane jako wysoce specjalistyczne lub badawcze. Są to przede wszystkim testy funkcjonalne/czynnościowe, które umożliwiają ocenę zdolności plemników do odbycia serii reakcji/procesów w żeńskich drogach rodnych prowadzących do zapłodnienia komórki jajowej.

Rozdział ten można porównać do rozdziału z 5. edycji podręcznika, w którym zamieszczone były tzw. procedury badawcze. Znaleźć w nim można zarówno uaktualnione wersje testów zamieszczonych w poprzednim podręczniku, jak i testy nowe, które zostały opisane po raz pierwszy. Usunięto także przestarzałe testy weryfikujące interakcje plemnika z komórką jajową (testy wiązania z osłonką przejrzystą oocyty/oocytem, test penetracji oocytów chomika).

Spośród metod, które opisane były w poprzednim podręczniku, w obecnej edycji znalazły się uaktualnione wersje testu oceniającego reaktywne formy tlenu (metoda chemiluminescencji z luminolem) oraz testów oceniających status akrosomu i jego zdolność do odbycia reakcji akrosomalnej. Co ciekawe, w rozdziale tym umieszczono także analizę nasienia wspomaganą komputerowo (CASA,

ang. *computer assisted sperm analysis*), która w poprzedniej wersji znajdowała się w rozdziale „Procedury opcjonalne”. Nowe testy, które pojawiły się w podręczniku to przede wszystkim dodatkowe testy służące ocenie stresu oksydacyjnego nasienia, testy oceniające status chromatyny plemnika (jej dojrzałość) oraz testy oceniające czynności kanałów jonowych w błonie komórkowej plemnika (Tabela 4).

Obecnie, nie ulega wątpliwości, że stres oksydacyjny nasienia jest jedną z głównych przyczyn zaburzeń męskiej płodności (Agarwal i Said, 2005; Aitken, 2020). W wielu stanach klinicznych występuje zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu, np. przy żylakach powrózków nasiennych (Agarwal i wsp., 2006), wnetrostwie (Imamoğlu i wsp., 2012; Avci i wsp., 2019), skręcie jądra (Filho i wsp., 2004), stanach zapalnych w męskim układzie płciowym (Saleh i wsp., 2002), przy chorobach ogólnoustrojowych (np. cukrzyca) (Ramalho-Santos i wsp., 2008), ale także przy czynnikach związanych ze stylem życia (np. palenie papierosów, otyłość) (Fraga i wsp., 1996; Aitken i wsp., 2014; Agarwal i wsp., 2014; Leisegang i wsp., 2021). Konsekwencją zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu są uszkodzenia głównych makromolekuł (białek, lipidów, kwasów nukleinowych), i w konsekwencji upośledzenie funkcji plemnika i ich zdolności do zapłodnienia komórki jajowej (Aitken, 2020; Cicek i wsp., 2021; Garcia-Segura i wsp., 2020). Warto zauważyć, że ocena stresu oksydacyjnego w nasieniu powinna dotyczyć nie tylko ilościowej oceny reaktywnych form tlenu, ale także zdolności antyoksydacyjnej nasienia. Dlatego też w obecnej edycji podręcznika WHO, oprócz oceny poziomu reaktywnych form tlenu metodą chemiluminescencyjną z wykorzystaniem luminolu, dodane zostały testy umożliwiające ocenę całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia (metoda kolorymetryczna, TEAC; ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*), a także potencjału oksydacyjno-redukcyjnego nasienia (z wykorzystaniem systemu MiOXSYS – ang. *male infertility oxidative system*).

Dojrzałość chromatyny plemnika, czyli zastąpienie histonów przez protaminy i odpowiednie „upakowanie” materiału genetycznego, ma kluczowe znaczenie dla procesu zapłodnienia oraz rozwoju i jakości zarodka. Nieprawidłowości w dojrzewaniu chromatyny związane są z większym ryzykiem niepowodzenia uzyskania ciąży m.in. przy wykorzystaniu metod wspomaganego rozrodu (Björndahl i Kvist, 2011; Marchini i wsp., 2017). Testy oceniające status chromatyny plemnika wprowadzone do obecnej edycji podręcznika to test z błękitem aniliny, który jest barwnikiem wiążącym się do histonów oraz test z chromomycyną A3 – fluorochromem wiążącym się do nici DNA w miejscu z odsłoniętymi sekwencjami bogatymi w parę guanina-cytosyna, do których wykazują powinowactwo także protaminy.

Niebagatelne znaczenie dla procesu zapłodnienia i prawidłowego przebiegu poszczególnych jego etapów (aktywny transport plemnika w drogach rodnych kobiety, kapacytacja, hiperaktywacja, reakcja akrosomalna) mają

zmiany wewnątrzkomórkowego pH oraz stężenia jonów wapnia i potencjału błonowego plemnika. W zdarzeniach tych biorą udział przezbłonowe kanały, wymienniki czy transportery jonowe specyficzne dla plemników. Wydaje się, że u podłoża niektórych przypadków niewyjaśnionej dysfunkcji plemników może leżeć nieprawidłowa czynność jednego lub kilku z tych białek. W obecnym podręczniku zostały opisane testy oceniające czynność dwóch kanałów jonowych: CatSper – kanał wapniowy oraz Slo3 – kanał potasowy. Ich nieprawidłowa czynność lub ekspresja w plemnikach związana jest z zaburzeniami płodności u mężczyzn (Ren i wsp., 2001; Smith i wsp., 2013; Kelly i wsp., 2018; Brown i wsp., 2019; Luo i wsp., 2019). Jednak Autorzy podręcznika podkreślają, że obecne metody oceny czynności kanałów jonowych CatSper i Slo3 są zbyt wymagające, aby można je było wdrożyć w laboratorium diagnostycznym. Dlatego potrzebne są nowe łatwe w wykonaniu testy, które je zastąpią.

Opisane powyżej testy są najczęściej wykorzystywane w badaniach naukowych, i jak na razie ich wykorzystanie w diagnostyce męskiej płodności jest ograniczone, przede wszystkim ze względu na brak standaryzacji i walidacji. Także niewystarczająca ilość dobrej jakości badań, co do ich wartości prognostycznych, uniemożliwia opracowanie wartości referencyjnych, i tym samym kliniczną interpretację uzyskanych wyników.

Jeśli chodzi o analizę CASA, to z jednej strony Autorzy podręcznika podkreślają, że system ten nie powinien być, na obecnym etapie rozwoju, wykorzystywany jako narzędzie do rutynowej analizy nasienia. Tym samym, analiza nasienia przy użyciu CASA, nie powinna być rekomendowana jako metoda analizy nasienia równoznaczna z analizą manualną, wykonywaną przez wyszkolonego pracownika laboratorium (Baldi i wsp., 2022). Chodzi tutaj przede wszystkim o ocenę koncentracji plemników, na którą może wpływać jakość próbki, np. duża ilość zanieczyszczeń, tzw. „debris”, które mogą być błędnie zliczane przez system jako nieruchome plemniki, czy też oceny i rozróżnienia plemników aglutynowanych czy zagregowanych (Tomlinson i Naeem, 2018). W takim wypadku, będzie to skutkowało niewiarygodną oceną ruchu plemników. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku innych testów czynnościowych, zwraca się uwagę na brak standaryzacji używanych algorytmów oraz brak ujednoliconych procedur kontroli jakości dla używanych systemów, co utrudnia walidację analizy (Lu i wsp., 2014; Tomlinson i Naeem, 2018; Cupples i wsp., 2021; Mortimer i Mortimer, 2021; Baldi i wsp., 2022). Jednakże z drugiej strony, nie ulega wątpliwości, że przy stosowaniu odpowiednich procedur kontrolnych możliwe jest uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników przez wyszkolony personel, który dokładnie zna zarówno mocne jak i słabe strony systemu. Dlatego też, podkreśla się możliwość wykorzystywania CASA jako narzędzia do dodatkowych analiz, przede wszystkim związanych z kinematyką ruchu (czyli parametrów, których ocena nie jest możliwa dla ludzkiego oka), ale także z oceną morfologii

plemników, w celu zwiększenia obiektywności przeprowadzonej analizy (*Baldi i wsp., 2022*). W 6. edycji podręcznika opisane są zalecenia do wykonywania oceny ruchliwości, hiperaktywacji i morfologii plemników (bez oceny koncentracji), które mogą być przydatne w standaryzacji wykonywanych procedur z użyciem CASA. Należy też zwrócić uwagę, że ciągły rozwój algorytmów używanych w systemach CASA może w przyszłości doprowadzić do usunięcia obecnych ograniczeń systemu.

W podręczniku zwraca się też uwagę na nowe technologie. Rozwój ulepszonych algorytmów obliczeniowych może w przyszłości pozwolić na zliczanie plemników z próbek o bardzo wysokiej koncentracji oraz rozszerzoną analizę ruchu witki, odczyt którego może dostarczyć dodatkowych informacji na temat metabolizmu i biochemicznej sygnalizacji w komórce podczas ruchu (*Goodson i wsp., 2017; Urbano i wsp., 2017; Gallagher i wsp., 2019; Wei i wsp., 2019*). Wspomina się także o możliwości wykorzystania w przyszłości podręcznych urządzeń (np. smartfonów) do oceny nasienia w domu, co przyczynić się może do wcześniejszego zasięgania przez mężczyzn, z suboptymalnymi wynikami analizy, porady medycznej.

Preparatyka nasienia i krioprezervacja

Rozdziały dotyczące zarówno preparatyki nasienia jak i krioprezervacji plemników zostały uaktualnione. Dodatkowo, w obecnej edycji podręcznika w rozdziale dotyczącym preparatyki nasienia, nowością jest dodanie opisu procedury MACS, w celu selekcji plemników o potencjalnie nieuszkodzonym DNA (*Bucar i wsp., 2015*), do wykorzystania do metod wspomaganej rozrodu. Nie do końca jest jasne dlaczego, spośród nowych technik selekcji plemników, akurat ta metoda została wybrana do włączenia do podręcznika. W szczególności, że sami Autorzy cytują wyniki ostatniej analizy Cochrane z roku 2019, w której nie wykazano wyższości MACS względem innych metod selekcji (tj. sortowanie z wykorzystaniem potencjału Zeta; selekcja za pomocą wiązania do kwasu hialuronowego), w zwiększeniu szansy na uzyskanie ciąży lub zmniejszeniu ryzyka wystąpienia poronień (*Lepine i wsp., 2019*).

Z kolei rozdział dotyczący krioprezervacji nasienia, został wzbogacony o opis procedury witrifikacji plemników (zarówno bezpośredniej jak i przy wykorzystaniu słomek), jako „metody obiecującej” w porównaniu z bardziej konwencjonalnymi metodami (*Isachenko i wsp., 2017; Berkovitz i wsp., 2018; Li i wsp., 2019; O'Neill i wsp., 2019; Wang i wsp., 2022*). Jednakże, wg Autorów podręcznika, przy obecnym stanie wiedzy, metoda ta powinna być w dalszym ciągu rozpatrywana jako metoda eksperymentalna.

Kontrola jakości w laboratorium seminologicznym

Rozdział ten został poprawiony i uproszczony, aby także osoby bez rozległej wiedzy statystycznej były w stanie zaimplementować przedstawione tam procedury kontroli jakości w swoim laboratorium. Podobnie

jak w poprzednich podręcznikach, podkreśla się, że każde laboratorium seminologiczne powinno stosować regularnie procedury wewnętrznej kontroli jakości (IQC, ang. *internal quality control*) oraz uczestniczyć w programach kontroli zewnętrznej (EQC, ang. *external quality control*). Warto także zaznaczyć, że w roku 2021, wydana została przez Międzynarodową Organizację Normalizacji (ISO, ang. *International Organization for Standardization*) norma dla badania nasienia (ISO162:2021) w oparciu o procedury zawarte w obecnym podręczniku (*ISO, 2021*). Dokument ten może być przydatny dla laboratoriów seminologicznych ubiegających się o akredytację na podstawowe badanie nasienia.

Podsumowanie

Choć tradycyjnie, podstawowe badanie nasienia pozostaje integralnym elementem wstępnej diagnostyki zaburzeń męskiej płodności, to w podręczniku w wielu miejscach podkreśla się potrzebę wprowadzania dodatkowych testów czynnościowych/ jakościowych do oceny plemników. Wyniki takich testów mogą dostarczyć z jednej strony istotnych informacji na temat potencjału zapładniającego plemników, z drugiej zaś mogą stanowić narzędzie do poszerzenia wiedzy na temat czynności i zaburzeń męskiego układu płciowego, a tym samym zdrowia reprodukcyjnego mężczyzny. Nie ulega wątpliwości, że niezbędna jest standaryzacja procedury badania nasienia oraz dodatkowych testów seminologicznych w laboratoriach na całym świecie. Z jednej strony zaowocuje to wzrostem jakości badań diagnostycznych, a z drugiej – umożliwi międzynarodowym zespołom badawczym uzyskiwanie wysokiej jakości danych, które będą kluczowe dla dalszego rozwoju andrologii (klinicznej i badań podstawowych). Na pewno obecna edycja podręcznika jest cennym instrumentem, który ułatwi te procesy, co przełoży się w przyszłości na lepszą opiekę medyczną nad nieplodną parą.

Piśmiennictwo

- Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho Ch-L, Henkel R., Vij S. i wsp.: Male infertility. *Lancet*. 2021, 397(10271), 319-333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2. PMID: 33308486.
- Agarwal A., Farkouh A., Parekh N., Zini A., Arafa M., Kandil H. i wsp.: Sperm DNA Fragmentation: A Critical Assessment of Clinical Practice Guidelines. *World J Mens Health*. 2022, 40(1), 30-37. doi: 10.5534/wjmh.210056. PMID: 33988000.
- Agarwal A., Majzoub A., Parekh N., Henkel R.: A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health*. 2020, 38(3), 308-322. doi: 10.5534/wjmh.190068. PMID: 31385475.
- Agarwal A., Prabakaran S., Allamaneni S.S.: Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: A meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 2006, 12, 630-633. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61190-x. PMID: 16790111.
- Agarwal A. i Said T.: Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU Int*. 2005, 95, 503-507. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05328.x. PMID: 15705068.

- Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S.: Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014, 32, 1–17. doi: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1. PMID: 24872947.
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R.: A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015, 13, 37. doi:10.1186/s12958-015-0032-1. PMID: 25928197.
- Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De Iuliis G.N.: Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014, 16, 31–38. doi: 10.4103/1008-682X.122203. PMID: 24369131.
- Aitken R.J., Sutton M., Warner P., Richardson D.W.: Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil*. 1985, 73(2), 441–449. doi: 10.1530/jrf.0.0730441. PMID: 3989795.
- Aitken R.J.: Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*. 2020, 159(4), R189–R201. doi: 10.1530/REP-19-0452. PMID: 31846434
- Amaral, S., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos J.: Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr. Diabetes Rev*. 2008, 4, 46–54. doi: 10.2174/157339908783502398. PMID: 18220695.
- Anderson J.E., Farr S.L., Jamieson D.J., Warner L., Macaluso M.: Infertility services reported by men in the United States: national survey data. *Fertil Steril*. 2009; 91: 2466–70. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.022. PMID: 18439586.
- Avci V, Ayengin K, Alp HH. Oxidative DNA Damage and NOX4 Levels in Children with Undescended Testes. *Eur J Pediatr Surg*. 2019 Dec, 29(6), 545–550. doi: 10.1055/s-0039-1692167. PMID: 31167233.
- Baldi E., Gallagher M.T., Krasnyak S., Kirkman-Brown J., Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Extended semen examinations in the sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: contributing to the understanding of the function of the male reproductive system. *Fertil Steril*. 2022, 117(2), 252–257. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.11.034. PMID: 34986981.
- Barratt C.L., Björndahl L., Menkveld R., Mortimer D.: ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: a continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod*. 2011, 26(12), 3207–3212. doi: 10.1093/humrep/der312. PMID: 21965314.
- Barratt C.L., McLeod I.D., Dunphy B.C., Cooke I.D.: Prognostic value of two putative sperm function tests: hypo-osmotic swelling and bovine sperm mucus penetration test (Penetrak). *Hum Reprod*. 1992, 7(9), 1240–4. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137834. PMID: 1479005.
- Barratt C.L.R., Björndahl L., De Jonge C.J., Lamb D.J., Osorio Martini F., McLachlan R. *i wsp.*: The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017, 23(6), 660–80. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00799.x. PMID: 28981651.
- Beiswanger J.C., Deaton J.L., Jarow J.P.: Partial ejaculatory duct obstruction causing early demise of sperm. *Urology*. 1998, 51(1), 125–7. doi: 10.1016/s0090-4295(97)00478-0. PMID: 9457305.
- Berkovitz A., Miller N., Silberman M., Belenky M., Itsykson P.: A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. *Hum Reprod*. 2018;33(11):1975–83. doi: 10.1111/andr.12414. PMID: 30285105.
- Björndahl L. *i* Kvist U. A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Syst Biol Reprod Med*. 2011, 57(1–2), 86–92. doi: 10.3109/19396368.2010.516306. PMID: 21204594.
- Björndahl L. *i* Kvist U.: Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int J Androl*. 1990, 13(3), 232–7. doi: 10.1111/j.1365-2605.1990.tb00981.x. PMID: 2387643.
- Björndahl L. *i* Kvist U.: Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(4):440–8. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61888-3. PMID: 14656406.
- Björndahl L., Kjellberg S., Kvist U.: Ejaculatory sequence in men with low sperm chromatin-zinc. *Int J Androl*. 1991, 14(3), 174–8. doi: 10.1111/j.1365-2605.1991.tb01079.x. PMID: 2066163.
- Björndahl L., Söderlund I., Kvist U.: Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*. 2003, 18(4), 813–6. doi: 10.1093/humrep/deg199. PMID: 12660276.
- Björndahl L.: The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl*. 2010, 12(1), 33–5. doi: 10.1038/aja.2008.50. PMID: 20111079.
- Björndahl L.: What is normal semen quality? On the use and abuse of reference limits for the interpretation of semen analysis results. *Hum Fertil (Camb)*. 2011, 14(3), 179–86. doi: 10.3109/14647273.2011.580823. PMID: 21770820.
- Bollendorf A., Check J.H., Lurie D.: Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization. *J Androl*. 1996, 17(5), 550–7. PMID: 8957699. PMID: 8957699.
- Borges E. Jr, Setti A.S., Braga D.P., Figueira R.C., Iaconelli A. Jr.: Total motile sperm count has a superior predictive value over the WHO 2010 cut-off values for the outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Andrology* 2016, 4, 880–886. doi: 10.1111/andr.12199. PMID: 27152971.
- Borges E. Jr.: Total motile sperm count: a better way to rate the severity of male factor infertility? *JBRA Assist Reprod* 2016;2:47–48. doi: 10.5935/1518-0557.20160012. PMID: 27244760.
- Boyd J.C.: Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl*. 2010, 12(1), 83–90. doi: 10.1038/aja.2009.9. PMID: 20111086.
- Braham A., Ghedir H., Zidi I., Sallem A., Hajlaoui A., Ajina M. *i wsp.*: Nuclear sperm quality in total polymorphic teratozoospermia and its impact on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia*. 2019, 51(5), e13252. doi: 10.1111/and.13252. PMID: 30821000.
- Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A.: Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2011, 28(1), 41–8. doi: 10.1007/s10815-010-9482-8. PMID: 20872065.
- Brown S.G., Publicover S.J., Barratt C.L.R., Martins da Silva S.J.: Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update*. 2019, 25(6), 758–76. doi: 10.1093/humupd/dmz032. PMID: 31665287.
- Bucar S., Goncalves A., Rocha E., Barros A., Sousa M., Sa R.: DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet*. 2015, 32(1), 147–54. doi: 10.1007/s10815-014-0370-5. PMID: 25374393.
- Campbell M.J., Lotti F., Baldi E., Schlatt S., Festin M.P.R., Björndahl L. *i wsp.*: Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collected for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021, 9(3), 817–822. doi: 10.1111/andr.12983. PMID: 33528873.
- Cicek O.S.Y., Kaya G., Alyuruk B., Doger E., Girisen T., Filiz S.: The association of seminal oxidation reduction potential with sperm parameters in patients with unexplained and male factor infertility. *Int Braz J Urol*. 2021, 47(1), 112–119. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2019.0751. PMID: 33047916.
- Cissen M., Wely M.V., Scholten I., Mansell S., Bruin J.P., Mol B.W. *i wsp.*: Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165125. PMID: 27832085.
- Comhaire F.H., Vermeulen L., Hinting A., Schoonjans F.: Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1988, 5(6), 326–331. doi: 10.1007/BF01129567. PMID: 3221124.
- Cooper T.G. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod*. 2005, 20(1), 9–11. doi: 10.1093/humrep/deh555. PMID: 15471925.
- Cooper T.G., Hellenkemper B., Jonckheere J., Callewaert N., Grootenhuys A.J., Kersemaekers W.M. *i wsp.*: Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *Androl*. 2006, 27(4), 483–90. doi: 10.2164/jandrol.05210. PMID: 16598028.
- Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S., Auger J., Baker H.W.G., Behre H.M. *i wsp.*: World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010, 16(3), 231–245. doi: 10.1093/humupd/dmp048. PMID: 19934213.
- Cooper T.G. *i* Yeung C.H.: Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril*. 2006, 85, 220–224. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.07.1286. PMID: 16412757.

- Cooper T.G., Brazil Ch., Swan S.H., Overstreet J.W.: Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl*. 2007, 28(1), 1-4. doi: 10.2164/jandrol.106.001297. PMID: 16957135.
- Cupples G., Gallagher M.T., Smith D.J., Kirkman-Brown J.C.: Heads and Tails: Requirements for Informative and Robust Computational Measures of Sperm Motility. W: XIIIth International Symposium on Spermatology. Red. L. Björndahl, J. Flanagan, R. Holmberg, U. Kvist. Springer, Cham 2021, 135-150. doi:10.1007/978-3-030-66292-9_21
- Dadoune J.P., Mayaux M.J., Guihard-Moscato M.L.: Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 1988, 20(3), 211-7. doi: 10.1007/s10815-010-9482-8. PMID: 3177899.
- Devillard F., Metzler-Guillemain C., Pelletier R., DeRobertis C., Bergues U., Hennebicq S. i wsp.: Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod*. 2002;17(5):1292-8. doi: 10.1093/humrep/17.5.1292. PMID: 11980754.
- Eliasson R.: Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl*. 2010, 12(1), 26-32. doi: 10.1038/aja.2008.58. PMID: 20111078.
- Enciso M., Alfaraewati S., Wells D.: Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod*. 2013, 28(6), 1707-15. doi: 10.1093/humrep/det077. PMID: 23526303.
- Esteves S.C., Zini A., Coward R.M., Evenson D.P., Gosálvez J., Lewis S.E.M. i wsp.: Sperm DNA fragmentation testing: summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*. 2021, 53, e13874. doi: 10.1111/and.13874. PMID: 33108829.
- Filho D.W., Torres M.A., Bordin A.L., Crezcynski-Pasa T.B., Boveris A.: Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med*. 2004, 25, 199-210. doi: 10.1016/j.mam.2004.02.020. PMID: 15051328
- Fraga C.G., Motchnik P.A., Wyrobek A.J., Rempel D.M., Ames B.N.: Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *MutatRes*. 1996, 351, 199-203. doi: 10.1016/0027-5107(95)00251-0. PMID: 8622715.
- Franken D.R., Barendsen R., Kruger T.F.: A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril*. 2000, 74(4), 721-4. doi: 10.1016/s0015-0282(00)01498-9. PMID: 11020513.
- Gallagher M.T., Cupples G., Ooi E.H., Kirkman-Brown J.C., Smith D.J.: Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Hum Reprod*. 2019, 34(7), 1173-85. doi: 10.1093/humrep/dez056. PMID: 31170729.
- Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C. i wsp.: Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000, 15(4), 830-9. doi: 10.1093/humrep/15.4.830. PMID: 10739828.
- Garcia-Segura S., Ribas-Maynou J., Lara-Cerrillo S., Garcia-Peiró A., Castel A., Benet J. i wsp.: Relationship of seminal oxidation-reduction potential with sperm DNA integrity and pH in idiopathic infertile patients. *Biology* 2020, 9, 262. doi: 10.3390/biology9090262. PMID: 32882928.
- Gill K., Machałowski T., Piasecka K., Harasny P., Piasecka M.: Wpływ statusu chromatyny plemników ludzkich na wyniki rozrodu w warunkach in vitro/ The influence of human sperm chromatin status on in vitro fertilization outcome. *Post Androl Online*. 2020, 7(2), 6-25. doi: 10.26404/PAO_2353-8791.2020.04. Dostępny w: <http://www.postepyandrologii.pl>
- Godo A., Blanco J., Vidal F., Sandalinas M., Garcia-Guixé E., Anton E.: Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online*. 2015, 31(1), 79-88. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.04.003. PMID: 25985997.
- Goodson S.G., White S., Stevens A.M., Bhat S., Kao C.Y., Jaworski S. i wsp.: CASanova: a multiclass support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biol Reprod*. 2017;97(5):698-708. doi: 10.1093/biolre/iox120. PMID: 29036474.
- Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C. i wsp.: Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001, 345(19), 1388-93. doi: 10.1056/NEJMoa003005. PMID: 11794171.
- Hamilton J.A., Cissen M., Brandes M., Smeenk J.M., de Bruin J.P., Kremer J.A. i wsp.: Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod* 2015, 30, 1110-1121. doi: 10.1093/humrep/dev058. PMID: 25788568.
- Imamoglu M., Bülbül S.S., Kaklıkkaya N., Sarihan H.: Oxidative, inflammatory and immunologic status in children with undescended testes. *Pediatr Int*. 2012, 54(6), 816-9. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03695.x. PMID: 22783848.
- Inhorn M.C. i Patrizio P.: Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*. 2015, 21, 4, 411-426. doi: 10.1093/humupd/dmv016. PMID: 25801630.
- International Standards Organization. ISO 23162:2021 Basic semen examination— Specification and test methods. Geneva: ISO; 2021. <https://www.iso.org/standard/74800.html>, data wejścia 28.07.2022
- Irvine D.S. i Aitken R.J.: Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service. *Hum Reprod*. 1986, 1(8), 539-45. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136470. PMID: 3818912.
- Isachenko V., Rahimi G., Mallmann P., Sanchez R., Isachenko E.: Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*. 2017;5(6):1055-63. PMID: 28992376.
- Jakubik-Uljasz J., Gill K., Rosiak-Gill A., Piasecka M.: Relationship between sperm morphology and sperm DNA dispersion. *Transl Androl Urol*. 2020, 9(2), 405-415. doi: 10.21037/tau.2020.01.31. PMID: 32420146.
- Janicka A., Spaczyński R., Kurzawa R., SPiN PTG, Fertility Clinics.: Assisted reproductive medicine in Poland – Fertility and Sterility Special Interest Group of the Polish Gynaecological Society (SPiN PTG) 2012 report. *Polish Gynaecology*. 2015, 86, 12, 932-939. doi: 10.17772/gp/60549. PMID: 26995944.
- Jedrzejczak P., Taszarek-Hauke G., Hauke J., Pawelczyk L., Duleba A.J.: Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl*. 2008, 31(5), 499-507. PMID: 17651398.
- Keihani S., Verrilli L.E., Zhang Ch., Presson A.P., Hanson H.A., Pastuszak A.W. i wsp.: Semen parameter thresholds and time-to-conception in sub-fertile couples: how high is high enough? *Hum Reprod*. 2021, 36(8), 2121-2133. doi: 10.1093/humrep/deab133. PMID: 34097024.
- Kelly M.C., Brown S.G., Costello S.M., Ramalingam M., Drew E., Publicover S.J. i wsp.: Single-cell analysis of [Ca²⁺]_i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum Reprod*. 2018, 33(6), 1023-33. doi: 10.1093/humrep/dey096. PMID: 29697805.
- Kohn, T.P., Kohn, J.R., Darilek, S., Ramasamy, R., Lipshultz, L.: Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J. Assist. Reprod Genet*. 2016, 33, 571-576. doi: 10.1007/s10815-016-0702-8. PMID: 27020275.
- Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F., Oehninger S.: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1988, 49(1), 112-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59660-5. PMID: 3335257.
- Kvist U., Kjellberg S., Björndahl L., Soufir J.C., Arver S.: Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl*. 1990;13(4):245-52. doi: 10.1111/j.1365-2605.1990.tb01028.x. PMID: 2387645.
- Le M.T., Nguyen T.A.T., Nguyen H.T.T., Nguyen T.T.T., Nguyen V.T., Le D.D. i wsp.: Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol*. 2019;3;18(4), 390-396. doi: 10.1002/rmb2.12297. PMID: 31607800.
- Leisegang K., Sengupta P., Agarwal A., Henkel, R.: Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrology* 2021, 53, e13617. doi: 10.1111/and.13617. PMID: 32399992.
- Lepine S., McDowell S., Searle L.M., Kroon B., Glujovsky D., Yazdani A.: Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019, 7(7), CD010461. doi: 10.1002/14651858.CD010461.pub3. PMID: 31425620.
- Li Y.X., Zhou L., Lv M.Q., Ge P., Liu Y.C., Zhou D.X.: Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.11.028. PMID: 30580229.

- Lindholmer C. Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculate. *Fertil Steril*. 1973;24(7):521-6. doi: org/10.1016/S0015-0282(16)39792-8. PMID: 4715227.
- Lotti F., Corona G., Cocci A., Cipriani S., Baldi E., Degl'Innocenti S. *i wsp.*: The prevalence of midline prostatic cysts and the relationship between cyst size and semen parameters among infertile and fertile men. *Hum Reprod*. 2018, 33(11), 2023-34. doi: 10.1093/humrep/dey298. PMID: 30285122.
- Lu J.C., Huang Y.F., Lu N.Q.: Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 2014;46(4):329-38. doi: 10.1111/and.12093. PMID: 23550608.
- Luo T., Chen H.Y., Zou Q.X., Wang T., Cheng Y.M., Wang H.F. *i wsp.*: A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod*. 2019;34(3):414-23. doi: 10.1093/humrep/dey377. PMID: 30629171.
- Ma Y., Xie N., Li Y., Zhang B., Xie D., Zhang W. *i wsp.*: Teratozoospermia with amorphous sperm head associate with abnormal chromatin condensation in a Chinese family. *Syst Biol Reprod Med*. 2019, 65(1), 61-70. doi: 10.1080/19396368.2018.1543481. PMID: 30452285.
- Machev N., Gosset P., Viville S.: Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet Genome Res*. 2005, 111(3-4), 352-7. doi: 10.1159/000086910. PMID: 16192715.
- MacLeod J. *i Gold R.Z.*: The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *The Journal of urology*. 1951, 66(3), 436-49. doi: 10.1016/j.juro.2016.10.077. PMID: 14861973.
- Madbouly K., Isa A., Habous M., Almanni R., Abu-Rafea B., Binsaleh S.: Postwash total motile sperm count: should it be included as a standard male infertility work up. *Can J Urol* 2017, 3, 8847-8852. doi: 10.1111/andr.12199. PMID: 28646941.
- Magli, M.C., Crippa, A., Benincasa, M., Terzuoli, G., Azzena, S., Maresca, L. *i wsp.*: Sperm chromosome abnormalities in patients with normal karyotype and in translocation carriers: Clinical relevance for assisted reproductive technology. *Reprod. Biomed. Online*. 2020, 41, 1055-1069. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.08.005. PMID: 33032906.
- Marchiani S., Tamburrino L., Benini F., Fanfani L., Dolce R., Rastrelli G. *i wsp.*: Chromatin protamination and CatSper expression in spermatozoa predict clinical outcomes after assisted reproduction programs. *Sci Rep*. 2017, 7(1), 15122. doi: 10.1038/s41598-017-15351-3. PMID: 29123209.
- Martin R.H., Rademaker A.W., Greene C., Ko E., Hoang T., Barclay L. *i wsp.*: A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod*. 2003;69(2):535-9. doi: 10.1095/biolreprod.102.015149. PMID: 12724277.
- Mehdi M., Khantouche L., Ajina M., Saad A.: Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia*. 2009, 41(6), 383-6. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00953.x. PMID: 19891637.
- Menkveld R., El-Garem Y., Schill W.B., Henkel R.: Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet*. 2003, 20(10), 432-8. doi: 10.1093/humrep/deac102. PMID: 14649383.
- Menkveld R., Stander F.S., Kotze T.J., Kruger T.F., van Zyl J.A.: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*. 1990, 5(5), 586-92. doi: 10.1093/oxford-journals.humrep.a137150. PMID: 2394790.
- Minhas S., Bettocchi C., Boeri L., Capogrosso P., Carvalho J., Cilesiz N.C. *i wsp.*: European Association of Urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility. *Eur. Urol*. 80, 603-620 (2021). doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014. PMID: 34511305.
- Mortimer D. *i Mortimer S.T.*: Routine Application of CASA in human clinical andrology and ART laboratories. W: XIIIth International Symposium on Spermatology. Red. L. Björndahl, J. Flanagan, R. Holmberg, U. Kvist. Springer, Cham 2021, 183-197. doi.org/10.1007/978-3-030-66292-9_26.
- Mortimer D., Pandya I.J., Sawers R.S.: Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986, 78(1), 93-102. doi: 10.1530/jrf.0.0780093. PMID: 3761279.
- Nagler H.M., Rotman M., Zoltan E., Fisch H.: The natural history of partial ejaculatory duct obstruction. *J Urol*. 2002;167(1):253-4. PMID: 11743325.
- O'Neill H.C., Nikoloska M., Ho H., Doshi A., Maalouf W.: Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet*. 2019, 36(8), 1713-1720. doi: 10.1007/s10815-019-01505-x. PMID: 31273587.
- Paoli D., Pallotti F., Lenzi A., Lombardo F. Sperm motility evaluation according to WHO VI edition: moving forward turning back? *J Endocrinol Invest*. 2022, 45(3), 675-677. doi: 10.1007/s40618-021-01684-4. PMID: 34585362.
- Paoli D., Gallo M., Rizzo F., Baldi E., Francavilla S., Lenzi A. *i wsp.*: Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril*. 2011, 95, 7, 2315-2319. doi: org/ 10. 1016/j. fertn stert. 2011.03. 059. PMID: 21507394.
- Pelfrey R.J., Overstreet J.W., Lewis E.L.: Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertil Steril*. 1982, 38(1), 112-4. doi: 10.1016/s0015-0282(16)46407-1. PMID: 7095158.
- Perrin A., Louanjli N., Ziane Y., Louanjli T., Le Roy C., Gueganic N. *i wsp.*: Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia *Reprod Biomed Online*. 2011, 22(2), 148-54. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.10.006. PMID: 21233018.
- Ramasamy R., Scovell J.M., Kovac J.R., Cook P.J., Lamb D.J., Lipshultz L.I.: Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2015;103(4):906-9 e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.029. PMID: 25707335.
- Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q. *i wsp.*: A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 2001, 413(6856), 603-9. doi: 10.1038/35098027. PMID: 11595941.
- Rengan A.K., Agarwal A., van der Linde M., du Plessis S.S.: An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012, 10, 92. doi: 10.1186/1477-7827-10-92. PMID: 23159014.
- Robinson L., Gallos I.D., Conner S.J., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S. *i wsp.*: The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012, 27(10), 2908-17. Doi: 10.1093/humrep/des261. PMID: 22791753.
- Rothmann S.A., Bort A.M., Quigley J., Pillow R.: Sperm morphology classification: a rational method for schemes adopted by the world health organization. *Methods Mol Biol*. 2013, 927, 27-37. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_4. PMID: 22992901.
- Saleh R., Agarwal A., Kandirali E., Sharma R., Thomas A.J., Nada E. *i wsp.*: Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril*. 2002, 78, 1215-1224. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04237-1. PMID: 12477515.
- Sifer C., Sasportes T., Barraud V., Poncelet C., Rudant J., Porcher R. *i wsp.*: World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Hum Reprod*. 2005, 20(10), 2769-75. PMID: 15958402.
- Simon L., Zini A., Dyachenko A., Ciampi A., Carrell D.T.: A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017, 19(1), 80-90. doi: 10.4103/1008-682X.182822. PMID: 27345006.
- Smith J.F., Syritsyna O., Fellous M., Serres C., Mannowetz N., Kirichok Y. *i wsp.*: Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca²⁺ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(17):6823-8. doi: 10.1073/pnas.1216588110. PMID: 23530196.
- Smith J.F., Walsh T.J., Turek P.J.: Ejaculatory duct obstruction. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):221-7, viii. doi: 10.1016/j.ucl.2008.01.011. PMID: 18423242.
- Sun H., Gong T.T., Jiang Y.T., Zhang S., Zhao Y.H., Wu Q.J.: Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a Global Burden of Disease Study, 2017. *Aging (Albany NY)*. 2019, 11, 10952-91. doi: 10.18632/aging.102497. PMID: 31790362.
- Tan J., Taskin O., Albert A., Bedaiwy M.A.: Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2019, 38(6), 951-60. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.029. PMID: 30979611.
- Templado C., Hoang T., Greene C., Rademaker A., Chernos J., Martin R.: Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol Reprod Dev*. 2002, 61(2), 200-4. doi: 10.1002/mrd.1148. PMID: 11803555.

- Thonneau P., Marchand S., Tallec A., Ferial M.L., Ducot B., Lansac J. i wsp.: Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod.* 1991, 6, 811–16. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433. PMID: 1757519.
- Tomlinson M.J., Naeem A.: CASA in the medical laboratory: CASA in diagnostic andrology and assisted conception. *Reprod Fertil Dev* 2018, 30, 850–9. doi: 10.1071/RD17520. PMID: 29559071.
- Turek P.J., Magana J.O., Lipshultz L.I.: Semen parameters before and after transurethral surgery for ejaculatory duct obstruction. *J Urol.* 1996, 155(4), 1291–3. PMID: 8632556. PMID: 8632556.
- Urbano L.F., Masson P., VerMilyea M., Kam M.: Automatic Tracking and Motility Analysis of Human Sperm in Time-Lapse Images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2017, 36(3), 792–801. doi: 10.1109/TMI.2016.2630720. PMID: 27875219.
- Van den Bergh M., Emiliani S., Biramane J., Vannin A.S., Englert Y.: A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998, 13(11), 3103–7. doi: 10.1093/humrep/13.11.3103. PMID: 9853865.
- Vander Borgh M., Wyns C.: Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018, 62, 2–10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. PMID: 29555319.
- Wang B., Nie B., Tang, D., Li R., Liu X. Song, J. i wsp.: Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. *Balkan J Med Genet* 2017;20(1):43–50. doi: 10.1515/bjmg-2017-0003. PMID: 28924540.
- Wang M., Todorov P., Wang W., Isachenko E., Rahimi G., Mallmann P. i wsp.: Cryoprotectants-Free Vitrification and Conventional Freezing of Human Spermatozoa: A Comparative Transcript Profiling. *Int J Mol Sci.* 2022, 23(6):3047. doi: 10.3390/ijms23063047. PMID: 35328464.
- Wei S.Y., Chao H.H., Huang H.P., Hsu C.F., Li S.H., Hsu L.: A collective tracking method for preliminary sperm analysis. *Biomed Eng Online.* 2019, 18(1), 112. Doi: 10.1186/s12938-019-0732-4. PMID: 31775764.
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Singapore: Press Concern; 1980
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1987
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1992
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2021
- Yeung C.H., Tüttelmann F., Bergmann M., Nordhoff V., Vorona E., Cooper T.G.: Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum Reprod.* 2009, 24(6), 1288–95. doi: 10.1093/humrep/dep017. PMID: 19221095.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S., Racowsky C., De Mouzon J., Sokol R. i wsp.: The international glossary on infertility and fertility care. *Fertil Steril.* 2017, 108, 393–406. doi: 10.1093/humrep/dex234. PMID: 29117321.
- Zollner U., Schleyer M., Steck T.: Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 1996, 11(10), 2155–61. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019068. PMID: 8943521.