

Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

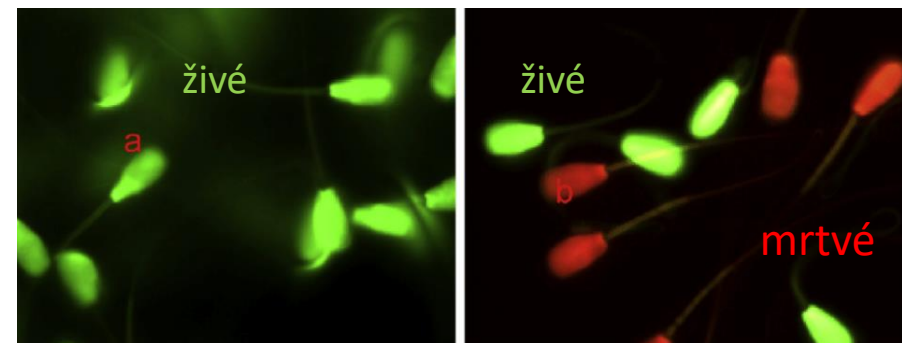
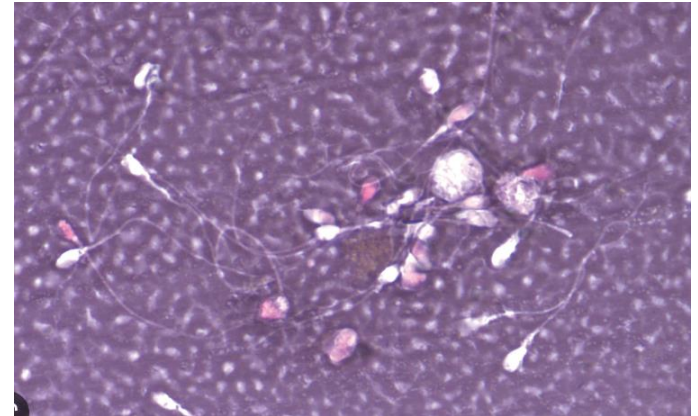
28.3.2023

Testy funkčních vlastností spermií

- Pouhé vyšetření spermiogramu mnohdy není dostatečné pro posouzení plodnosti muže
- I přes velký posun v technikách IVF je nárůst PR a IR nízký
- Bylo vyvinuto mnoho funkčních testů zaměřujících se na různé funkční vlastnosti spermií nebo procesy spojené s fertilizací
 - spermií musí být dostatečný počet a i jejich funkční kvalita musí být dostatečná (kvalita membrán, funkce akrozomu, funkce mitochondrií, vhodně kondenzovaná a intaktní DNA)
 - spermie musí dostávat patřičné živiny ze semenné plasmy
 - spermie musí být chráněny před účinkem RMK
- Volba metody oplození
- Ideální test funkce spermií by specifikoval chybnou funkci spermie, předpověděl úspěšnost léčby a indikoval patřičný postup léčby

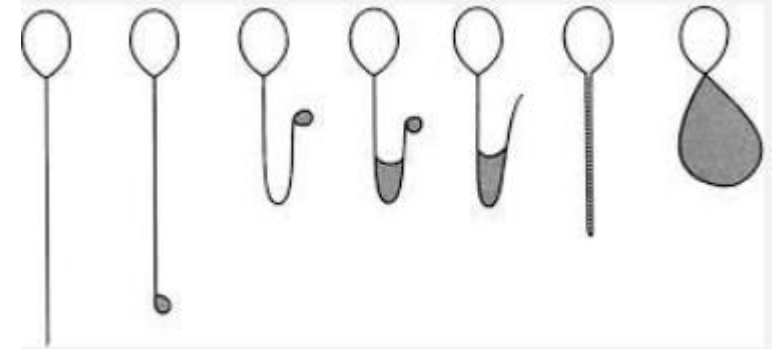
Vitalita spermií

- Integrita membrány -membrána živé buňky nepropustí barvivo
- Eosin – v kombinaci s nigrosinem (podbarvení)
- Roztěr, světelná mikroskopie
- Propidium Iodide (často v kombinaci se SYBR green)
- Suspenze, fluorescenční mikroskopie



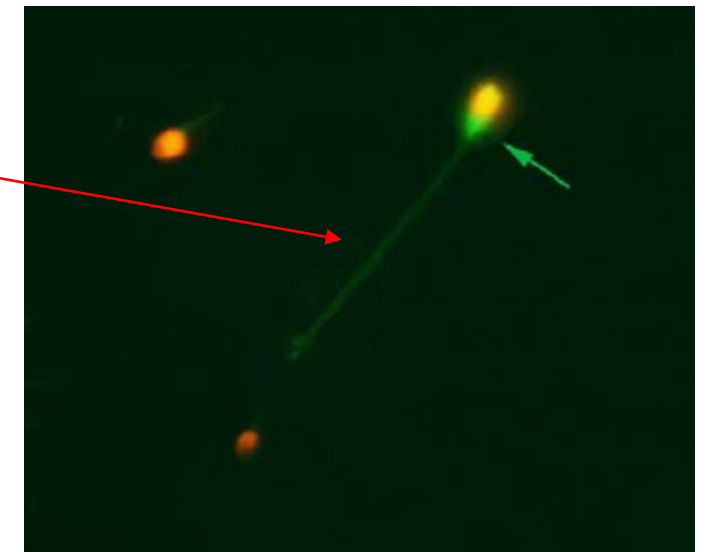
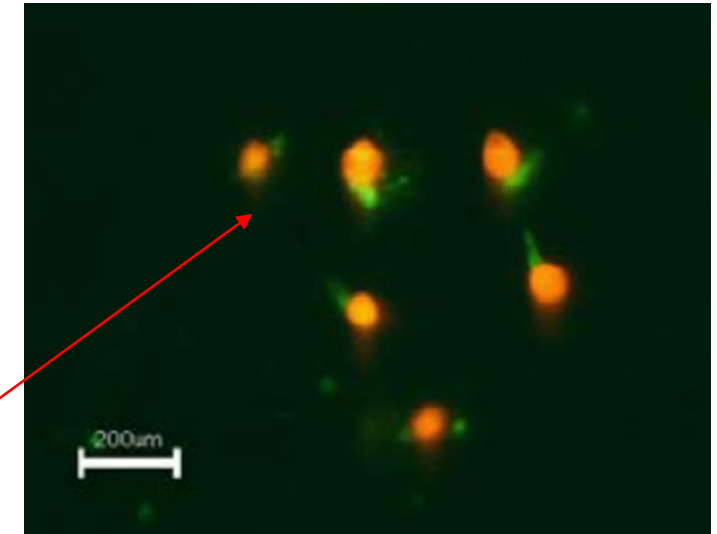
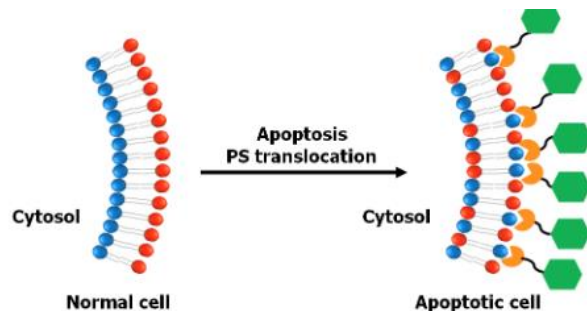
Hypoosmotic swelling test (HOS)

- Integrita membrán spermií
- Transport tekutiny přes intaktní membránu probíhá v hypoosmotickém prostředí dokud není dosaženo rovnováhy
- Buňka se roztáhne
- Změny lze pozorovat na bičíku (svinutí) ve světelném mikroskopu
- Buňky s poškozenou membránou nereagují
- Dříve využití i v klinické praxi, dnes neexistuje certifikované hypoosmotické médium



AnexinV binding assay

- Detekce časných apoptických změn (přesun fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu membrány)
- Annexin V, propidium iodid
- Živé spermie (annexin V-negativní and PI-negativní);
- **Mrtvé spermie –pozdně apoptické, nekrotické**(annexin V-pozitivní and PI-pozitivní);
- Buňky se zhoršenou integritou membrány –**časně apoptické** (annexin V-pozitivní and PI-negativní)
- Průtokový cytometr/ fluorescenční mikroskop

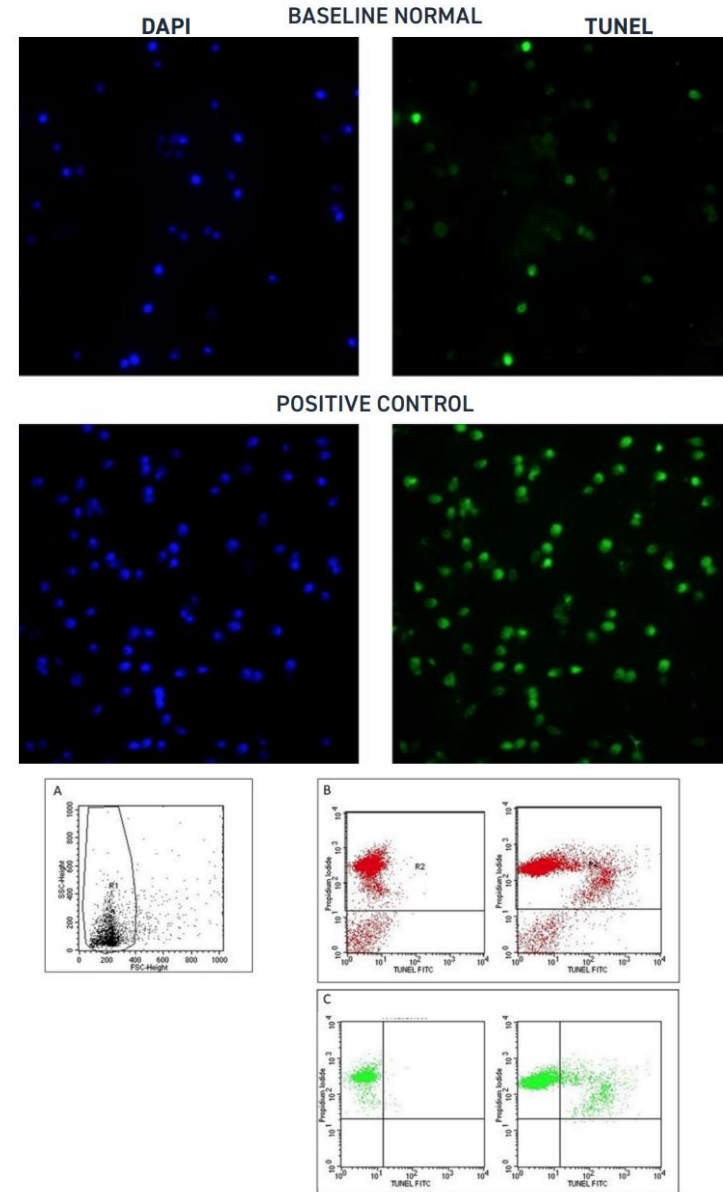


Fragmentace DNA spermií

- Porušení integrity DNA spermií – nejčastěji jedno nebo dvojřetězcové zlomy
- Chybná kondenzace DNA během vývoje spermií, apoptóza, oxidační stres
- Schopnost spermie fertilizovat oocyt zůstává nenarušena!
- Negativní vliv na vývoj embryí, implantaci nebo průběh těhotenství in vivo i in vitro
- Jedno z nejpoužívanějších doplňkových vyšetření
 - TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase nick and labelling)
 - Comet assay (Single cell gel electrophoresis)
 - SCSA (Sperm chromatine structure assay)
 - SCD Sperm chromatine disperion test

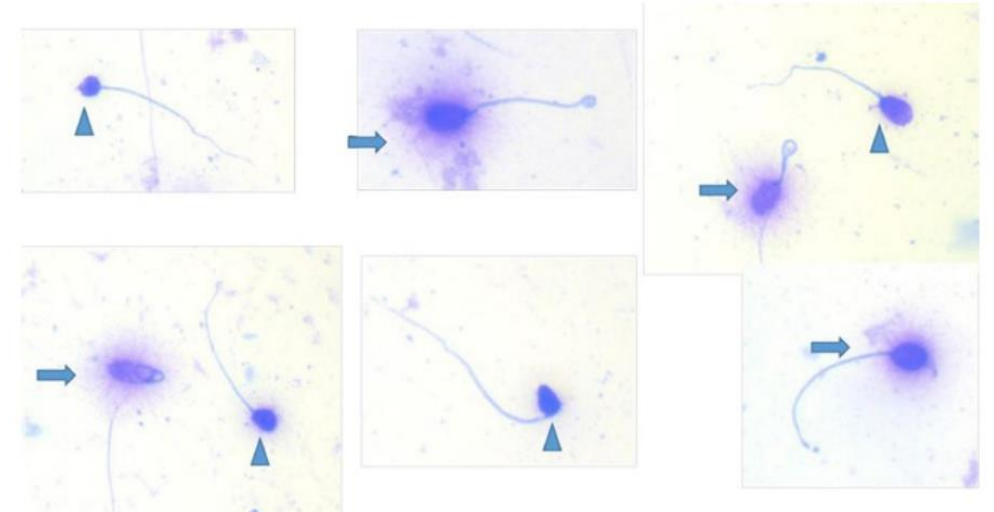
Tunel test

- detekce zlomů řetězce DNA in situ označením fluorochromy nebo sondami s biotinem (následná konjugace se streptavidinem-HRP (*křenová peroxidáza*) a chromogenním substrátem HRP)
- Principem je značení zlomů v DNA s deoxynukleotidy (obvykle dUTP, deoxyuridinfosfát), ten je přímo značen fluorescenčním barvivem nebo značen biotinem
- 3'-OH konce zlomů slouží jako primery, jsou značeny bromodeoxyuridinem (Brd-U) v reakci katalyzované terminální deoxynukleotidyl transferázou (TDT, DNA polymeráza nezávislá na templátu)
- Komerční kity
- Průtokový cytometr, fluorescenční mikroskop



Sperm chromatine dispersion test

- Světelná mikroskopie-možnost provést v andrologické laboratoři
- Hodnotí se náchylnost DNA spermií ke kyselé denaturaci
- **Expanze smyček DNA** následující po denaturaci a extrakci jaderných proteinů v **případě intaktní DNA**
- V případě fragmentované DNA je tato expanze minimální nebo žádná
- Kolem hlaviček s intaktní DNA spermií se po expozici kyselému a následně lyzačnímu roztoku v agaru tvoří tzv. **halo** – svatozáře (odpovídají smyčkám relaxované DNA připojeným ke zbytkovým jaderným strukturám a uvolněným po odnětí jaderných proteinů)

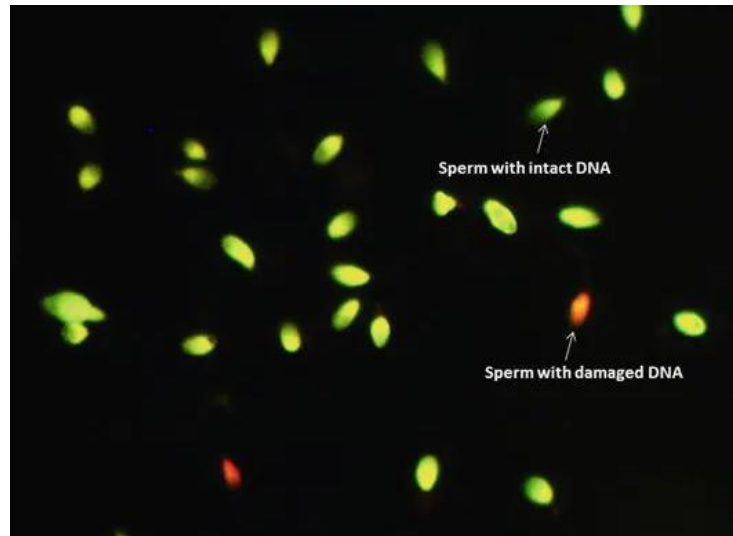


Komerčně dostupný, snadno proveditelný test –Halosperm nebo Gold Cyto



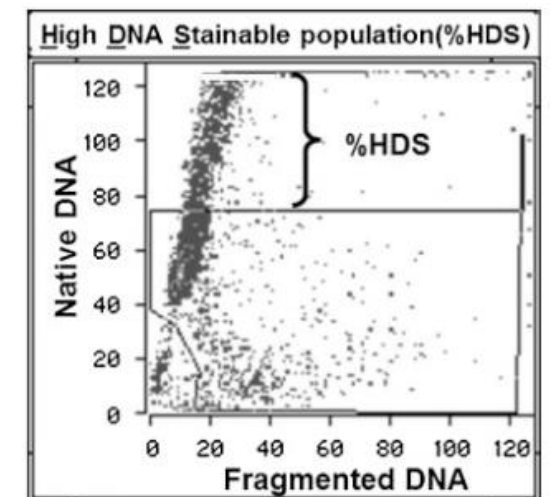
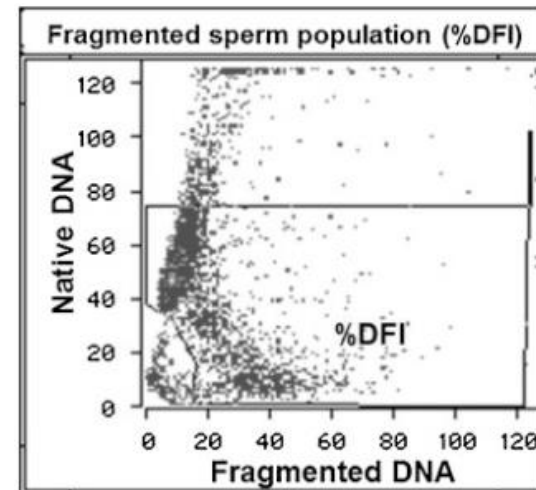
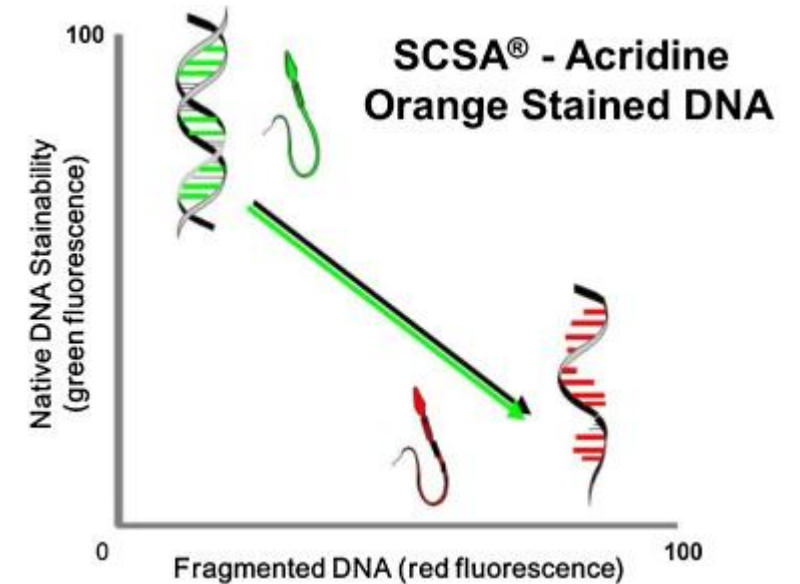
Sperm chromatine structure assay

- akridinová oranž – metachromatická (zelená vs. červená)
- průtokový cytometr
- populace nezralých spermií - nízká kondenzace chromatinu
- Software – vysoká míra standardizace



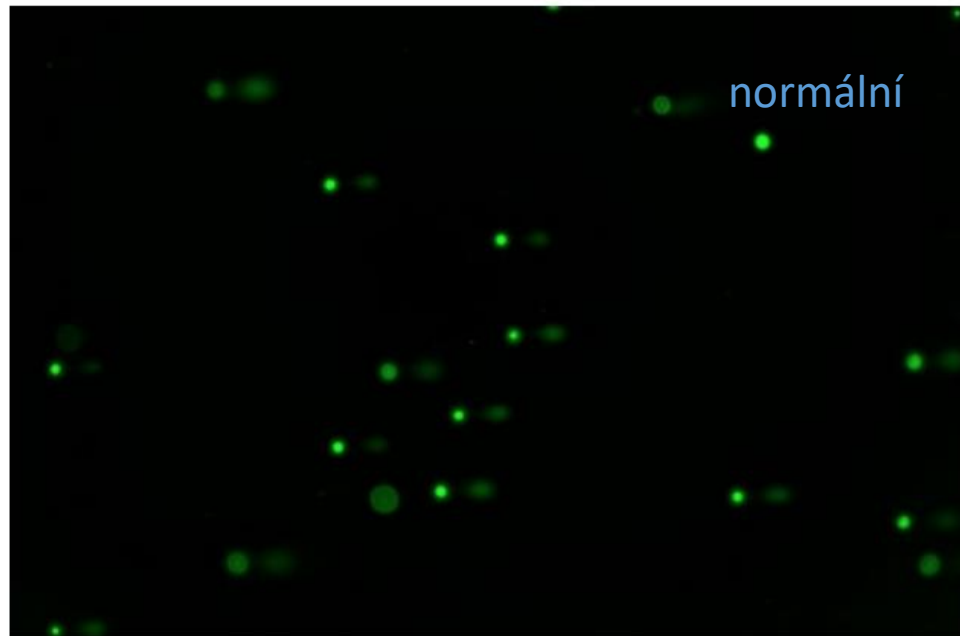
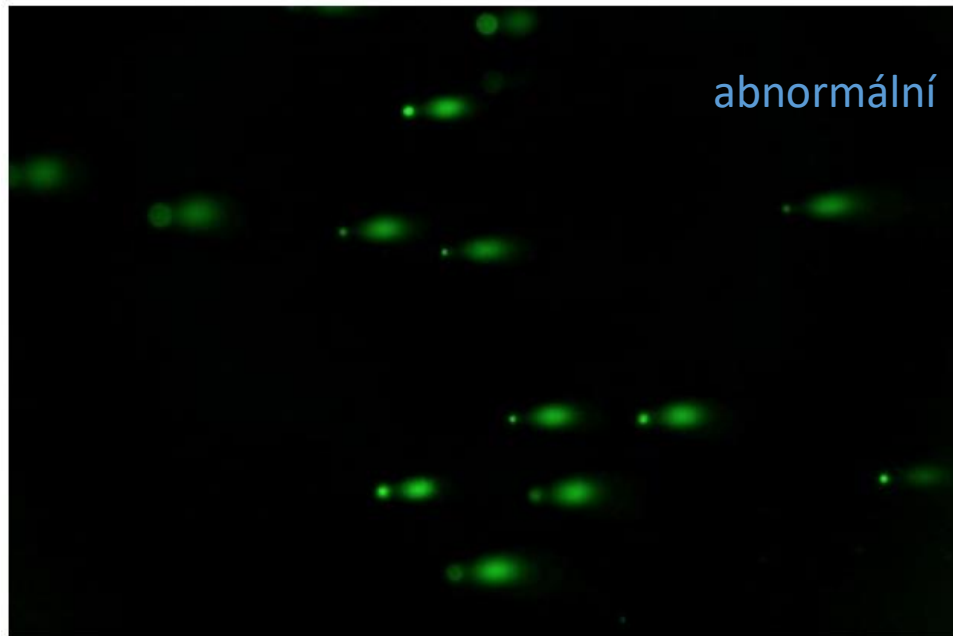
<https://abdominalkey.com/sperm-dna-damage-causes-and-laboratory-detection/>

Evenson 2016



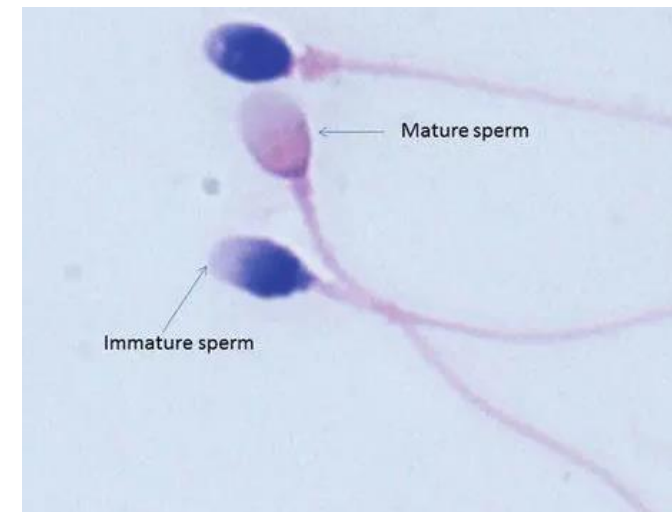
Commet assay

- Principem je rozdílná migrace zlomených řetězců DNA pod vlivem elektrického pole závisující na náboji a velikosti řetězců
- Fragmenty DNA spermií v agaróze jsou odděleny od hlavičky spermie elektroforetickým pohybem → vzhled komety
- Fluorescenční mikroskop, ethidium bromid



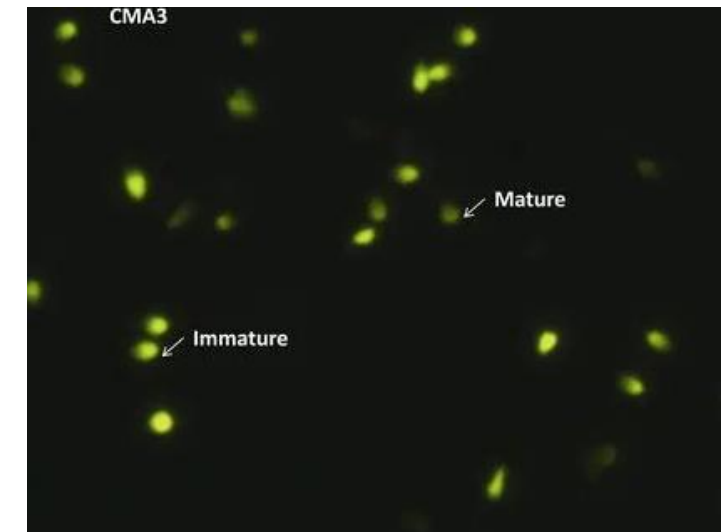
Anilin blue staining

- Světelná mikroskopie, zralost spermií
- Rozdíly ve sbalení chromatinu spermií
- Nepřímo měří poměr histonů/protaminů
- Anilinová modř má vyšší afinitu k histonům
- Vyšší počet aniline blue pozitivních spermií indikuje poruchy v kondenzaci chromatinu
- modré spermie považujeme za nezralé, nicméně existuje mnoho škál zabarvení a výsledky není snadné interpretovat



Chromomycin A3

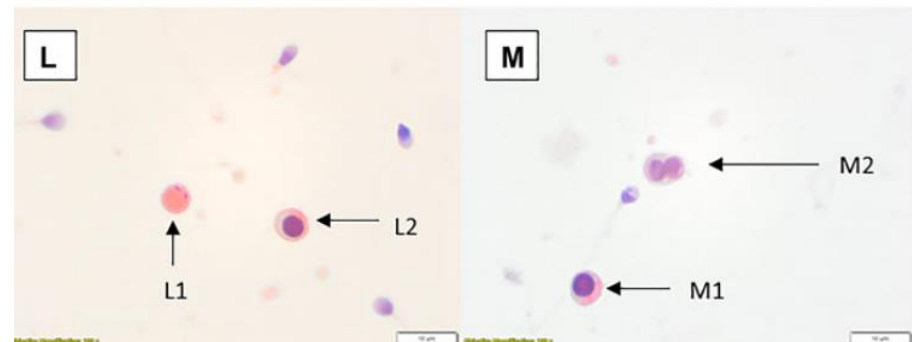
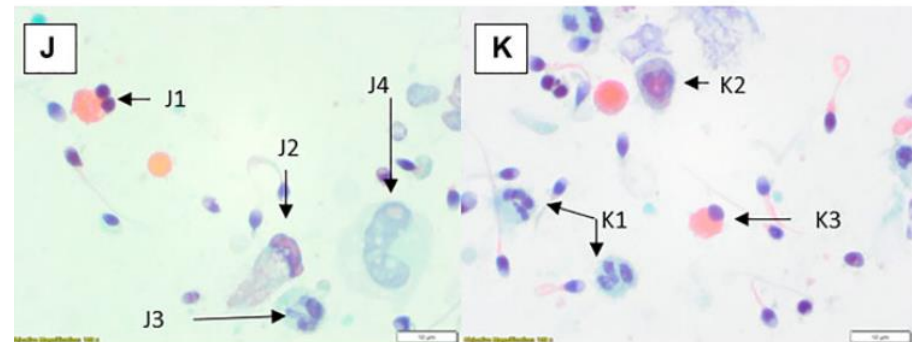
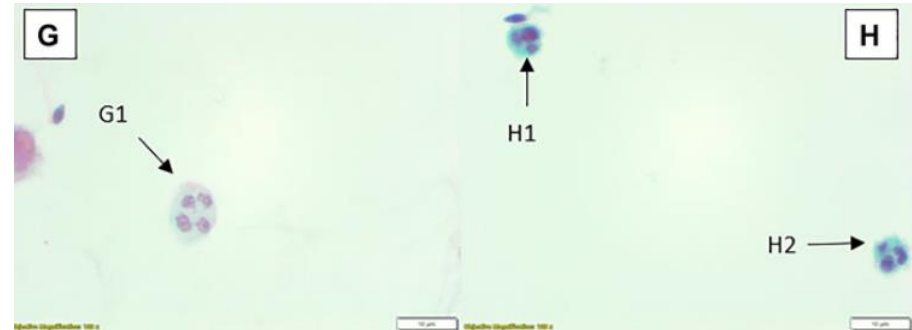
- Fluorescenční mikroskopie, zralost spermií
- Úroveň protaminace a sbalení chromatinu
- CMA3 se váže specificky k regionům bohatým na G-C (současně jde o místo vazby protaminů)



Hodnocení leukocytů v ejakulátu

- Dominují polymorfonulkeální leukocyty (neutrofily)
- Papanicolauovo barvení – tvar a velikost jádra, zabarvení cytoplasmy
- U ostatních barvení bohužel hrozí záměna s degenerujícími spermatidami

(G) Neutrophil (G1). **(H)** Two small neutrophils (H1, H2). **(J)** Spermatid (J1), possible degenerate/damaged neutrophil (J2), neutrophil (J3), possible degenerate monocyte (J4). **(K)** Neutrophils (K1, K2), spermatid (K3). **(L)** Cytoplasmic remnant (L1), spermatocyte (L2). **(M)** Spermatocyte (M1), spermatids (M2).



Barvení cytoplasmatické peroxidázy pomocí ortho-toluidinu

- peroxidáza-enzym typický pro granulocyty
- Jednoduchá histochemická metoda, která ale:

nedetekuje aktivované (degranulované) granulocyty
nedetekuje ostatní typy leukocytů



The cells that were stained brown are peroxidase-positive.

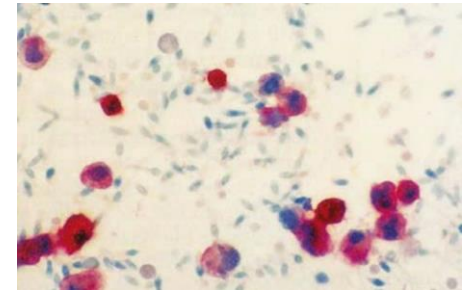


There are 40 vials of reaction A per kit and the reaction A is directly used for testing conveniently.



Imunocytochemické značení antigenu CD45

- Všechny leukocyty
- Časově i finančně náročnější
- Fluorescenční mikroskop/ průtokový cytometr
- Sperm Flow Ex Kit- informace o počtu spermií, počtu leukocytů, viabilitě a integritě akrozómů



Oxidační stres

Luminol

- Chemiluminiscence při kontaktu s volnými radikály
- Luminometr, počel RLU (relative light units) na milión spermií
- Neakreditované pro laboratorní diagnostiku

Oxidoredukční potenciál

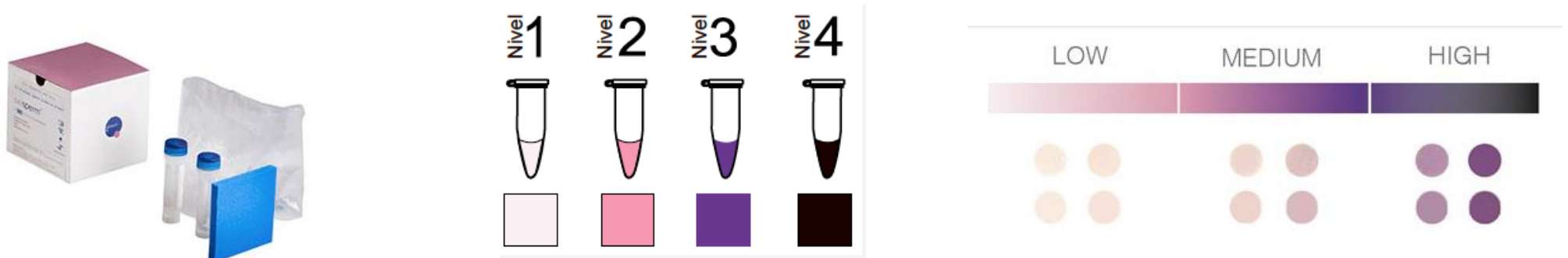
- Celkové měřítko oxidačního stresu

Mioxsys rychlý IVD prostředek ke kvantitativnímu měření (milivoly) statického oxidoredukčního potenciálu v ejakulátu za využití elektrochemické technologie



Oxisperm

- měří redoxní aktivitu pomocí **Nitrotetrazoliové modři** (v přítomnosti oxidoreduktáz tvoří modré nerozpustné krystalky)



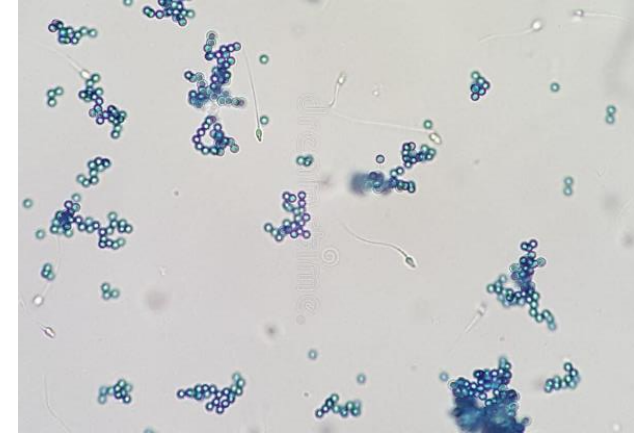
- Castleton et al. 2022 – **nebyl potvrzen potenciál predikovat funkci spermie nebo oxidační stres v ejakulátu** (ani u MiOxsys ani u Oxisperm)

Protilátky proti spermiím

- Aglutinace – motilní spermie, hlavička/hlavička, bičík/bičík nebo mix
- Mohou se vyskytovat i bez aglutinací a stejně tak aglutinace může být způsobena něčím jiným
- Pouhá přítomnost protilátek proti spermiím není dostatečná pro diagnózu autoimunitní reakce proti spermiím
- Narušují interakci s cervikálním hlenem, ovlivňují vazbu na ZP a akrozomální reakci
- IgA a IgG, velmi zřídka IgM
- IgA jsou klinicky významnější
- Detekce přímo na spermiích nebo v tělních tekutinách
- Mixed antiglobuline reaction, Immunobead test, Elisa

MAR test (Mixed antiglobulin reaction test)

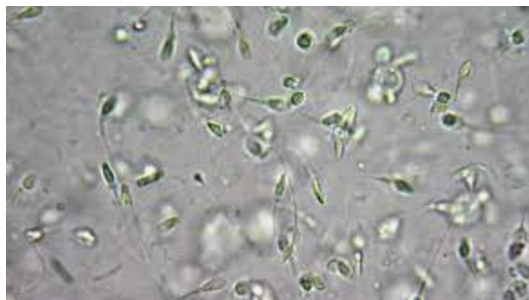
- Světelná mikroskopie
- Levný, rychlý, senzitivní
- Protilátky proti IgG nebo IgA konjugované s latexovými částicemi - „beads“ (kuličky/korálky)
- Přímý test: ejakulát smíchan se suspenzí latexových částic konjugovaných s anti-human IgG/IgA → konjugáty
- Počítají se spermie s navázanými částicemi IgG/IgA – podíl
- v současné době není stanovena „evidence-based“ referenční hodnota



Interakce spermií s cervikálním hlenem

- Postkoitální test
- Cervikální hlen je pro spermie dobře průchozí po omezený čas v období před ovulací (vliv estrogenu), délka tohoto období se u žen liší
- Cílem je určení počtu pohyblivých spermií v cervikálním hlenu a vyhodnocení přežití spermií
- **Imunologický faktor ze strany ženy**
- Načasování styku – běžná délka cyklu, ultrazvuk, bazální tělesná teplota, hormonální screening
- Hlen musí být vyšetřen 9-14 hodin po styku-cervikální hlen (živé spermie, vaginální hlen – mrtvé spermie), světelný mikroskop

Cervikální hlen: spermie nenalezeny → negativní



progresivní spermie → není imunologický faktor
pohyb na místě → imunologický faktor

Funkce přídatných pohlavních žláz

- Abnormální sekrece přídatných pohlavních žláz může mít negativní efekt na funkce spermií
- Dočasné změny v sekreci mohou být způsobeny infekcí, , v některých případech jsou změny ireverzibilní
- Funkce žláz může být kontrolována měřením jejich sekrece:

prostata: kyselina citrónová, **zinek** a kyselá fosfatáza

nadvarlata: L-carnitin, glyceofosfocholin (GPC),
neutrální α -glukosidáza

semenné vajíčky – fruktóza

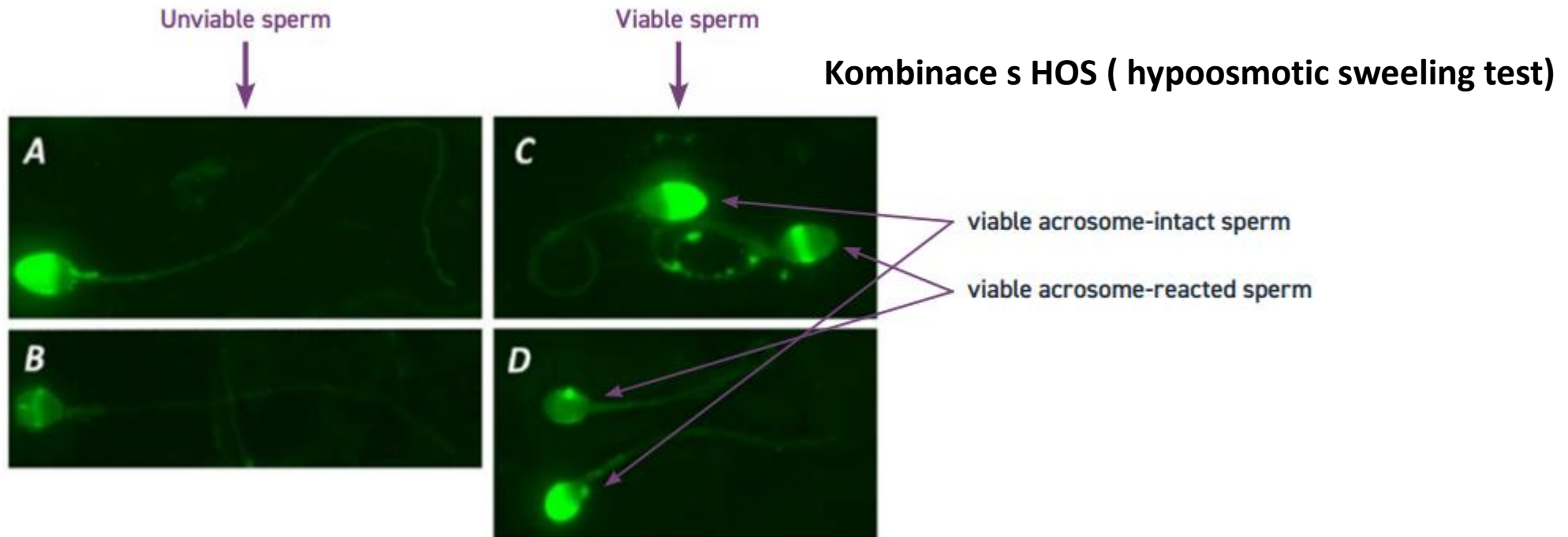
- Spektrofotometrie, kolorimetrie



Akrozom

- Pisum sativum agglutinin (PSA) –FITC
- Fluorescenční mikroskop
- Lze i indukovat akrozomální reakci (ionofor, progesteron)

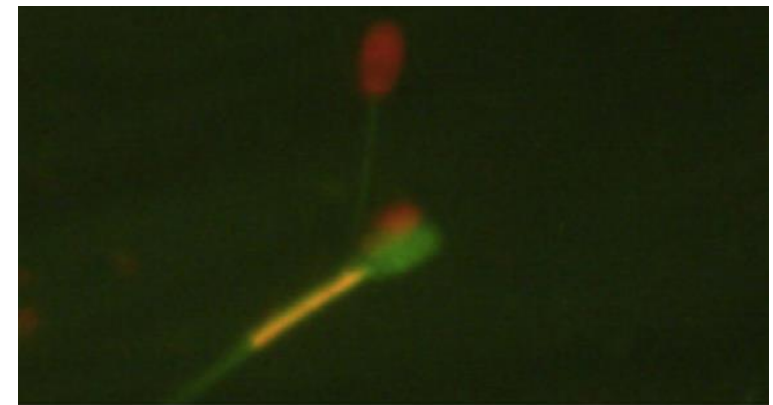
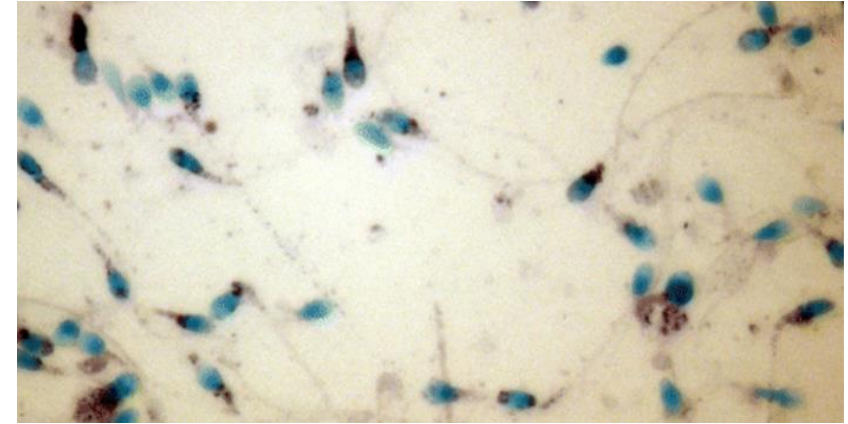
Fig. 4.1 Examples of FITC-PNA-stained acrosome-intact and acrosome-reacted, viable and unviable spermatozoa



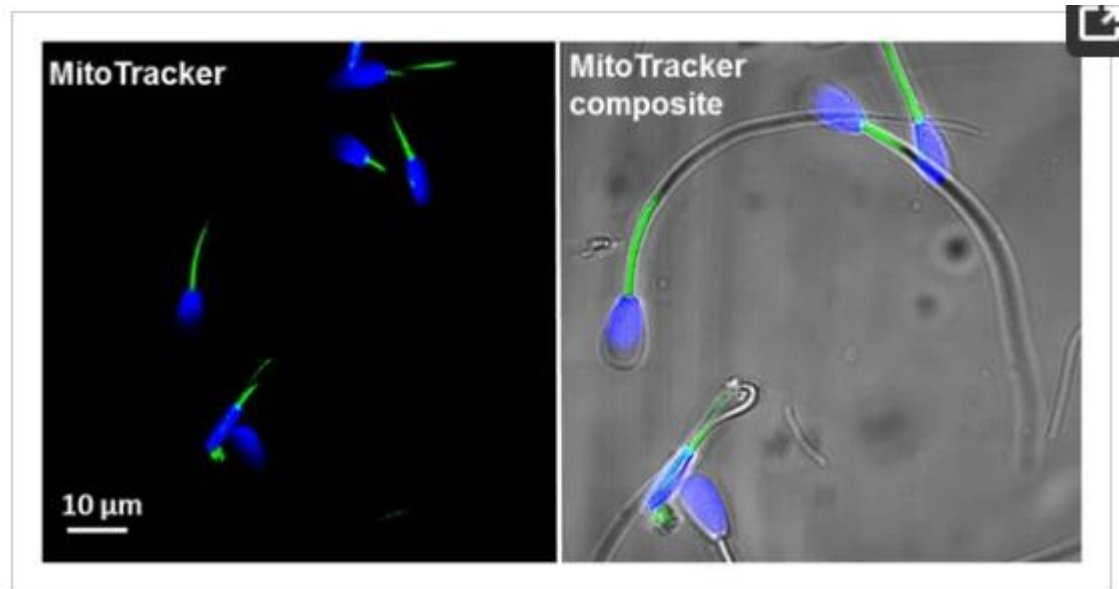
Test mitochondriální aktivity spermii

- Mitochondriální oxidoredukční enzymatický aparát
- **Nintrotetrazoliová modř** modrý nerozpustný pigment kolem střední části spermie, světelná mikroskopie
- Korelace s motilitou spermii

- **JC-1** – fluorescenční karbokyjaninové barvivo
→ **žlutooranžová fluorescence- vysoká mitochondriální aktivita** (vysoký membránový potenciál), **zelená fluorescence – nízká mitochondriální aktivita**
- Tvoří agregáty při vysokém membránovém potenciálu



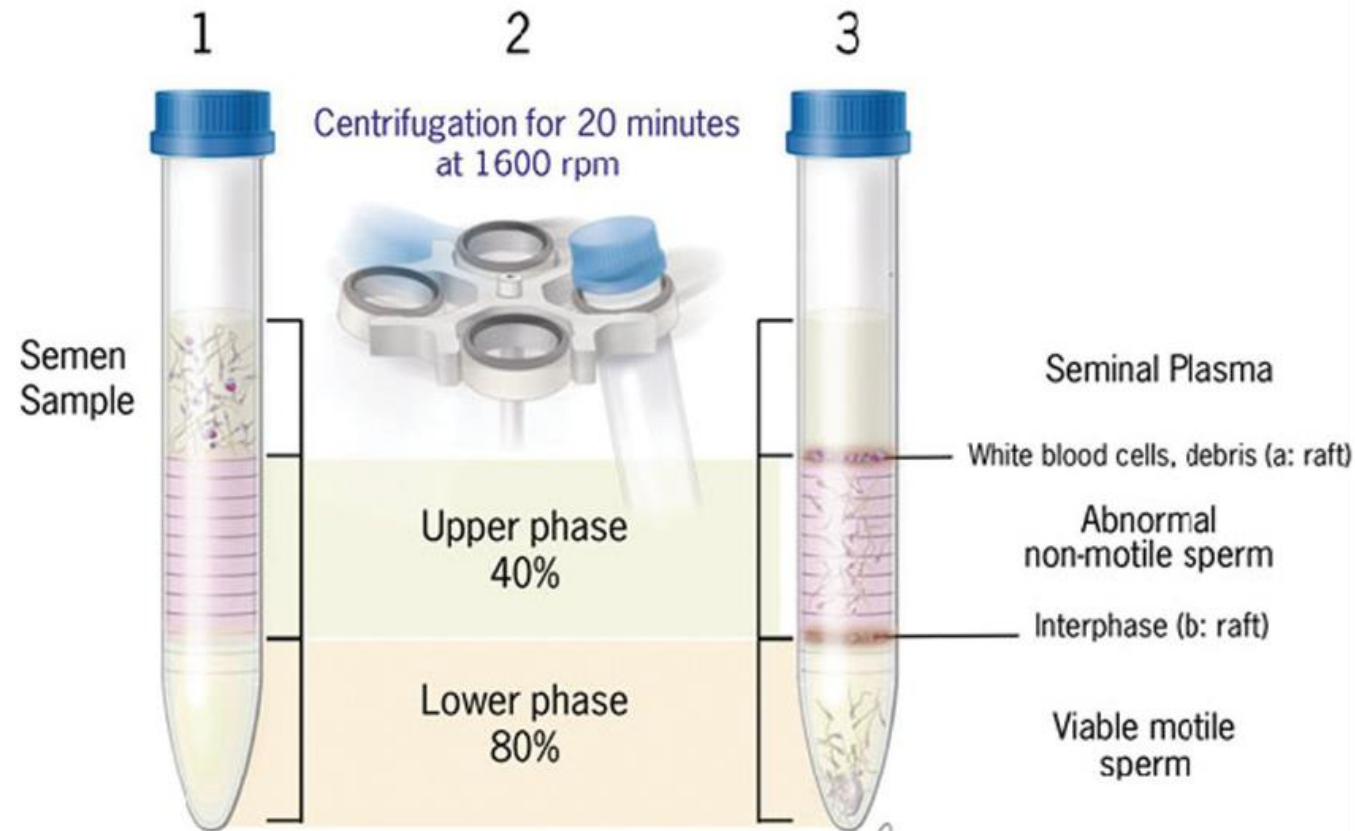
- MitoTracker Green – zelená fluorescenční látka selektivně se akumulující v matrix mitochondrií. Kovalentně se váže k mitochondriálním proteinům reakcí s volnými thiolovými skupinami cysteinových residuí-pouze detekce mitochondrií, nikoli jejich aktivity



MitoTracker green + DAPI

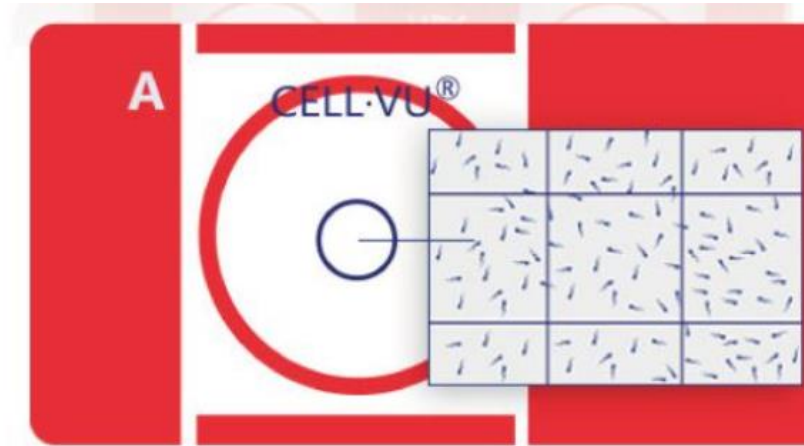
Pokusné promytí spermií

- Před IVF, doplňkové vyšetření k SPG
- Vhodnost použití metodiky zpracování spermií
- Výběr metody oplození
- Hodnotí se zisk spermií (počet) a funkční kvalita po zpracování (pohyb)



Hyaluronan binding assay - HBA

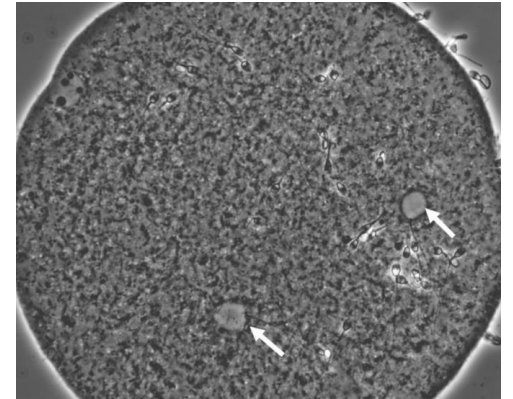
- Vazba spermií k **hyaluronanu**
- Zralost spermií v ejakulátu
- Jednoduchá metoda, světelná mikroskopie
- **HBA skóre (%)**- počet navázaných spermií/celkový počet motilních spermií
- Vazbu vykazují spermie maturované, s intaktní DNA, intaktním akrozomem a lepší morfologií, nižší podíl aneuploidií
- **HA receptor CD 44**- spermie s lepším fertilizačním potenciálem, lepší struktura plasmatické membrány, lepší mitochondriální aktivita
- (princip metody PICSI)



Testy interakce s oocytem

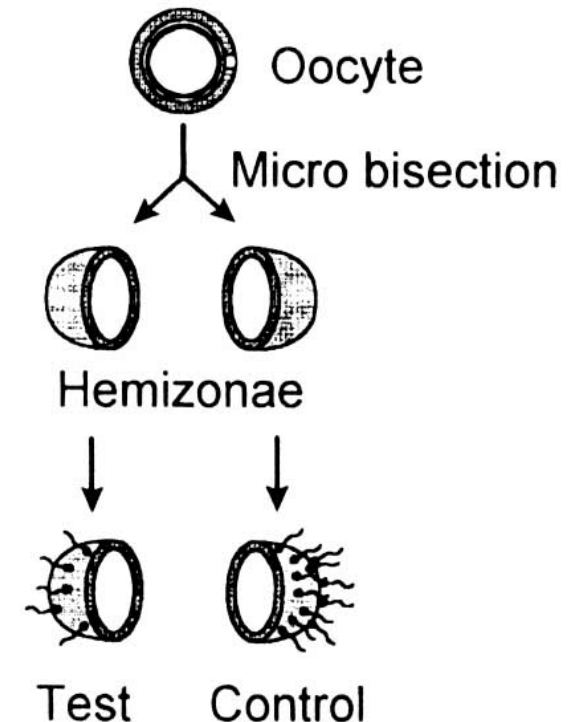
Sperm penetration assay (SPA)

- lidské spermie x oocyt křečka zbavené ZP – kapacitace, akrozomální reakce, penetrace, dekondezace –rutinně se nepoužívá, nízká vypovídací hodnota



Sperm zona pellucida binding test

- HZA Hemizona assay nebo Competitive intact zona sperm binding assay - primárním výstupem je pevná vazba spermie na ZP oocyt, vysoká prediktivní hodnota
- HZA: spermie fertilního muže jako kontrola → **hemizona index (HZI: počet navázaných spermií testovaného/počet spermií kontrolního fertilního muže x 100)**
- HZI < 30 –signifikantně nižší pregnancy rate po IUI (intrauterinní inseminace)



Fluorescence in situ hybridization FISH

- Chromozomy X, Y, 13, 18 and 21 (Klinefelterův syndrom [XXY-XXXXY], Turnerův syndrom [XO], Patauův syndrom [trisomy 13], Edwardsův syndrom [trisomy 18] and Downův syndrom [trisomy 21]).
- Ideální je detekce všech aneuploidií (ale vysoké náklady)
- Genetická konzultace (předchozí selhání, astenozoospermie, těžké oligozoospermie)

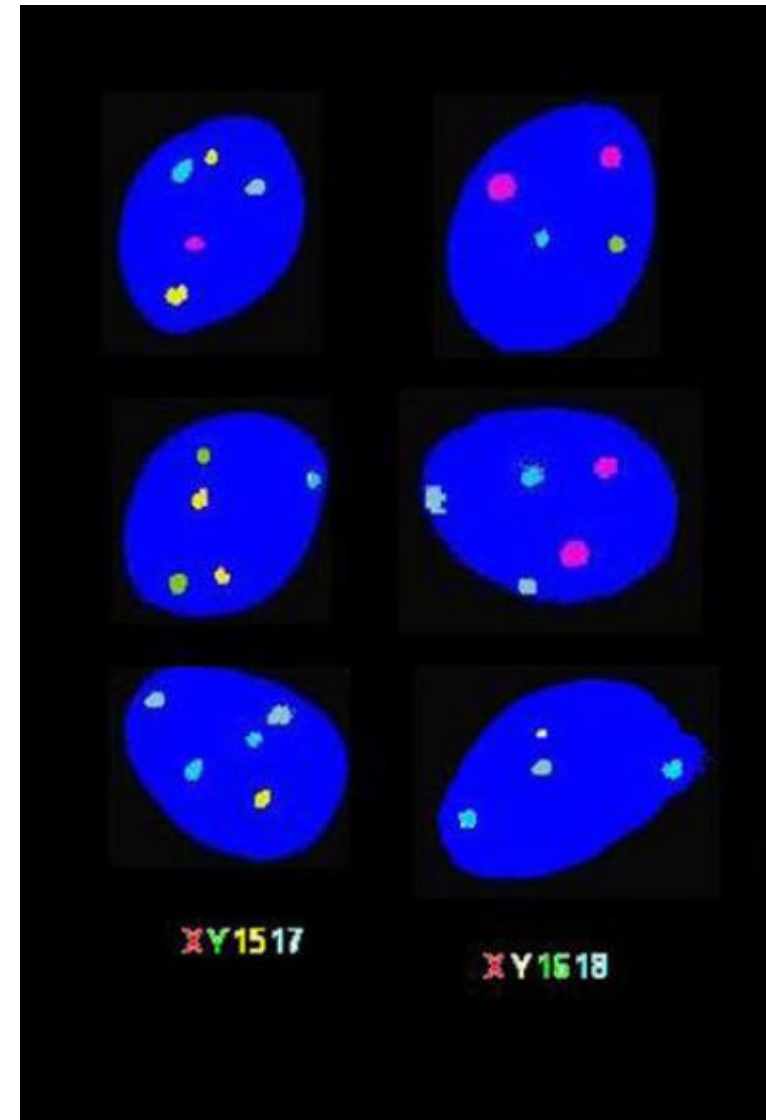


Table 3.3 Basic levels of sperm chromosome disomy of healthy fertile men

Chromosome #	Templado et al.	Neusser et al.
1	0.08	0.16
2	0.09	0.09
3	0.20	0.20
4	0.08	0.10
6	0.04	0.07
7	0.06	0.10
8	0.03	0.18
9	0.16	0.13
12	0.14	0.09

Chromosome #	Templado et al.	Neusser et al.
13	0.12	0.13
15	0.10	0.10
16	0.07	0.12
18	0.06	0.10
20	0.12	0.12
21	0.17	0.21
22	0.47	0.41
X,Y	0.27	0.21

(WHO 2021, 6th edition)