

Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

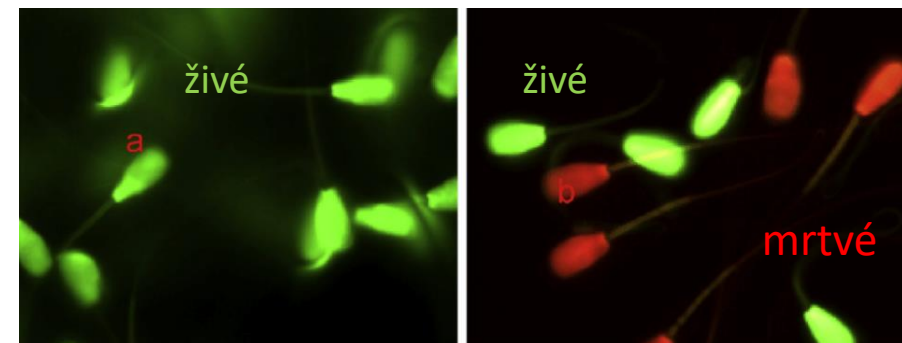
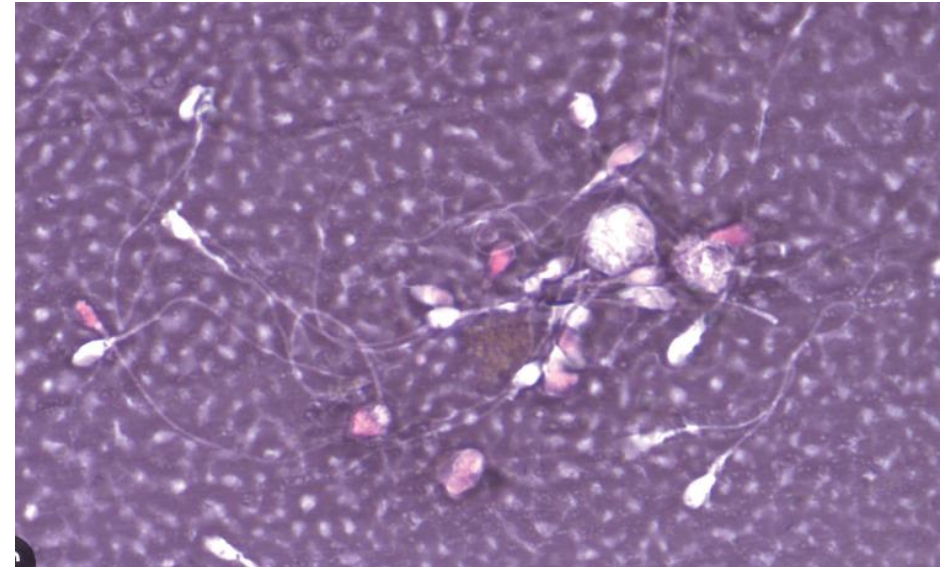
28.3.2023

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

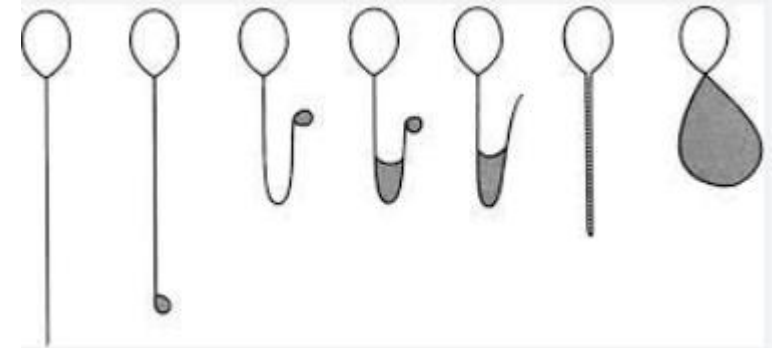
- Důležitý ukazatel v případě snížené pohyblivosti spermií
 - **Integrita buněčné membrány** -membrána živé buňky nepropustí barvivo
 - **Eosin** – v kombinaci s nigrosinem (podbarvení)
 - Roztěr, světelná mikroskopie
-
- **Propidium Iodide** (často v kombinaci se **SYBR green**)
 - Suspenze, fluorescenční mikroskopie



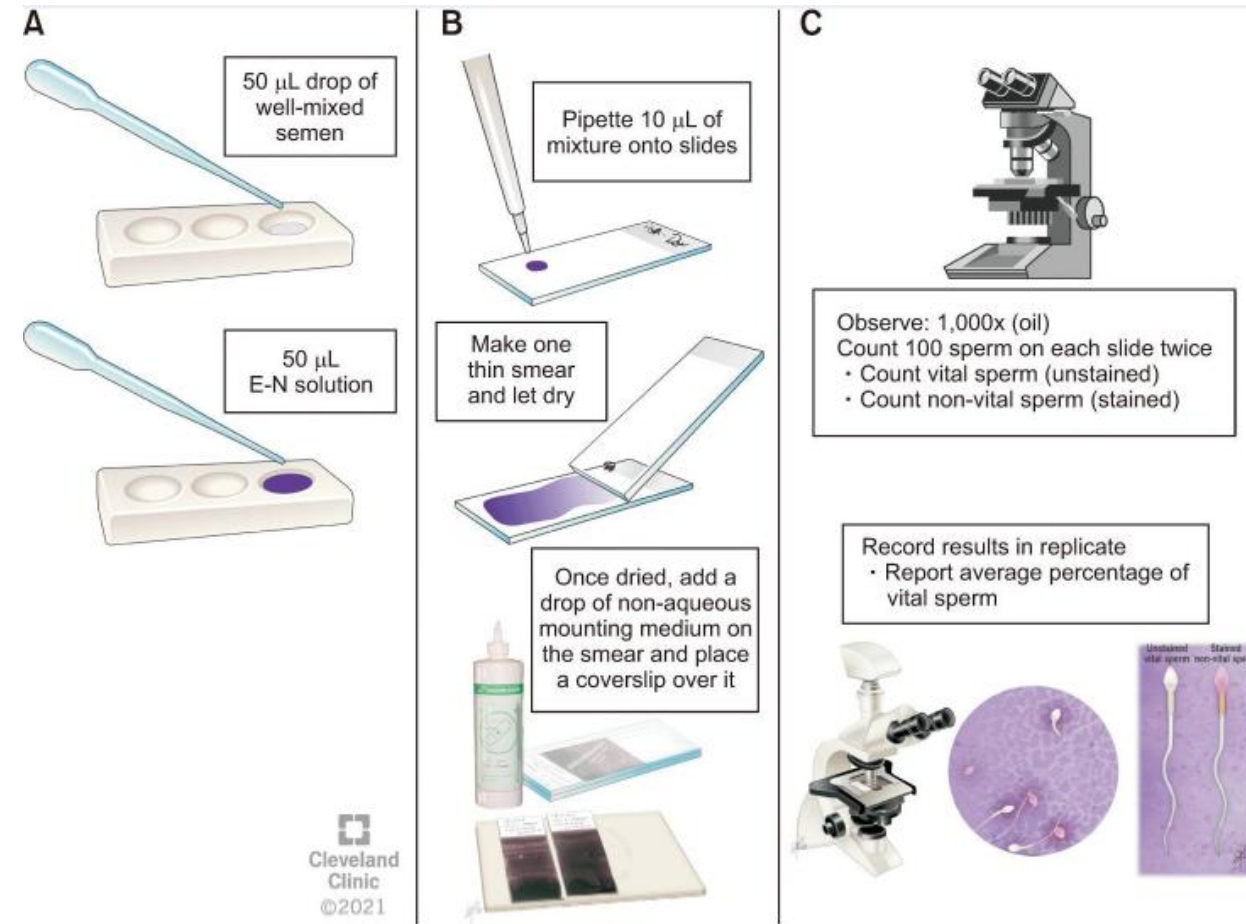
Hypoosmotic swelling test (HOS)

- Integrita membrán spermií; **viabilita** - životaschopnost
- 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
- **Spermie zůstávají nepoškozené**, vhodné k použití pro ICSI

- Dříve využití i v klinické praxi, dnes **neexistuje certifikované hypoosmotické médium**



Eosin nigrosin staining



Testing for necrozoospermia

Indication: if total sperm motility is less than 40%

Importance: in order to distinguish whether the immotile spermatozoa are dead (necrozoospermia) or are alive but with abnormal motility (asthenozoospermia), as this will have clinical implications in terms of approach and management

Methods:

- Eosin-nigrosin staining: dead sperm heads are stained dark pink or red – all tested sperm are damaged and can no longer be used for ART
- HOS test: live sperm tails become swollen – sperm is not damaged and can be used for ART

Causes and risk factors of necrozoospermia

- Genital tract infections – the most common cause
- Testicular hyperthermia – local or systemic (such as fever)
- Varicocele
- Hyperthyroidism
- Spinal cord injury
- Polycystic kidney disease
- Antisperm antibodies
- Advanced male age
- Toxic substances – such as: tobacco, cannabis, pesticides
- Idiopathic

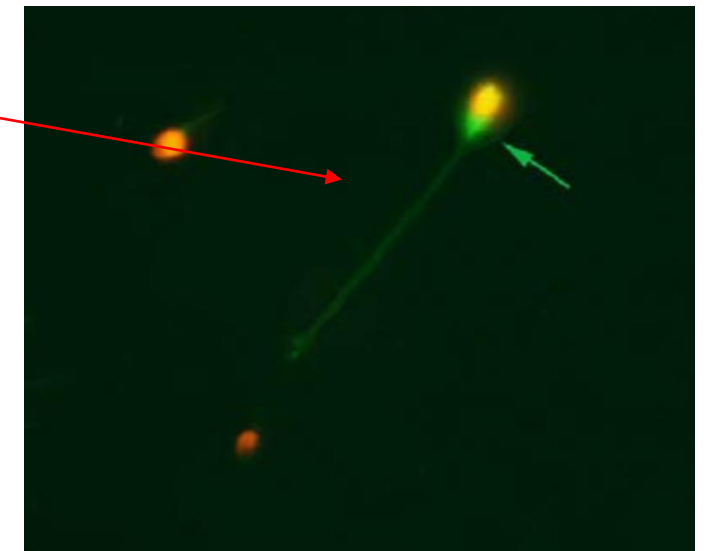
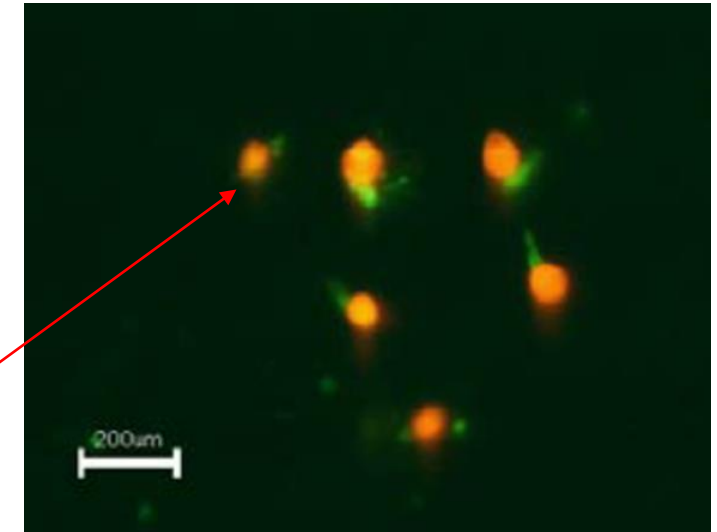
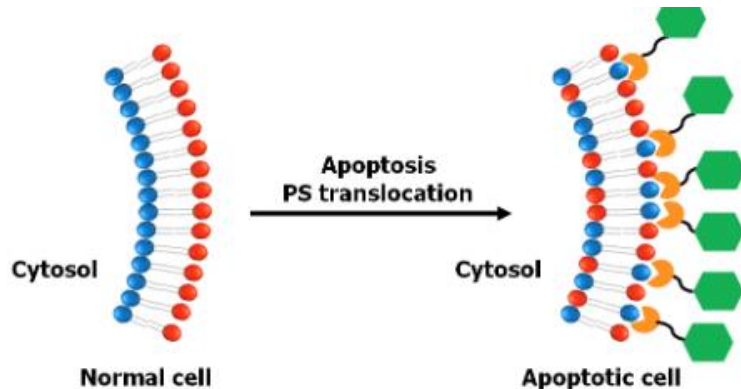
Note: Should always rule out false results due to lubricant use or contamination of semen sample with antiseptic solution, soap, or water

Management of necrozoospermia

- Avoiding and treating underlying risks and conditions
- Frequent ejaculation
- Absolute asthenozoospermia: consider the diagnosis of flagellar dyskinesia - perform HOS test or use enhancers of sperm motility and select viable sperm for ICSI
- Absolute necrozoospermia: consider SDF testing if ejaculated live sperm are to be used in ICSI, testicular sperm extraction followed by ICSI

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 –pozdě 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)

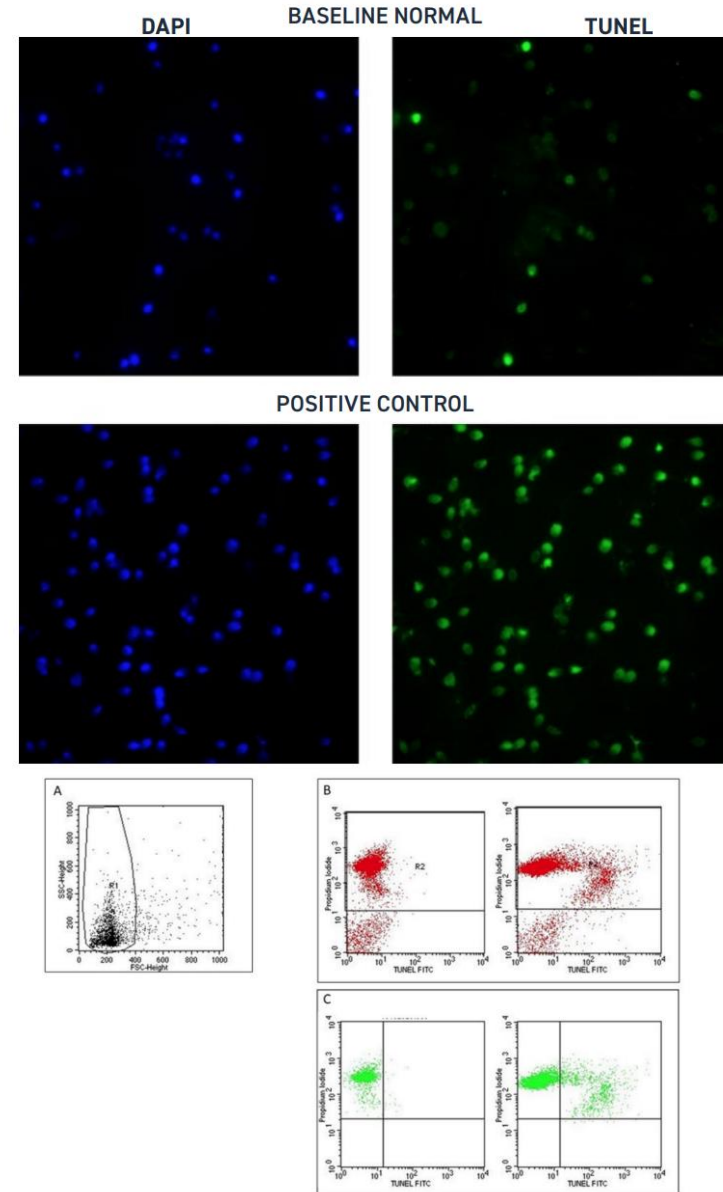
Comet assay (Single cell gel electrophoresis)

SCSA (Sperm chromatine structure assay)

SCD Sperm chromatine disperion test

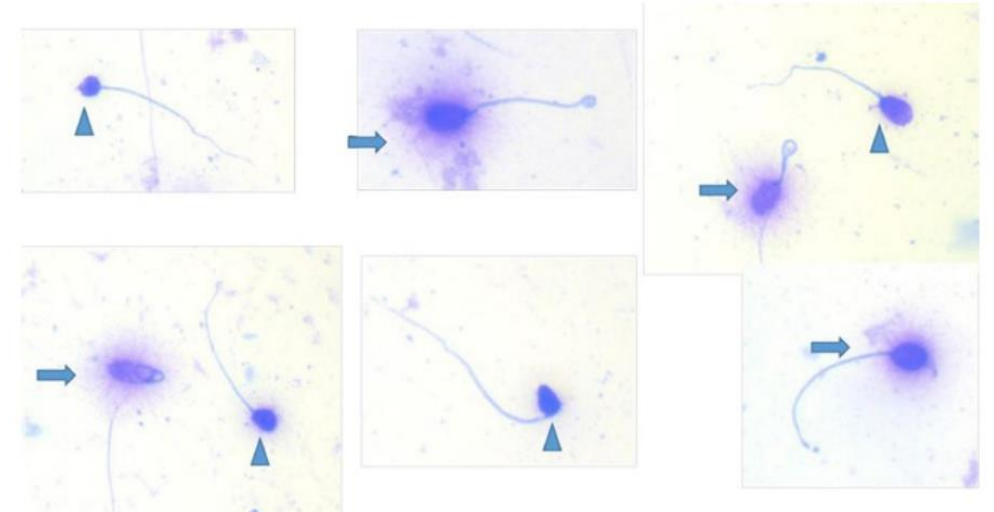
Tunel test

- Vysoce senzitivní metoda detekce zlomů řetězce DNA in situ označením fluorochromy nebo sondami s **biotinem** (následná konjugace se *(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)

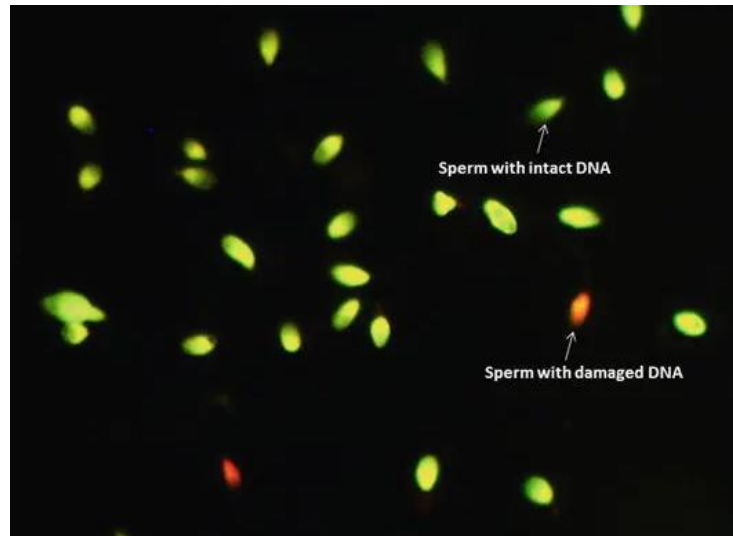


Komerčně dostupný, snadno proveditelný test –Halosperm nebo Gold Cyto



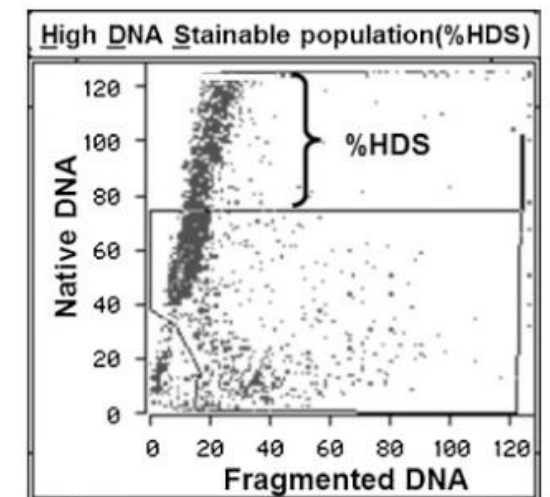
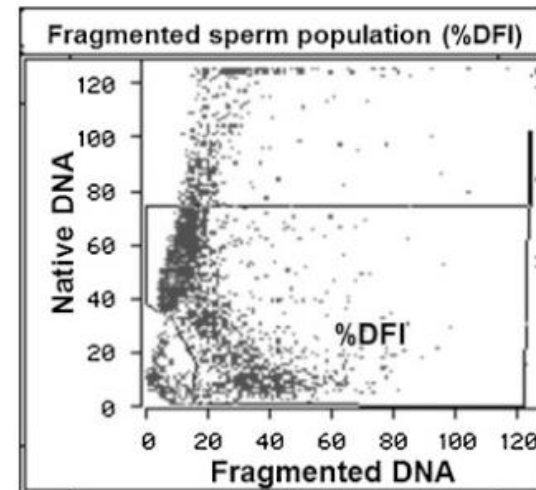
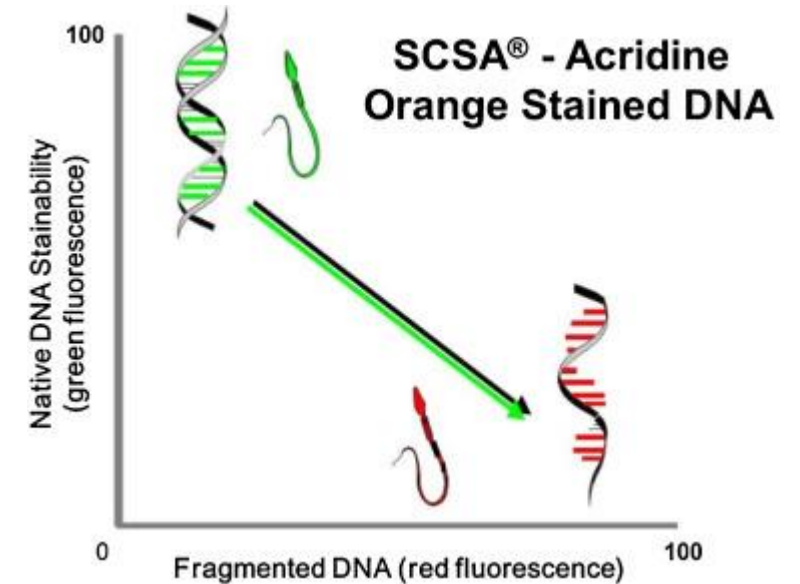
Sperm chromatine structure assay

- akridinová oranž – metachromatické barvivo – odlišně značí dvouvláknové a jednovláknové nukleové kyseliny (zelená vs. červená)
- průtokový cytometr
- populace nezralých spermií - nízká kondenzace chromatinu
- Software – vysoká míra standardizace



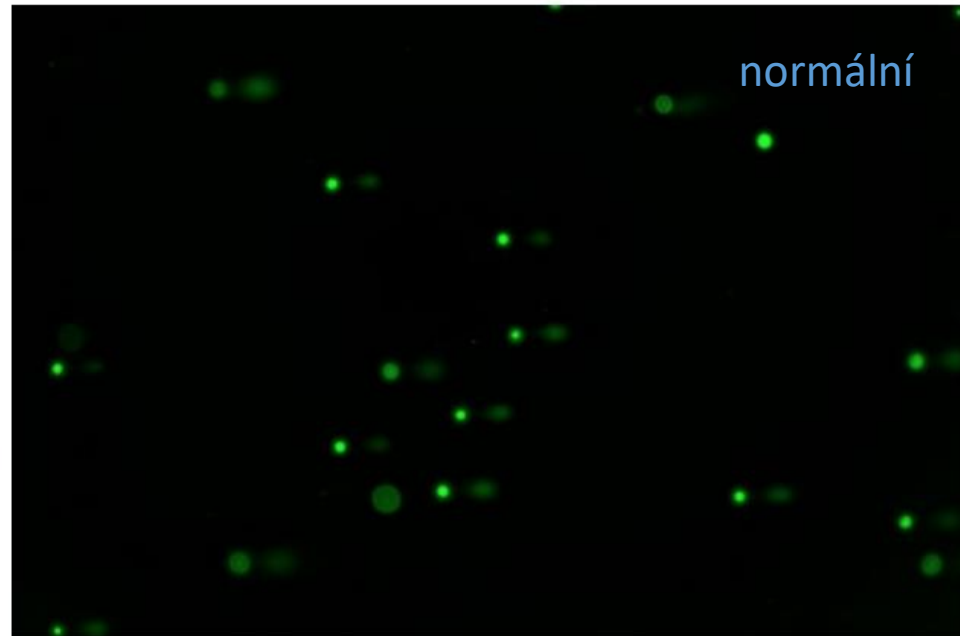
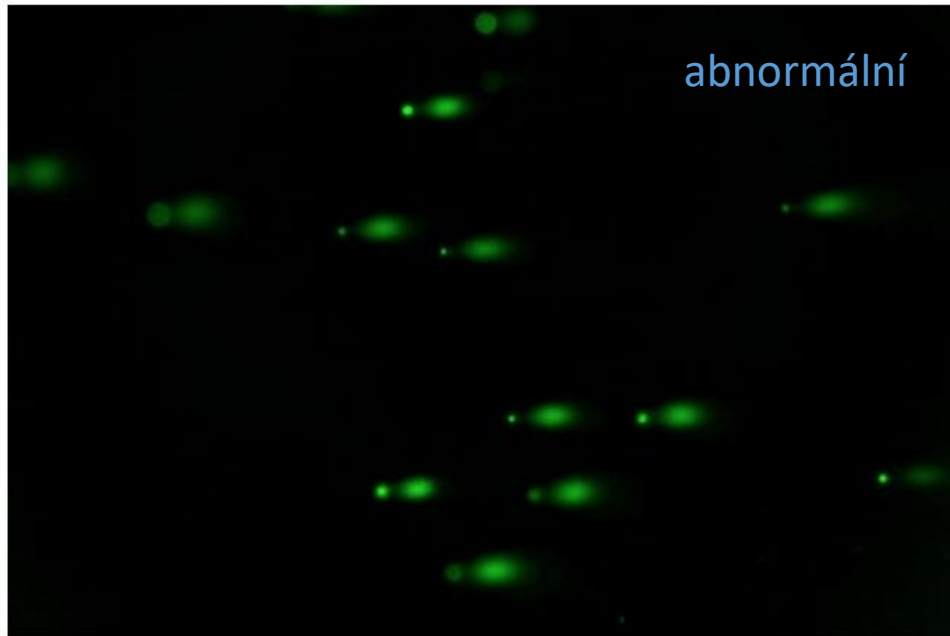
<https://abdominalkey.com/sperm-dna-damage-causes-and-laboratory-detection/>

Evenson 2016



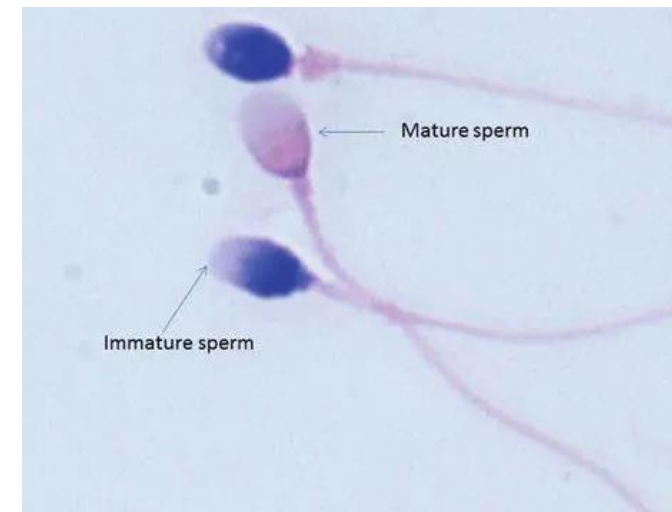
Commet assay

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



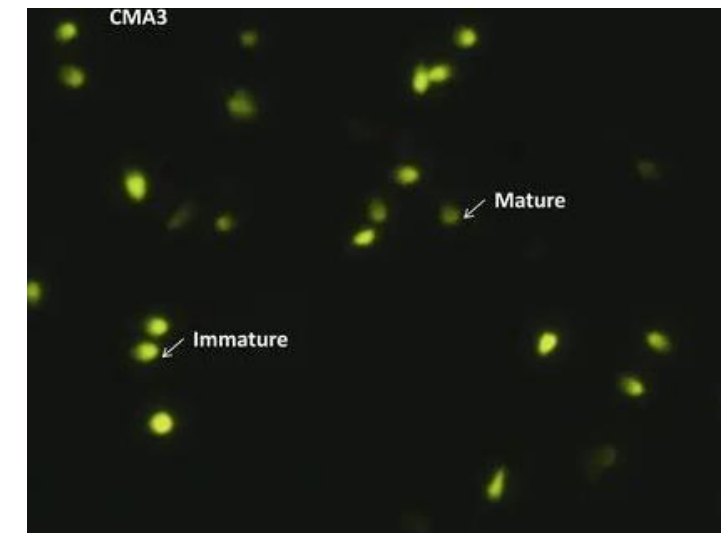
Anilin blue staining

- 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

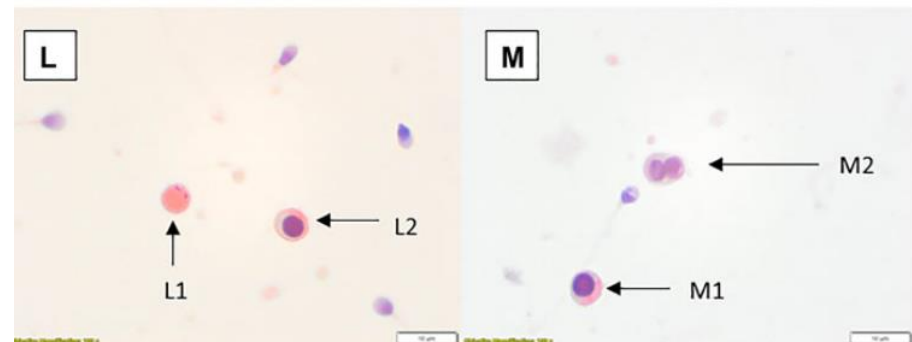
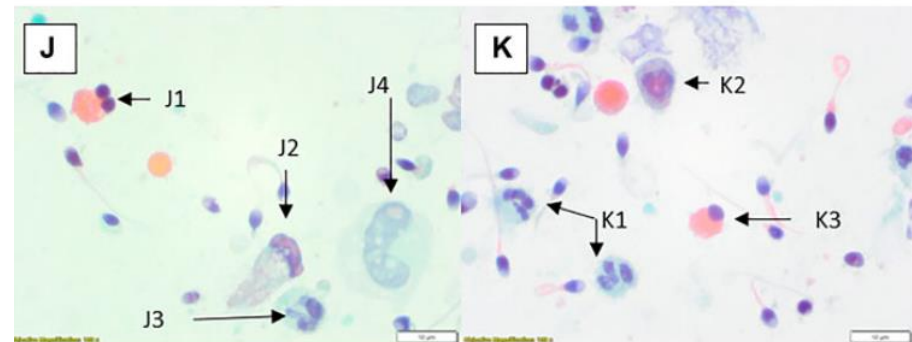
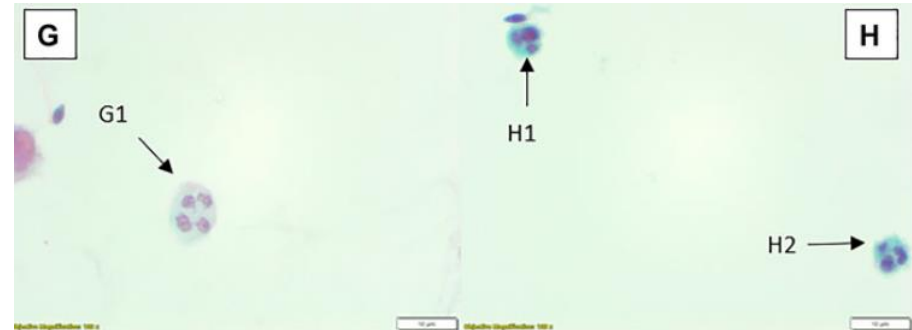
- Fluorescenční mikroskopie, **zralost spermií**
- Úroveň **protaminace a sbalení chromatinu**
- **CMA3** se váže specificky k regionům bohatým **na G-C** (současně jde o místo vazby protaminů)



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.

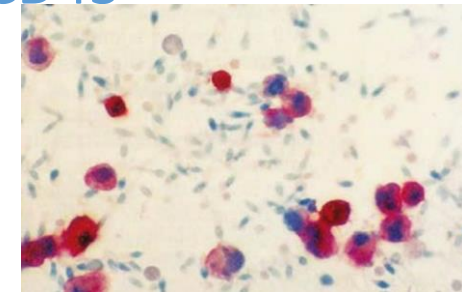


There are 40 vials of reaction A per kit and the reaction A is directly used for testing conveniently.



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

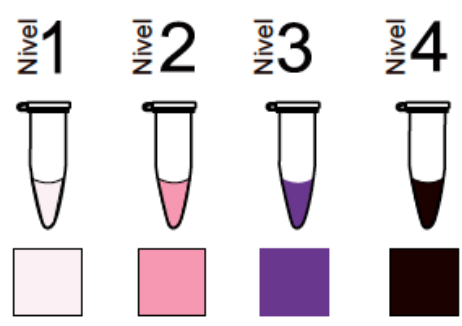
Mioxsys rychlý IVD prostředek ke kvantitativnímu měření (milivolty) **statického oxidoredukčního potenciálu v ejakulátu** (rovnováha mezi celkovou oxidační a celkovou redukční aktivitou)

- využití elektrochemické technologie (měření předávání a přijímání elektronů)



Oxisperm

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



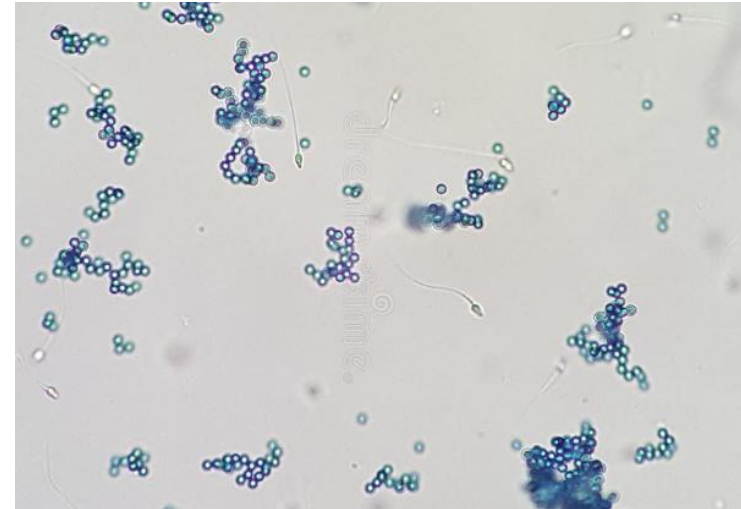
- Castleton et al. 2022 – nebyl potvrzen potenciál predikovat funkci spermie nebo oxidační stres v ejakulátu (ani u MiOxsys ani u Oxisperm)
- Názory odborníků se různí

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)

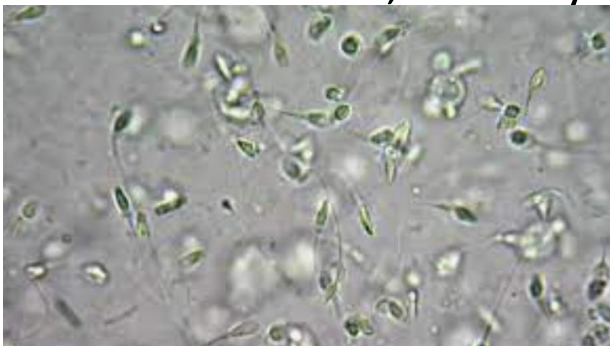
- Světelná mikroskopie
- Levný, rychlý, senzitivní, komerčně dostupný kit
- Protilátky proti **IgG nebo IgA konjugované s latexovými částicemi** - „beads“ (kuličky/korálky)
- Přímý test: ejakulát smíchán se suspenzí latexových částic konjugovaných s anti-human IgG/IgA → konjugáty
- Počítají se spermie 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 (schopnost spermií přežít v cervikálním hlenu)
- 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, světelný mikroskop: spermie nenalezeny → negativní výsledek testu



progresivní spermie → není imunologický faktor

pohyb na místě → imunologický faktor

- využívá se zřídka, jeho predikční hodnota nikdy nebyla potvrzena

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

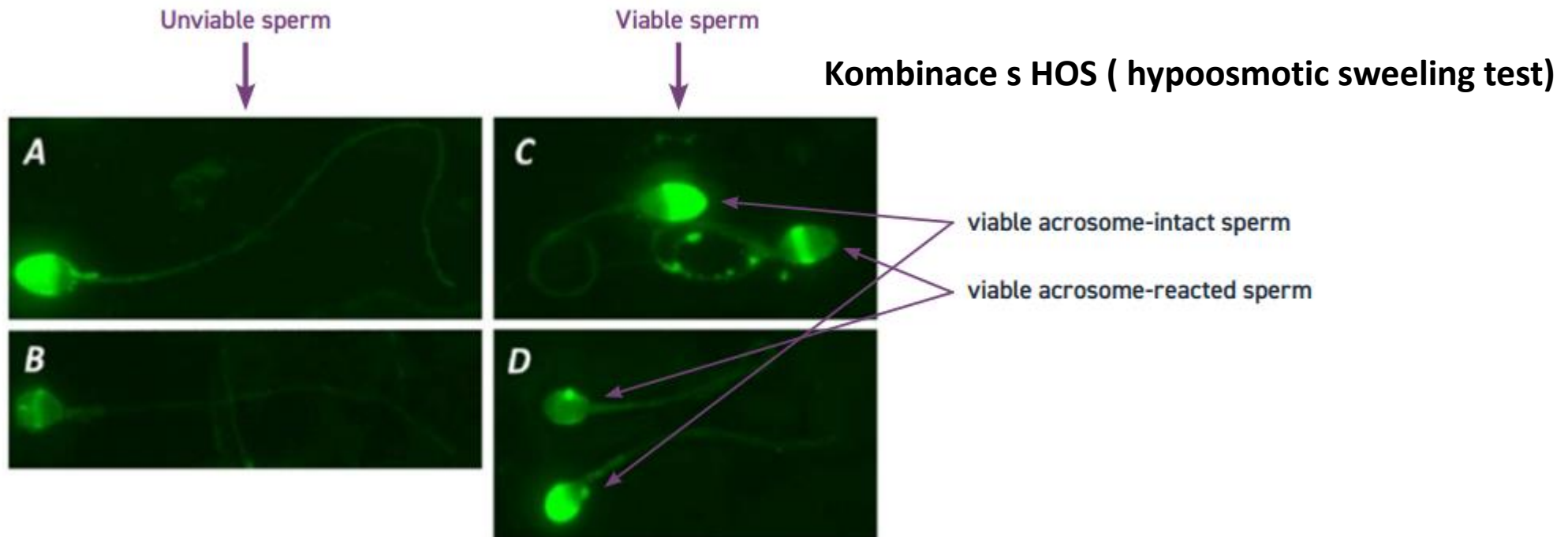
- Spektrofotometrie, kolorimetrie



Akrozom

- *Pisum sativum* agglutinin (PSA) –FITC
- Fluorescenční mikroskop –spermie s intaktním nebo reagujícím akrozomem
- Lze i indukovat akrozomální reakci (ionofor, progesteron)

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

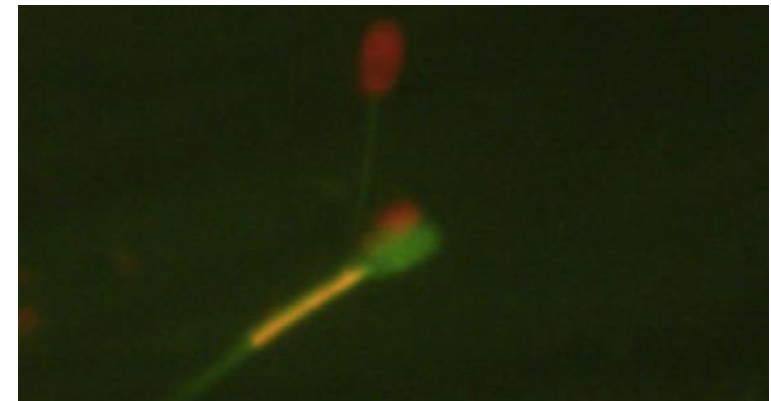
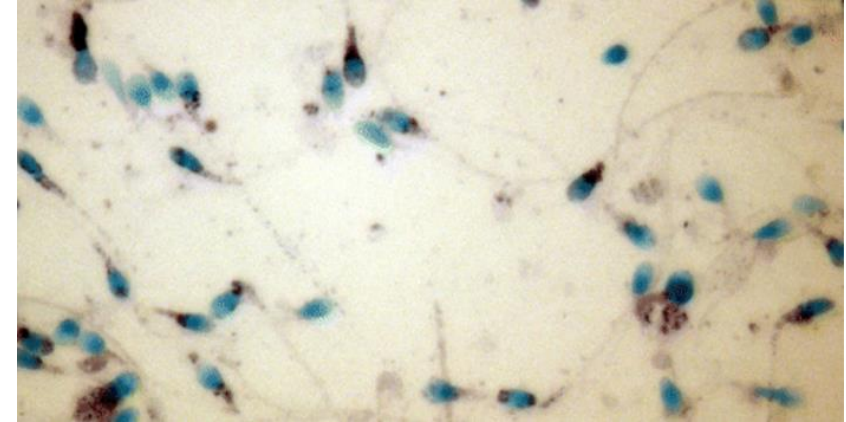


Test mitochondriální aktivity spermii

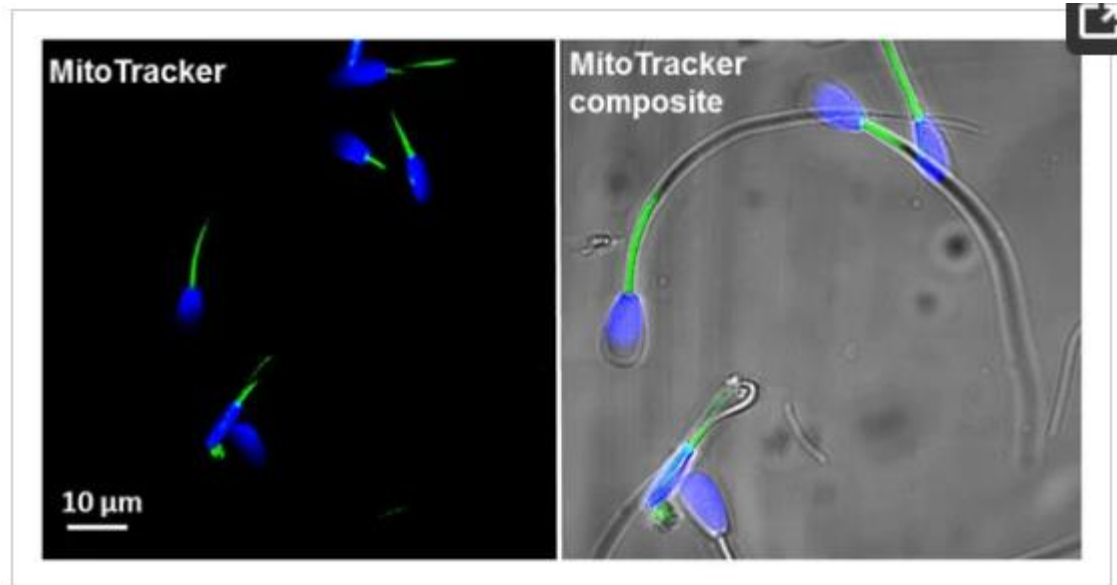
- Mitochondriální oxidoredukční enzymatický aparát
- **Nintrotetrazoliová modř (NBT)** modrý nerozpustný pigment - kolem střední části spermie (mitochondrie), světelná mikroskopie
- NBT se redukuje volnými kyslíkovými radikály za vzniku modročerné sloučeniny, formazanu
- Korelace s motilitou spermii

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

https://www.researchgate.net/figure/Sperm-reactivity-to-nitro-blue-tetrazolium-NBT-after-oxisperm-reaction-a-Whole_fig3_315650678



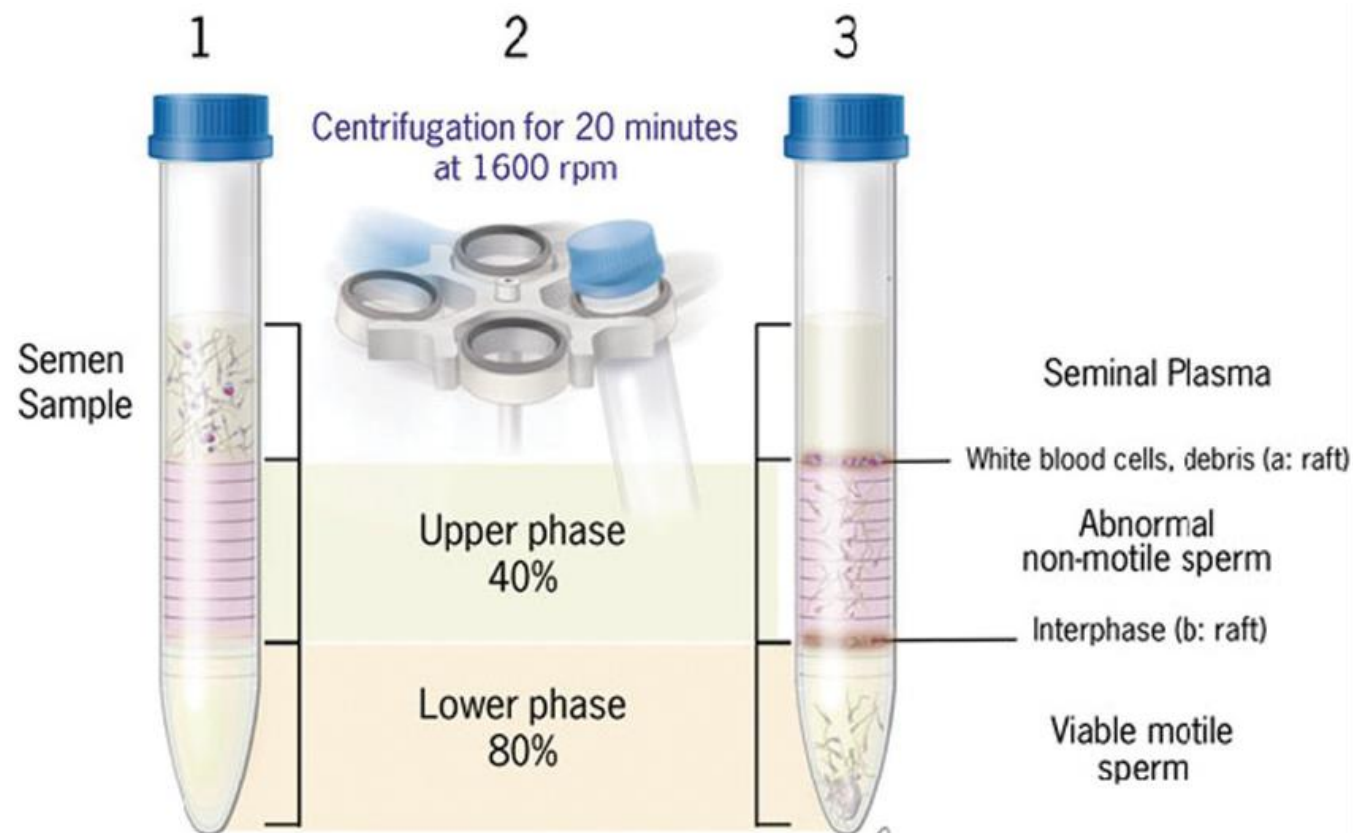
- **MitoTracker Green** – zelená fluorescenční látka selektivně se akumulující v matrix mitochondrií. Kovalentně se váže k mitochondriálním proteinům reakcí s volnými thiolovými skupinami cysteinových residuí-pouze detekce mitochondrií, nikoli jejich aktivit



MitoTracker green + DAPI

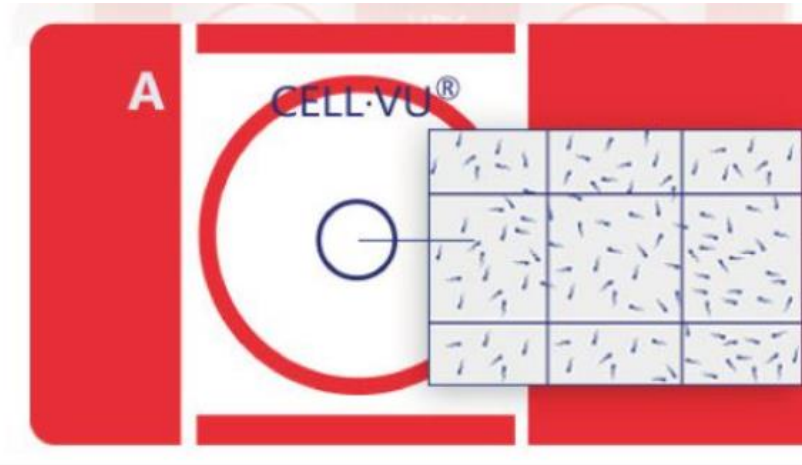
Pokusné promytí spermií

- 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

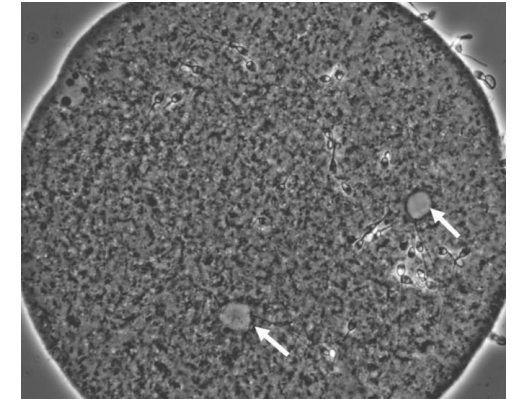
- Vazba spermií k **hyaluronanu**
- Zralost spermií v ejakulátu
- Jednoduchá metoda, světelná mikroskopie
- **HBA skóre (%)**- počet navázaných spermií/celkový počet motilních spermií
- Vazbu vykazují spermie maturované, s intaktní DNA, intaktním akrozomem a lepší morfologií, nižší podíl aneuploidií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



Testy interakce s oocytem

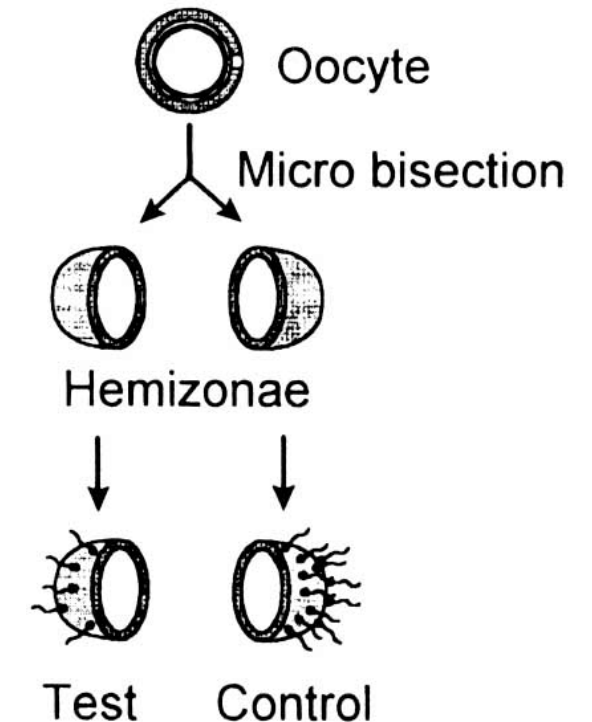
Sperm penetration assay (SPA)

- 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)
- U normozoospermiků převažují nulizomie, následované dizomiemi a diploidiiemi.
- Chromozomální abnormality jsou signifikantně zvýšeny u mužů, jejichž partnerky prodělaly opakovanou těhotenskou ztrátu

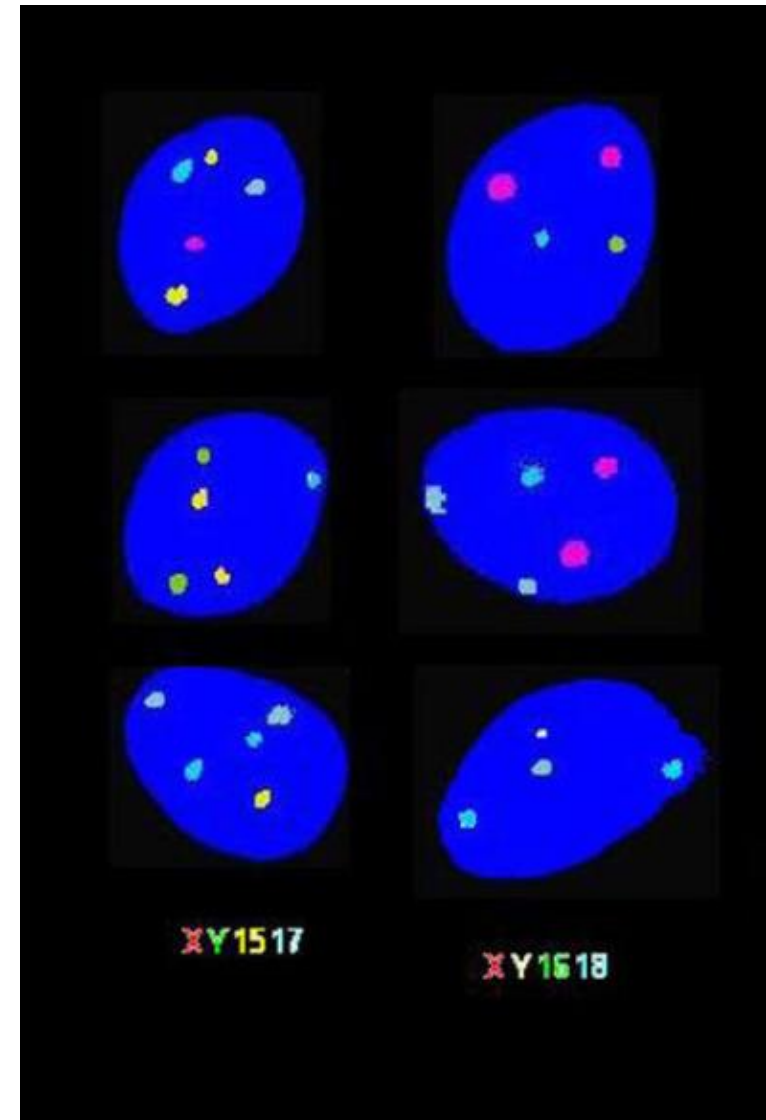


Table 3.3 Basic levels of sperm chromosome disomy of healthy fertile men

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)