



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

ANDROLOGIE - CVIČENÍ

Soňa Kloudová

Projekt: Masarykova univerzita 4.0
Reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002418

MUNI
LÉKAŘSKÁ
FAKULTA

BRNO 2022

Autor: Mgr. Soňa Kloudová, Ph.D.



Toto dílo je šířeno pod licencí
CC BY-SA 4.0 Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International

Obsah

1	Úvod	5
2	Základní analýza ejakulátu	6
3	Hodnocení koncentrace spermií	8
4	Hodnocení motility spermií	13
5	Hodnocení morfologie spermií	16
6	Práce s Maklerovou komůrkou	20
7	Vitalita spermií, protilátky proti spermiím, fragmentace DNA spermií	22
8	Vliv externích faktorů na funkční vlastnosti spermií	24
9	Separace spermií – gradientová centrifugace	26
10	Separace spermií- metoda Swim up	28
11	Praktický nácvik kryokonzervace ejakulátu	30
12	Praktický nácvik rozmrazení ejakulátu	32
13	Návštěva andrologické laboratoře	34
14	Exkurze – CASA	35
	Použité literární zdroje	36

1 Úvod

Praktická cvičení z andrologie jsou zaměřena na reálný obraz v klinické praxi a zároveň nabízejí vhled do specializovaných oblastí andrologické diagnostiky.

V rámci cvičení se studenti naučí zpracování ejakulátu, stanovení a vyhodnocení spermiogramu. Dále budou seznámeni s některými speciálními metodami stanovení kvality spermií (DNA fragmentace, stanovení apoptózy, test na přítomnost protilátek proti spermiím a další).

Po absolvování předmětu budou studenti schopni zhodnotit morfolickou a funkční kvalitu spermií dle WHO kritérií, provádět běžné diagnostické testy a zpracovat ejakulát pro použití in vitro.

2 Základní analýza ejakulátu

Úkol: Proved'te základní posouzení kvality ejakulátu, zhodno'tte objem, zabarvení, viskozitu, změřte pH vzorku, posuďte přítomnost kulatých buněk, epitelálních buněk a buněčných úlomků, posuďte přítomnost agregace/aglutinace spermií

Pomůcky: rukavice, podložní skla se zábrusem/bez zábrusu, krycí skla, špičky na pipety, počítačka, kalkulačka, barvicí sada DipQuick, pH štítky

Přístroje: pipety, mikroskop, digestoř

Postup:

- Zkapalnění hodnotíme prohlédnutím vzorku v nádobce za současného jemného promíchání krouživým pohybem ruky. Zkapalněný ejakulát je homogenní a v nádobce se přelévá souměrně. Vzorek by měl zkapalnit do 60 minut po odběru, může obsahovat želatinové inkluze, které nemají klinický význam nebo mukózní vlákna způsobující agregace, jejichž přítomnost by měla být sledována
- Viskozita se hodnotí pomocí Pasteurovy pipety. Nasajeme vzorek do Pasteurovy pipety a pomalu jej vypouštíme zpět do nádoby. Vzorek by měl plynule odkapávat. Viskozita se označí jako abnormální, pokud se při odkapávání tvoří vlákno delší než 2 cm.
- Pomocí Pasteurovy pipety nebo pipety Eppendorf se nanese kapka ejakulátu na indikátorový papírek pro hodnocení pH a zhodnotíme výsledek podle barevné stupnice na štítku. Jako abnormální pH se označuje $\text{pH} < 7.2$.
- **Příprava nativního preparátu:** Jemným promícháním kelímku krouživými pohyby ruky se provede homogenizace vzorku. Pomocí pipety Eppendorf se nanese 10 μl ejakulátu na mikroskopické podložní sklo a překryje se krycím sklem o velikosti 22 x 22mm. Dbá se na to, aby nedošlo k vytvoření bublin. Pokud se tak stane, zhotoví se nový preparát. Protože ejakulát je velmi variabilní, zhotovíme nativní preparáty vždy 2 (na jednom podložním skle). Na preparátu se následně hodnotí shlukování spermií, přítomnost ostatních buněčných elementů a pohyblivost spermií podle postupu níže.
- Shlukování spermií pozorujeme na nativním preparátu pod zvětšením 200x. Pokud je v ejakulátu pozorováno shlukování spermií, zaznamená se, zda se jedná o agregaci nebo o aglutinaci. Jako agregace spermií se označí stav, kdy jsou v ejakulátu pozorovány shluky nemotilních spermií nebo adherence motilních spermií na mukózní vlákna, ostatní buňky či buněčné úlomky. Jako aglutinace spermií se označí stav, kdy jsou v ejakulátu pozorovány shluky motilních spermií.
- Přítomnost ostatních buněčných elementů se pozoruje na nativním preparátu pod zvětšením 400x nebo 200x. Z nativního preparátu se odečte přítomnost kulatých buněk, erytrocytů, epitelíí a buněčných úlomků. Ve výjimečných případech mohou

být pozorovány bakterie nebo protozoa, jejich přítomnost se zaznamená v poznámce v protokolu a rovněž se uvede ve výsledkové listině.

- V případě výskytu kulatých buněk se stanovuje jejich koncentrace.

Pokud je v zorném poli při zvětšení 400 x přítomno 4 a méně kulatých buněk, uvádí se výsledná koncentrace jako $\leq 1 \times 10^6$ kulatých buněk/ml.

Pokud je při zvětšení 400x nalezeno více než 4 kulatých buněk na zorné pole, stanovuje se přesná koncentrace kulatých buněk pomocí Neubauerovy komůrky (dnes neprovádíme).

Zápis:

Datum:

Zkapalnění: normální / abnormální

Viskozita: normální / abnormální

pH:

Agregace: ano / ne

Aglutinace: ano / ne

Ostatní buněčné elementy:

Koncentrace kulatých buněk: $\leq 1 \times 10^6$ / $>1 \times 10^6$

Poznámky:

Otázky:

Jaké buňky zahrnujeme do kategorie kulatých buněk? Lze je od sebe rozeznat v nativním preparátu?

Jaký je rozdíl mezi zkapalněním a viskozitou?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

3 Hodnocení koncentrace spermií

Úkol: Proved'te hodnocení koncentrace spermií pomocí Neubauerovy komůrky

Pomůcky:

Rukavice, přřízezy, špičky na viskózní vzorky

Přístroje:

Neubauerova komůrka, pipeta na viskózní vzorky, vortex, mikroskop, počítačka

Postup:

- Po důkladném promíchání ejakulátu odeberte 10 μ l vzorku a připravte nativní preparát. Zhodnoťte počet spermií na zorné pole při zvětšení 20x nebo 40x a podle tabulky č. 1, se zvolí vhodné ředění ejakulátu. Ejakulát v mikrozkuřavce nařeďte ředidlem pro výpočet koncentrace a koncentrace spermií se z takto připraveného preparátu hodnotí ve světelném poli v Neubauerově komůrce.

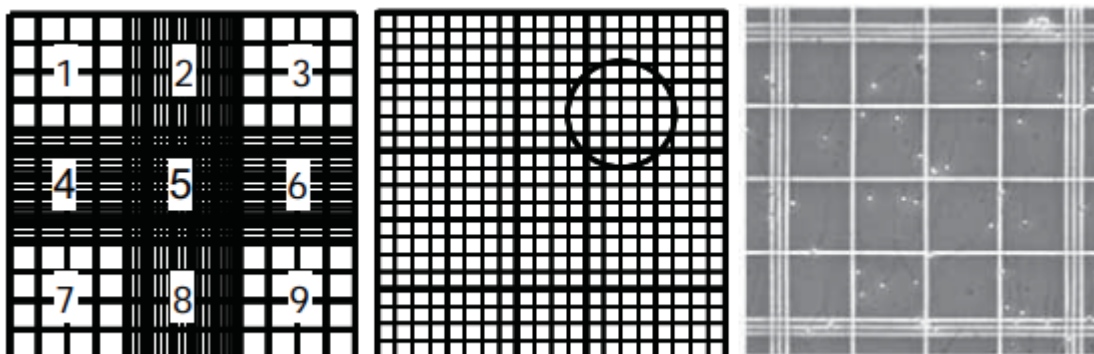
Tabulka 1: Výběr vhodného ředění ejakulátu pro výpočet koncentrace spermií v Neubauerově komůrce.

Počet spermií na zorné pole 400x	Počet spermií na zorné pole 200x	Požadované ředění	Ejakulát (μ l)	Fixativum (μ l)	Čtverce k hodnocení
> 101	> 404	1:20	50	950	čtverce 5, 4, 6
16 - 100	64 - 400	1:5	50	200	čtverce 5, 4, 6
2 - 15	8 - 60	1:2	50	50	čtverce 5, 4, 6
< 2	< 8	1:2	50	50	všech 9 čtverců

- Ihned po naředění mikrozkuřavku se vzorkem po dobu 10 sekund vortexujte
- Povrch Neubauerovy komůrky se lehce navlhčí „dýchnutím“ a na mřížky se umístí krycí sklo, krycí sklo se jemným tlakem prsty pevně usadí.
- Po vortexování vzorku, pipetou Eppendorf ihned odeberte 10 μ l vzorku, který následně naneste do horního oddílu Neubauerovy komůrky.
- Stejným způsobem připravte druhý vzorek pro výpočet koncentrace a naneste do druhé, dolní, části Neubauerovy komůrky. Komůrka se umístí na 4 - 7 minut do vlhkého prostředí. Vlhké prostředí se vytvoří umístěním navlhčené buničiny do plastové dózy s těsným víkem.
- Výpočet se provádí při zvětšení 200x nebo 400x. Začíná se hodnocením centrálního čtverce (viz obr. č. 1, čtverec č. 5) a postupuje se zleva doprava, po jednotlivých řádcích.

Obrázek 1. Schéma Neubauerovy komůrky.

Neubauerova komůrka se skládá z 9 mřížek, centrální mřížka č. 5 se skládá z 25-ti velkých čtverců, z nichž každá se stává z 16 malých čtverců. Řádkem se při výpočtu rozumí každý tučněji odlišený vodorovný řádek. Mřížka 5, 4 a 6 tedy obsahuje 5 řádků (každý po pěti čtvercích, z nichž každý čtverec obsahuje 14 malých čtverců). Mřížky 1 - 3 a 7 - 9 obsahují řádky 4.



- Počítají se pouze celé spermie (s hlavičkami a bičíky), počítají se hlavičky, orientace bičíku přitom není podstatná. Hranice čtverce je dána středními liniemi (viz obrázek č. 1 vpravo), spermie se započítá, pokud její hlavička leží mezi oběma vnitřními liniemi čtverce. Pokud část hlavičky spermie leží na prostřední linii, počítají se pouze spermie na levé a spodní linii (tvar písmene L). Počet spermií se zaznamenává na elektronické počítače.
- V případě ředění **1:20 a 1:5 (a 1:50)** se hodnotní **v mřížkách 5, 4 a 6**. V první komůrce se počítá po jednotlivých řádcích, dokud není napočítáno minimálně 200 spermií. Ve druhé komůrce se počítá stejný počet řádků nezávisle na výsledném počtu spermií (může jich být méně než 200). Vždy se **dokončí výpočet řádku** a do pracovního listu se poznamená **počet řádků** použitých pro výpočet a počet zhodnocených spermií.
- V případě ředění **1:2 s doporučením výpočtu v mřížkách 5, 4 a 6**, se počítá po jednotlivých řádcích, dokud není napočítáno minimálně 200 spermií, dokončí se výpočet celé mřížky. Ve druhé komůrce se počítá stejný počet mřížek jako v první komůrce, nezávisle na výsledném počtu spermií (může jich být méně než 200). Vždy se **dokončí výpočet celé mřížky** a **poznamená se počet mřížek** použitých k výpočtu a počet zhodnocených spermií.
- V případě ředění **1:2 s doporučením výpočtu ve všech 9 mřížkách** se počítá po jednotlivých mřížkách, vždy se dokončí výpočet všech devíti mřížek. Stejně se spočítá druhá replika.
- Vypočte se rozdíl obou výpočtů a porovná se s tabulkou č. 2. Pokud je rozdíl akceptovatelný, lze pokračovat ve výpočtu. Pokud není, výpočet koncentrace se provede znovu (včetně ředění).

Tabulka 2. Akceptovatelné rozdíly mezi dvěma opakováními pro součet obou opakování

Součet	Akceptovatelný rozdíl	Součet	Akceptovatelný rozdíl	Součet	Akceptovatelný rozdíl
35-40	12	144-156	24	329-346	36
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

- Pokud ani třetí opakování výpočtu koncentrace spermií není adekvátní, zprůměrují se všechny zjištěné hodnoty.
- Pokud po zhodnocení všech doporučených čtverců nedosáhneme počtu 200 spermií, provede se nižší ředění (kde je to možné).
- K výpočtu koncentrace spermií se používají vzorce, kdy koncentrace spermií v ejakulátu je jejich počet, dělený objemem, ve kterém byly nalezeny, za současného zohlednění ředícího faktoru.
- V případě ředění **1:5**, **1:20** a **1:50** se použije vzorec

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{ředící faktor}$$

kde C je koncentrace v **10⁶/ml**, N je celkový počet spermií (součet obou replik) a n je celkový počet řádků (součet řádků obou replik), ředící faktor má hodnotu 5 pro ředění 1:5, 20 pro ředění 1:20 a 50 pro ředění 1:50

- V případě ředění **1:2 s hodnocením mřížek 5, 4 a 6** se použije vzorec

$$C = (N/n) \times (1/100) \times 2$$

kde C je koncentrace v **10⁶/ml**, N je celkový počet spermií, (součet obou replik) a n je celkový počet mřížek (součet mřížek obou replik), ředící faktor má hodnotu 2

- V případě ředění 1:2 s hodnocením celé plochy komůrky se použije vzorec

$$C = (N/1.8) \times 2$$

kde C je koncentrace v **10³/ml**, N je celkový počet spermií (součet obou replik), objem obou ploch Neubauerovy komůrky tvoří 1.8 µl, ředící faktor má hodnotu 2

Pokud je při ředění 1:2 v každé části Neubauerovy komůrky nalezeno méně než 25 spermií (tedy celkem v obou výpočetních plochách Neubauerovy komůrky méně než 50

spermií), zaznamená se výsledná koncentrace jako < 56000 spermií/ml. Do závěru se uvede poznámka, že pro přesný výpočet koncentrace spermií byl nalezen příliš nízký počet spermií.

Zápis:

Datum:

KONCENTRACE	ředění:		mřížek k hodnocení:			součet	výsledná
replika	řádků/mřížek	počet spermií	součet replik	rozdíl replik	akceptováno	řádků/mřížek	koncentrace
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
			Průměrná koncentrace(repliky 1-6) při nakcept. opakováních:				

Poznámky:

Nákres: zakreslete čtverec č. 5 (prostřední) mřížky Neubauerovy komůrky, vyznačte do něj spermie a označte ty, které se do výpočtu „nepočítají“

Otázky:

Jakým způsobem při počítání spermií zajistíme, abychom jednu spermii nezapočítali vícekrát?

Proč je nutné spermie pře výpočtem koncentrace imobilizovat?

Je možné provádět hodnocení koncentrace v neubauerově komůrce v embryologické laboratoři? Proč?

Z jakého důvodu při stanovení koncentrace spermií používáme na ejakulát speciální pipety na špičky s vnitřním pístem?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

4 Hodnocení motility spermií

Pomůcky:

Rukavice, přřezy, podložní skla bez zábrusu, krycí skla, špičky, instruktážní video

Přístroje:

Pipeta, mikroskop, počítačka

Postup:

- Hodnotí se mikroskopicky ve světelném poli v nativním preparátu při zvětšení 200x nebo 400x.
- Hodnocení se provádí na vyhřevné ploténce předem vyhřáté na 37 °C.
- Připraví se nativní preparát a vyčká se, než v preparátu ustane proudění.
- Hodnotí se minimálně 5 mm od okraje krycího sklíčka, aby pohyb nebyl ovlivněn vysycháním preparátu.
- Hodnotí se následující kategorie pohybu spermií:
 - Progresivní spermie:** aktivně se pohybující spermie, nezávisle na směru pohybu, včetně pohybu ve velkých kruzích.
 - Neprogresivní spermie:** všechny ostatní stupně pohybu (pouhé kmitání bičíku, pohyb v malých kroužcích nebo stav, kdy je hlavička silou bičíku jen "ztěžka posunována").
 - Nepohyblivé spermie:** žádný pohyb.
- Mikroskopický preparát se mikroskopem projíždí systematicky tak, aby žádné zorné pole nebylo zhodnoceno dvakrát. Zorná pole se často střídají, bez ohledu na počet motilních spermií v zorném poli.
- Motilita spermií se hodnotí na definované ploše zorného pole. Nejdříve se počítají progresivní spermie a poté na stejné ploše zorného pole současně neprogresivní a nepohyblivé spermie. Výsledek se zaznamenává na elektronickou počítačku.
- Prohlíží a počítá se rychle, aby se předešlo nadhodnocení progresivních spermií, počítají se spermie původně přítomné v hodnocené části zorného pole, nepočítají se spermie, které do hodnocené části zorného pole připlavou v průběhu hodnocení (nevracíme se v hodnocení do již zhodnocené plochy).
- Špendlíkovité hlavičky (pohybující se bičík bez hlavičky) se nezapočítávají, nečeká se, až spermie do zorného pole připlave.

- Počítá se minimálně 200 spermií na minimálním počtu 5 zorných polí.
- Vždy se dokončí hodnocení vybraného úseku zorného pole pro kategorii progresivních, neprogresivních i nepohyblivých spermií
- Hodnocení se provádí ve 2 opakováních, pro druhé opakování se připraví nový preparát.
- Počty spermií v jednotlivých kategoriích se přepočítají na procentuální podíly.
- Procentuální hodnoty získané oběma hodnoceními se zprůměrují. Následně se vybere početně nejvíce zastoupená kategorie pohybu spermií, vypočte se rozdíl mezi oběma hodnoceními pro tuto kategorii, a zhodnotí se, zda rozdíl prvního a druhého hodnocení motility je v rámci této kategorie akceptovatelný (viz tab. 3). Pokud je rozdíl hodnocení příliš vysoký, zhotoví se nové preparáty a hodnocení se zopakuje. Původní hodnocení přitom již není bráno v úvahu a záznam do protokolu je uveden pouze z výsledků hodnocení s akceptovatelným rozdílem.
- Pokud nebylo možné hodnotit 200 spermií, neprovádí laborant hodnocení akceptovatelnosti rozdílů a poznamená skutečnost do protokolu.
- Součtem podílu progresivních a neprogresivních spermií je zjištěn podíl motilních spermií.

Tabulka 3. Akceptovatelný rozdíl mezi dvěma procenty pro daný průměr

Průměr (%)	Akceptovatelný rozdíl	Průměr (%)	Akceptovatelný rozdíl
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

Zápis:

- Datum:

MOTILITA	počet spermií				průměrný podíl (%)			nejzastoupenější kategorie		akcept.
replika	progres.	neprogres.	nepohyb.	celkem	progres.	neprogres.	nepohyb.	rozdíl	průměr	ANO/NE)
1.										
2.										
3.										
4.										
5.										
6.										
	průměr dvou akceptovaných replik:						celková motilita (%) :			

Poznámky:**Otázky:**

Jaký je rozdíl v pohyblivosti spermií hodnocené při pokojové teplotě a při 37°C?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

5 Hodnocení morfologie spermií

Pomůcky:

Rukavice, přřízezy, podložní skla, roztěrová skla se zkosenými hranami, pipety, barvicí sada

Přístroje:

lednice, inkubátor, teploměr, minutky

Postup:

- Pipetou Eppendorf se nanese 10 μ l vzorku ejakulátu na podložní sklo se zábrusem, pomocí roztěrového skla se provede roztěr (viz obrázek) a vzorek se nechá oschnout na vzduchu. Stejným způsobem se připraví druhý roztěr.



- Pokud se spermie na roztěru vzájemně překrývají, vzorek se opatrně po kapkách za stálého promíchávání naředí promývacím médiem. Pokud se provedlo ředění vzorku, poznamená se tato skutečnost do poznámky v protokolu.
- Po zaschnutí se mikroskopický preparát přenese do digestoře, kde se fixuje a obarví pomocí barvicí sady Dip Quick:

Při barvení barvicí sadou Dip Quick se roztěr ponoří 3x do fixačního roztoku, 1x do roztoku č. I a 2x do roztoku č. II, nakonec se provede oplach skla destilovanou vodou ze stříčky.
- Po zaschnutí se na každém preparátu hodnotí minimálně 200 spermií pod imerzí při zvětšení 1000x, vždy se dokončí hodnocení celého zorného pole
- Na počítači se zaznamenávají se následující kategorie:
 - počet spermií s normálním tvarem
 - počet spermií s jakýmkoliv defektem
 - počet spermií s defektem hlavičky

- počet spermií s defektem střední části (včetně spermií s nadměrným cytoplasmatickým residuem)
- počet spermií s defektem bičíku

- **Morfologicky normální spermie:**

Hlavička je hladká, pravidelně tvarovaná, spíše oválného tvaru, akrozomální region je dobře patrný a zabírá 40-70 % plochy hlavičky; akrozom nemá obsahovat velké vakuoly a nemá obsahovat více než 2 malé vakuoly, které nemají zabírat více než 20% plochy hlavičky, postakrozomální region nemá obsahovat vakuoly. Tvar hlavičky je důležitější než její rozměry, pokud hlavička není abnormálně velká.

Střední část je tenká, s pravidelným obrysem a má přibližně stejnou délku jako hlavička. Hlavní osa střední části by měla být zarovnaná s hlavní osou hlavičky, může obsahovat cytoplasmatickou kapénku, která však nesmí být větší než 1/3 hlavičky spermie (v takovém případě se jedná o nadměrné cytoplasmatické residuum).

Bičík je přibližně 45 µm dlouhý (tato velikost odpovídá přibližně desetinásobku délky hlavičky spermie), je tenčí než střední část a má stejný průměr po celé své délce, může být ohnutý (i do smyčky), ale nesmí na něm být patrný zlom.

- Číselné hodnoty jednotlivých kategorií se převedou na procentuální podíly a výsledky obou výpočtů se zprůměrují. Zhodnotí se, zda je podíl obou hodnocení v rámci kategorie morfologie normálních spermií akceptovatelný (viz tabulka č. 3). Pokud je rozdíl příliš vysoký, hodnocení se zopakuje. Pokud nebylo možné zhodnotit 2x 200 spermií, poznamená se skutečnost do protokolu a neprovádí se hodnocení akceptovatelnosti rozdílů obou hodnocení.
- Do protokolu se zapíše průměrné podíly spermií s normálním tvarem a průměrný podíl spermií s defektem hlavičky, střední části, bičíku a s cytoplasmatickou kapénkou z celkového počtu hodnocených spermií.
- **Výsledky hodnocení morfologie:** výsledek se uvádí jako podíl spermií s normálním tvarem, dále se ve výsledkové listině uvádí podíl spermií s defektem hlavičky, podíl spermií s defektem střední části a podíl spermií s defektem bičíku.
- Z obarveného nátěru ejakulátu se provádí kontrolní **odečet přítomnosti jiných buněk** (provede se i při azoospermii/kryptozoospermii):
 - Vývojové buňky spermií (spermatogeneze) - spermatogonie, spermatocyty, spermatidy (viz atlas morfologie spermií). Nezralé zárodečné buňky spermií se často zaměňují za buňky leukocytů, jsou si velmi podobné, můžeme je rozlišit podle jejich velikostí buněk a barvou cytoplazmy.
 - Leukocyty - především neutrofilní segmenty, monocyty, lymfocyty, makrofágy (viz atlas morfologie spermií), při nadměrném množství $\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$ PMN leukocytů = leukocytospermie - (leukospermie, pyospermie, viz 0290 SOP A Detekce PMN leukocytů barvením cytoplasmatické peroxidázy) – po domluvě s lékařem odeslat ejakulát na mikrobiologické vyšetření do laboratoře Aeskulab.

- Bakterie, protozoa - po domluvě s lékařem odeslat ejakulát na mikrobiologické vyšetření do laboratoře Aeskulab.

Norma: 4% a více spermií s normálním tvarem

Abnormální: pod 4% spermií s normálním tvarem - TERATOZOOSPERMIE

Nákres:

Zakreslete pro každou část spermie 2 typy defektů, které jste pozorovali:

Zápis:

Datum:

MORFOLOGIE				defekt			%	% normálních		akceptováno
replika	normální	abnormální	celkem	hlavička	stř. část	blížík	normál.	rozdíl	průměr	
1.										
2.										
1.										
2.										
1.										
2.										
	% defektních spermií		1. replika				Pozn:			
			2. replika							
			průměr							

Poznámky:

Otázky:

Vypište, jaké defekty jste v preparátu pozorovali.

Hlavička:

Střední část:

Bičík:

Které defekty jsou nejčastější?

Vypište, které typy ostatních buněk jste měli možnost na obarveném preparátu pozorovat:

Jakých rozdílů jste si všimli při pozorování připravených instruktážních roztěrů spermií?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

6 Práce s Maklerovou komůrkou

Pomůcky:

Rukavice, přilepy, špičky, Maklerova komůrka

Přístroje:

Mikroskop



Postup:

- Ejakulát se dobře promíchá a odebere se 10 μ l vzorku, který se kápne na Maklerovu komůrku (bez bublin a jiných artefaktů, pokud jsou přítomny bubliny a artefakty, je nutné provést nové nanesení vzorku).
- Hodnotíme 10 čtverců (1 řada) nebo ve 100 čtvercích (10 řad) podle počtu spermií ve čtverečku Maklerovy komůrky (horizontálně nebo vertikálně), nebo ve 100 čtvercích (do 5 mil), do počtu se nezahrnují spermie, co mají špendlíkovou hlavičku.
- Konečný počet spermií se získá sečtením počtu všech spermií v hodnocených čtvercích.

- Hodnotí se podle počtu odečtených čtverců:

V 10 čtvercích	$c = n \times 1 \times 10^6/\text{ml}$
Ve 100 čtvercích	$c = n / 10 \times 10^6/\text{ml}$

- Při vysoké koncentraci se může vzorek ejakulátu naředit médiem pro spermie (ejakulát se neředí, pokud je porucha zkapalnění). Ředění je nutné zaznamenat a kalkulovat s ním při konečném výpočtu koncentrace (při ředění 1:1, se výsledná koncentrace násobí dvěma)
- Nanesení kapky a zhodnocení zopakujeme 3x, výsledné hodnoty zprůměrujeme.
- Hodnotíme nejdříve progresivní spermie – zapíšeme číslo, následně přičítáme spermie pohybující se na místě- zapíšeme číslo a nakonec přičítáme nepohyblivé spermie – zapíšeme číslo; hodnoty zapisujeme zprava do leva. Jednotlivé výpočty (čtverce nebo řádky) zapisujeme pod sebe, nakonec hodnoty pod sebou sečteme a vypočteme tak konečnou koncentraci spermií a motilitu spermií.

Zápis:

Datum:

Výpočet provádíme v: 10 čtvercích / deseti řádcích

1)

2)

3)

Poznámky:**Otázky:**

Která z komůrek – Maklerova vs Neubauerova- je přesnější pro výpočet koncentrace spermií a proč?

Jaká je výhoda Maklerovy komůrky?

Čím čistíme Maklerovu komůrku?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

7 Vitalita spermií, protilátky proti spermiím, fragmentace DNA spermií

Pomůcky:

zkumavky, Pasteurovy pipety, 0,5 ml pejety, médium na ředění spermií, kryokonzervační médium, vodní lázeň, polystyrenový box, tekutý dusík,

Přístroje:

lednice, tavička na pejety, teploměr, minutky

Postup:

- Připravíme si zkumavku, popíšeme identifikátorem vzorku a datem, Pasteurovou pipetou do zkumavky umístíme 0,5 ml suspenze spermií
- Pasteurovou pipetou se odebere stejný objem vytemperovaného mrazícího média, jako je objem kryokonzervovaného ejakulátu a toto médium se po kapkách za stálého jemného promíchávání krouživými pohyby zápěstí přidává k suspenzi spermií.
- Po smíchání celého objemu přidávaného mrazícího média s ejakulátem, se nechá odběrová nádobka stát při laboratorní teplotě 3 minuty, následuje plnění pejet.
- Připraví se 0,5 ml pejety, jejichž počet závisí na objemu směsi ejakulátu a mrazícího média, popíšeme straws jednoznačným identifikátorem a na každou pejetu nasadíme sterilní plnicí násadec (nozzle).
- Naředěný ejakulát se přes sterilní násadec nasaje pomocí injekční stříkačky do straws, na konci straw, kde není vatová zátky, se ponechá vzduchová bublina asi 1-0,5 cm. Oba konce straw se zataví pomocí ultrazvukové tavičky na pejety.
- Straws se vloží do nádoby s vodou o pokojové teplotě (asi 250 ml) a umístí se na 30 minut do lednice.
- Připravíme polystyrenový box s tekutým dusíkem a držáky na pejety umístěnými asi 10-12 cm nad hladinou tekutého dusíku.
- Po 30 minutách vyjmeme pejety pinzetou z vody, osušíme je gázou a přemístíme na 30 minut do par tekutého dusíku (10-12 cm nad hladinou dusíku). Po 30 pejety ponoříme do tekutého dusíku a uložíme na patřičné místo do Dewarovy nádoby (mapu uložení zapíšeme pro příští rozmrazení).

Zápis:

Datum:

Objem kryokonzervovaného vzorku:

Motilita spermií před kryokonzervací:

Teplota vodí lázně:

Teplota v lednici:

Počet zamrazených pejet:

Označení kryokonzervovaných pejet

Uložení kryokonzervovaných pejet

Náčrt pejet s kryokonzervovaným materiálem:

Poznámky:

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

8 Vliv externích faktorů na funkční vlastnosti spermií

Úkol: Zjistěte jaký efekt má na ejakulát teplotní stres. Proved'te farmakologickou aktivaci pohybu spermií pomocí teofylinu.

Pomůcky:

mikrozkumavky, Pasteurovy pipety, médium na ředění spermií, SpermMobil

Přístroje:

lednice, inkubátor, teploměr, minutky

Postup:

- Připravíme si 4 mikrozkumavky a popíšeme identifikátorem vzorku a datem a označíme čísla 1-4.
- Vzorek spermií rozdělíme pipetou po 50 μ l do připravených zkumavek.
- Ve zkumavce č. 1 spočítáme pohyblivost spermií a vložíme ji do inkubátoru (37°C) – tento vzoreček nám bude sloužit jako kontrola. Po 30 minutách stanovíme motilitu spermií.
- Zkumavku číslo 2 necháme inkubovat 30 minut při pokojové teplotě, poté stanovíme motilitu spermií.
- Zkumavku číslo 2 necháme inkubovat 30 minut v lednici, poté stanovíme motilitu spermií.
- Do zkumavky č. 4 přidáme 5 μ l média SpermMobil a vložíme do inkubátoru na 10 minut. Poté stanovíme motilitu spermií.

Zápis:

Datum:

Motilita spermií v kontrolním vzorku v čase t_0 :

Motilita spermií ve vzorku s přídavkem média SpermMobil po inkubaci:

Motilita spermií ve vzorku inkubovaném 30 minut při pokojové teplotě:

Motilita spermií v kontrolním vzorku inkubovaném 30 minut při 37°C:

Poznámky:**Otázky:**

Jaký efekt má teplota na kvalitu spermií?

Popište rozdíl v pohyblivosti spermií ve vzorku inkubovaném při 37°C a ve vzorku inkubovaném při laboratorní teplotě.

Měl přídavek teofylinu efekt na pohyblivost spermií? Jaký je mechanismus aktivace pohybu teofylinem?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

9 Separace spermií – gradientová centrifugace

Úkol: proveďte zpracování ejakulátu nebo rozmrazeného vzorku pomocí metody gradientové centrifugace

Pomůcky: rukavice, přřezy, zkumavky, špičky, podložní a krycí skla, zkumavky

Přístroje: inkubátor, centrifuga, mikroskop

Postup:

- Gradient Isolate (Irvine) se připravuje ihned po odběru ejakulátu.
- Všechny použité zkumavky musí být náležitě označeny štítkem s identifikačními údaji pacienta.
- Připravte kónickou zkumavku a na její dno umístěte Pasteurovou pipetou 2 ml 90 % ISolate lower layer (Irvine), na tuto vrstvu opatrně navrstvěte novou Pasteurovou pipetou 2 ml 40 % ISolate (Irvine) upper layer, přesvědčte se vizuálně, že je přítomno rozhraní v gradientu. Gradient se v pevně uzavřené zkumavce vloží na 30 minut k zahřátí do inkubátoru (37 °C).
- Na gradient se opatrně navrství 1-2 ml ejakulátu a provede se centrifugace (20 minut, 200-300 g).
- pomocí Pasteurovy pipety se odsaje zbylý ejakulát i obě vrstvy gradientu až po sediment.
- Pellet se naředí pomocí Pasteurovy pipety v malém množství média (do 0,5 ml) , naředí se 2 ml média na ředění spermií a provede se centrifugace (5-10 minut, 300 -600 g).
- Pomocí Pasteurovy pipety se odsaje médium až na sediment a přidá se as 200 µl média.
- Proveďte se zhodnocení motility a koncentrace spermií v Maklerově komůrce.
- Proveďte se výpočet zisku spermií: stanovíme kolik motilních spermií bylo ve vstupním vzorku určeném k separaci a kolik motilních spermií jsme získali po separaci, zisk následně vyjádříme procentuálně (tj procento vyseparovaných motilních spermií z celkového počtu motilních spermií použitých pro separaci)

Nákres: Zakreslete schéma kolony Swim up

Zápis:

Datum:

Identifikátor vzorku:

Motilita a koncentrace vzorku před zpracováním:

Motilita a koncentrace vzorku po separaci:

Objem zpracovávaného vzorku:

Objem vzorku získaný po separaci:

Zisk spermií:

Poznámky:**Otázky:**

Popište, kterými faktory může být ovlivněn celkový zisk spermií.

Pro které vzorky je / není vhodná metoda Swim up?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

10 Separace spermií- metoda Swim up

Úkol: proveďte separaci spermií pomocí metody Swim up. Vypočtete procentuální zisk spermií.

Pomůcky: rukavice, přřezy, zkumavky, špičky, podložní a krycí skla, zkumavky

Přístroje: mikroskop, centrifuga, inkubátor

Postup:

- Do označené konické zkumavky se pomocí Pasteurovy pipety přenese 2ml separačního média, Pasteurovou pipetou se nabere 0,5 - 1 μ l ejakulátu (podle kvality vzorku) a opatrně se ponoří na dno zkumavky a podvrství pod médium. Případně lze obráceným postupem navrstvit ejakulát na médium.
- Zkumavka se vloží do kovového stojanu pod úhlem 45° a vloží do inkubátoru Labotect (6% CO₂ / 37 °C) a spermie se nechají 30-60 minut vycestovat (Do protokolu pacienta se запиše čas začátku zpracování, metoda zpracování a použité médium).
- Po uplynulé době se opatrně z inkubátoru vyjme stojan.
- Ze zkumavky se pomocí pipety se špičkou stáhne shora 1,5 ml média s vycestovanými spermiemi, přenese se do druhé centrifugační zkumavky. Kterou centrifugujeme 5 minut při 400g
- Po stažení vzorku peletu naředíme 200 μ l média
- V mikroskopu se hodnotí na Maklerově komůrce koncentrace a celková pohyblivost spermií.
- Proveďte se výpočet zisku spermií: stanovíme kolik motilních spermií bylo ve vstupním vzorku určeném k separaci a kolik motilních spermií jsme získali po separaci, zisk následně vyjádříme procentuálně (tj procento vyseparovaných motilních spermií z celkového počtu motilních spermií použitých pro separaci)

Nákres: Zakreslete schéma kolony Swim up

Zápis:

Datum:

Identifikátor vzorku:

Motilita a koncentrace vzorku před zpracováním:

Motilita a koncentrace vzorku po separaci:

Objem zpracovávaného vzorku:

Objem vzorku získaný po separaci:

Zisk spermií:

Poznámky:

Otázky:

Popište, kterými faktory může být ovlivněn celkový zisk spermií.

Pro které vzorky je / není vhodná metoda Swim up?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis)

11 Praktický nácvik kryokonzervace ejakulátu

Úkol: proveďte kryokonzervaci ejakulátu v parách tekutého dusíku. Spočtete motilitu spermií před kryokonzervací.

Pomůcky: zkumavky, Pasteurovy pipety, 0,5 ml pejety, médium na ředění spermií, kryokonzervační médium, vodní lázeň, polystyrenový box, tekutý dusík,

Přístroje: lednice, tavička na pejety, teploměr, minutky

Postup:

- Připravíme si zkumavku, popíšeme identifikátorem vzorku a datem, Pasteurovou pipetou do zkumavky umístíme 0,5 ml suspenze spermií
- Pasteurovou pipetou se odebere stejný objem vytemperovaného mrazícího média, jako je objem kryokonzervovaného ejakulátu a toto médium se po kapkách za stálého jemného promíchávání krouživými pohyby zápěstí přidává k suspenzi spermií.
- Po smíchání celého objemu přidávaného mrazícího média s ejakulátem, se nechá odběrová nádobka stát při laboratorní teplotě 3 minuty, následuje plnění pejet.
- Připraví se 0,5 ml pejety, jejichž počet závisí na objemu směsi ejakulátu a mrazícího média, popíšeme straws jednoznačným identifikátorem a na každou pejetu nasadíme sterilní plnicí násadec (nozzle).
- Naředěný ejakulát se přes sterilní násadec nasaje pomocí injekční stříkačky do straws, na konci straw, kde není vatová zátky, se ponechá vzduchová bublina asi 1-0,5 cm. Oba konce straw se zataví pomocí ultrazvukové tavičky na pejety.
- Straws se vloží do nádoby s vodou o pokojové teplotě (asi 250 ml) a umístí se na 30 minut do lednice.
- Připravíme polystyrenový box s tekutým dusíkem a držáky na pejety umístěnými asi 10-12 cm nad hladinou tekutého dusíku.
- Po 30 minutách vyjmeme pejety pinzetou z vody, osušíme je gázou a přemístíme na 30 minut do par tekutého dusíku (10-12 cm nad hladinou dusíku). Po 30 pejety ponoříme do tekutého dusíku a uložíme na patřičné místo do Dewarovy nádoby (mapu uložení zapíšeme pro příští rozmrazení).

Zápis:

- Datum:
- Objem kryokonzervovaného vzorku:
- Motilita spermií před kryokonzervací:
- Teplota vodí lázně:
- Teplota v lednici:
- Počet zamrazených pejet:
- Označení kryokonzervovaných pejet
- Uložení kryokonzervovaných pejet

Náčrt pejety s kryokonzervovaným materiálem:

Poznámky:

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

12 Praktický nácvik rozmrazení ejakulátu

Úkol: Rozmrazte svůj dříve zamrazený vzorek, vyseparujte spermie, všimněte si rozdílů v pohyblivosti spermií po rozmrazení a po zpracování, porovnejte i s pohyblivostí před zamrazením (informace z předešlého cvičení). Proveďte naředění vyseparovaného vzorku na 1×10^6 spermií/ml

Pomůcky: nůžky, zkumavky, Pasteurovy pipety, pipety a špičky, médium na ředění spermií, médium na ředění spermií, Maklerova komůrka

Přístroje: vodní lázeň, inkubátor, centrifuga, minutky

Postup:

- Rozmražený vzorek spermií přenesete pomocí jednorázové 3 ml Pasteurovy pipety (ejakulát) do označené 11ml konické zkumavky označené datem a identifikátorem.
- Pejeta je důkladně osušena, k otevření jsou použity nůžky a obsah je vytlačen pomocí inzuliniky (**pipeta**) se sterilní špičkou do zkumavky.
- K rozmraženému vzorku se pomocí jednorázové silné Pasteurovy pipety přidají po kapkách 2 ml média na ředění a vzorek se důkladně promíchá nasátím do Pasteurovy pipety a opětovným vypuštěním.
- Odebere se 10 μ l vzorku, umístí se na podložní sklo, překryje krycím sklem a zhodnotí pohyb spermií (stačí orientačně)
- Zkumavka se uzavře a vloží do centrifugy a centrifuguje se 600 g (1,4-2,0 rpm) / 5 min.
- Tenkou Pasteurovou pipetou se odstraní supernatant až po sediment.
- pomocí automatické pipety se sterilní špičkou se na sediment pomalu po stěně zkumavky navrství – 200 μ l equilibrovaného separačního média
- zkumavka se vloží do kovového stojanu pod úhlem 45° a vloží do inkubátoru Labotect (6% CO₂ / 37 °C) a spermie se nechají 30 minut vycestovat
- Po uplynutí této doby se 200 μ l pipetou odebere svrchní supernatant do malé 5ml zkumavky a pomocí automatické pipety se umístí 5-10 μ l vzorku na Maklerovu komůrku, ve které se vycestované spermie zhodnotí.
- Hodnotí se koncentrace a celkový pohyb spermií.
- Zjistíte objem vyseparovaného vzorku a pomocí zjištěné koncentrace spermií naředíte pomocí média na spermie vzorek na koncentraci 1×10^6 spermií/ml

Zápis:

- Datum:
- Identifikátor vzorku:
- Motilita vzorku po rozmrazení:
- Motilita a koncentrace vzorku po separaci:
- Objem vzorku po rozmrazení:
- Koncentrace vzorku po naředění:

Poznámky: (popište průběh ředění)

Otázky:

Co se stalo s motilitou vzorku po rozmrazení?

Co se stalo s motilitou vzorku po separaci?

Proč je důležité po rozmrazení médium ke vzorku spermií přidávat pomalu?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

13 Návštěva andrologické laboratoře

Pomůcky:

Plášť, přezůvky, zápisník

Zápis:

Otázky:

Jaké přístroje jsou klíčové pro chod andrologické laboratoře?

Proč je vhodné mít provoz andrologické laboratoře oddělený od provozu embryologické laboratoře?

Co jsou největší obavy IVF laboratoří a jaké opatření lze zavést, aby se tato rizika minimalizovala?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

14 Exkurze – CASA

Pomůcky:

Plášť, přezůvky, zápisník

Zápis:

Otázky:

Jaký typ přístroje jsme viděli na exkurzi?

Jaké jsou výhody počítačové analýzy ejakulátu?

Kontrola vyučujícím (datum, podpis):

Použité literární zdroje

De Jonge CH.J., Barrat C.L.R.: The Sperm Cell. 1st ed., Cambridge 2006.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed., 2010

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed., 2021