

Cytometrické vyšetření kvality spermií aneb není normozoospermik jako normozoospermik

Krátká Z.¹, Novák J.², Vik V.²

¹Imunologická laboratoř GENNET s.r.o., Praha; ²Urologická klinika VFN a 1.LF UK Praha, ³Urologie a andrologie GENNET s.r.o., Praha
zuzana.kratka@gennet.cz

Úvod

Základním vyšetřením fertility mužů je spermiogram. Otázkou je, do jaké míry spermiogram popisuje kvalitu spermií a nakolik koreluje s fertilitou mužů. Ke stanovení funkční kvality spermií je vhodné využít také cytometrické či mikroskopické vyšetření ejakulátu v laboratoři reprodukční imunologie. Pomocí průtokového cytometru je možné stanovit nejen koncentraci spermií a leukocytů v ejakulátu, ale také % živých a apoptotických spermií, % spermií s fragmentací DNA a % spermií s nízkou integritou akrozomu. Mikroskopicky lze zjistit přítomnost protilátek proti spermiím.

Soubor pacientů

Soubor zahrnuje 1176 pacientů s diagnózou N46 mužská neplodnost, ve věku 21 – 70 let. Jde o muže z párů léčených pro poruchu plodnosti v IVF klinikách GENNET. U všech pacientů byl stanoven spermiogram v IVF laboratořích. Soubor zahrnoval 516 normozoospermiků (43,8 %) a 660 mužů s patologickým spermiogramem (56,2 %). U všech 1176 pacientů bylo vyšetřeno % živých a apoptotických spermií, u 299 mužů bylo vyšetřeno poškození akrozomu, u 50 mužů byla stanovena fragmentace DNA, u 387 mužů byly detekovány protilátky proti spermiím.

METODY

Stanovení počtu spermií s fragmentací DNA metodou TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) - pomocí enzymu deoxynucleotidyl transferázy se specificky označí spermie s fragmentovanou DNA. Norma je < 20 % spermií s fragmentací DNA.

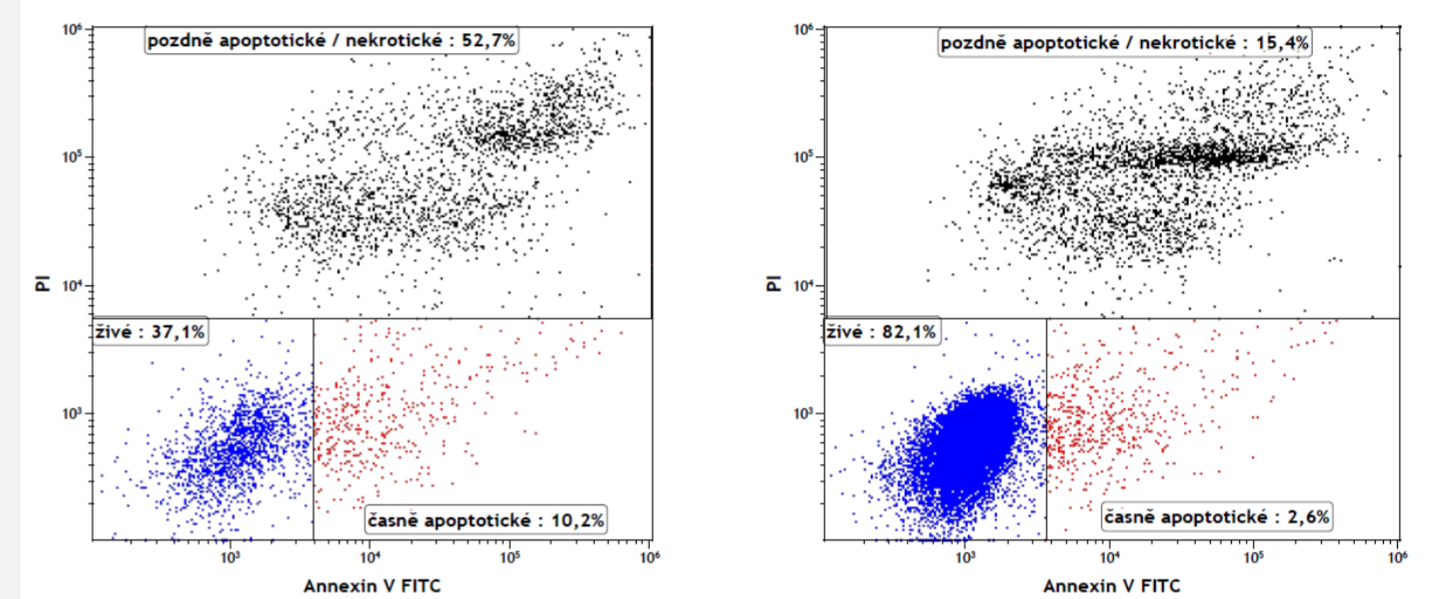
Stanovení poškození akrozomu – pokud je membrána akrozomu narušená, pak detekční protilátka proniká do akrozomu a váže se na intraakrozomální protein.

Norma je < 30 % spermií s poškozeným akrozomem.

Stanovení protilátek proti spermiím metodou MAR – detekční kuličky reagují s protilátkami, které jsou přítomné na spermiích. Mikroskopicky se hodnotí počet pohyblivých spermií s navázanými kuličkami.

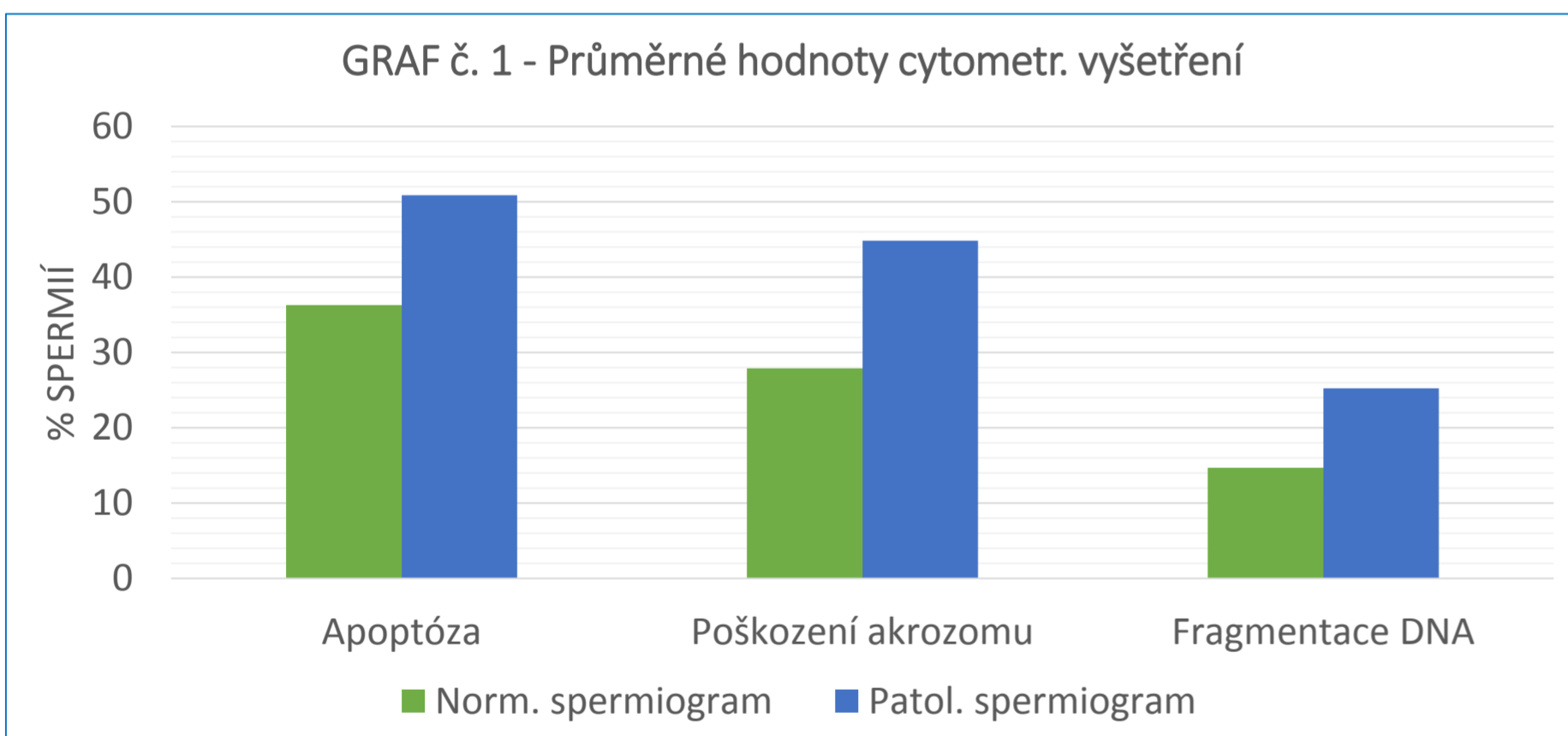
Norma je < 10 % pozitivních spermií, ale klinicky významné je > 40 % pozitivních spermií

Stanovení živých a apoptotických spermií – spermie se označí pomocí annexinu - FITC, který se váže na povrch apoptotických spermií, a propidium jodidu (PI), který proniká do mrtvých spermií. Živé spermie jsou annex. neg. + PI neg (Obrázek). Norma je < 50 % apoptotických spermií



Výsledky

Průměrné hodnoty cytometrických vyšetření u normozoospermiků a pacientů s patologickým spermiogramem jsou uvedeny v Grafu č. 1. Vyšší průměrné hodnoty % apoptotických spermií, spermií s poškozeným akrozomem a fragmentací DNA byly zjištěny u pacientů s patologickým spermiogramem.



Výskyt živých spermií v závislosti na věku

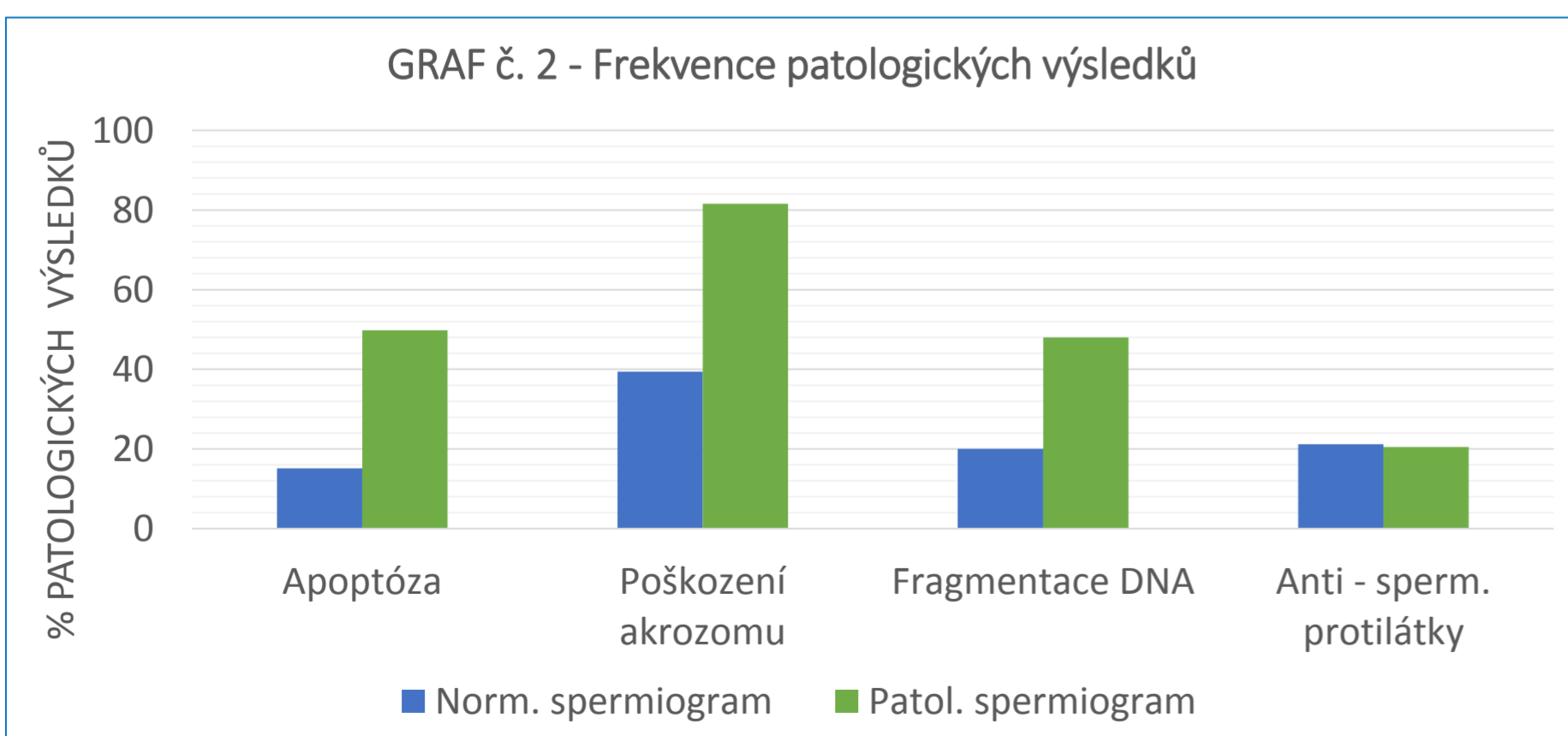
Průměrný počet živých spermií klesá s rostoucím věkem mužů (Tabulka). Současně stoupá počet mužů s vysokým zastoupením apoptotických spermií u starších věkových skupin. Překvapivě zastoupení normozoospermiků s věkem neklesá, nejvíc jich bylo ve věkové skupině 40 – 45 let.

Věk (roky)	Počet pacientů	Prům. živých sp. (%) (Průměr ± smodch)	Počet pac. s vyšší apoptózou spermií (%)	Počet normozoospermiků (%)
< 30	137	57,0 ± 17,4	34,3	42,3
30 - 34,9	334	57,6 ± 14,7	29,3	44,6
35 - 39,9	418	55,3 ± 15,7	35,9	45,0
40 - 44,9	188	55,2 ± 15,4	33,5	45,2
45 - 49,9	64	50,6 ± 16,3	43,7	35,9
> 50	35	45,2 ± 16,4	60,0	37,1

Výskyt patologií spermií u normozoospermiků

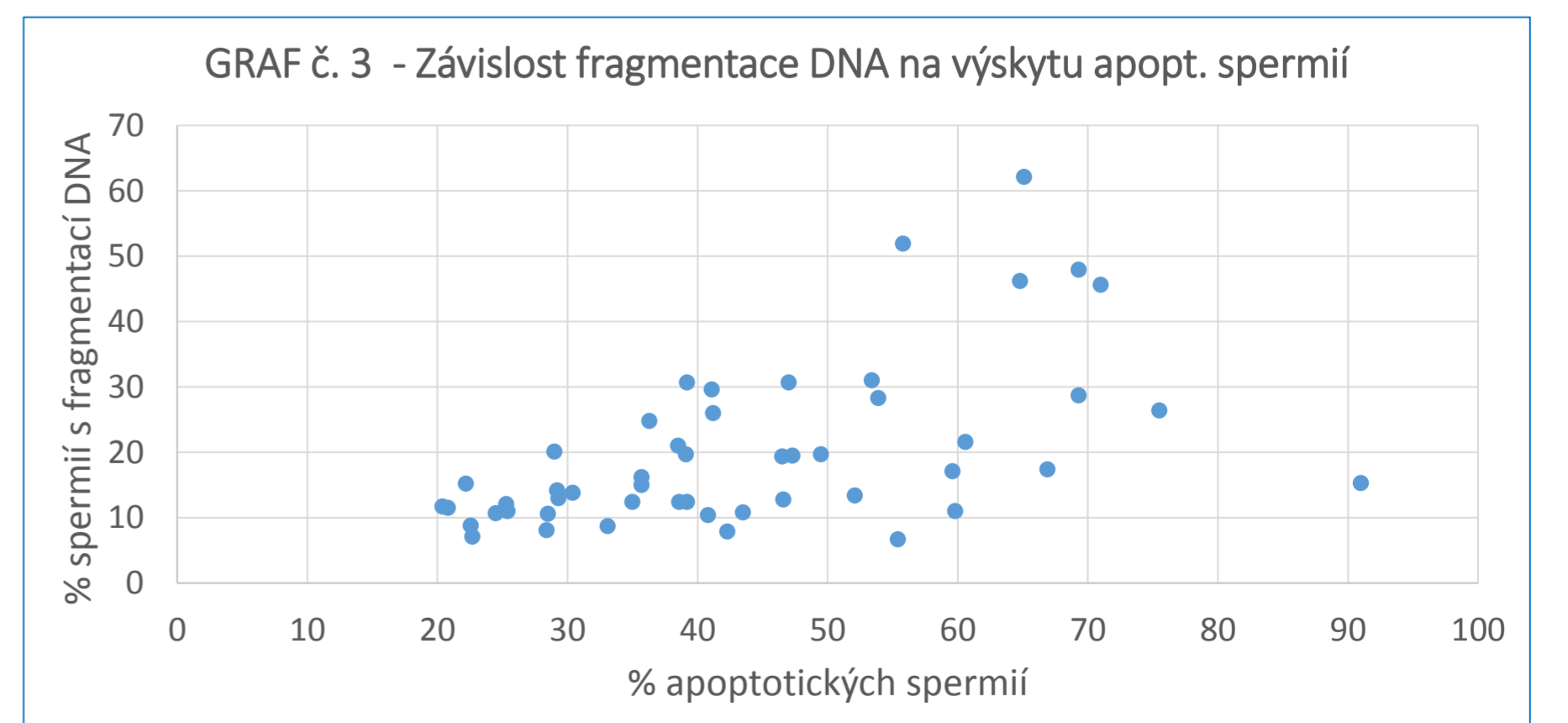
V Grafu č. 2 je uvedena frekvence výskytu patologických hodnot u normozoospermiků a pacientů s patologickým spermiogramem. vypočítaná jako % mužů s hodnotou vyšetření mimo normu.

U 15,1 % normozoospermiků bylo zjištěno vysoké zastoupení apoptotických spermií, u 39,4 % byla zjištěna poškození akrozomu, u 20,0 % byl vyšší počet spermií s fragmentací DNA a u 21,2 % byly vysoce pozitivní protilátky proti spermiím.



Význam vyšetření apoptózy spermií

Uvedené patologie spolu souvisí a proto je možné využít vyšetření apoptózy spermií jako screeningové. U pacientů s vyšší apoptózou spermií je i vyšší riziko vysokého počtu spermií s fragmentací DNA (Graf č.3). Výhodou vyšetření apoptózy spermií oproti vyšetření fragmentace DNA je jeho jednoduchost a možnost provedení z čerstvého ejakulátu. V případě vyšší apoptózy spermií je vhodné doplnit vyšetření fragmentace DNA, která se provádí ze zamraženého ejakulátu.



Závěry

Stanovení apoptotických spermií společně se spermiogramem využíváme pro vyhledání rizikových pacientů. S vyšším výskytem apoptotických spermií se častěji objevuje fragmentace DNA, poškození akrozomu i přítomnost protilátek proti spermiím. Tyto funkční poruchy se vyskytují nejen u pacientů s patologickým spermiogramem, ale také u 15 – 20 % mužů z infertilních párů s normálním spermiogramem. Při opakovaném výskytu vysoké apoptózy spermií nebo patologického spermiogramu je vhodné provést vyšetření u urologa / androloga s cílem zjistit příčinu (infekce, hormonální disbalance, varikokéla, genetická příčina atd.). Následnou léčbou může dojít ke zlepšení kvality spermií a fertility pacientů.