

Metody užívané k vyšetření semene

Ne všechny spermie produkované ve varlatech samců jsou normálně vyvinuté. Vliv na jejich tvorbu a zrání má celá řada faktorů vnitřního i vnějšího prostředí. Ejakulát je třeba hodnotit např. při posuzování fertility mužů v rámci asistované reprodukce nebo ve sféře veterinární medicíny při hodnocení ejakulátů plemeníků pro přípravu inseminačních dávek. Ejakulát se hodnotí v následujících kritériích:

1. Objem:

Stanoví se v kalibrovaném odměrném válci, ev. vážením.

2. Koncentrace spermií:

Posuzuje se fotometricky, počítačem částic nebo cytometricky. Fotometrické stanovení koncentrace je orientační a provádí se především v rutinních provozních laboratořích. V kontrolních laboratořích je doporučeno automatické posouzení počtu spermií elektronickým počítačem částic nebo cytometrickou metodou s použitím klasické metody počítání spermií v Bürkerově komůrce po naředění ejakulátu roztokem dle Hayema v melanžeru na červené krvinky. Hodnocení se provádí ve světelném mikroskopu při zvětšení 200x.

3. Aktivita spermií:

Pohyblivost spermií (tzn. kolik procent spermií je pohyblivých) se posuzuje u každého ejakulátu, hodnocení se provádí ve světelném mikroskopu nebo při fázovém kontrastu za zvětšení 200x.

4. Živé a mrtvé spermie:

Stanovují se vitálními barvicími testy, obvykle se užívá **primulin** nebo 0,5% roztok **eosinu s kontrastním barvivem 10% nigrosinu** (při tomto barvení se mrtvé spermie barví růžově, živé zůstávají zcela bílé). Posuzuje se 100 spermií při zvětšení 1000x (imerze), hodnotí se jen celé nepoškozené spermie!!!



Obr. : Živá a mrtvá spermie
Býk

(Barvení: E/N – eosin-nigrosin)



5. Rychlost pohybu spermií:

Stanoví se testem propulsivity (měří se čas, za který projde 25 spermií čtverečkem v Bürkerově komůrce). Popř. lze pohyb hodnotit automaticky pomocí speciálních počítačových programů s analýzou obrazu (CASSA, LUCIA).

6. Mitochondriální aktivity spermií:

Stanoví se pomocí měření redukce nitrotetrazoliové modři. Jako redukčního činidla se používá 0,1 % nitrotetrazoliová modř, hodnocení se provádí po 30 minutové inkubaci při zvětšení 1000x fázovým kontrastem nebo ve světelném mikroskopu po dobarvení 0,5 % eosinem. (Kromě nitrotetrazoliové modři lze použít i jiná barviva, jejichž oxidace, či redukce v mitochondriích je následně detekována spektrofotometricky nebo spektrofluorimetricky – rhodamin 123, fluorescein, atd.)

7. pH:

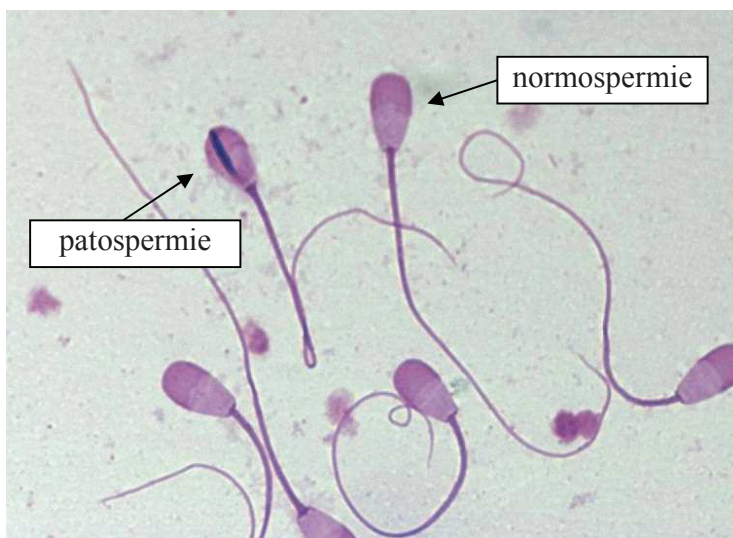
Stanoví se potenciometricky pomocí pH metru.

8. Morfologický obraz – Striktní analýza morfologického obrazu (SASMO):

Zjišťuje se mikroskopickým posouzením 100 či 200 spermií a stanovením procenta morfologicky změněných (patologických) spermií a normospermií bez morfologických vad. Hodnocení se provádí na nátěru obarveném podle Hancocka či McFarely při zvětšení 1000x.

Získaná data z morfologické analýzy jsou vyjadřována:

- počtem normálních spermií a patologicky změněných spermií
- stanovením četnosti nálezů v jednotlivých kriteriích
- **přepočtem patologických změn na jednu patologickou spermii = index teratospermie (IT)**
- frekvencí jednotlivých změn na počet všech hodnocených spermií
- frekvencí jednotlivých změn na počet patologických spermií
- výčtem změn podle jejich četnosti
- klasifikací změn podle geneze na vývojové a získané



Obr. : SASMO, Býk

(Barvení: Hancock)

