

METODY ANALIZY PARAMETRÓW FUNKCJONALNYCH MĘSKICH KOMÓREK ROZRODCZYCH

1. Warunki wstępne

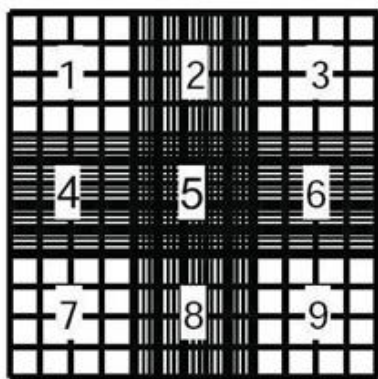
Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy powtórzyć wiadomości dotyczące przebiegu procesu spermatogenezy oraz budowy i funkcji plemnika ssaków.

2. Wstęp

Badania prowadzone w ostatnich dekadach wskazują na wzrost częstości występowania zaburzeń morfologiczno-funkcjonalnych w układzie rozrodczym ludzi i zwierząt, które skutkują zaburzeniem płodności lub sterility osobników. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) potwierdza, iż niepłodność ma zasięg globalny o tendencji wzrostowej, a jej największe nasilenie obserwuje się w krajach wysoko uprzemysłowionych. Jak wynika z badań epidemiologicznych czynnik męski jest przyczyną około 50% przypadków niepłodności. Jedną z bezpośrednich przyczyn problemów z płodnością mężczyzn są nieprawidłowe parametry nasienia. Stąd też **analiza parametrów funkcjonalnych męskich komórek rozrodczych** stanowi istotny element diagnostyki niepłodności, a także wykorzystywana jest w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach, prowadzonych w celu poznania możliwych przyczyn i mechanizmów zaburzeń płodności.

U ssaków, aby doszło do zapłodnienia w warunkach naturalnych plemniki w odpowiedniej liczbie, muszą dotrzeć do jajowodu, gdzie znajduje się komórka jajowa, pokonać osłonkę przejrzystą oocyta, aby ostatecznie jeden z nich uległ fuzji z błoną komórki jajowej, dostarczając swój materiał genetyczny do wnętrza oocyta. W procesie tym niektóre etapy są ściśle uzależnione od aktywności ruchowej męskich gamet. Krytycznym parametrem najlepiej korelującym z potencjałem płodności w warunkach naturalnych okazała się być koncentracja ruchliwych plemników.

Koncentracja plemników to liczba plemników w jednostce objętości nasienia (1 ml), podczas gdy całkowita liczba plemników to liczba plemników w całej objętości ejakulatu i wylicza się ją mnożąc koncentrację plemników przez objętość ejakulatu. Do liczenia plemników zalecane jest używanie komór o głębokości 100 μm lub głębszych. Zaleca się przeprowadzanie procedury oceny koncentracji plemników w udoskonalonej komorze Neubauera. Udoskonalona komora Neubauera posiada dwie oddzielne komory zliczeniowe (o rozmiarach 3×3 mm). Każda z komór podzielona jest na 9 siatek o rozmiarach 1×1 mm. Siatki nr 1,3,7,9 zawierają 4 rzędy po 4 duże kwadraty. Siatki nr 2 i 8 zawierają 4 rzędy po 5 dużych kwadratów. Siatki nr 4 i 6 zawierają 5 rzędów po 4 duże kwadraty. Środkowa siatka nr 5 zawiera 5 rzędów po 5 dużych kwadratów. Komorę przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym o określonej grubości (0.44 mm).



Termin „azoospermia” oznacza brak plemników w ejakulacie, zaś „oligozoospermia” to obniżona całkowita liczba i/lub koncentracja plemników.

Ruch plemników klasyfikuje się według następującej skali:

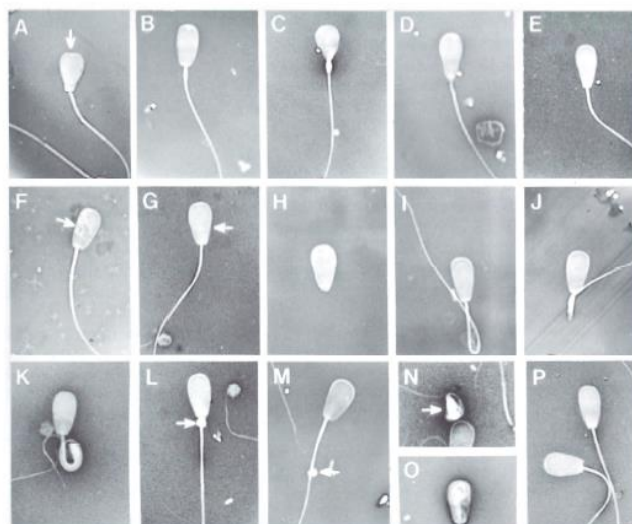
- ruch postępowy – plemniki poruszające się ruchem postępowym zarówno liniowym, jak i po dużym okręgu bez względu na ich szybkość
- ruch niepostępowy- plemniki poruszające się ruchem niepostępowym (w miejscu i po małym okręgu)
- plemniki nieruchome

Asthenozoospermia to termin określający niską liczbę plemników poruszających się ruchem postępowym.

Odsetek żywych plemników ocenia się poprzez identyfikację plemników z nienaruszoną integralnością błony komórkowej. Nekrozoospermia to niski odsetek żywych plemników w ejakulacie. Ocena żywotności plemników powinna być wykonana zaraz po upłynięciu próbki, najlepiej w czasie do 30 min od jej pobrania. Ocena żywotności plemników można przeprowadzić wykorzystując różne metody. Najczęściej stosowane to test eozyna-nigrozyna, przyżyciowy test eozynowy i test pęcznienia plemników (HOS test, ang. hypo-osmotic swelling test). Test eozyna-nigrozyna oraz przyżyciowy test eozynowy opierają się na zasadzie przepuszczalności błony komórkowej martwego plemnika dla barwnika. Plemniki żywe nie absorbują eozyny i pozostają niezabarwione, plemniki martwe natomiast barwią się na czerwono. Odsetek plemników nie zabarwionych (żywych) nie powinien być mniejszy niż odsetek plemników ruchomych. Test HOS tzw. test pęcznienia jest metodą alternatywną do przedstawionych metod barwnych. Plemniki z nienaruszoną błoną komórkową (żywe) zawieszone w hipoosmotycznym medium „pęcznią” po 5 min., co widoczne jest jako zmiana wyglądu witki.

Plechnik ssaka składa się z główki, w której zawarty jest materiał genetyczny i akrosom, wstawki zawierającej mitochondria i witki, która wprawia go w ruch. Morfologia oraz wymiary plemnika są charakterystyczne dla danego gatunku ssaka, np. u człowieka i knura główka plemnika ma kształt owalny, jej długość wynosi odpowiednio 4-5 μm i 9-10 μm , u szczura natomiast główka jest haczykowato zagięta, a jej długość to około 2,5 μm . **Morfologię plemników** oceniamy w mikroskopie świetlnym pod imersją, przy powiększeniu 1000x, po wcześniejszym wybarwieniu rozmazu. Zalecane jest barwienie m.in. metodą Papanicolaou lub Shorr’a. Teratozoospermia to termin oznaczający niską liczbę plemników o

prawidłowej budowie (morfologii). Za plemniki o nieprawidłowej budowie uznaje się takie, które mają nieprawidłowości w obrębie główki, wstawki lub wici. Dany plemnik może mieć tylko jeden albo kilka defektów jednocześnie. W nasieniu zwykle występują plemniki o różnych nieprawidłowościach w budowie. Jeśli jakiś defekt jest częstszy niż inne, może to wskazywać na konkretne zaburzenie, np. obecność plemników ze spiralnie zwiniętą wtką może wskazywać na zaburzenia funkcjonowania najądrzy. W nasieniu ludzkim odsetek plemników o prawidłowej morfologii rzadko przekracza 30%, natomiast u gryzoni czy knura plemniki o prawidłowej morfologii stanowią zdecydowaną większość (> 85 – 90 %).



Rys. 1. Powszechnie występujące nieprawidłowości w budowie plemników (A- B- nieprawidłowy zaokrąglony akrosom, C- silna forma gruszkowata, D- umiarkowana forma gruszkowata, E- lekka forma gruszkowata, F- wakuole jądrowe, G- defekt w środkowej części główki plemnika, H- wolna główka, I- odwrócona wotka, J- wada wstawki plemnika, K- silnie zagięta wstawa, L-, M- krople cytoplazmatyczne, N- silna forma teratoidalna, O- umiarkowana forma teratoidalna, P- prawidłowy plemnik. (http://www.brahman.com.au/images/information/technical/reproduction/Sperm-Abnormalities_L.jpg)

Na standardową ocenę nasienia składa się:

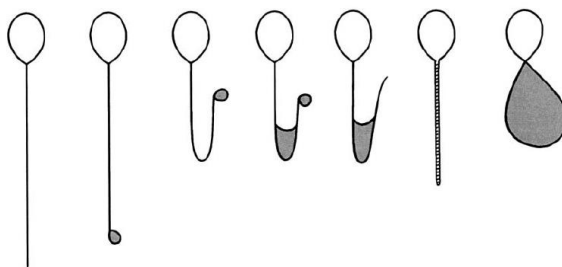
- makroskopowa ocena parametrów środowiska, w którym zawieszone są plemniki (objętość, lepkość, pH, czas upłynnienia, kolor); parametry te są odzwierciedleniem prawidłowości funkcjonowania gruczołów dodatkowych produkujących płyn, w którym zawieszone są plemniki
- ocena mikroskopowa plemników (koncentracja, ruchliwość, żywotność oraz morfologia)
- dodatkowo ocenie podlega ewentualna obecność tzw. komórek okrągłych oraz bakterii.

3. Opis procedury

Ćwiczenie 1. Ocena żywotności plemników testem HOS (Hypo-osmotic swelling test) czyli testem pęcznienia

1. Wymieszać próbkę nasienia z wodą destylowaną w stosunku 1:20
2. Nałożyć 10 µl próbki na szkiełko podstawowe i przykryć nakrywkowym (preparat bezpośredni)
3. Inkubować w temperaturze 37°C przez 5 min.

4. Przygotować 2 preparaty i określić liczę plemników o napęczniałych witkach (tzn. żywych) przypadającą na zliczonych 100 plemników.



WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
Fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research

5. Żywotność wyraża się jako odsetek (%) plemników o zmienionych witkach zaokrąglając do liczby całkowitej. Wynik podaje się jako średnią z dwóch wyników uzyskanych w dwóch preparatach.

Ćwiczenie 2. Ocena koncentracji plemników

1. Delikatnie wymieszać próbkę i nałożyć na szkiełko podstawowe 10 µl próbki, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i oglądać (pow. 400x lub 200x). Ocenic liczbę plemników w polu widzenia.
2. Przygotować rozcieńczenie wg dostarczonej tabeli. Jako rozcieńczalnika użyć r-ru hipertonicznego.
3. Zliczyć 400 plemników (z dwóch komór); z każdej po ok. 200 plemników zachowując regułę 2 boków Bürkera w rzędach siatki 5 (jeśli nie zliczymy 200 plemników liczymy dalej w rzędach siatki 4 i 6)
4. Sprawdzić czy średnia z wyników i różnica pomiędzy wynikami mieszczą się w tabeli
5. Wyliczyć koncentrację plemników ze wzoru:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{wsp. rozcieńczenia}$$
N-liczba plemników
n=liczba rzędów

Ćwiczenie 3. Barwienie plemników metodą Papanicolaou

Do barwienia należy użyć wysuszonego rozmazu plemników.

Odczynniki	Czas zanurzenia / ilość zanurzeń preparatu w odczynniku
1. Etanol 80%	10 zanurzeń
2. Etanol 70%	10 zanurzeń
3. Etanol 50%	10 zanurzeń
4. Woda destylowana	10 zanurzeń
5. Hematoksylina Harrisa	4 min
6. Woda bieżąca	3-5 min

7. Kwaśny etanol	2 zanurzenia
8. Woda bieżąca	3-5 min
9. Woda destylowana	1 zanurzenie
10. Etanol 50%	10 zanurzeń
11. Etanol 70%	10 zanurzeń
12. Etanol 80%	10 zanurzeń
13. Etanol 90%	10 zanurzeń
14. Orange G 6	2 min
15. Etanol 95%	10 zanurzeń
16. Etanol 95%	10 zanurzeń
17. EA-50	5 min
18. Etanol 95%	5 zanurzeń
19. Etanol 95%	5 zanurzeń
20. Etanol 95%	5 zanurzeń

W celu oceny morfologii plemników wybarwione preparaty należy oglądać w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 1000x.

3. Wymagania

Student powinien umieć scharakteryzować podstawowe parametry funkcjonalne plemników ssaków oraz znać metody pozwalające na ocenę tych parametrów.

4. Literatura dodatkowa:

1. Journal of Laboratory Diagnostics 2010, Vol 46, Issue 2, p. 161-170 (http://www.diagnostrykalaboratoryjna.eu/journal/DL_2_2010_str_161-170.pdf)
2. Rat Sperm Morphological Assessment (http://www.irdg.co.uk/Sperm_morphology.pdf)