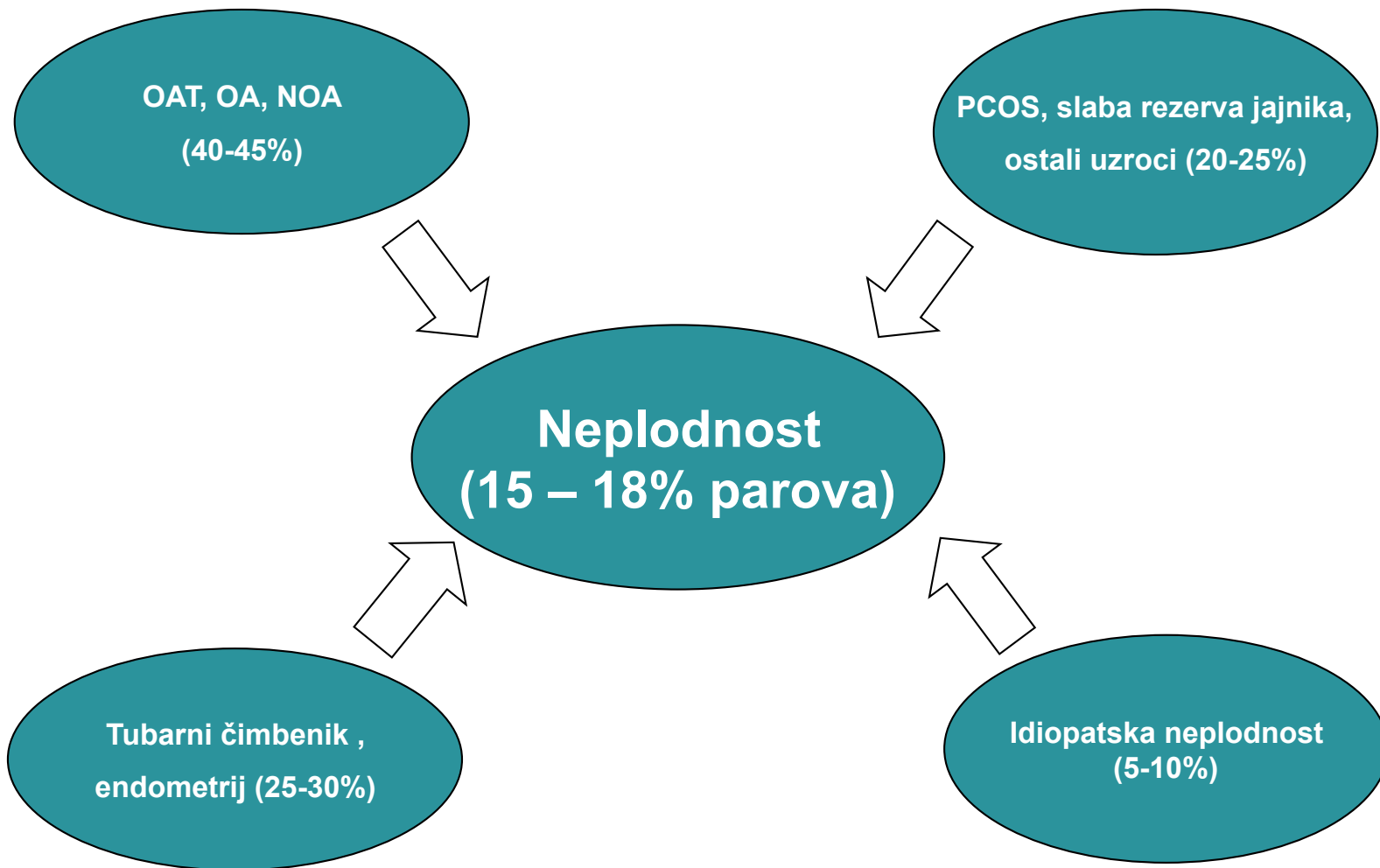


Laboratorijska dijagnostika plodnosti muškaraca

Dr.sc. Patrik Stanić, klinički embriolog



Uzroci muške neplodnosti

- Testikularni (čimbenici koji štetno djeluju na spermatogenezu)
 - prirodne abnormalnosti:
 - Klinefelterov sindrom (47 XXY)
 - mikrolelecije Y kromosoma
 - kriptorhizam
 - varikokela
 - stečeni poremećaji:
 - orhitis
 - ionizirajuće zračenje
 - traume i torzije sjemenika
 - lijekovi (metrotreksat, nitrofurantoin, hormonski preparati)
 - toksini iz okoliša (kadmij, olovo, živa)

Uzroci muške neplodnosti

- Post-testikularni (čimbenici koji oštećuju provodne kanale ili dovode do spolne disfunkcije)
 - CBAVD i CUAVD
 - epididimitis
 - prostatitis
 - vazektomija
 - impotencija
 - hipospadija
 - epispadija

Uzroci muške neplodnosti

- Pre-testikularni (hipotalamičko-hipofizni poremećaji i ostale endokrinopatije)
 - Kallmanov sindrom (nedostatak GnRH, KAL-1 na X-kromosomu)
 - hipogonadizam (slabo razvijene sekundarne spolne osobine)
 - tumori hipofize i hipotalamusa
- Genitalnourinarne infekcije
- Imunološki čimbenici
- Način/stil života
 - alkohol, pušenje, prekomjerna debljina, nošenje tijesne odjeće, duge vožnje biciklom, predugi boravak u saunama

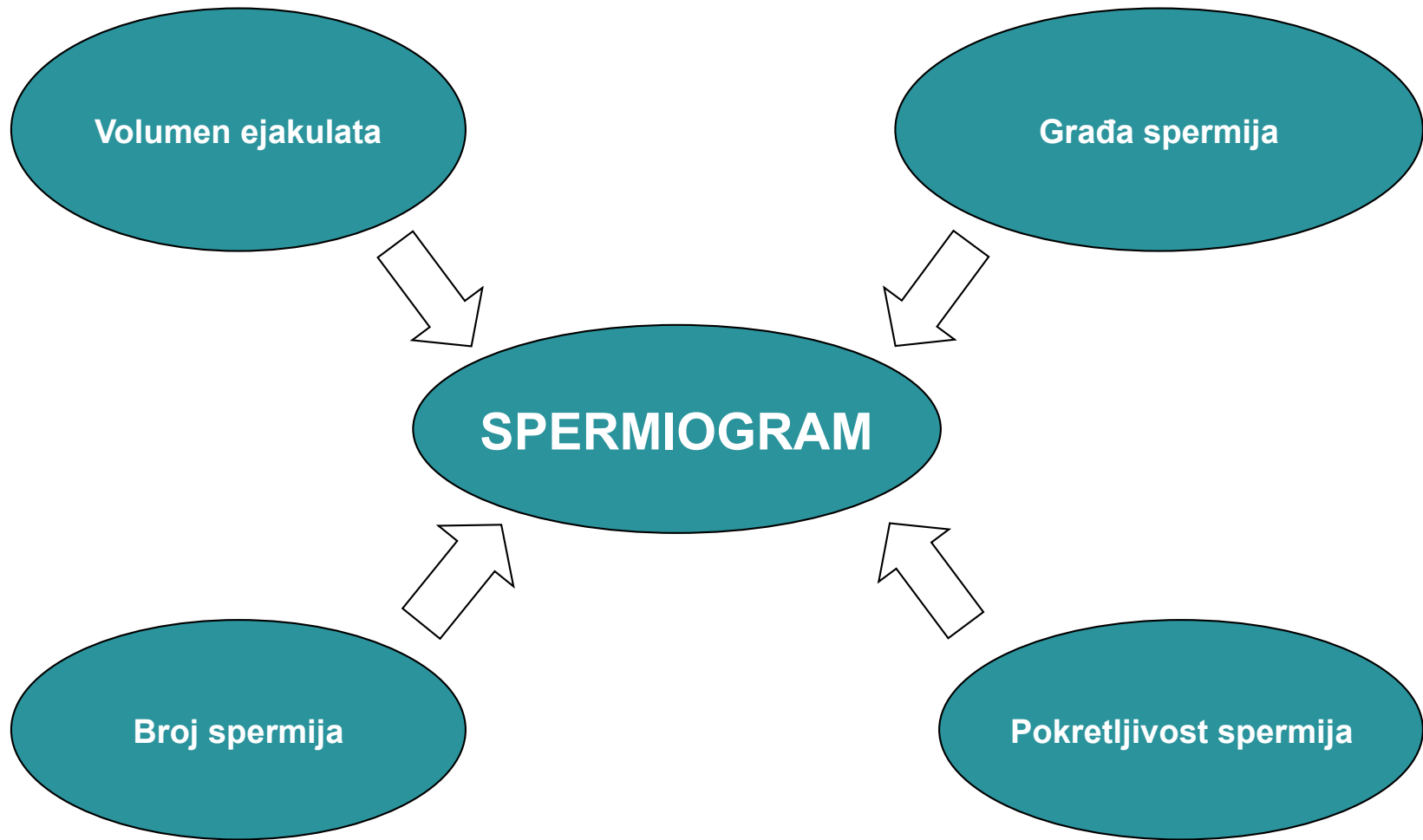
Dijagnostički testovi za utvrđivanje muške plodnosti

- Spermioqram (analiza ejakulata)
- Određivanje hormona
 - testosteron i FSH; LH, prolaktin i inhibin B
- Dodatni testovi sjemene analize
 - vitalnost
 - protuspermijska protutijela
 - mikrobiološka analiza
 - biokemijska analiza sjemene tekućine
 - prostata (kisela fosfataza, citrat, Zn i Mg)
 - sjemeni mjehurići (fruktoza, prostaglandini)
 - pasjemenik (neutralna α -glukozidaza)

Dijagnostički testovi za utvrđivanje muške plodnosti

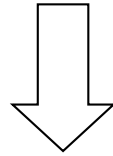
- Genetski testovi
 - kariogram
 - mikrolelecije Y kromosoma
 - CFTR genotipizacija

- Specijalizirani testovi – testovi funkcije spermija
 - CASA (computer-aided sperm analysis) računalna analiza kinetike spermija
 - HBA (hyaluronan binding assay) test - zrelost spermija
 - test DNK fragmentacije spermija
 - određivanje stanja akrosoma



World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

SPERMIJI



EJAKULAT

**Sekretii sjemenika,
pasjemenika i
vas deferensa**

**Sekretii prostate,
sjemenih mjehurića i
bulbouretralnih žlijezda**

**Sjemena analiza 2 - 7 dana
apstinencije**

Makroskopska analiza sjemena

- likvefakcija
 - 15 min. na 37°C → početak analize nakon 30 min.
- boja
 - crveno-smeđa → hematospermia
 - žuta → pyospermia
- volumen
 - lagana aspiracija u pipetu
 - ne koristiti špricu i igle
 - normalno više od 1,5 ml
 - hyospermia: < 1,5 ml
 - hyperspermia: > 6,0 ml
- pH
 - indikator papir 6-9
 - normalan pH – viši od 7,2

Mikroskopska analiza sjemena

- koncentracija spermija
 - normalno - $\geq 15 \times 10^6 / \text{ml}$
 - Polyzoospermia, Oligozoospermia, Cryptozoospermia, Azoospermia

- pokretljivost spermija
 - a – brza linearna progresivna gibljivost
 - b – progresivna gibljivost
 - c – na mjestu pokretni spermiji
 - d – nepokretni spermiji
 - normalno - $\geq 32\%$ spermija s progresivnom gibljivošću (a+b), ili $\geq 25\%$ linearno progresivnih spermija (a)
 - Asthenozoospermia

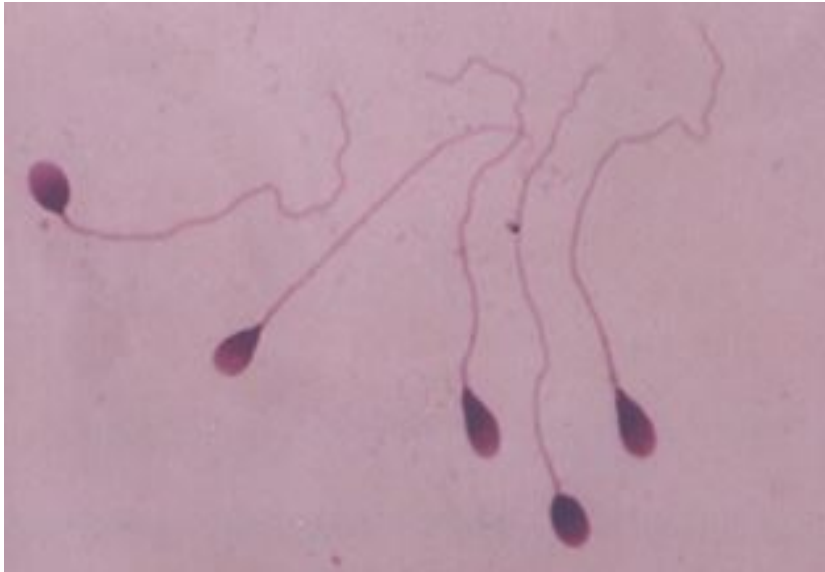
- građa spermija
 - normalno - 30% ili više spermija normalnih oblika prema kriterijima SZO (1999.)
 - normalno - $\geq 4\%$ prema striktnim kriterijima SZO (2010.)
 - Teratozoospermia

Mikroskopska analiza sjemena

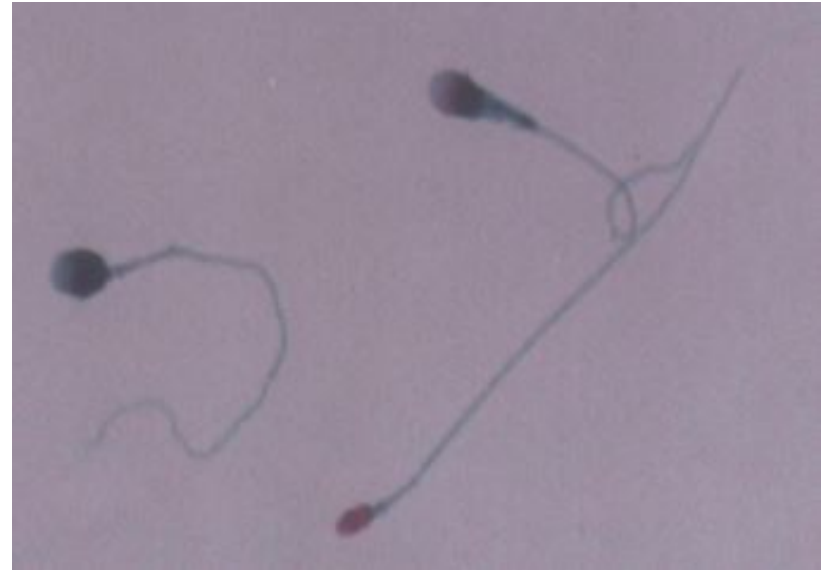
- vitalnost
 - normalno - $\geq 58\%$ živih spermija
 - hipoosmotski test bubrenja repa spermija (HOS-test)
 - fazno-kontrastni mikroskop
 - bojanje eozin/nigrozin
 - mikroskop sa svjetlim poljem, 100 x uljni objektiv
 - diferencijacija nepokretnih spermija u žive ili mrtve

- protutijela na spermije
 - spermijska protutijela u sjemenjnoj tekućini: IgA i IgG
 - test miješane antiglobulinske reakcije (MAR)
 - čestice lateksa obavijeni protutijelima tipa IgA ili IgG + antiserum za humani IgA ili IgG
 - test imunih kuglica (IB)
 - plastične kuglice kovalentno povezane s kunićjim protutijelima na humane imunoglobuline

Određivanje građe spermija



Građa spermija određivana metodom bojanja po Giemsi



Građa spermija određivana metodom bojanja po Spermacu

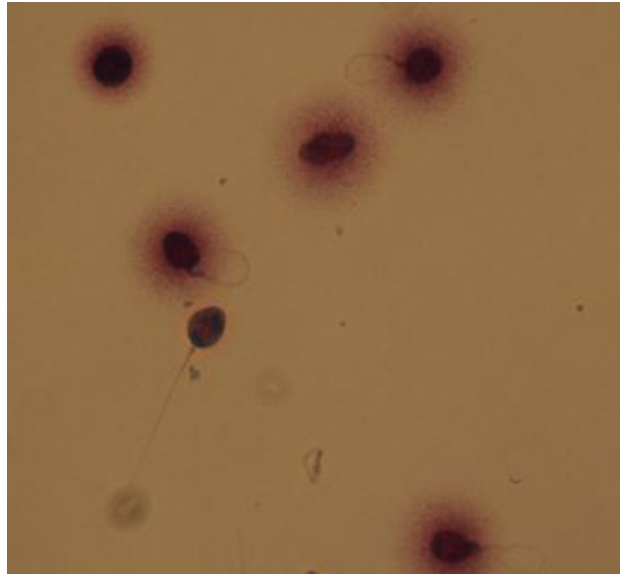
Vitalnost spermija – eozin nigrozinski test



Bijelo obojena glava spermija = eozin negativni spermij, cjelovita stanična membrana glave;

Crveno obojena glava spermija = eozin pozitivni spermij, oštećena stanična membrana glave.

Analiza DNK fragmentacije u spermijima



Halosperm test

SPERMIJI BEZ DNK FRAGMENTACIJE

- spermiji s velikom austom: širina aure jednaka ili veća od manjeg promjera jezgre
- spermiji sa srednjom austom: veličina aure između onih s velikom i onih s malom austom

SPERMIJI S FRAGMENTIRANOM DNK

- spermiji s malom austom: širina aure je jednaka ili manja od 1/3 manjeg promjera jezgre
- spermiji bez aure i degradirani: koji ne pokazuju nikakvu auru i kod kojih je jezgra nepravilno ili slabo obojena

Određivanje stanja akrosoma



Membrana akrosoma obojena pomoću *Pisum sativum* aglutinina konjugiranog s fluorescein izotiocijanatom (FITC-PSA) i etidij homodimera-1

Referentne vrijednosti (SZO, 2010)

- volumen - $\geq 1,5$ ml
- pH - $\geq 7,2$
- broj spermija u ml ejakulata - $\geq 15 \times 10^6$ /ml
- ukupan broj spermija - $\geq 39 \times 10^6$ /ejakulat
- pokretljivost - $\geq 32\%$ progresivni ili $\geq 25\%$ brzi linearno progresivni
- građa spermija- $\geq 4\%$ normalnih oblika

Referentne vrijednosti (SZO, 2010)

- vitalnost - $\geq 58\%$ živih spermija
- HBA test - $\geq 80\%$ zrelih spermija
- DNK fragmentacija - $< 30\%$
- leukociti - $< 1 \times 10^6/\text{ml}$
- testovi na spermijaska protutijela - $< 50\%$ spermija vezanih za kuglice

Dijagnoze (SZO)

- Normozoospermia – normalan ejakulat
- Oligozoospermia – konc. spermija < 15×10^6 /ml
- Asthenozoospermia - <32% spermija s brzom pokretljivošću
- Teratozoospermia - <4% spermija s normalnom građom
- Oligoasthenoteratozoospermia
- Azoospermia – nema spermija u ejakulatu
- Aspermia – nema ejakulata

Metode medicinski pomognute oplodnje

- Intrauterina inseminacija (IUI)
- Intratubarna inseminacija (ITI)
- *In vitro* fertilizacija (IVF)
- Intracitoplazmatska injekcija spermija (ICSI)
 - PICS (physiological ICSI)
 - IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection)
- *In vitro* maturacija (IVM)

A I H
Artificial Insemination by Husband

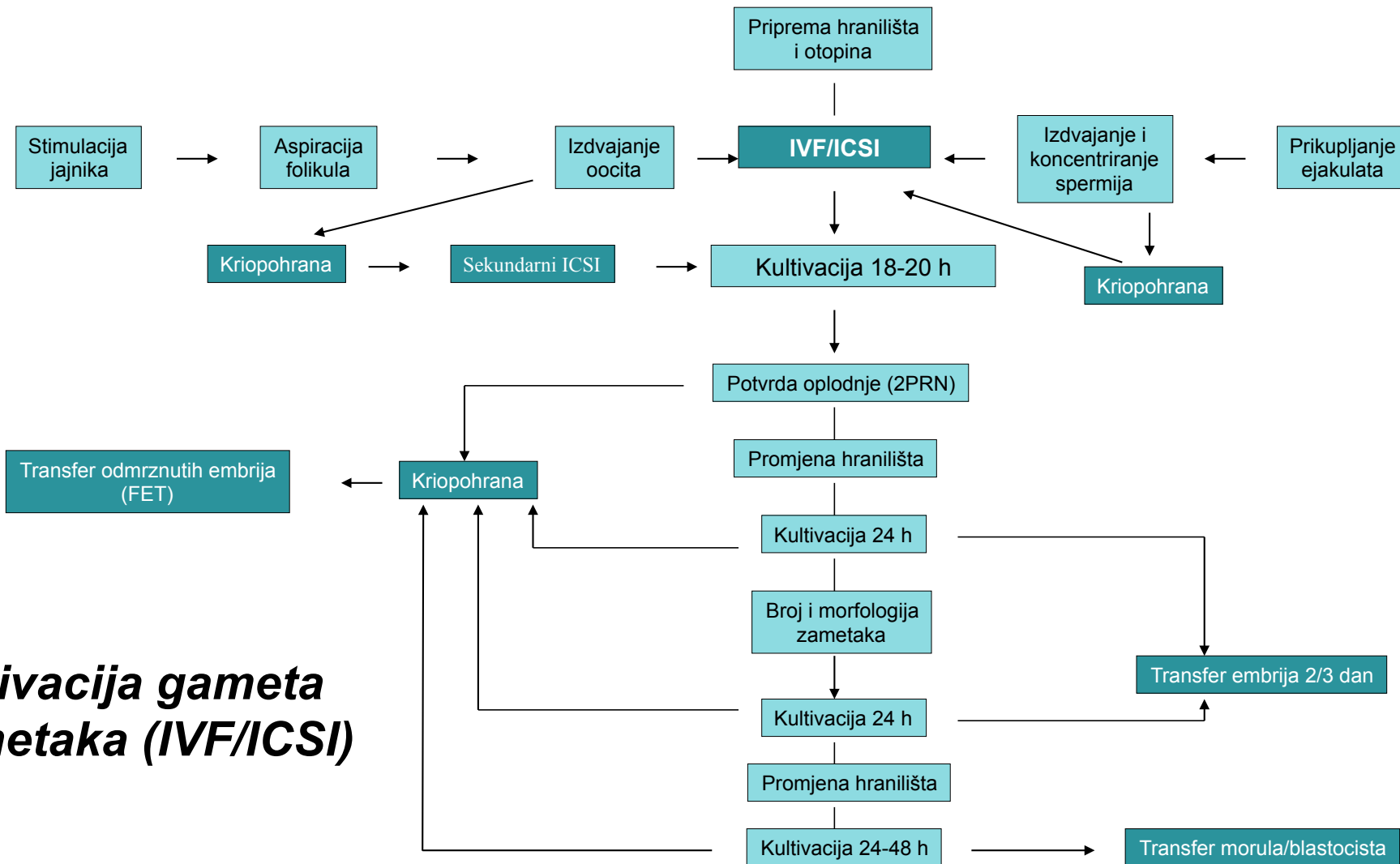
↑
ejakulatorna disfunkcija
smanjena kvaliteta sjemena
imunološki faktor
cervikalni faktor

INSEMINACIJA

NO azoospermia
nasljedne bolesti



A I D
Artificial Insemination by Donor



Kultivacija gameta i zametaka (IVF/ICSI)

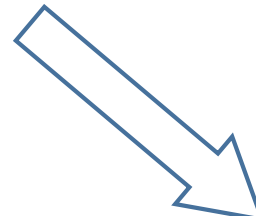
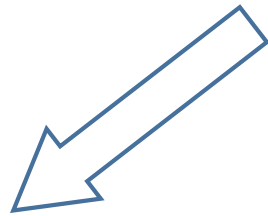
Obrada spermija za metode medicinski pomognute oplodnje

- Ejakulat
 - Pasjemenik (PESA i MESA)
 - Sjemenik (TESA, TESE i Micro-TESE)
 - Urin
-
- Cilj obrade spermija za MPO postupke:
 - odvojiti spermije od sjemene tekućine
 - izolirati pokretne spermije
-
- Tehnike obrade i pripreme spermija za metode MPO
 - metoda ispiranja
 - metoda isplivavanja (“swim-up”)
 - diskontinuirani gradijent gustoće

AZOOSPERMIA

Nema spermija u ejakulatu i nakon centrifugiranja

Učestalost azoospermije - 8% neplodnih muškaraca



**Opstruktivna
azoospermija
(OA) – 40%**

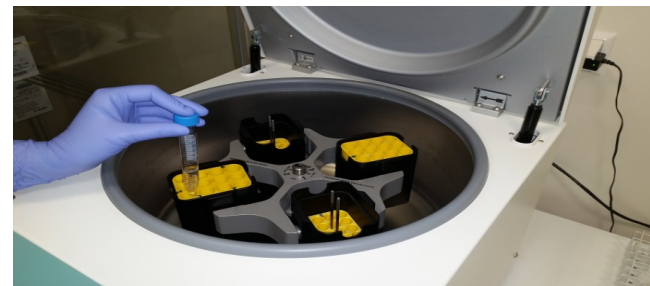
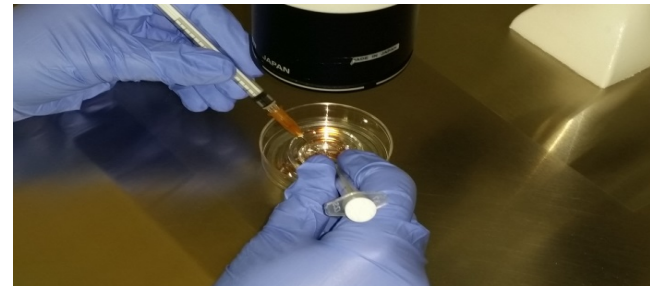
spermiji >98%

**Neopstruktivna
azoospermija
(NOA) – 60%**

spermiji ~50%

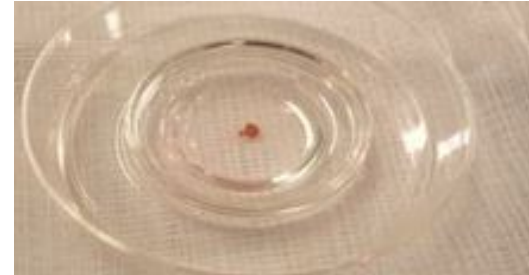
Priprema zamrznutog TESE uzorka za ICSI postupak

- Otapanje zamrznutog TESE uzorka / uklanjanje krioprotektora / inicijalno ispiranje
- A) Maceracija TESE uzorka (15-30 min)
- B) Enzimatska razgradnja kolagenazom (1-2 h)
- Ispiranje u mediju / centrifugiranje / x 300g – 10 min

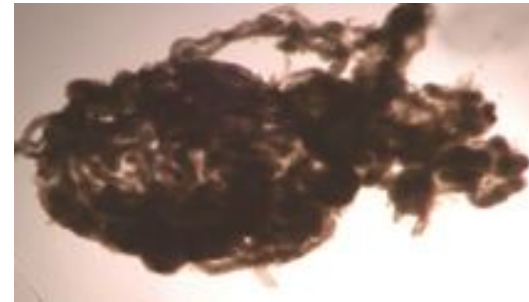


Obrada TESE uzorka u IVF laboratoriju

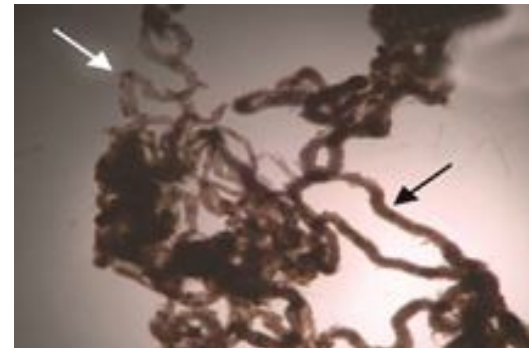
- Dio parenhima sjemenika dobivenog nakon TESE



- TESE uzorak pri povećanju x40

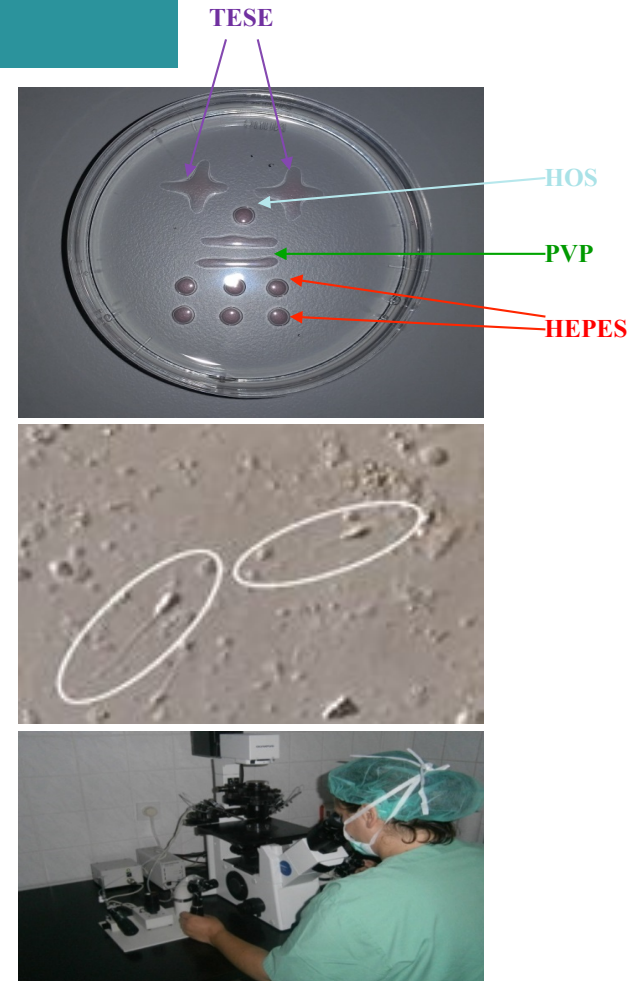


- Pregled sjemenskih kanalića



TESE - ICSI

- Priprema Petrijeve zdjelice za izolaciju testikularnih spermija
- Obradeni uzorak TESE nakon ispiranja pri povećanju x400
- Invertni mikroskop / HOS test / ICSI (OA-5 min; NOA-12 min)



HVALA NA PAŽNJI