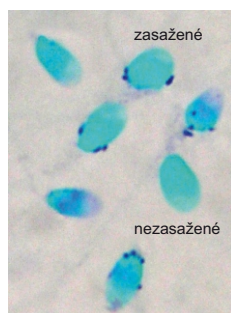
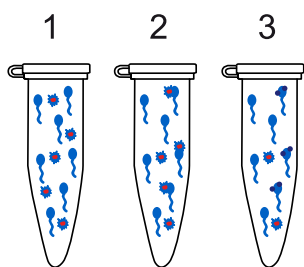


Principy metody

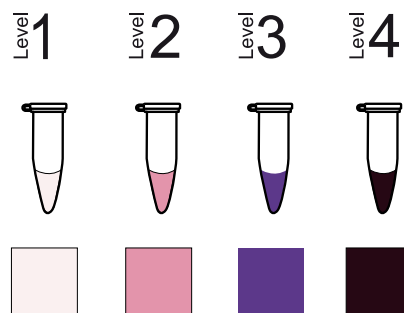
K výskytu destruktivních reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou spojovány s oxidačním stresem, dochází v situaci, kdy není přirozená antioxidační ochrana schopna blokovat aktivní ROS. Výsledkem je buněčné poškození na různých úrovních. Předpokládaným cílem ROS jsou i somatické a zárodečné buňky. V případě zasažení zárodečných buněk má nadbytek oxidačního stresu přímý vliv na mužskou plodnost (Aitken a De Iuliis, 2010).

V současnosti je zavedeno množství citlivých testů pro posouzení různých úrovní ROS a molekul odpovědných za tvorbu oxidačního stresu, avšak klinické andrologické laboratoře je často nepoužívají. OxiSperm poskytuje lékařům snadné, spolehlivé a dobře zavedené testy pro měření možného nadbytku superoxidových aniontů (O₂⁻) v ejakulátu.

Test je založen na nitrotetrazoliové modři (NBT) ve formě reaktivního gelu (RG), který je součástí sady OxiSperm. NBT test je založen na schopnosti ve vodě rozpustné tetrazoliové soli, která se činností superoxidových aniontů přemění na ve vodě nerozpustný modrý krystal, který je známý jako formazan (Baehner et al, 1976). Ve spermatu se produkty této reakce připojí k membránám spermatu a jsou snadno viditelné při mikroskopii ve světlém poli (Obr. 1). Tyto krystaly vytváří v RG barvu o různé intenzitě (od žluté po různé stupně purpurově modré, viz diagram), která může být snadno stanovena porovnáním okem při použití barevné stupnice. Alternativně lze použít kolorimetr pro měření absorpce vlnových délek od 530 nm po 630nm. Intenzita barvy souvisí se stupněm oxidačního stresu (nadbytkem superoxidových aniontů) ve vzorku (viz barevná paleta).



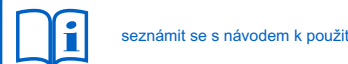
Obr. 1 Diagramové zobrazení oxidační reakce a jak se sperma změní po přeměně NBT na formazan. Fotografie napravo ukazuje spermie, které byly zasaženy O₂⁻ a ostatní, kde byl efekt nulový. Tak jak se zvyšuje počet molekul na povrchu spermatu, zvyšuje se i barevná intenzita RG.



Obr. 2 Diagramové zobrazení stupně barevné intenzity podle schopnosti vzorku spermatu vytvořit kolorimetrickou reakci.

Protokol

1. Do zkumavky umístíte RG a zahříváte 1 minutu v inkubátoru na maximální stupeň. Alternativně lze RG zkapalnit ve vodní lázni při 90° C přibližně po dobu 5 minut.
2. Zmírníte teplotu RG na 37° C za použití vodní lázně nebo v inkubátoru při 37° C.
3. Smíchejte RG se vzorkem spermatu v jedné z přiložených eppendorfových zkumavek. Pokuste se vyvarovat bublinám ve výsledné směsi.
4. Nechte směs zrosolovatět při 4° C po dobu 5 minut.
5. Inkubujte po dobu 45 minut při 37° C a porovnejte barvu vzorku s barevným schématem.



seznámit se s návodem k použití



označení výrobku



číslo šarže



spotřebujte do



postačující pro „n“ testy



omezení teploty



uchovávejte v suchu

Klasifikovány jsou čtyři stupně (L) intenzity: L1: nízká, L2: nižší střední, L3: střední, L4: vysoká.

Jak spočítat potřebný vzorek

Číslo 1000 vydělíte koncentrací spermií. Výsledkem je objem, který se musí smíchat se stejným množstvím RG (poměr 1:1, sperma – RG).

Příklad: pro koncentraci 32 milionů spermií:

$$1000 / 32 = 31.25$$
$$31.25 \mu\text{l spermatu} + 31.25 \mu\text{l RG.}$$

Za účelem snazšího výpočtu je možné násobit objemy společným jmenovatelem až do 100 μl pro obě části směsi.

V našem příkladu by to bylo:

$$31.25 \times 3 = 93.75 \mu\text{l spermatu} + \text{stejně množství (93,75 } \mu\text{l) RG}$$

V tomto případě byl použit jmenovatel x3.

Pro získání nejlepších výsledků se musí test provádět při použití čerstvých vzorků spermatu a ihned po zkapalnění. Vzorky se musí testovat na oxidační stres 60 minut po ejakulaci. Při delším prodlení se mohou vyskytnout falešné pozitivní výsledky. Při míchání vzorku spermatu s RG je nutné udržovat teplotu blízko 37° C, jinak směs zrosolovatí.

NB: je velmi důležité znát přesnou koncentraci spermií. Vysoké koncentrace spermií mohou vytvářet barvu o vysoké intenzitě kvůli zrychlení tlaku oxidačního stresu při kolizi spermií a následnému poškození membrány.

Preventivní opatření

1. S veškerými vzorky pacientů a činidly se musí zacházet jako s potenciálně infekčními a uživatel musí při provádění testu nosit ochranné rukavice, ochranu očí a laboratorní plášť.
2. Test je nutné po provedení vyhodit do vhodného kontejneru na biologicky nebezpečný odpad.
3. Nejezte, nepijte ani nekuřte v prostorách, kde se manipuluje se vzorky a činidly.
4. Doporučuje se použití rukavic a obličejové masky.
5. List údajů o bezpečnosti materiálu je dostupný na vyžádání.

Podmínky skladování

Skladujte při pokojové teplotě (22°).

Aitken RJ, De lullis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod. 2010;16:3-13.

Baehner, R. L., Boxer, L. A. & Davis, J. (1976) The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. Blood 48, 309–313.