STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Počítačem asistované hodnocení morfologie spermií

Šimon Hajda

Středoškolská odborná činnost

Obor 06 – Zdravotnictví

Počítačem asistované hodnocení morfologie spermií

Autor:	Šimon Hajda
Škola:	Gymnázium, Brno – Řečkovice,
	Terezy Novákové 2, 621 00 Brno
	Septima A
Konzultanti:	Prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.
	RNDr. Kateřina Cibulková

Brno 2010 – Jihomoravský kraj

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením Prof. MUDr. Pavla Trávníka, DrSc. Veškeré informační zdroje včetně internetu jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Brně dne 22.2.2010

.....
Podpis

Poděkování patří mému odbornému konzultantovi Prof. MUDr. Pavlu Trávníkovi, DrSc., bez jehož materiálů, času a ochoty by táto práce vůbec nevznikla. Také bych chtěl poděkovat sanatoriu Repromeda, které mi při tvorbě práce vyšlo vstříc.

Anotace

Předmětem této práce je ověření přesnosti měření morfologie spermií poloautomatickým softwarem SpermEvalCamera na barvených preparátech, které jsou z nám známých metod považovány za nejseriózněji k vyhodnocování.

V první fázi jsem za pomocí poloautomatického software změřil 15 spermií ze 6 barvených vzorků klientů přicházejících na diagnostiku neplodnosti anebo vzorky dárců spermatu. Každou spermii jsem změřil celkem 10x, aby byly výsledné hodnoty co nejobjektivnější. Jednalo se o délku a šířku hlavičky, dále pak o šířku krčku a délku spermie. V další fázi jsem zaznačil jednotlivé hodnoty do tabulek, z nichž jsem vypočítal, pro naše měření nejdůležitější, směrodatnou odchylku jednotlivých měření a celého souboru.

Výsledky ukázaly, že použitá metoda umožňuje dostatečně přesné měření potřebných rozměrů spermie, tudíž bude možné pokračovat ve vývoji software pro poloautomatické hodnocení morfologie spermií pro diagnózu i výzkumné účely.

Práce pro mne měla velký praktický význam, co se týče práce s jednotlivými preparáty a měření rozměrů spermie. V budoucnu bych rád vystudoval medicínu a věnoval se oboru reprodukční medicíny, gynekologie nebo porodnictví. Výsledky mé práce budou přínosné pro centra asistované reprodukce, kdy by toto poloautomatické hodnocení morfologie spermií mělo nahradit dosavadní daleko méně přesnou metodu hodnocení nativních spermií.

Obsah:

Úvod 8
1 Teoretická část 8
1.1 Spermie 8
1.1.1 Vznik a vývoj pohlavních buněk 8
1.1.2 Varle, jeho stavba a vývodné cesty pohlavní 9
1.1.3 Spermatogeneze 10
1.1.4 Stavba spermie 14
1.1.4.1 Hlavička spermie 15
2 Praktická část 16
2.1 Význam hodnocení morfologie spermií a možnosti jeho objektivizace 16
2.1.1 Co morfologie spermií indikuje? 16
2.1.2 Metody hodnocení morfologie spermií 16
2.1.2.1 Odvození morfologie od parametrů pohyblivosti 17
2.1.2.2 Hodnocení nativních spermií ve fázovém kontrastu 18
2.1.2.3 Vyhodnocení barvených preparátů 19
2.1.3 Nevýhody manuálního vyhodnocení 19
2.1.4 Řešení 20
2.1.4.1 Potřebné parametry rozměrů a tvaru spermie 20
2.1.4.2 Místo a úhel připojení krčku k hlavičce 20
2.1.4.3 Přítomnost ostrých úhlů na bičíku 20
2.1.4.4 Nepravidelnosti tvaru spermie 20
2.1.5 Schůdná cesta je poloautomatická 20
2.1.5.1 Manuální kroky 20
2.1.5.2 Automatické kroky 20
2.1.6 Závěr 21
2.2 Postup při měření 21
2.2.1 Statistické pojmy 21

2.2.1.1 Průměr (aritmetický průměr) 21
2.2.1.2 Medián 21
2.2.1.3 Minimum 21
2.2.1.4 Maximum 22
2.2.1.5 Průměrná odchylka 22
2.2.1.6 Směrodatná odchylka výběru 22
2.2.2 Kalibrace 23
2.2.2.1 Typ kamery a její parametry 23
2.2.3 Prostředí softwaru SpermEvalCamera 25
2.2.4 Snímky 26
2.2.4.1 *Snímek č. 1:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s globozoospermií. 26
2.2.4.2 *Snímek č. 2:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s globozoospermií.. 26
2.2.4.3 *Snímek č. 3:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií. 27
2.2.4.4 *Snímek č. 4:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií. 27
2.2.4.5 *Snímek č. 5:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií 28
2.2.4.6 *Snímek č. 6:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií 28
2.2.5 Výsledky měření 29
2.2.5.1 *Tabulka č. 2:* Délka hlavičky 29
2.2.5.2 *Tabulka č. 3:* Šířka hlavičky 30
2.2.5.3 *Tabulka č. 4:* Šířka krčku 31
2.2.5.4 *Tabulka č. 5:* Délka spermie 32
Závěr 33
Seznam použité literatury 34

Úvod

Toto téma jsem si vybral za účelem zjistit průběh hodnocení parametrů morfologie spermií, jenž jsou velmi důležité pro vyšetření mužské plodnosti. Našim cílem je dospět co k nejobjektivnějším hodnotám morfologie spermií, čehož docílíme použitím poloautomatického software.

1 Teoretická část

1.1 Spermie

1.1.1 Vznik a vývoj pohlavních buněk

Již v časných stadiích embryonálního vývoje se od ostatních somatických buněk odlišují buňky, které jsou předchůdci budoucích buněk pohlavních, tzv. primordiální* zárodečné buňky. Z těchto buněk mohou vznikat jen buňky pohlavní; jsou-li zničeny, je jedinec sterilní.[1] Migrují z ektodermu přes extraembryonální entoderm* do primordia budoucích gonád*, zárodečné rýhy.

Pokud je přítomen chromozom Y, pak se v sedmém týdnu vývoje vyvine primordium pro varlata, pokud chybí, v osmém týdnu se objeví primordium pro vaječníky.

Primordiální gonocyty se v gonádách stávají zdrojem pohlavních buněk, které z nich vznikají množením, růstem a zracím, tj. redukčním dělením. I když jsou mezi vývojem samčích a samičích pohlavních buněk, tj. mezi spermatogenezí a oogenezí*, rozdíly související s podstatně rozdílným konečným utvářením a úlohou gamet* různého pohlaví, zrací dělení probíhá v zásadě shodně.[2]

primordiální* - prapohlavní (primordium - počátek), entoderm - vnitřní zárodečný list živočišného embrya, gonáda - pohlavní žláza, oogeneze - vývoj vajíčka ve vaječníku, gameta* - zralá pohlavní buňka

---

[1] Přehled biologie

[2] www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato02.html#aubau

1.1.2 Varle, jeho stavba a vývodné cesty pohlavní

Varle *(testes)* je samčí pohlavní žláza a také důležitá žláza endokrinní. Jedná se o párový orgán; zdravý jedinec má normálně dvě varlata, jedno je větší než druhé a to tak, že levé varle je většinou větší a sestouplejší níže. Na zadní stěně na ně shora navazuje nadvarle *(epididymis)*.

Varlata jsou uložena za penisem v kožním vaku, který se nazývá šourek *(scrotum)*. Vyvíjejí se v dutině břišní a většinou již v průběhu nitroděložního vývoje sestupují tříselným kanálem do šourku. U chlapců by k sestoupení varlat mělo dojít do tří měsíců věku. Nesestoupení varlat se nazývá kryptorchismus, pokud nesestoupí jen jedno varle, je to jednostranný kryptorchismus nebo také monorchismus. Oboustranný kryptorchismus vede k neplodnosti.

Kryptorchismus je nejčastější porucha vývoje pohlavních orgánů (3% novorozenců; část se však spontánně upraví, v jednom roce je to již jen 1%). Komplikace porušeného sestupu varlat zahrnují nejen neplodnost *(oboustranný kryptorchismus, nesestoupení obou varlat)*, ale i zvýšené riziko maligních nádorů varlete.

Na povrchu je varle kryté vazivovým obalem *(tunica albuginea)*, vazivo zasahuje i do parenchymu varlete a rozděluje ho na neúplné lalůčky. Nerozdělená část varlete *(mediastinum)* přechází v hlavu nadvarlete. Parenchym varlete se skládá z mnohonásobně stočených semenotvorných kanálků *(tubuli seminiferi contorti)* a řídkého vaziva vyplňující prostor mezi nimi, které obsahuje Leydigovy buňky produkující mužský pohlavní hormon testosteron.

Stěny semenotvorných kanálků tvoří zárodečný epitel, který je tvořen spermatogoniemi, buňkami, ze kterých procesem spermatogeneze vznikají spermie. Tyto buňky jsou vyživované a chráněné podpůrnými Sertoliho buňkami. Sertoliho buňky obalují jednotlivá stadia vývoje spermie a chrání je i před vlivy vnějšího prostředí. Semenotvorné kanálky se spojují a přechází do kanálků nadvarlete.[3]

[3] www.wikipedia.org/wiki/Varle

V nadvarleti se spermie mísí s hlenovitým sekretem buněk, vystýlajících nadvarle, a dozrávají. Vývodem nadvarlete je chámovod *(ductus deferens)* probíhající vzhůru tříselným kanálem a ústící pod močovým měchýřem do močové trubice. V místě vyústění chámovodů obemyká močovou trubici žláza předstojná *(prostata)*. Žlázky prostaty produkují sekret, který svou alkalickou reakcí neutralizuje kyselou reakci v pochvě a močové trubici, a zvyšuje tak životnost a pohyblivost spermií. Před vstupem do žlázy předstojné se připojují k chámovodům měchýřkovité žlázy *(glanduae vesiculosa)*. Jejich sekret se mísí s obsahem prostaty a s hlenovitým sekretem nadvarlat. Vzniklá tekutina se nazývá ejakulát *(chám)*.[4]

1.1.3 Spermatogeneze

Vývoj samčích pohlavních buněk *(spermatogeneze)* probíhá ve varleti. Vývoj varlat nastává, kromě jiných faktorů, hlavně pod vlivem testosteronu, který je produkován Leydigovými intersticiálními buňkami. Ty vycestovávají z mezenchymu zárodečné rýhy a zahajují svoji aktivitu v sedmém týdnu zárodečného vývoje. Druhá vlna aktivity těchto buněk přichází v pubertě. Vede k dozrání epitelia gonád a růstu a formování lumenu* v semenotvorných kanálcích.

Po celý zbytek života se pak v semenotvorných kanálcích tvoří spermie, denně okolo 100 milionů. Ke svému vývinu potřebují teplotu o 2-3°C nižší než je tělesná teplota. Teplota varlat je ovladatelná pomocí napětí stěny šourku. Při stažení šourku se varlata přitáhnou blíže k tělu, kde se jejich teplota zvýší. Při povolení stěny šourku naopak teplota uvnitř poklesne. Tak dochází k regulaci teploty. Druhý předpoklad pro zdárně probíhající vývin je nepatrně zvýšený tlak okolí.[5]

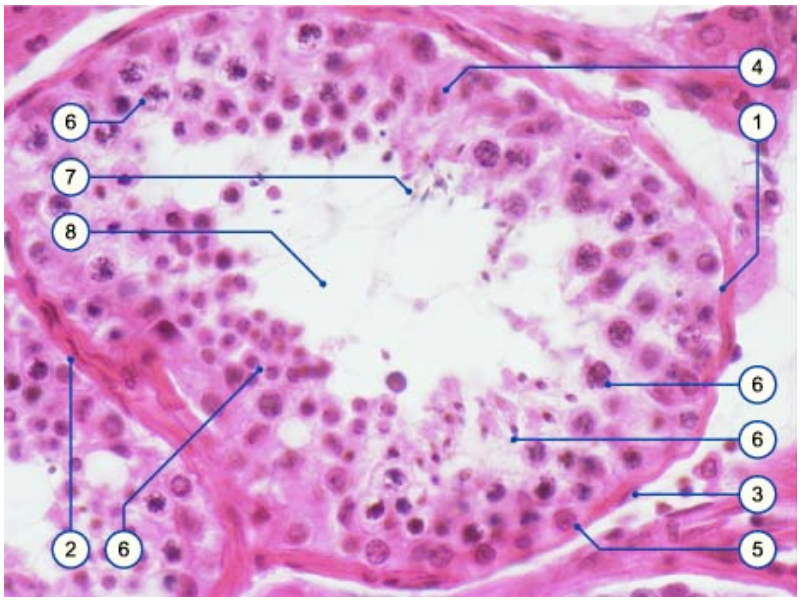
lumen* - dutina kanálků

---

[4] http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm#sestup

[5] www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato01.html#einleitung

Obrázek č. 1: **Histologický preparát semenotvorného kanálku *(tubuli seminiferi contorti)* u dospělého jedince**



1 basální membrána (nerozpoznatelná)

2 myofibroblast

3 fibrocyt

4 Sertoliho buňky

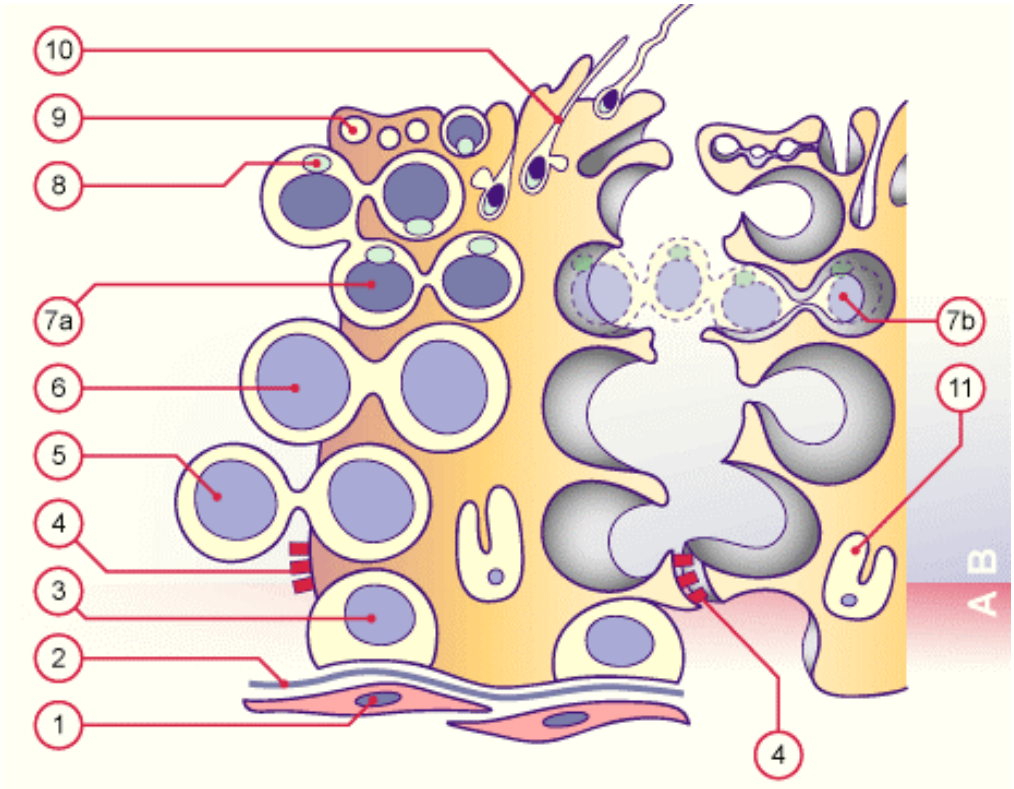
5 spermatogonium

6 různá stadia vývoje zarodečné buňky během spermatogeneze

7 spermie

8 lumen

Obrázek č. 2: **Průběh spermatogeneze**



1 peritubulární buňky
2 basální membrána
3 spermatogonium
4 těsný styk
5 primární spermatocyty
6 sekundární spermatocyty
7a spermatidy
7b spermatidy
8 akrosom
9 zbytky spermatid
10 spermie
11 Sertoliho buňky
A basální oblast
B oblast lumenu

Spermatogonia, která jsou uložena pod basální membránou semenných váčků, podstupují mitotické dělení za vzniku primárních spermatocyt *(spermatocyty I. řádu)*. Primární spermatocyty jsou diploidní, avšak po prvním meiotickém dělení z nich vznikají haploidní sekundární spermatocyty *(spermatocyty II. řádu)*. Ty mají stále zdvojené chromatidy, proto záhy dochází k druhému meiotickému dělení, jehož produktem jsou spermatidy. Tyto buňky jsou již plně haploidní a dále se nedělí. Spermatidy poté prochází procesem spermiogeneze, při kterém dochází ke kondenzaci jádra, vytvoření bičíku a ztrátě většiny cytoplazmy a některých organel. Nezralé spermie putují přes semenotvorné kanálky do nadvarlete, kde dochází k jejich definitivnímu zrání.[6]

Celý cyklus trvá přibližně 64 dní a dá se také rozdělit na čtyři fáze, odlišující se od sebe délkou trvání *(viz Tabulka č. 1)*.

Tabulka č. 1: **Trvání jednotlivých fází spermatogeneze**

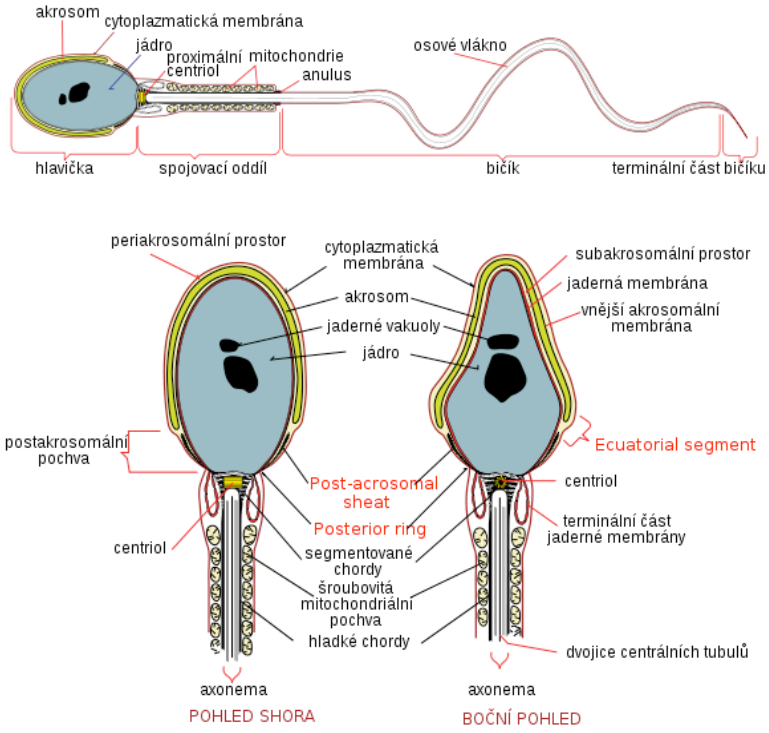
Název	**Trvání**	**Výsledek**
Mitóza spermatogonií	16 dní	Primární spermatocyt
První meióza	24 dní	Sekundární spermatocyt
Druhá meióza	hodiny	Spermatida
Spermiogeneze	24 dní	Spermie
Transport nadvarletem	8 – 17 dní	Dokončuje se zrání spermií

[6] https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm

1.1.4 Stavba spermie

Správná morfologie spermie a přítomnost všech jejích komponentů jsou důležitým a nezbytným předpokladem pro úspěšné splynutí s vajíčkem a následný vývoj zárodku. Zralá spermie se dělí na tři hlavní části: hlavičku, střední část *(krček)* a bičík.[7]

Obrázek č. 3: **Stavba spermie**



Spermie je 60 µm dlouhá buňka, z toho 55 µm připadá na bičík. Pohybuje se rychlostí 10 – 60 µm/s, zdrojem energie pro spermii je glukóza. Pro funkci spermií je zásadně důležitá přítomnost kalciových a magneziových iontů.

Na celém povrchu je spermie pokryta buněčnou membránou, pod níž leží tenká vrstvička cytoplazmy. Hlavička má oválný tvar a ze strany je zploštělá. Podstatnou část hlavičky tvoří jádro, jenž obsahuje haploidní počet chromozomů.[8] Ve spojovacím oddíle jsou uloženy mitochondrie, které vyrábějí energii potřebnou k pohybu spermie a bičík obsahuje mikrotubuly.[9]

---

[7] http://is.muni.cz/th/94059/prif_m/DIPLOMKA_HLAVNI.txt
[8] Disertační práce MUDr. Veselé
[9] https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm

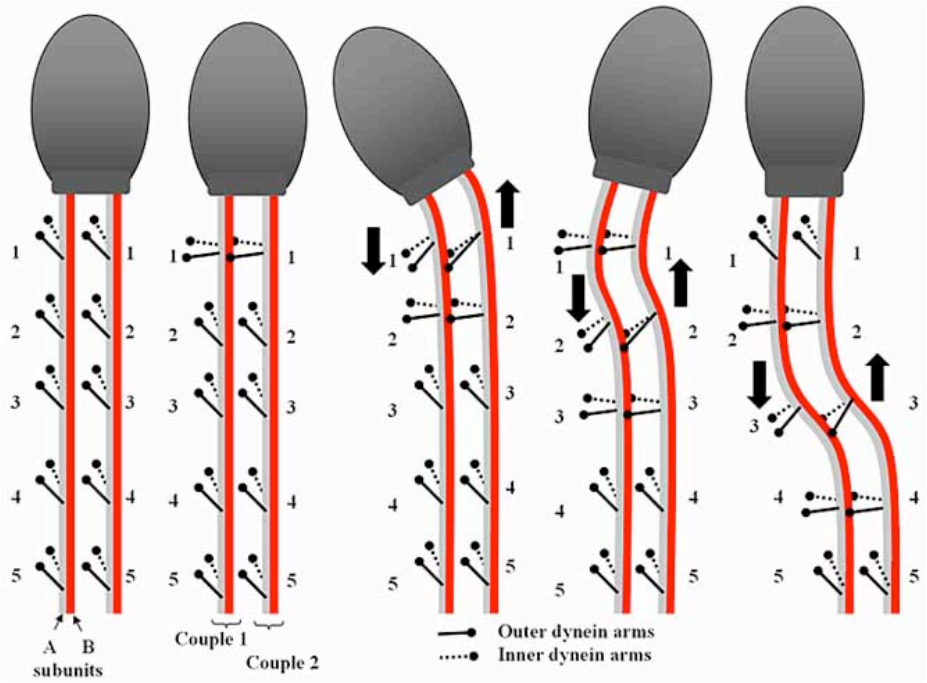
1.1.4.1 Hlavička spermie

Formace a organizace hlavičky spermie je složitý proces zahrnující změny jak morfologické, tak i molekulární. Dochází k postupným změnám v jádře a akrozomu, který je v předních dvou třetinách hlavičky, ve spolupráci s hlavním svazkem mikrotubulů *(manchette)*. Spolu s manchette se těchto změn účastní další dvě struktury, a to akroplaxom* a perinukleární théka*.

Hlavička spermie obsahuje:

- haploidní jádro
- akrozom *(specializovaný lysozom vznikající splynutím váčků Golgiho aparátu, který obsahuje proteolytické enzymy nezbytné pro překonání obalů vajíčka)*
- centrioly[10]

Obrázek č. 4: **Mechanismus pohybu bičíku**



akroplaxom* - ztenčený přední okraj vzniklý během zplošťování akrozomální čepičky (v raném stádiu spermatid), perinukleární théka* - cytoskeletální element obsahující molekuly podílející se na formování jádra a akrozomu a nezbytné pro oplození (oocyty aktivující faktor)

[10] Toshimori&Chizuru, 2003

2 Praktická část

2.1 Význam hodnocení morfologie spermií a možnosti jeho objektivizace

Hodnocení morfologie spermií je nedílná součást vyšetření parametrů mužské plodnosti, při němž využíváme řadu rutinních metod. Naším úkolem je nalézt cestu k objektivizaci vyhodnocení morfologie spermií.

2.1.1 Co morfologie spermií indikuje?

- Průběh spermatogeneze a spermiogeneze
- Schopnost spermie oplodnit vajíčko
- Vývojový potenciál vzniklého embrya
- Možný výskyt genetických odchylek *(aneuploidií)*

2.1.2 Metody hodnocení morfologie spermií

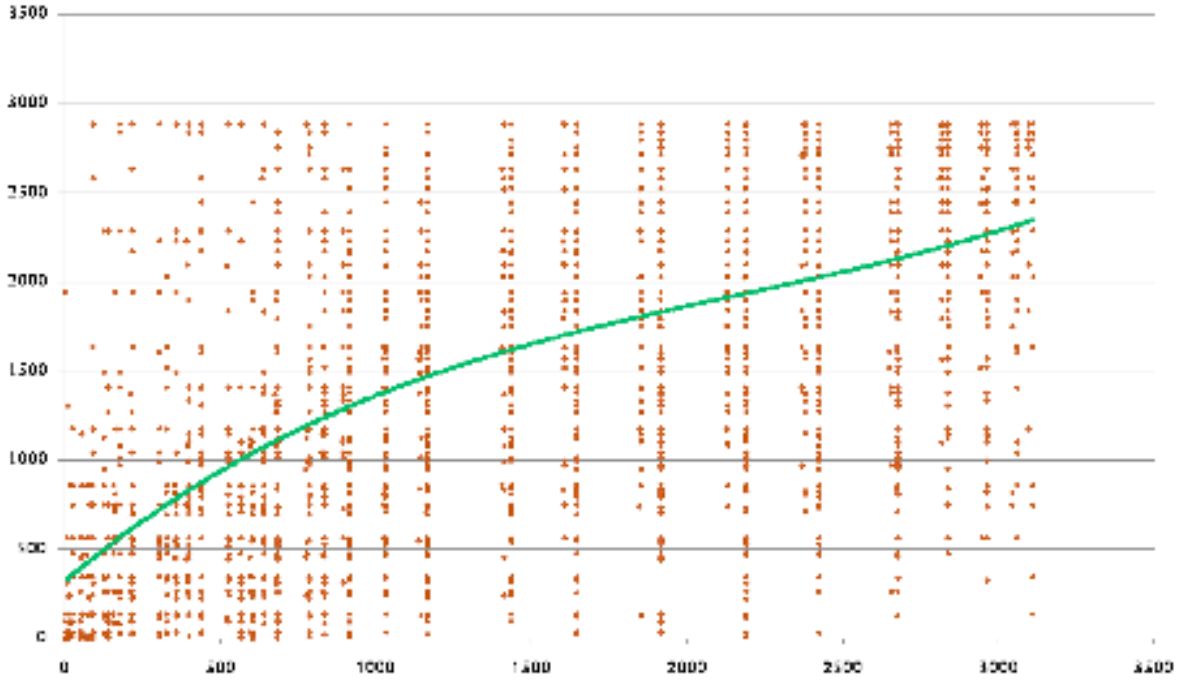
- Odvození morfologie od parametrů pohyblivosti
- Hodnocení nativních* spermií ve fázovém kontrastu
- Vyhodnocení barvených preparátů

nativní spermie* - živá spermie, která není zabarvena kontrastní látkou; volně se pohybující

2.1.2.1 Odvození morfologie od parametrů pohyblivosti

Nejde o seriózní hodnocení – předpokládá se korelace mezi morfologií a pohyblivostí spermií, což platí pro velké soubory, ne individuálně.

Graf č. 1: **Vztah mezi morfologií spermií a jejich pohyblivostí**



Aby bylo možno porovnávat dvě různé veličiny, které nabývají různých hodnot, byly hodnoty obou veličin seřazeny podle velikosti.

Na ose **x** je vyneseno pořadí hodnoty pohyblivosti (podíl spermií progresívně rychle pohyblivých z celkového množství), na ose **y** pořadí hodnoty morfologie (podíl spermií s normální morfologií z celkového množství).

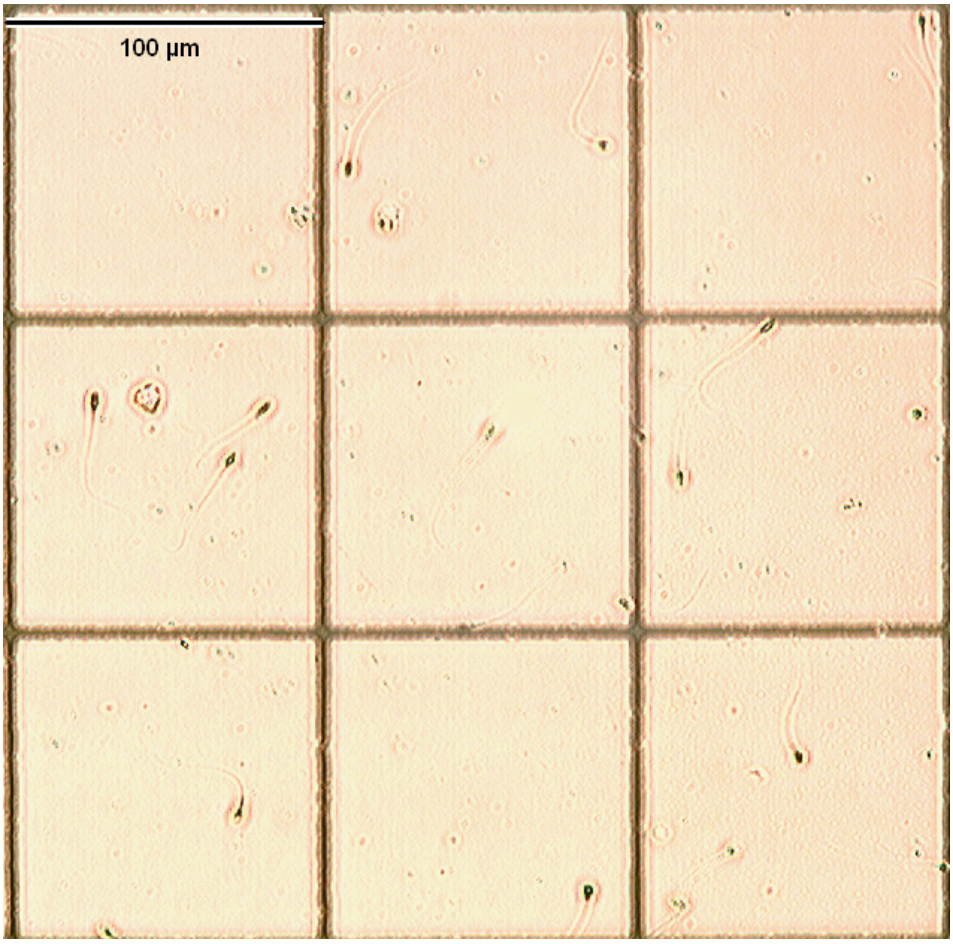
Korelační koeficient mezi pohyblivostí a morfologií spermií je 0,58, což svědčí pro silnou korelaci.

Z grafu je zřejmé, že statistická závislost existuje, ale rozptyl hodnot je tak velký, že pro individuální diagnostiku nemá smysl.

2.1.2.2 Hodnocení nativních spermií ve fázovém kontrastu

- Rozlišovací schopnost 1-1,5 µm (20 – 30% velikosti hlavičky), z čehož plyne velmi malá přesnost měření
- Spermie se pohybuje, proto ji nejsme schopni přesně změřit
- Neostrý obraz (halo)

Obrázek č. 5: **Hodnocení morfologie ve fázovém kontrastu**



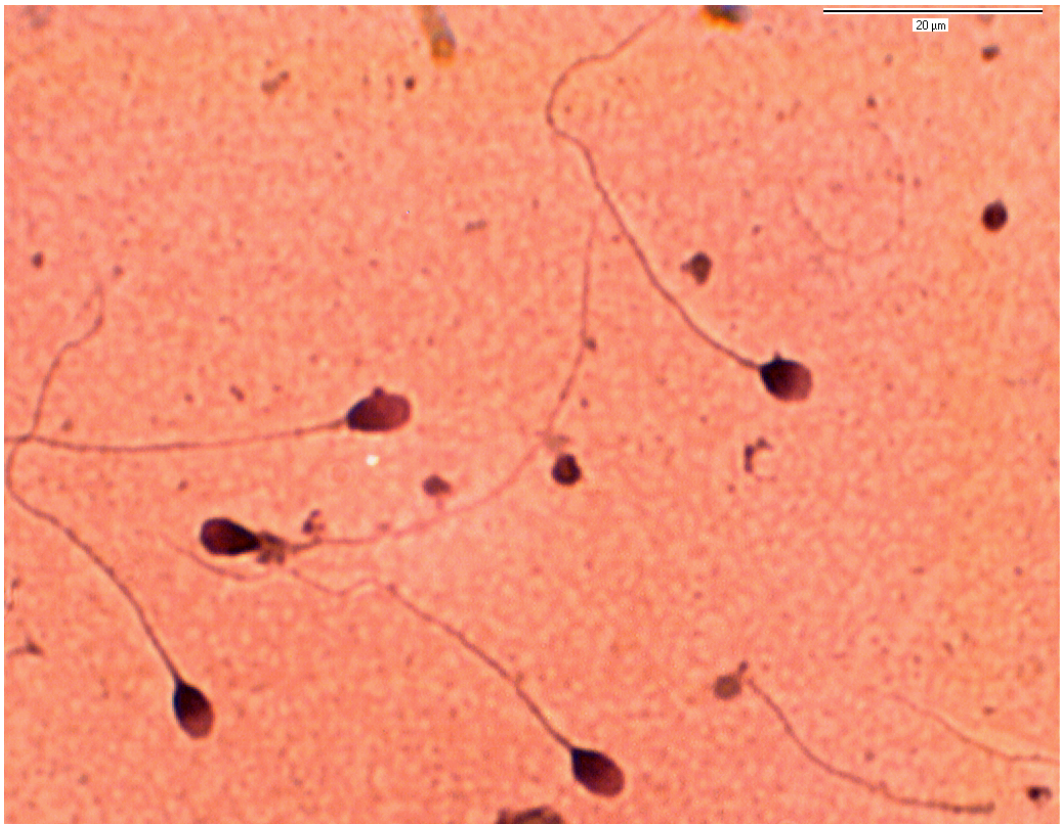
Fotografie spermií v Maklerově komůrce ve fázovém kontrastu. Zvětšení 500x.

Z obrázku je patrné, že zvětšení není dostatečné pro vyhodnocení tvaru spermie a velikosti jejích součástí. Tvar spermie je navíc neostrý.

2.1.2.3 Vyhodnocení barvených preparátů

- Rozlišovací schopnost cca 0,3 µm při imerzním objektivu 100x
- Spermie se nepohybuje
- Ostrý obraz a barevný kontrast

Obrázek č. 6: **Hodnocení morfologie na barveném preparátu**



Fotografie spermií na barveném nátěru. Zvětšení 1650x.

Spermie jsou na barveném nátěru znázorněny ostře, lze dobře určit velikost a tvar jejích součástí.

2.1.3 Nevýhody manuálního vyhodnocení

- Zdlouhavé měření okulárovým mikrometrem
- Malá přesnost měření okulárovým mikrometrem
- Nutnost ručního záznamu měření a přepisování výsledků
- Nutnost ručního výpočtu hodnot
- Chybí označení již vyhodnocených spermií
- Chybí indikace dosažení dostatečného počtu měření

2.1.4 Řešení

- Objektivizace a racionalizace

2.1.4.1 Potřebné parametry rozměrů a tvaru spermie

- Rozměry hlavičky
- Rozměry akrozomální oblasti
- Šířka krčku (případné cytoplazmatické kapky)
- Délka spermie

2.1.4.2 Místo a úhel připojení krčku k hlavičce

2.1.4.3 Přítomnost ostrých úhlů na bičíku

2.1.4.4 Nepravidelnosti tvaru spermie

- Vyhodnocení rozměrů a tvaru spermie
- Vyhodnocení parametrů spermie počítačem

2.1.5 Schůdná cesta je poloautomatická

2.1.5.1 Manuální kroky

- Identifikace spermie
- Identifikace 5 bodů a 1 linie na spermii
- Doplnění identifikace odchylek tvaru spermie

2.1.5.2 Automatické kroky

- Zjištění rozměrů v zadaných bodech
- Označení již změřené spermie
- Identifikace konce měření (dostatečný počet měření)
- Provedení všech výpočtů
- Uložení výsledků do databáze
- Tiskový výstup

2.1.6 Závěr

- Vyhodnocení morfologie spermií je velmi užitečné jak pro diagnózu, tak i pro výzkumné účely
- Seriózní výsledky dává jen vyhodnocení barvených preparátů
- Manuální vyhodnocení je časově náročné a zatížené chybami
- Jako schůdná cesta se ukazuje poloautomatická analýza obrazu

2.2 Postup při měření

2.2.1 Statistické pojmy

2.2.1.1 Průměr (aritmetický průměr)

Vyjadřuje statistickou střední hodnotu, je to podíl součtu všech hodnot a jejich počtu. Dává správný obraz o střední hodnotě, jen když má soubor normální rozdělení.

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^N x_i}{N}$$

2.2.1.2 Medián

Vyjadřuje statistickou střední hodnotu, je to hodnota v pořadí podle velikosti prostřední položky. Dává správný obraz i u souborů s jiným, než normálním rozdělením a u souborů s odlehlou hodnotou (1 nebo několik položek souboru se svou velikostí vymyká např. **1**, 5, 5, 6, 5, 7, 5, 6, **12**).

$$\tilde{x} = x_{n/2}$$

2.2.1.3 Minimum

Nejmenší naměřená hodnota.

2.2.1.4 Maximum

Největší naměřená hodnota.

2.2.1.5 Průměrná odchylka

Průměr absolutních hodnot odchylek jednotlivých položek od průměrné hodnoty souboru.

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^{N} |x_i - \bar{x}|}{N}$$

2.2.1.6 Směrodatná odchylka výběru

Vyjadřuje míru rozptylu hodnot statistického výběru.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}$$

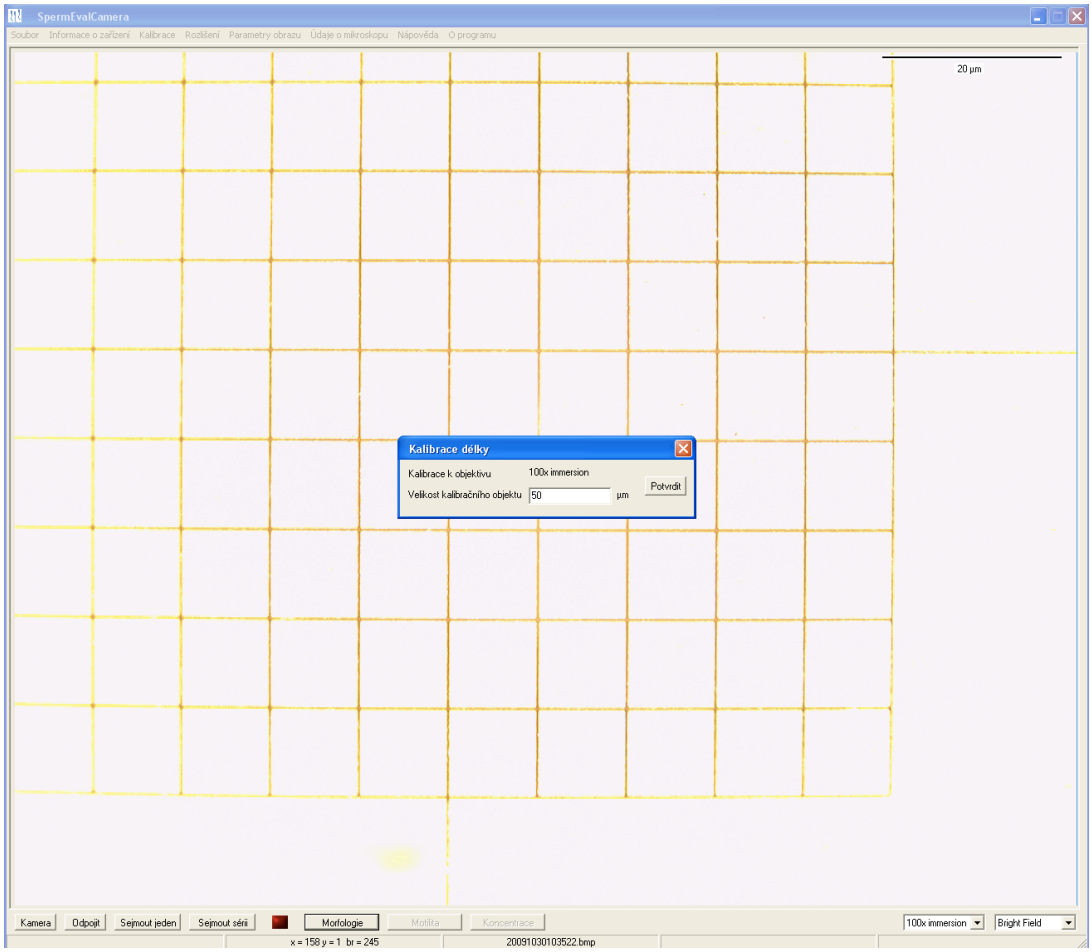
2.2.2 Kalibrace

Při kalibraci je v mikroskopu příslušným objektivem vyfotografována přesná mřížka Maklerovy komůrky a změřena relativní délka úsečky, zahrnující několik polí mřížky. Ze známé velikosti polí mřížky a zjištěné odpovídající délky úsečky je stanoven faktor, kterým musíme násobit (respektive program automaticky vynásobí) změřenou hodnotu, abychom dostali skutečnou hodnotu v mikrometrech.

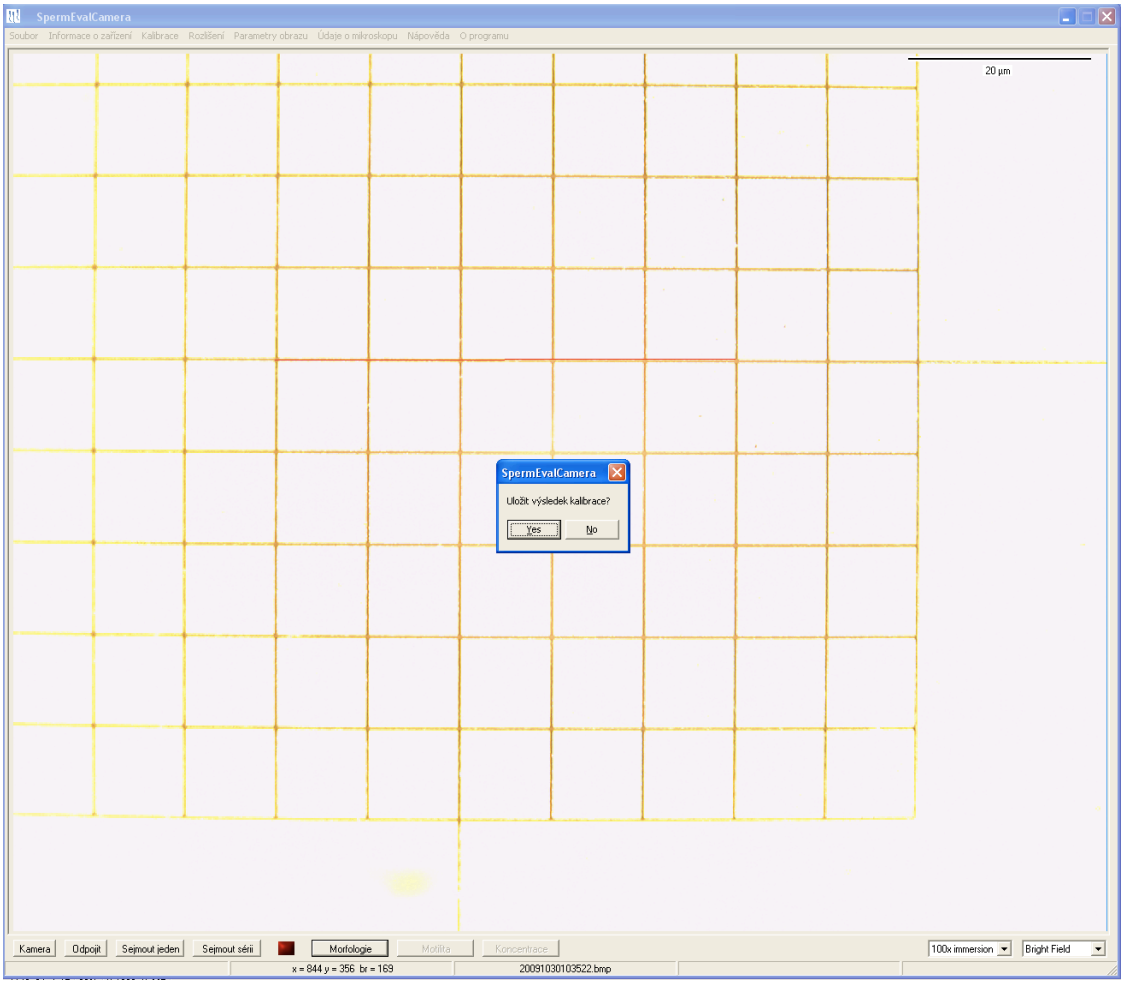
2.2.2.1 Typ kamery a její parametry

USB kamera ScopeTek DCM130 pracovala při rozlišení 1280x1024 bodů.

Obrázek č. 7 : **Kalibrace délky**

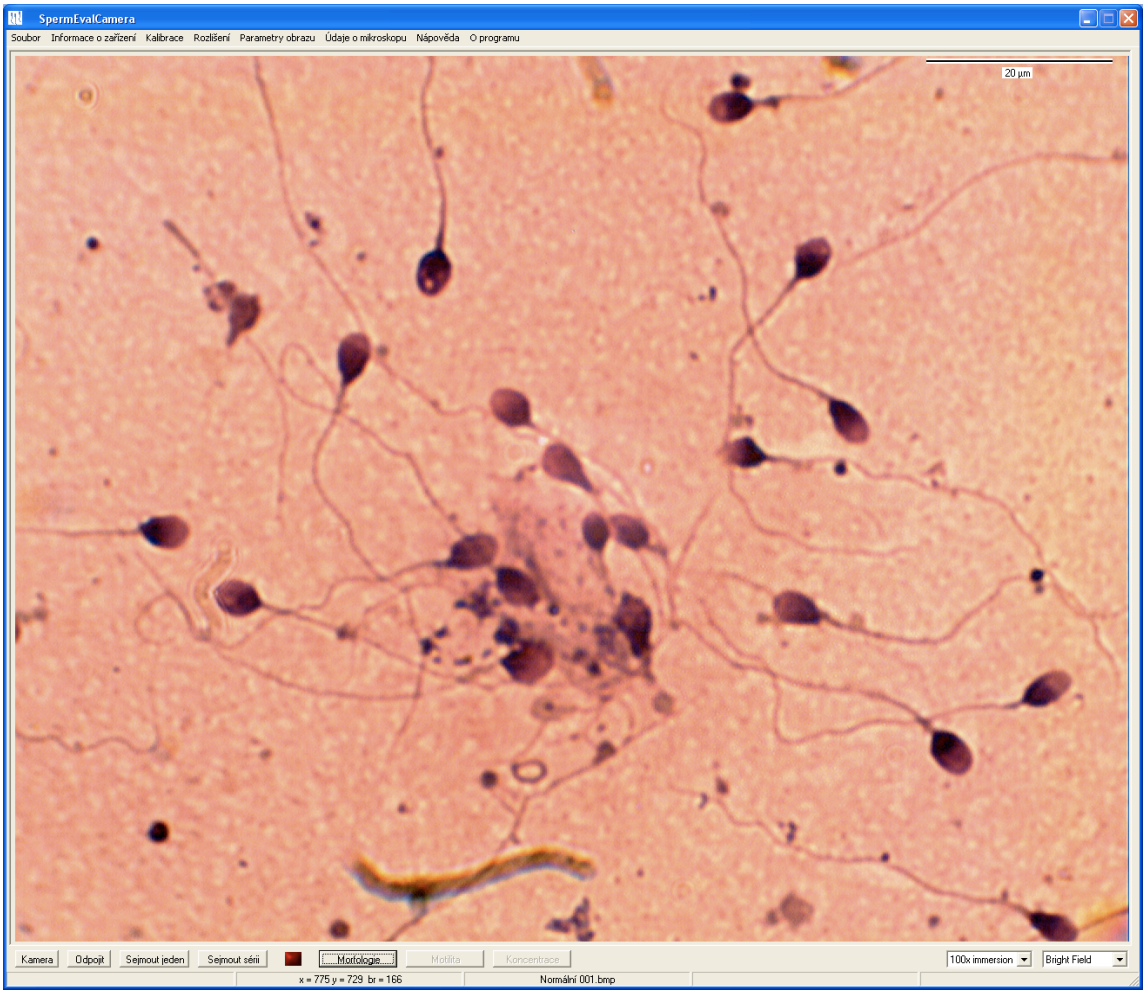


Obrázek č. 8: **Kalibrace**



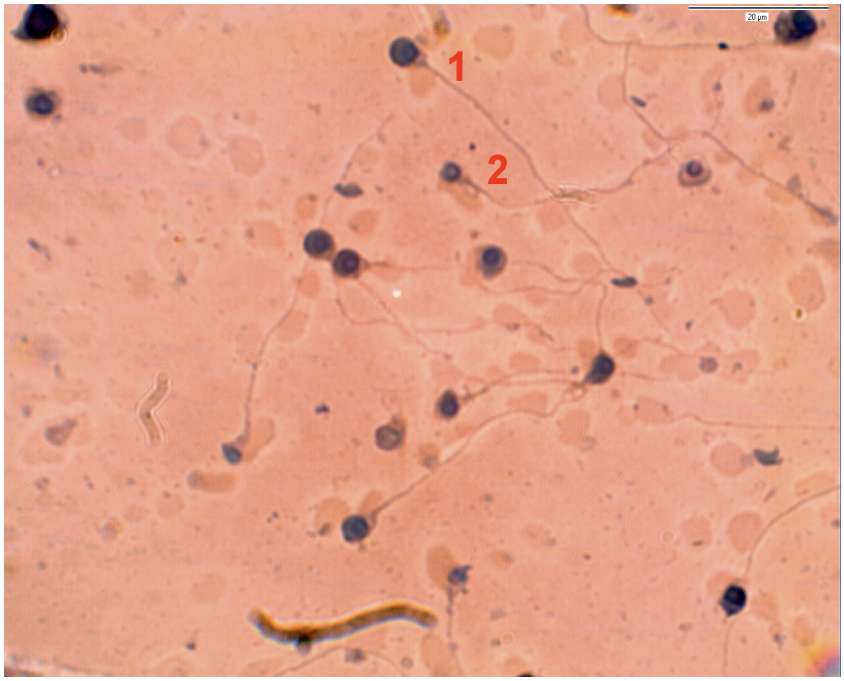
2.2.3 Prostředí softwaru SpermEvalCamera

Obrázek č. 9: **Pohled na okno softwaru**

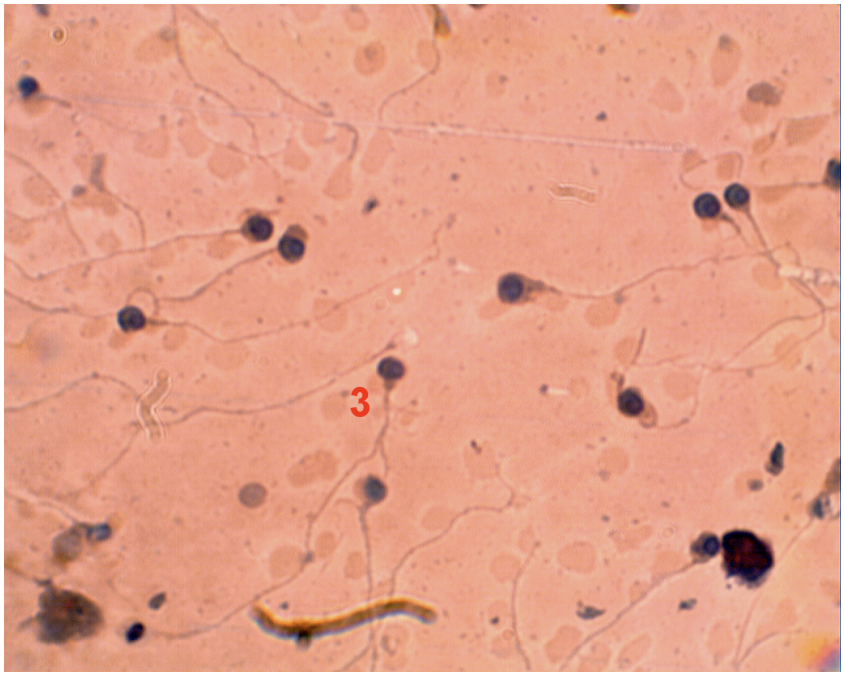


2.2.4 Snímky

2.2.4.1 *Snímek č. 1:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s globozoospermií*. Zvětšení 1650x.

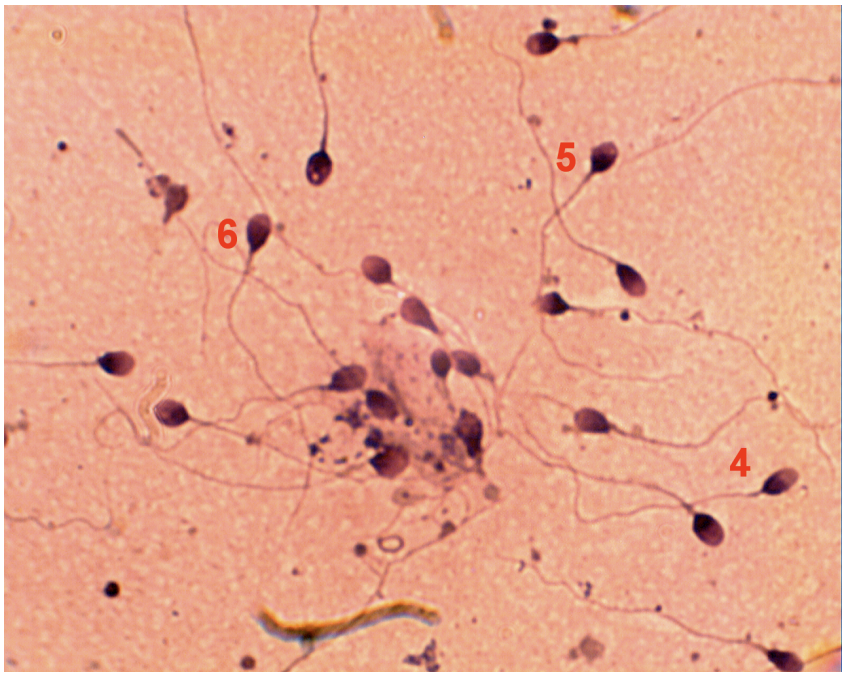


2.2.4.2 *Snímek č. 2:* Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s globozoospermií. Zvětšení 1650x.

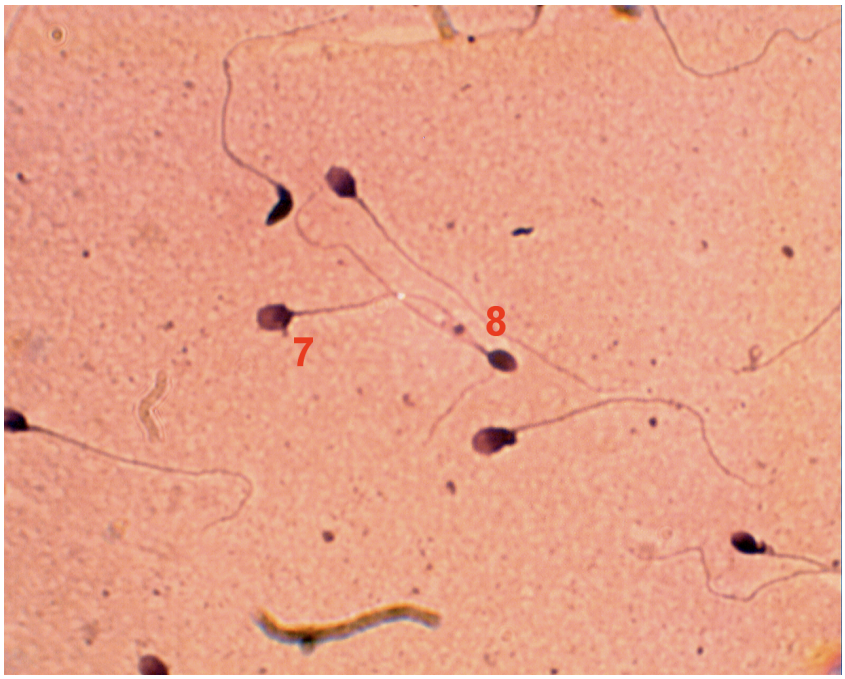


globozoospermie* - menší kulatá hlavička spermie

2.2.4.3 ***Snímek č. 3:*** **Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií*. Zvětšení 1650x.**

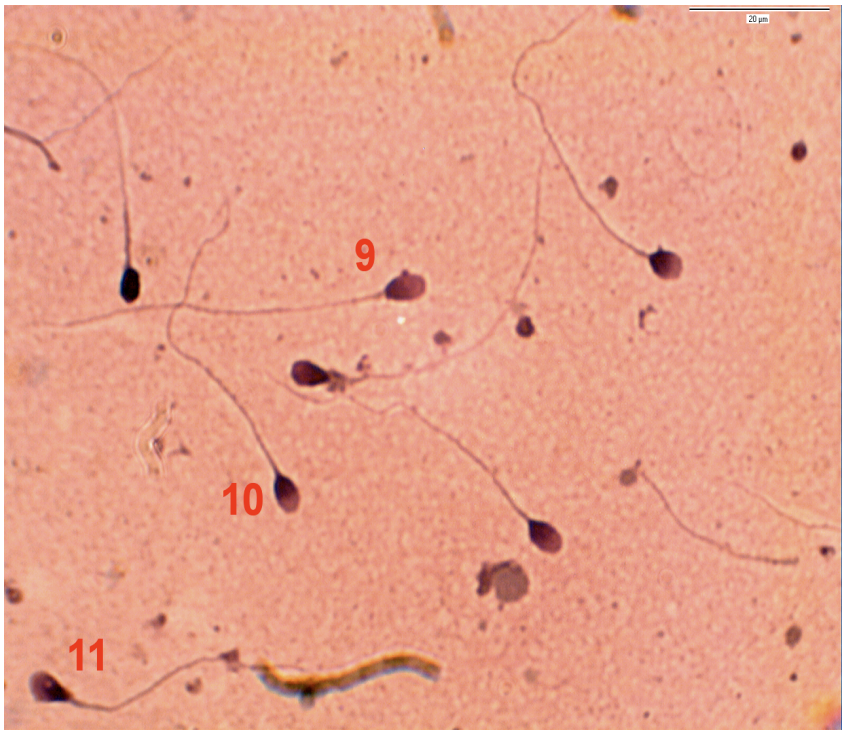


2.2.4.4 ***Snímek č. 4:*** **Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií. Zvětšení 1650x.**

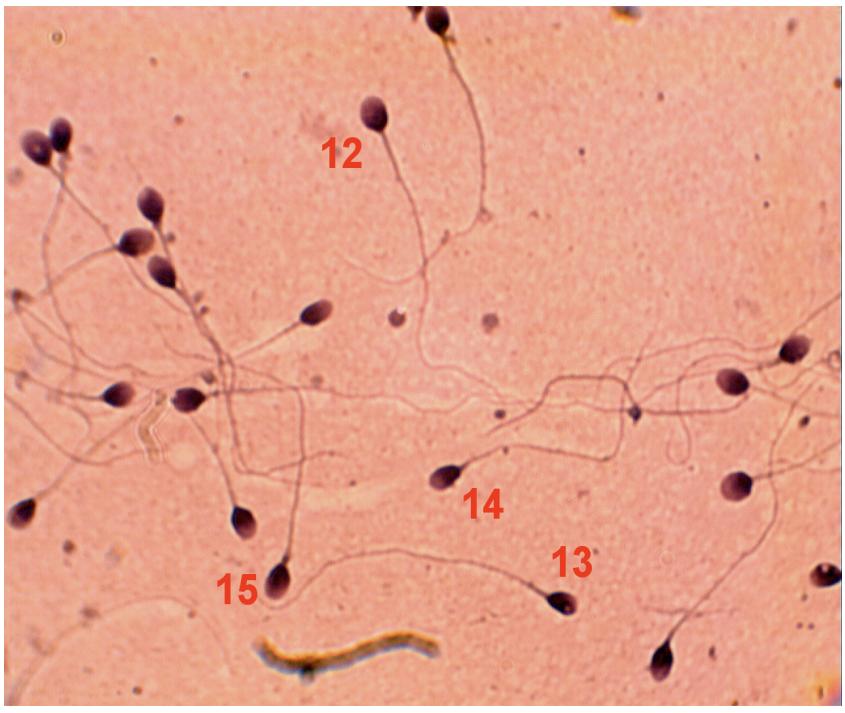


normospermie* - morfologicky normální spermie

2.2.4.5 ***Snímek č. 5:*** **Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií. Zvětšení 1650x.**



2.2.4.6 ***Snímek č. 6:*** **Preparát – nátěr spermií barvených metodou DIP-QUICK – pacient s normospermií. Zvětšení 1650x.**



2.2.5 Výsledky měření

Ze 6 barvených vzorků jsem vybral 15 spermií, které se zdály být morfologicky normální, bez větších odchylek. U každé spermie jsem označil 5 údajů – začátek hlavičky, začátek akrosomu, konec hlavičky, začátek krčku, konec krčku a poté myší vyznačil celou délku bičíku. Naměřené údaje jsem zaznamenal do tabulky.

2.2.5.1 *Tabulka č. 2:* Délka hlavičky

Spermie	Délka hlavičky [µm]						
	Počet měření	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Průměrná odchylka	Směrodatná odchylka výběru
1	10	4.24	4.26	3.93	4.49	0.1300	0.1654
2	10	2.79	2.80	2.62	2.99	0.0678	0.1023
3	10	3.33	3.27	3.18	3.55	0.1236	0.1404
4	10	5.70	5.70	5.61	5.80	0.0582	0.0776
5	10	5.03	5.05	4.77	5.14	0.0984	0.1229
6	10	4.97	4.95	4.86	5.14	0.0984	0.1154
7	10	4.64	4.67	4.49	4.77	0.0564	0.0759
8	10	4.43	4.44	4.30	4.58	0.0770	0.0916
9	10	5.82	5.80	5.70	5.89	0.0592	0.0744
10	10	5.22	5.14	5.05	5.42	0.1272	0.1504
11	10	6.50	6.45	6.26	6.82	0.1504	0.1836
12	10	4.98	4.95	4.86	5.24	0.1104	0.1343
13	10	4.62	4.63	4.30	4.77	0.1120	0.1478
14	10	4.72	4.72	4.49	4.86	0.1040	0.1264
15	10	4.97	4.95	4.77	5.14	0.1014	0.1369

Hodnoty celkové					
Počet měřených spermií	15	15		15	15
Průměr	4.80	4.78		0.0983	0.1230
Medián	4.97	4.95		0.1014	0.1264
Minimum	2.79	2.80		0.0564	0.0744
Maximum	6.50	6.45		0.1504	0.1836
Průměrná odchylka	0.6406	0.6284			
Směrodatná odchylka výběru	0.9161	0.9101			

Z výsledků měření vyplývá, že průměrná zjištěná délka hlavičky byla 4,80 µm se směrodatnou odchylkou 0,9161 µm. Průměr směrodatných odchylek jednotlivých měření je 0,1230 µm, což je 7,5 krát méně, než směrodatná odchylka celého souboru. Z toho usuzujeme, že přesnost měření je dostatečná.

2.2.5.2 *Tabulka č. 3:* Šířka hlavičky

Spermie	Šířka hlavičky [µm]						
	Počet měření	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Průměrná odchylka	Směrodatná odchylka výběru
1	10	3.77	3.74	3.74	3.83	0.0378	0.0435
2	10	3.16	3.18	2.99	3.27	0.0768	0.0949
3	10	3.62	3.65	3.55	3.74	0.0552	0.0654
4	10	3.41	3.42	3.27	3.46	0.0550	0.0652
5	10	3.81	3.83	3.74	3.93	0.0592	0.0744
6	10	3.78	3.74	3.65	3.93	0.0712	0.0907
7	10	3.50	3.46	3.37	3.65	0.0816	0.1001
8	10	3.23	3.18	3.18	3.37	0.0552	0.0660
9	10	3.79	3.83	3.74	3.83	0.0432	0.0465
10	10	3.59	3.55	3.55	3.65	0.0480	0.0516
11	10	3.34	3.37	3.09	3.55	0.0912	0.1244
12	10	3.73	3.74	3.65	3.74	0.0162	0.0285
13	10	3.13	3.14	2.99	3.18	0.0550	0.0652
14	10	3.39	3.37	3.27	3.55	0.0888	0.1081
15	10	3.66	3.70	3.46	3.74	0.0840	0.1034
Hodnoty celkové							
Počet měřených spermií	15	15				15	15
Průměr	3.53	3.53				0.0612	0.0752
Medián	3.59	3.55				0.0552	0.0660
Minimum	3.13	3.14				0.0162	0.0285
Maximum	3.81	3.83				0.0912	0.1244
Průměrná odchylka	0.2050	0.2093					
Směrodatná odchylka výběru	0.2390	0.2427					

Z výsledků měření vyplývá, že průměrná zjištěná šířka hlavičky byla 3,53 µm se směrodatnou odchylkou 0,2390 µm. Průměr směrodatných odchylek jednotlivých

měření je 0,0752 µm, což je 3 krát méně, než směrodatná odchylka celého souboru. Z toho usuzujeme, že přesnost měření je dostatečná.

2.2.5.3 *Tabulka č. 4:* Šířka krčku

Spermie	Šířka krčku [µm]						
	Počet měření	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Průměrná odchylka	Směrodatná odchylka výběru
1	10	1.45	1.40	1.22	1.68	0.1032	0.1399
2	10	1.52	1.45	1.22	2.15	0.2410	0.2964
3	10	2.39	2.24	1.96	2.90	0.3304	0.3734
4	10	0.80	0.84	0.75	0.84	0.0432	0.0465
5	10	1.13	1.17	1.03	1.22	0.0860	0.0945
6	10	1.96	1.96	1.78	2.24	0.1128	0.1450
7	10	2.08	2.11	1.78	2.24	0.1470	0.1783
8	10	0.40	0.37	0.28	0.65	0.0780	0.1083
9	10	1.28	1.27	1.03	1.50	0.1010	0.1316
10	10	0.44	0.47	0.28	0.56	0.0600	0.0783
11	10	0.62	0.65	0.37	0.84	0.0892	0.1256
12	10	0.72	0.75	0.65	0.84	0.0552	0.0654
13	10	0.28	0.28	0.09	0.37	0.0734	0.0970
14	10	1.25	1.22	1.12	1.40	0.0564	0.0759
15	10	1.38	1.36	1.22	1.59	0.1020	0.1245
Hodnoty celkové							
Počet měřených spermií	15	15				15	15
Průměr	1.18	1.17				0.1119	0.1387
Medián	1.25	1.22				0.0892	0.1245
Minimum	0.28	0.28				0.0432	0.0465
Maximum	2.39	2.24				0.3304	0.3734
Průměrná odchylka	0.5146	0.4867					
Směrodatná odchylka výběru	0.6411	0.6152					

Z výsledků měření vyplývá, že průměrná zjištěná šířka krčku byla 1,18 µm se směrodatnou odchylkou 0,6411 µm. Průměr směrodatných odchylek jednotlivých měření je 0,1387 µm, což je 4,5 krát méně, než směrodatná odchylka celého souboru. Z toho usuzujeme, že přesnost měření je dostatečná.

2.2.5.4 *Tabulka č. 5:* Délka spermie

Spermie	Délka spermie [µm]						
	Počet měření	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Průměrná odchylka	Směrodatná odchylka výběru
1	10	54.61	54.50	53.48	55.91	0.5544	0.7313
2	10	50.50	50.49	49.92	51.14	0.3370	0.4110
3	10	56.82	56.75	55.91	57.59	0.3220	0.4789
4	10	49.59	49.60	48.99	50.20	0.3550	0.4201
5	10	52.23	52.26	51.61	52.82	0.2880	0.3591
6	10	48.27	48.15	47.87	49.27	0.3064	0.4362
7	10	52.66	52.54	52.26	53.20	0.2860	0.3510
8	10	42.01	42.12	41.04	43.01	0.4520	0.6014
9	10	51.01	50.95	50.67	51.61	0.2360	0.3059
10	10	51.68	51.80	50.77	52.17	0.3024	0.4073
11	10	61.68	61.42	61.05	62.54	0.4900	0.5519
12	10	51.91	51.94	51.23	52.54	0.3640	0.4496
13	10	50.46	50.30	49.92	51.33	0.3738	0.4704
14	10	44.58	44.50	44.31	44.97	0.2032	0.2382
15	10	52.21	52.12	51.61	53.29	0.3356	0.4766

Hodnoty celkové					
Počet měřených spermií	15	15		15	15
Průměr	51.35	51.29		0.3471	0.4459
Medián	51.68	51.80		0.3356	0.4362
Minimum	42.01	42.12		0.2032	0.2382
Maximum	61.68	61.42		0.5544	0.7313
Průměrná odchylka	3.0694	3.0617			
Směrodatná odchylka výběru	4.6151	4.5618			

Z výsledků měření vyplývá, že průměrná zjištěná délka spermie byla 51,35 µm se směrodatnou odchylkou 4,6151 µm. Průměr směrodatných odchylek jednotlivých měření je 0,4459 µm, což je 10 krát méně, než směrodatná odchylka celého souboru. Z toho usuzujeme, že přesnost měření je dostatečná.

Závěr

V práci jsem se zabýval ověřením přesnosti měření morfologie spermií poloautomatickým softwarem SpermEvalCamera. Za nejserióznější metodu je považováno vyhodnocení barvených nátěrů, které jsem při své studii použil.

Hodnocení morfologie spermií je velmi důležité při vyšetření parametrů mužské plodnosti, proto je tedy zapotřebí, aby byla použitá metoda co nejobjektivnější.

Po vypočítání průměru směrodatných odchylek jednotlivých měření v každé tabulce jsme došli k závěru, že tato hodnota je několikrát nižší než směrodatná odchylka celého souboru. Můžeme tedy konstatovat, že přesnost měření je dostatečná, což platí v každém z našich měření.

V práci jsem splnil dané cíle. Použitá metoda umožňuje dostatečně přesné měření potřebných rozměrů spermie. Na základě statistického vyhodnocení měření bude možné pokračovat ve vývoji software pro poloautomatické hodnocení morfologie spermií pro výzkumné i klinické účely.

Seznam použité literatury

1 ROSYPAL, S. a kol. *Přehled biologie.* Praha: Scienia, 1994. 630 str. ISBN 80-85827-32-8

2 *Spermatogenesis* [online]. Poslední aktualizace 20.2.2008 [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato02.html#aubau>

3 *Varle* [online]. Poslední aktualizace 6.2.2010 [cit. 2010-2-15]. Wikipedia: otevřená encyklopedie. Dostupné z WWW: <http://www.wikipedia.org/wiki/Varle>

4 Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN. *Sestup varlat* [online]. c 2005-2006, [cit. 2009-11-26]. Dostupné z WWW: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/pohlavi.htm#sestup>

5 *Spermatogenesis* [online]. Poslední aktualizace 20.2.2008 [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato01.html#einleitung>

6 *Human Development* [online]. [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>

7 Bc. HRABCOVÁ, Lenka. Vztah morfologie spermií k jejich oplozovací schopnosti při IVF : diplomová práce. Brno : Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2007.

8 MUDr. VESELÁ, Kateřina. Gamety : disertační práce. Brno. 27 stran.

9 *Human Development* [online]. [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>

10 Toshimori, K., Chizuru, I. : Formation and organization of the mammalian sperm head. Arch Histol Cytol, 66, pp.383-396, 2003

obrázek č. 1:

Spermatogenesis [online]. Poslední aktualizace 20.2.2008 [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato01.html#einleitung>

obrázek č. 2:

Spermatogenesis [online]. Poslední aktualizace 20.2.2008 [cit. 2009-12-12]. Dostupné z WWW: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato02.html >

obrázek č. 3:

Toshimori, K., Chizuru, I. : Formation and organization of the mammalian sperm head. Arch Histol Cytol, 66, pp.383-396, 2003

obrázek č. 4:

Dostupné z WWW: <http://www.bioscience.org/2006/v11/af/1894/fig4.jpg>

tabulka č.1 :

MUDr. VESELÁ, Kateřina. Gamety : disertační práce. Brno. 27 stran.

graf č.1 :

Travnik P., Vesela K., Oracova E., Tauwinklova G., Vesely J., Hromadova L.: Interpretation of 4000 performed sperm assays, comparison with assisted reproduction results. Eur Androl Suppl 2008;2(1):37