



## Стекла Vitality SCA Протокол

### ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В СВЕТЛОМ ПОЛЕ

**Обоснование теста:** тест был разработан для измерения двух функциональных характеристик спермы. Первая: фактически живые сперматозоиды в образце. Вторая: качество /целостность клеточной мембраны, или способность клеточной мембраны противостоять осмотическому увеличению объема без разрушения.

Для оценки жизнеспособности используется раствор BrightVit на основе эозин-нигрозина. Мембраны нежизнеспособных клеток пропускают эозин, который окрашивает их в розовый цвет. Живые клетки остаются неокрашенными. Нигрозин служит темным фоном для обеспечения контраста.

Раствор BrightVit создан на основе гипосмотической среды, таким образом, параллельно можно провести тест на гипосмотическое набухание. Неповрежденные клетки будут набухать, тогда как у сперматозоидов с разрушенной мембраной будут наблюдаться тонкие прямые хвосты и отсутствие признаков набухания.

**Необходимые материалы:** Маленькие пробирки 0,5 мл типа Eppendorf, пипетки (2 по 50 мкл) и наконечники для них, стекла. Заливочная среда типа DPX или Eukitt и покровные стекла 20x50x0,13-0,16 мм опционально.

**Рекомендации:** Убедитесь, что все расходные материалы и растворы имеют одинаковую температуру (37 °C), чтобы избежать температурного шока.

BrightVit остается стабилен в течение года при условиях хранения в темном прохладном месте при температуре не выше 20 °C.

**Состав набора:** 8 мл раствора BrightVit, 200 стекол Vitality SCA.

**Процедура:** Рекомендуемая концентрация сперматозоидов для получения оптимальных результатов – от 4 до 8 млн/мл.

**Шаг 1:** Добавьте 40 мкл раствора BrightVit в маленькую пробирку Eppendorf (30 мкл для очень низких концентраций сперматозоидов – 1,5 млн и менее/мл).

**Шаг 2:** Поместите 10 мкл спермы в пробирку Eppendorf с раствором BrightVit и хорошо перемешайте в течение 15-20 секунд. Оставьте на 5-10 минут при температуре 37 °C.

**Шаг 3:** 20 мкл получившегося раствора поместите в центр стекла Vitality SCA. Положите обычное предметное стекло на стекло с каплей получившегося раствора таким образом, чтобы состав для окрашивания распределился по поверхностям обоих стекол. Для образцов с высокой концентрацией сперматозоидов (более 10 млн/мл) используйте примерно 10-15 мкл смеси спермы и BrightVit. Для образцов с низкой концентрацией сперматозоидов (менее 4 млн/мл) – 20-25 мкл.

**Шаг 4:** Сдвиньте стекла в противоположных направлениях. Так у вас получится два стекла для оценки. Оставьте стекла при комнатной температуре до полного высыхания.

Для сохранения образца рекомендуется покрыть образцы заливочной средой Eukitt или DPX или любой другой синтетической средой для заливки препаратов. После этого поместите предметные стекла в темную коробку;

озин чувствителен к свету, и, если будет подвержен световому воздействию до нескольких дней или недель, сперма может окраситься в розовый цвет.

**Шаг 5:** Проанализируйте оба стекла при помощи программы SCA. Проведите оценку по меньшей мере 100 сперматозоидов на каждом.

Живые сперматозоиды остаются неокрашенными (белыми), а мертвые окрашиваются в розовый цвет.

Выразите результат в процентах.

Важно, чтобы процент жизнеспособных сперматозоидов был равен проценту подвижных или больше него.

**Особые замечания:** Пвышенная вязкость спермы – распространенная проблема, с которой сталкиваются клиники ЭКО.

В таких случаях настоятельно рекомендуется произвести отмывку спермы обычной средой для отмывки спермы или хотя бы фосфатно-буферным раствором (например: смешайте 200 мкл необработанного образца с 1 мл буфера и центрифугируйте при 300 g в течение 10 минут. Удалите супернатант и разбавьте осадок фосфатным буфером, чтобы получить рабочую концентрацию сперматозоидов – от 4 до 8 млн/мл).

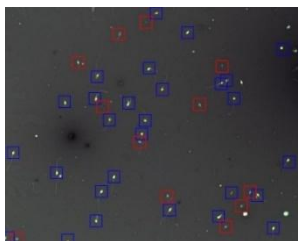


Fig. 1: Красными рамками отмечены окрашенные в розовый – мертвые сперматозоиды. Синими – живые.

Также уменьшает вязкость спермы ее аспирация с помощью шприца с луер-соединением через иглу 18G.

### Интерпретация результатов:

**Нижняя граница нормы:** По крайней мере 58% сперматозоидов должны быть живыми (неокрашенные сперматозоиды с набуханием хвостов).

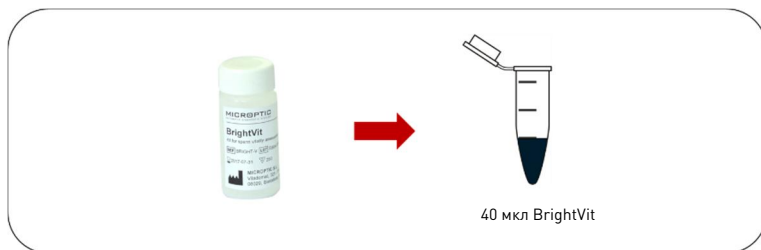
На рис. 1 показан автоматический анализ жизнеспособности, проведенный с помощью BrightVit.

На рис. 2 с большим увеличением показаны белые сперматозоиды с набухшими хвостами – демонстрация анализа на гипоосмотическое набухание. Эти исследования имеют большое значение в ВРТ.

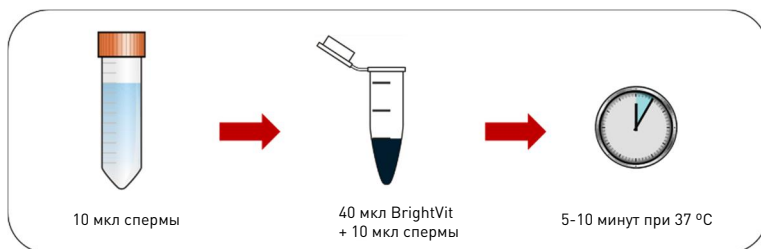


Рис. 2: Наблюдается осмотическое набухание хвостов неокрашенных сперматозоидов – они закручиваются в петлю в том месте, где присутствует отек. У окрашенных в розовый цвет сперматозоидов, напротив, хвосты тонкие и прямые из-за разрушения мембраны. Таким образом, здесь гипоосмотическое набухание = процент жизнеспособности.

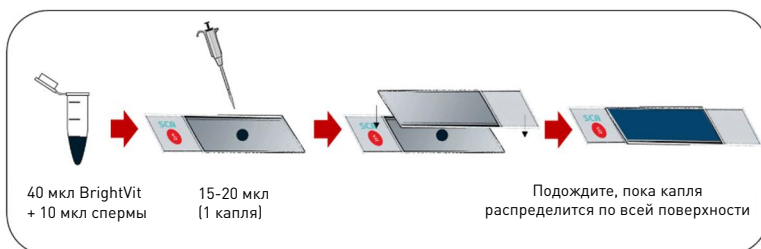
### Шаг 1:



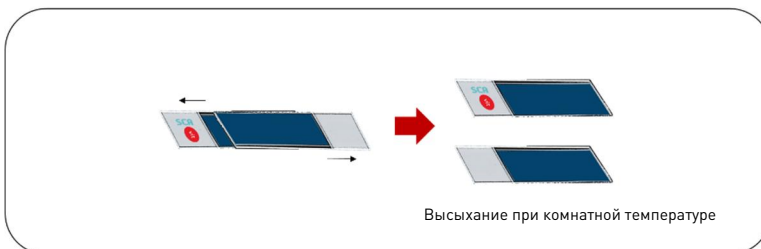
### Шаг 2:



### Шаг 3:



### Шаг 4:



### Шаг 5: Анализ при помощи SCA.



Эксклюзивный дистрибьютор ООО «БМТ»  
117342, г. Москва, ул. Бутлерова, 17Б  
+7 (495) 504-15-52, info@bmtltd.ru, www.bmtltd.ru