

Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

16.4.2024

Speciální metody selekce spermií

- Metody založené na koncentraci spermií, na změnách v napětí spermií, morfologii, motilitě, integritě membrán nebo integritě DNA
- Vývoj navazuje na pokroky v andrologické diagnostice
- Vyšší cenové náklady, vyšší nároky na vybavení laboratoře a na čas nutný ke zpracování vzorku
- Možnost indikace nejvhodnější techniky selekce spermií
- Diskutabilní výsledky – obvykle není jednoznačně prokázán pozitivní vliv na THBR (take home baby rate); HFEA „semafor“

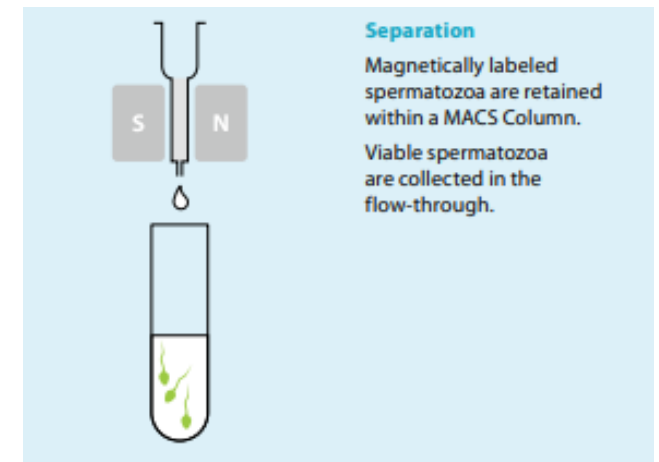
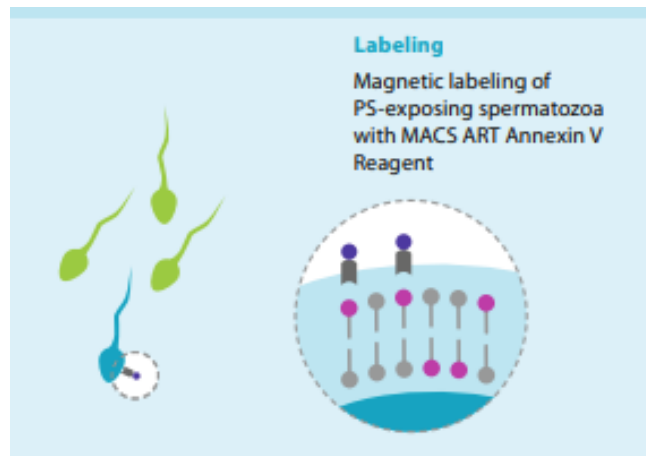
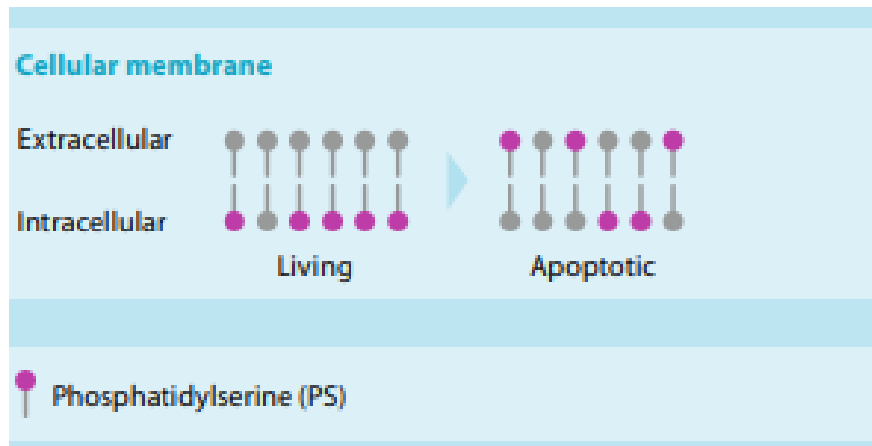
MACS

Magnetic activated cell sorting

- umožňuje selekci spermií na základě povrchových antigenů

MACS ART Annexin V system

- kit k odstranění apoptických spermií (**fosfatidylserin – annexin V** – drobná kovová nanočástice/kulička → průchod zmagnetizovanou kolonkou) → získání neapoptických spermií
- lepší funkční kvalita, nižší fragmentace DNA





- MACS lze kombinovat s předchozí gradientovou centrifugací nebo se swim-up
- Pozor na viskózní vzorky a želatinové inkluze -existuje možnost ucpání kolony
- Nevhodné na nízké koncentrace (pod milion/ml)

Mikrofluidní systémy

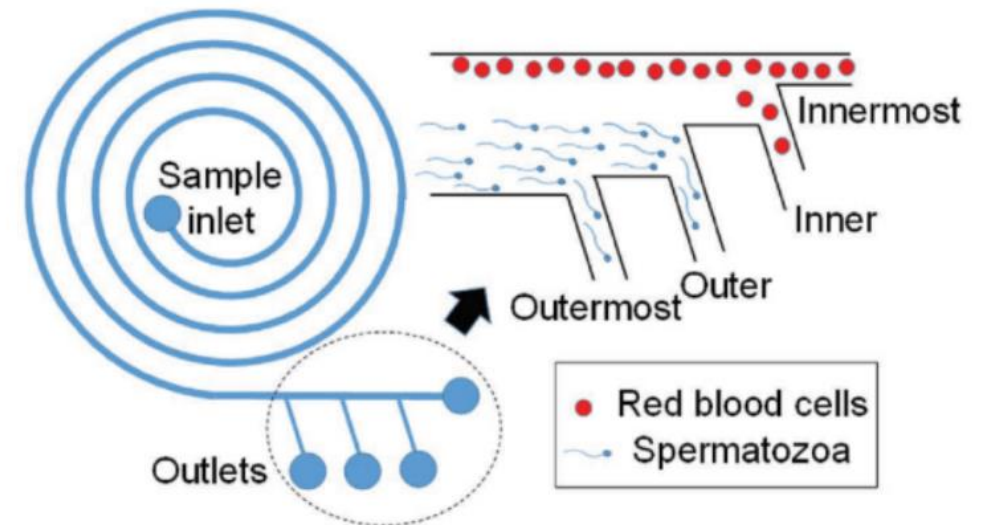
- Napodobení přirozených bariér, kterými spermie pronikají in vivo
- Neobsahují krok centrifugace spermií, šetrné ke vzorku
- Rychlé, pohodlné zpracování
- Vyšší cena než u běžného zpracování



- Selekcce na základě motility spermií (kanálky, membrány s póry) – **praktické využití v IVF** (mikrofluidní čipy)
- Selekcce na základě termotaxe, chemotaxe, rheotaxe
- Pasivní selekcce (na základě velikosti a hustoty buněk)
- Selekcce na základě pohlaví (využívá fotonické technologie rozlišující spermie nesoucí X a Y na základě rozdílného obsahu DNA)

Pasivní mikrofluidní selekce

- selekce na základě velikosti a hustoty buněk při průchodu spirálovým mikrokanálkem, kdy větší buňky mají tendenci migrovat k vnějšímu okraji kanálku, menší buňky zůstávají blíže středu kanálku
- spíše **experimentální**, vyvinuto na spermie potkana



Kombinace mikrofluidiky s Ramanovou spektroskopií

- dynamické vysokorychlostní zobrazování
- rozlišení spermií s intaktní DNA
- digitální zobrazování přímo na čipu- 3D zobrazování bez použití barvení –využití digitálního optoelektronického senzoru
- Principem digitální rekonstrukce 3D obrazu je záznam rozdílu interferenčního vzoru mezi referenční světelnou vlnou a světelnou vlnou rozptýlenou vzorkem
- Zatím experimentálně

https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Health_Care/Life_Sciences/Genomics/Raman_Analysis_of_Sperm_Nuclear_DNA_Integrity.pdf

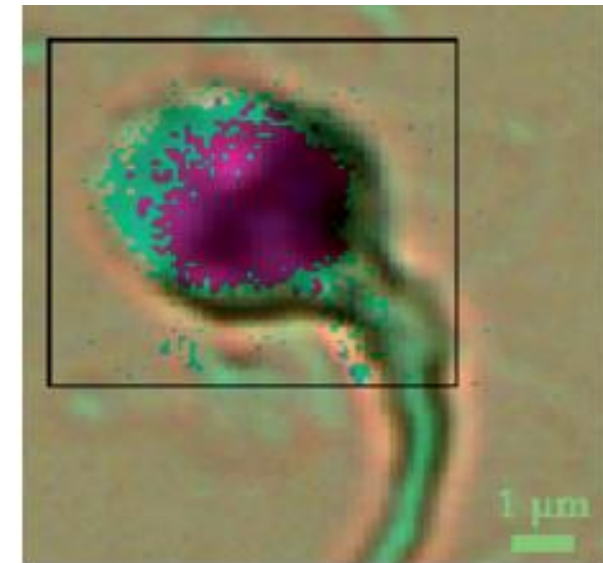
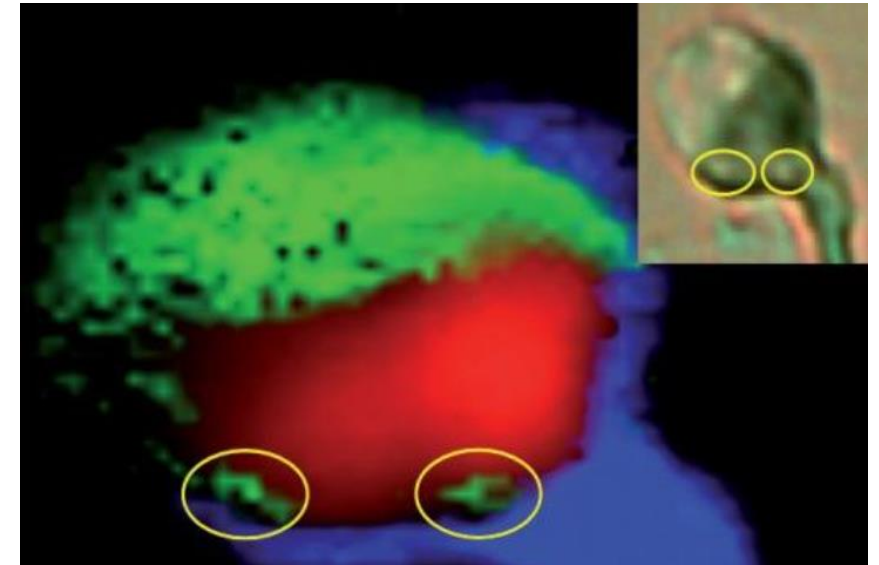


Figure 4: Overlay of human sperm showing the locations of spectra found to be indicative of intact (purple) and damaged (aqua) DNA.

Fertile(850 μ l) Sperm Separation Device

850 μ l ejakulátu se umístí pomocí tuberkulinky do spodní komory čipu, odkud spermie migrují přes membránu s mikropóry do média (750 μ l) naneseného nad membránu. Čip se umístí v petriho misce na 30 minut do 37°C. Následně je tuberkulinkou staženo médium s vyselektovanými spermii

- získá se populace motilních spermií s nižším podílem spermií s fragmentovanou DNA a s nižším podílem aneuploidií

- rutinně v praxi

- výhodou je, že se vzorek necentrifuguje!



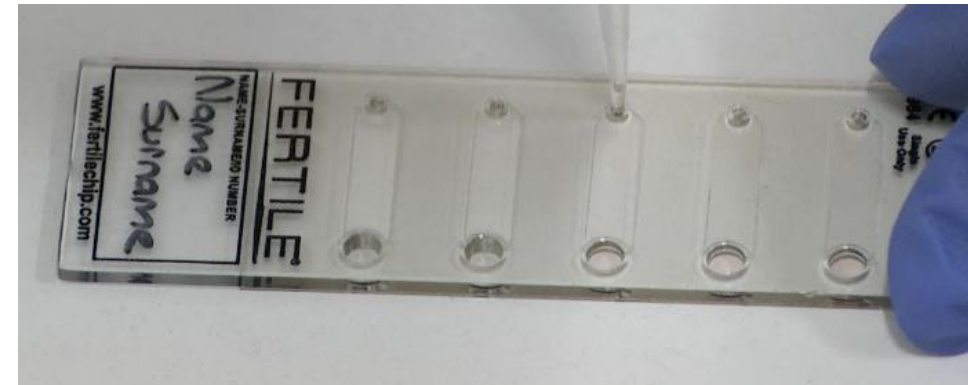
Fertile ICSI

Čip obsahuje 5 kanálků – kanálky naplníme „menším otvorem“ 15 μ l média a další kapku média umístíme do „většího otvoru“

Do menšího otvoru následně vpravíme 2 μ l ejakulátu a ponecháme 30 minut inkubovat v 37°C (v petriho misce).

Následně odebereme z většího otvoru médium se spermiemi pro ICSI

- rutinně v praxi



Vazba spermie k hyaluronanu

- **Vazba spermie na hyaluronan** – zralost spermie, funkčnost akrozomu, funkční kvalita, DNA fragmentace, fyziologický princip (hyaluronan je hlavní složkou ECM kumulárních buněk)
- zdlouhavější pro embryologa – **selektce spermií probíhá po běžné přípravě vzorku na andrologii až na speciální misce v embryologické laboratoři těsně před ICSI**
- **PICSI a SpermSlow**
- rutinně v praxi
- kombinovatelné s různými druhy zpracování spermií, pouze je třeba dostatečný zisk spermií

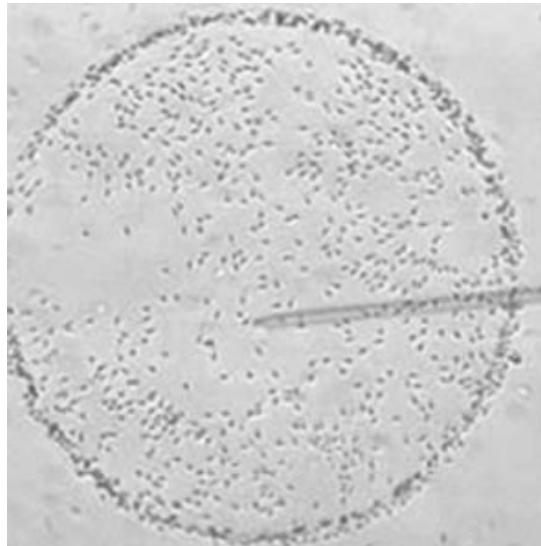


Physiological intracytoplasmic sperm injection (PICSI) – in use for patients having ICSI treatment for male factor infertility



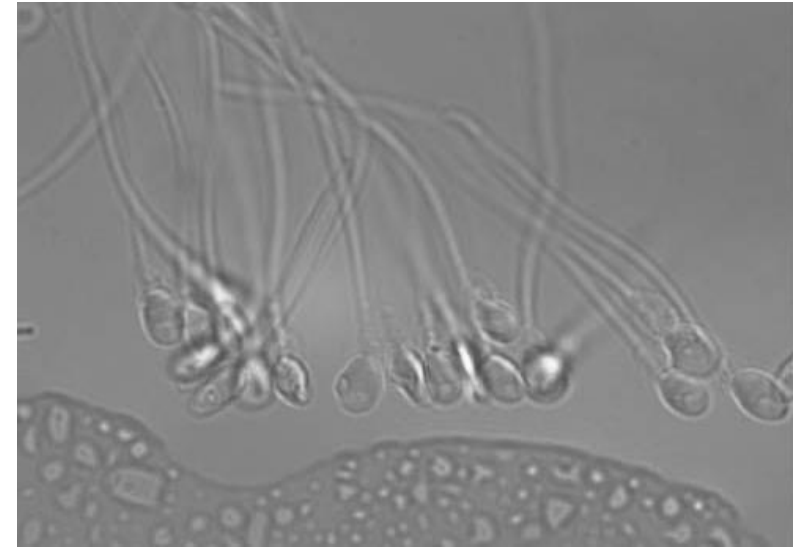
On balance, the evidence from moderate/high quality evidence shows that **this add-on has no effect on the treatment outcome.**

- **PICSI** – (physiological intracytoplasmic sperm injection) speciální hyaluronanem potažená miska, spermie přilnou a vykazují specifický pohyb
- **SpermSlow** – imobilizační médium obsahující hyaluronan, přidává se přímo na ICSI misku v blízkosti PVP (médium ke zpomalení spermií) a následně pomocí ICSI jehly jsou obě média propojena a embryolog vybírá spermie zachycené v médiu s hyaluronanem



IMSI

- intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
- 6000x
- MSOME- motile sperm organelle morphology examination
- Kombinace vysokého zvětšení a Nomarskiho interferenčního kontrastu → výběr spermií s dobrou morfologií a s velmi nízkým počtem vakuol



<https://fertilitypedia.org/edu/therapies/msome>



Intracytoplasmic morphologic
sperm injection (IMSI)



We cannot rate the effectiveness of this add-on at improving the treatment outcome as there is insufficient moderate/high quality evidence.

Selekce spermií pomocí Zeta potenciálu

- Membrána spermií je negativně nabitá (silně negativně nabitý povrch-maturované spermie s vyšší pravděpodobností intaktní DNA)
- Principem metody je buď přilnutí nabité spermie ke stěně zkumavky a nebo migrace v elektrickém poli
- V obou případech dochází k selekci spermií s vyšší integritou DNA (v porovnání s gradientovou centrifugací nebo i s metodou MACS)
- Pro aplikaci metody do běžné klinické praxe je nutné provést další studie

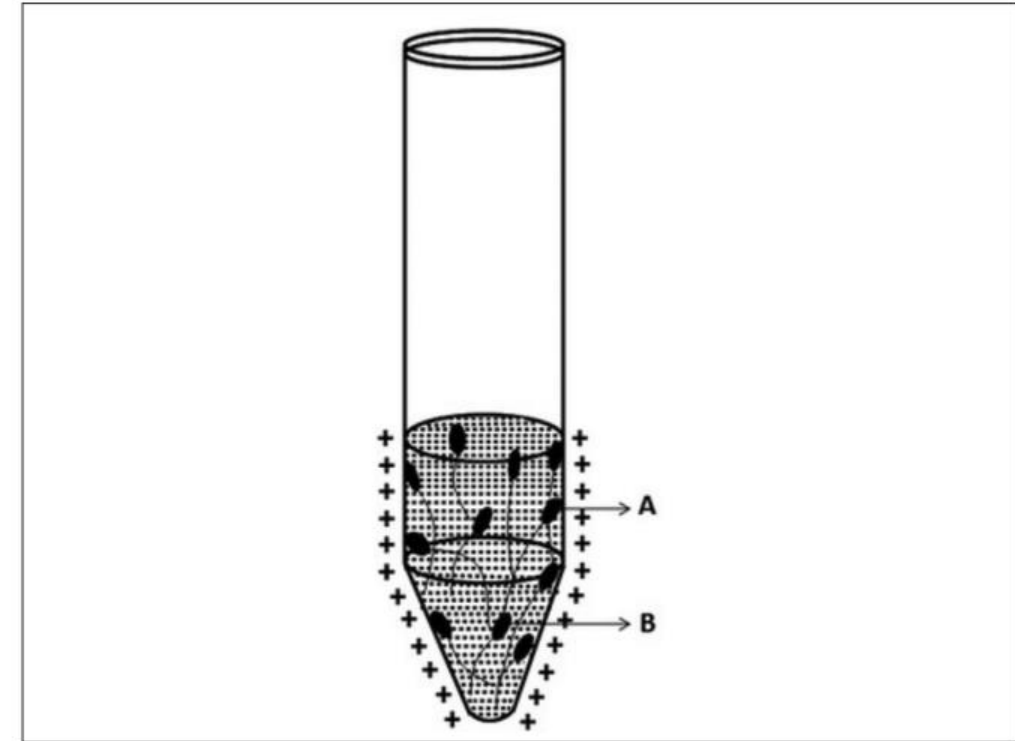


Figure 7. Sperm selection using zeta test. (A) Negatively charged mature sperm will move to the positively charged tube surface. (B) Immature spermatozoa will be discarded

Zpracování testikulární tkáně

Z varlete je vzorek nejčastěji získáván otevřenou biopsií.

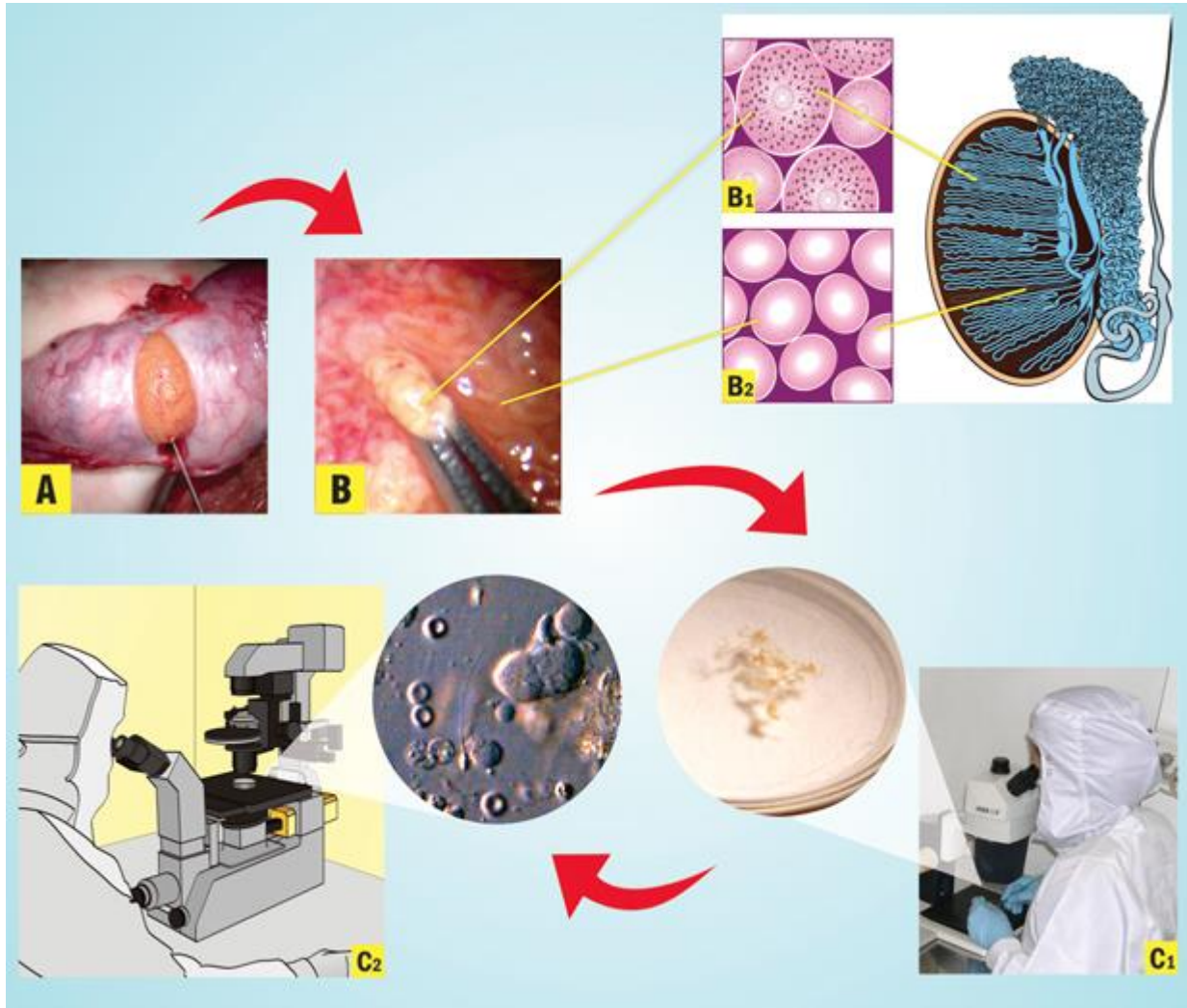
Získaný vzorek je kontaminován různými buňkami a krví.

V průběhu zpracování je nutné rozvolnit semenotvorné kanálky a uvolnit vazby elongovaných spermatid

- **Mechanické rozvolnění (WHO 2010):** lze použít k **vytlačení buněk ze semenotvorných kanálků tenké injekční jehly**, méně častý přístup je pak použít k rozvolnění tkáně v médiu krycí skříčka- třeme tkáň, dokud nevytvoříme jemnou hmotu

Další možný přístup je použít **sterilní sítko s třenkou**, kterou rozvoníme tkáň na sítku a vytlačíme obsah semenotvorných kanálků, přes sítko pak provedeme oplach malým množstvím média a získáme tak suspenzi buněk prostou větších kusů tkáně

- **Enzymatické rozvolnění (WHO 2010):** vzorek se inkubuje 1,5-2 hodiny v médiu s kolagenázou (37°C) a každých 30 minut je vortexován, následuje centrifugace vzorku 100g/10 minut a vyšetření sedimentu



http://brazjurol.com.br/september_october_2011/Esteves_570_583.htm

Zpracování aspirátu z nadvarlete

- K aspiraci spermií z nadvarlete se přistupuje zejména při obstrukční azoospermii
- Umožňuje získat vzorek –aspirát- s relativně velkými počty spermií, který je současně minimálně kontaminován jinými buňkami a krví.
- Pokud se ve vzorku nachází relativně vysoké počty spermií, je možné vzorek **zpracovat gradientní centrifugací**.
- Pokud se ve vzorku spermií vyskytuje málo, volíme **prostou centrifugaci vzorku**



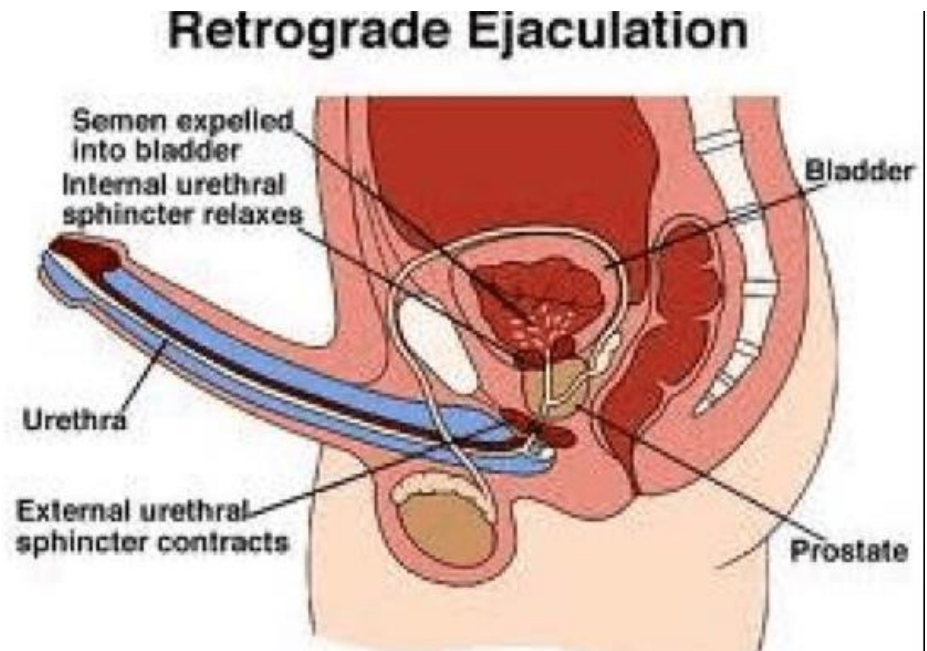
<https://www.hindujahospital.com/hindujaiivcentre/services/surigal-retrieval-sperm.html>

Retrográdní ejakulace

Stav kdy při ejakulaci dojde k vypuzení ejakulátu z pohlavních cest do močové trubice, odkud je ejakulát zpětně vypuzen do močového měchýře.

U muže se tento stav projevuje jako **aspermie** (absence ejakulátu), případně **velmi nízký objem ejakulátu** (v řádu několika set mikrolitrů).

Příčiny mohou být vrozené i získané. Stav se potvrzuje vyšetřením přítomnosti spermií v moči po ejakulaci.



Zpracování vzorků při retrográdní ejakulaci:

Před odběrem je třeba provést **alkalizaci moči pomocí běžně dostupné jedlé sody** – zvýšení pH moči zvýší šanci spermií na uchování pohyblivosti a ostatních funkcí. Pacient by měl vypít roztok s hydrogen uhličitánem sodným večer a ráno před odběrem vzorku.

Před odběrem ejakulátu by se měl pacient „**částečně**“ **vymočit**, ihned po masturbaci se pacient vymočí do odběrové nádoby obsahující médium pro spermie (případně ještě i odevzdá odběrovou nádobku s ejakulátem, pokud byl nějaký získán). Vzorek moči je pak centrifugován 500g /8 minut, sediment je naředěn a dál zpracován prostou centrifugací vzorku nebo gradientní centrifugací.

Zpracování vzorků odebraných „asistovanou ejakulací“

- muži s poruchou ejakulace (typicky při poranění míchy)
- **penilní vibrostimulace nebo rektální elektrická stimulace**
- muži s poruchami míchy mají často vysoké koncentrace spermií, nízkou pohyblivost a vzorek bývá infiltrován červenými a bílými krvinkami
- efektivní je zejména **gradientová centrifugace**



Výběr živých spermií u imobilních vzorků

Laser Assisted immotile sperm Selection

- Laserový výstřel je aplikován do blízkosti špičky bičíku spermie – živá spermie reaguje zkroucením bičíku, tzv. „curling“

Chemická aktivace pohybu

- **teofylin, pentoxifylin, papaverin**

Sperm Mobile – **teofylin** – inhibice fosfodiesterázy → zvýšení koncentrace cAMP → stimulace pohybu



<https://fertilitypedia.org/edu/therapies/laser-assisted-immotile-sperm-selection-1>



- **HOS test** – hypo-osmotic swelling test – živé spermie v hypoosmotickém prostředí „nabobtnají“, díky čemuž svinou bičík
- **MTT** – mechanical touch test – při laterálním dotyku jehlou by měl být bičík živé spermie „pružný“
- **PLM** – polarizační mikroskopie- hlavičky živých spermií jsou při průchodu polarizovaného světla dvojlomné



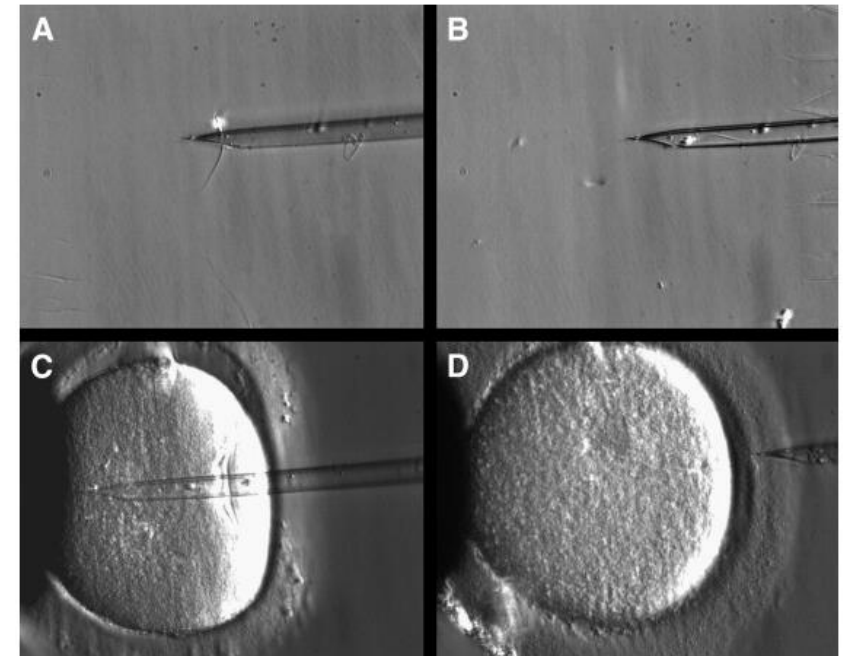
Fertility and Sterility
Volume 90, Issue 1, July 2008, Pages 104-112



Male factor

Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection

Luca Gianaroli M.D.^a, M. Cristina Magli M.Sc.^a, Giulia Collodel Ph.D.^b,
Elena Moretti Ph.D.^b, Anna P. Ferraretti M.D.^a, Baccio Baccetti M.D.^b



[Download : Download high-res image \(312KB\)](#)

[Download : Download full-size image](#)

Figure 2. The ICSI procedure is performed under the polarizing light. A birefringent spermatozoon is selected and immobilized (A), aspirated (B), injected (C), and released in the ooplasm (D). The birefringence of the head is evident at every step of ICSI.

Ke shlédnutí :

[\(131\) SpermSlow™ - Approaching physiological ICSI – YouTube](#)

[\(131\) MACS: Getting good quality sperm for ICSI..Live demo – YouTube](#)

[\(131\) HOS - Hypo Osmotic Swelling is a Sperm Function Test / Measure of Sperm's Fertility Potential – YouTube](#)

[\(131\) HOS test for identifying live sperms in testicular tissue - YouTube](#)