

Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

9.4.2024

Selekce spermií in vivo

- In vivo, spermie při své cestě k oplození oocytu zdolávají několik přirozených bariér – vaginou se přes cervix dostávají do dělohy a následně do ampuly vejcovodu, kde mohou setrvat až 6 dnů a vyčkávat na ovulaci, následně spermie musí zdolat další překážky v podobě ECM kumulárních buněk a ZP oocytu...během této cesty využívají mnoha fyziologických vlastností – pohyblivost, chemotaxe, kapacitace a akrozomální reakce, funkční receptory (vazba k ZP, k oolemě)...
- Za 40 let praxe se zpracováváním spermií pro IVF se zdá, že lepší metoda výběru spermie ještě nebyla nalezena 😊
- Soudobé metody selekce spermií jsou založeny nejčastěji na pohyblivosti spermií nebo na některé konkrétní funkční vlastnosti spermie

Separace spermií pro ART

- oddělení spermií od semenné plazmy (látky blokující kapacitaci a fertilizaci)
- získání optimálního počtu motilních spermií pro fertilizaci
- oddělení spermií nízké kvality a ostatních buněk (vývojové prekurzory, leukocyty, bakterie)
- eliminace toxických a bioaktivních látek (např. ROS)
- efektivní, rychlé, jednoduché a ekonomické
- vzorek čerstvý vs. vzorek rozmrazený

Výsledkem separace spermií je vzorek o určitém „**zisku spermií**“ vypočteném z absolutních počtů spermií nebo z celkového počtu motilních spermií. Nejvyšší zisk má metoda prosté centrifugace ejakulátu, nižší gradientní centrifugace spermií a jako nejnižší se zisk udává u metody swim-up.

- V ejakulátu se vyskytuje kromě spermií ještě mnoho dalších složek a faktorů, které musí být odstraněny.
- Zpracování spermií by mělo být zahájeno nejpozději do 1 hodiny po odběru (prevence poškození membrán v důsledku působení produktů ostatních buněčných elementů, včetně ROS)
- V důsledku působení dekapacitačních faktorů v semenné plazmě s časem klesá vitalita a motilita spermií
- I malé množství semenné plazmy může zabránit kapacitaci spermií (pozor u klasické fertilizace)
- Správná separační technika by měla poskytovat co nejlepší zisk při minimálním poškození spermií.
- **Pozor na výkyvy teplot a nadbytečné centrifugace**
- Síla centrifugace by měla být co nejnižší, aby byla zároveň efektivní z hlediska zisku spermií a zároveň při ní vznikalo co nejméně ROS
- Pozor na nastavení centrifugy (**RCF vs RPM**)
- Metodu zpracování ideálně volíme **podle orientačního zhodnocení kvality** vzorku (koncentrace, pohyblivost, objem vzorku, viskozita)

Základní metody:

- **Centrifugace spermií** –Simple washing (dobré vstupní parametry, vhodné např. pro inseminace; vhodné i pro vzorky o velmi nízkém počtu spermií)
- **Gradientová centrifugace spermií** (vzorky s nízkýou pohyblivostí, nízkou progresí, vysokým podílem nečistot, protilátkami proti spermiím)
- **Swim-up** (dobrá až vysoká koncentrace a pohyblivost)

Postupy základních metod čerpány z WHO manuálu 2021

WHO laboratory manual for the
**examination and processing of
human semen**

Sixth Edition

Ejakulát musí být odebrán do vhodné sterilní nádoby a stejně tak v průběhu zpracování musí být použity vhodné netoxické materiály (certifikace/vlastní validace).

Pro zpracování spermií používáme certifikovaná média k tomu účelu určená.

Quality System Approval Certificate **Medical Devices Directive 93/42/EEC**

Postup práce si do určité míry laboratoř optimalizuje sama, vždy však v souladu s doporučením výrobce používaných médií (případně vlastní validace).

→ Různí výrobci médií = různé pufrační systémy, různá doporučení vztahující se k teplotě uchování vzorku..

EC Certificate - Production Quality Assurance

Directive 93/42/EEC on Medical Devices, Annex V

No. CE 575680
Issued To: **BIRR Biosciences B.V.**
Bergseweg 4
3633 AK Vreeland
The Netherlands

In respect of:

The manufacture of sterile micro-pipettes and puncture needles and sets for assisted reproductive technology and obstetrics; sterile foetal blood sampling kits; sterile pipettes, containers, tubes, dishes and serological pipettes for in-vitro fertilization procedures.

Those aspects of Annex V concerned with securing and maintaining the sterility of laboratory medical devices and catheters for assisted reproductive technology and obstetrics; and operating theatre equipment covers.

on the basis of our examination of the quality assurance system under the requirements of Council Directive 93/42/EEC, Annex V. The quality assurance system meets the requirements of the directive. For the placing on the market of class IIb and class III products an Annex III certificate is required.

For and on behalf of BSI, a Notified Body for the above Directive (Notified Body Number 2797):



Gary E Slack, Senior Vice President Medical Devices

First Issued: **2016-05-16**

Date: **2021-05-07**

Expiry Date: **2024-05-26**

- Pro ředění a centrifugaci ejakulátu se používají média HEPES pufrovaná (nebo podobným pufrem), 37°C,
- Pro naředění vyseparovaných spermií v závislosti na metodách laboratoře je možné použít média pufrovaná HEPES nebo bikarbonátovým pufrem; 37°C, 6% CO₂ (nebo podobnými pufry)
- Teplota – uchování a zpracování vzorků je možné při pokojové teplotě nebo při 37°C - názory se různí
- Je třeba předcházet výkyvům teploty
- Bylo prokázáno, že při pokojové teplotě dochází k nižšímu poškození spermií ROS, existují však studie s protichůdnými závěry

[Turk J Obstet Gynecol](#). 2015 Mar; 12(1): 6–10.

Published online 2015 Mar 15. doi: [10.4274/tjod.31644](#)

PMCID: PMC5558408

PMID: [28913033](#)

The effect of preserving prepared sperm samples at room temperature or at 37 °C before intrauterine insemination (IUI) on clinical pregnancy rate

→ no difference

[Tayfun Çok](#),^{1,*} [Pinar Çağlar Aytaç](#),¹ [Erhan Şimşek](#),¹ [Bülent Haydardedeoğlu](#),¹ [Hakan Kalaycı](#),¹ [Halis Özdemir](#),¹ and [Esra Bulgan Kılıçdağ](#)¹

Centrifugace spermií – Simple washing

- Jednoduchá separační technika, **poskytuje nejvyšší zisk spermií**
- Vhodná pro vzorky o dobré kvalitě (lze použít i pro vzorky o velmi nízkém počtu spermií, abychom zachránili zisk spermií nutný pro oplození vajíček)
- Spočívá v prostém naředění ejakulátu promývacím médiem a následné centrifugaci vzorku
- Sílu a čas centrifugace volíme podle vstupních parametrů ejakulátu (v úvahu bereme počet, motilitu, viskozitu)
- Dochází ke koncentraci všech buněk, včetně buněčných úlomků, **nezvyšuje se kvalita spermií**

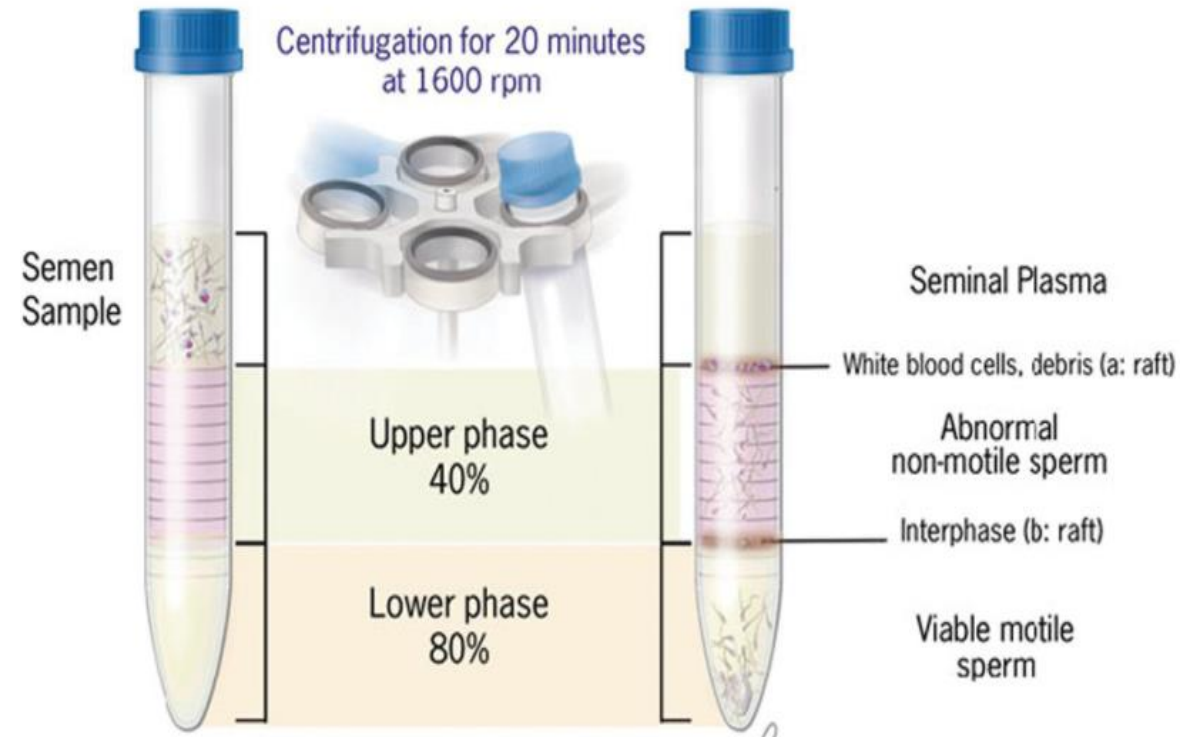
Metoda dle WHO 2021: naředit ejakulát s promývacím médiem 1+1 (1:2) → rozdělit po 3 ml do zkumavek → centrifugace 5-10 minut 300-500 g → odstranit supernatant → přidat 1 ml média a resuspendovat sediment → centrifugace 3-5 minut při 300-500g → odsát supernatant a sediment naředit promývacím médiem na potřebnou koncentraci



Gradientová centrifugace spermií

- Centrifugace ejakulátu skrz hustotní gradient
- **Koloidní oxid křemičitý pokrytý silanem** – typicky dvouvrstvý diskontinuální hustotní gradient (např. 80%(v/v) jako spodní vs. 40% (v/v) jako horní vrstva gradientu)
- Separace buněk na základě průchodu hustotním gradientem + aktivní pohyb spermií
- Dobrá separace spermií od semenné plazmy, ostatních buněk a buněčných úlomků, bakterií, plísní i virů
- Médium pro přípravu hustotního gradientu – buď přímo naředěné na požadované koncentrace a nebo koncentrované s nutností následného ředění
- Pro gradientní centrifugaci vždy používáme **kónickou zkumavku**
- Po přípravě kolony gradientu je nutná vizuální **kontrola existence gradientového rozhraní**

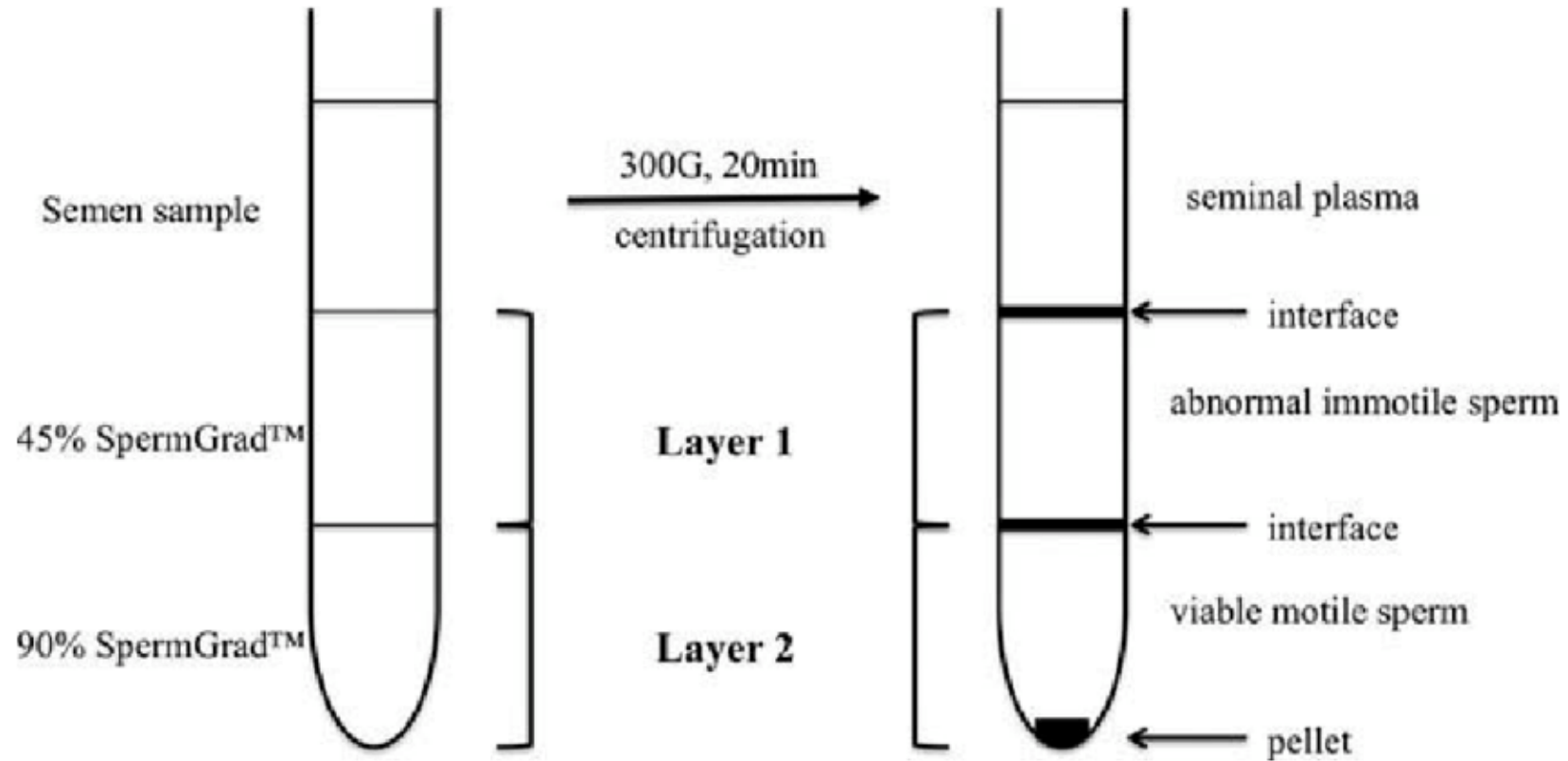
Metoda dle WHO 2021: připravit hustotní gradient opatrným navrstvením 40% (v/v) gradientního média na 80% (v/v) médium → umístit 1ml vzorku na kolonu gradientu → centrifugace 300-400g 15-30minut → odstranit supernatant → sediment resuspendovat v 5 ml promývacího média → centrifugace 200 g 4-10 minut → stáhnout a zopakovat resuspendaci v 5ml média s následnou centrifugací → sediment resuspendovat v malém množství média, vyhodnotit a naředit na patřičnou koncentraci



- Efektivní metoda zvyšující podíl motilních spermií i podíl spermií s normálním tvarem

Modifikace metody:

- **Úprava hustotních gradientů** umožňuje získat vyšší počet spermií nebo získat spermií s vyšší motilitou
např. gradient 90%/40 % → nižší počet spermií o vyšší motilitě v porovnání s gradientem 80%/40%
- **Úprava doby/síly centrifugace** –prodloužení-vyšší získání spermií (viskózní vzorky)
- **Úprava výšky kolony gradientu**

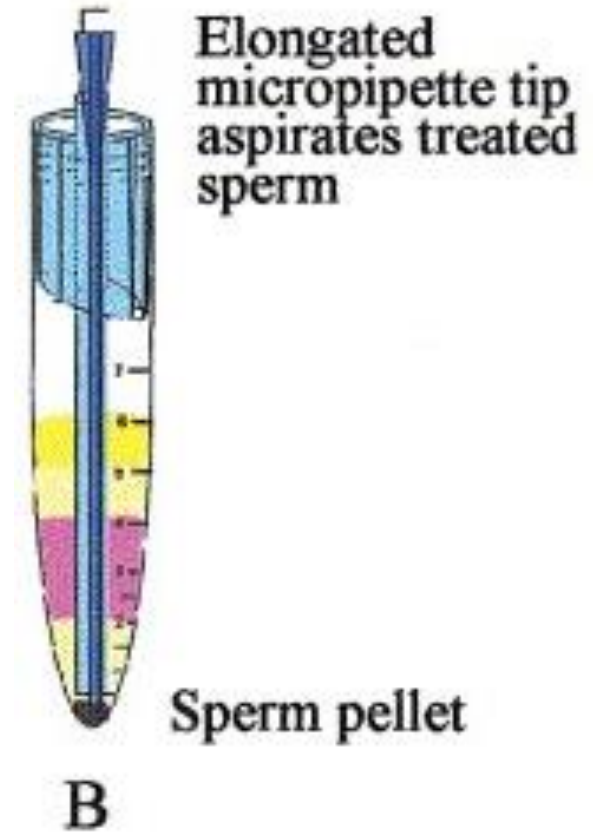




Koloidní suspenze částic oxidu křemičitého pokrytého kovalentně vázaným silanem



Nidacon - ProInsert -





Gender selection by Percoll® gradients by using intraperitoneal insemination in mice: as a model of human

Ilaf Hassan Hadi ¹, Hayder A. L. Mossa ^{2*}

Table 2. Effect of Percoll® gradients centrifugation method on Pregnancy Rate and Gender Selection in Mice

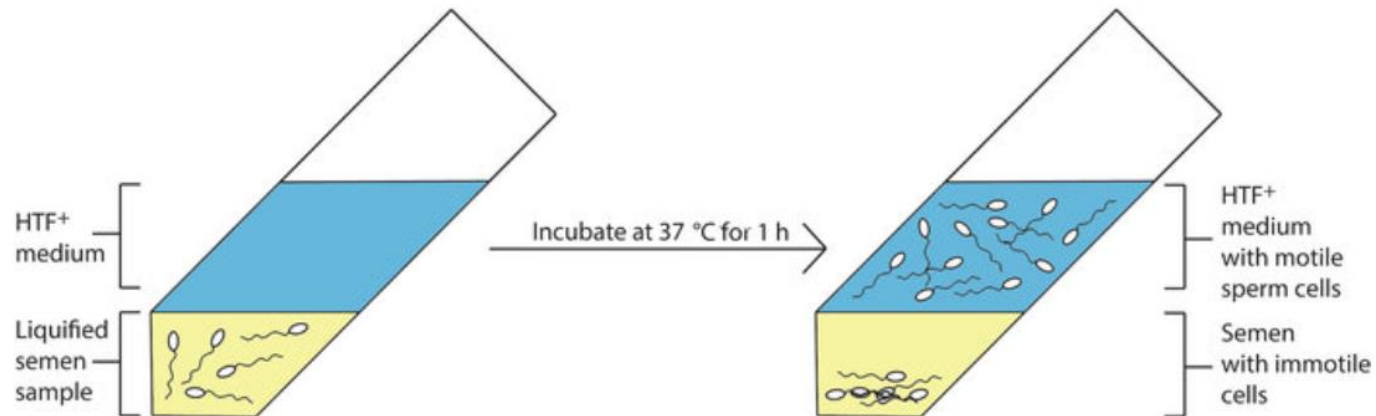
Groups	Pregnancy Rate	Total No. of Births	No. of Males	No. of Females
Percoll® gradients method				
Treated Group (30 female mice)	21 (70%)	110	80 (72.7%)	30 (27.3%)
Direct Sperm Activation Technique				
Control Group (30 female mice)	17 (56.7%)	85	45 (52.9%)	40 (47.1%)
P-Value	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Conclusions: Percoll® gradients method was founded 72.7% effective for male selection, despite of sperm X:Y ratio was unchanged after procedure, furthermore the pregnancy rate 70% was significantly more than using Direct Activation Technique.

Swim-up

- Metoda založená na aktivním pohybu spermií a jejich schopnosti vycestovat ze semenné plazmy do média
- Ejakulát je umístěn pod médium, do kterého spermie volně vycestují
- Šikmé uložení zkumavek zvýší plochu, skrze kterou je umožněno vycestování spermií
- V ideálním případě by sperma před swim-up nemělo být ředěno a centrifugováno, protože může docházet k uvolňování ROS (z kulatých a jiných buněk, nebo z mrtvých buněk) a poškozování membrán spermií
- Preferuje se tzv. přímý swim-up, při kterém je buď přímo na ejakulát nanášeno médium a nebo je ejakulát pod médium podvrstven
- Zisk spermií je sice nižší, ale dochází ke zvýšení podílu pohyblivých spermií

Postup podle WHO 2021: 1ml ejakulátu umístíme do konické centrifugační zkumavky → opatrně navrstvíme 1,2 ml média → zkumavku **nakloníme do úhlu 45°C** a inkubuje 1 hodinu při 37°C → opatrně odebereme vrchní 1ml média a umístíme do čisté zkumavky → naředíme 1,5 -2 ml média a centrifugujeme 300-500g 5 minut → supernatant stáhneme a sediment se spermiemi naředíme 0,5 ml média → zhodnotíme koncentraci a pohyblivost spermií, provedeme ředění na příslušnou metodu oplození



https://www.researchgate.net/figure/Swim-up-purification-of-motile-human-sperm-cells-Left-Tube-with-HTF-medium-and-an_fig1_331470103

Modifikace metody:

- Sekundární swim- up: jedná se o swim up spermií ze sedimentu získaného metodou prosté centrifugace nebo gradientí centrifugace spermií, cílem je zvýšení podílu motilních spermií ve vzorku, při této metodě je 1 ml média nanesen přímo na sediment spermií a nakloněná zkumavka je opět na hodinu umístěna do 37°C
- V případě vzorků o vysoké kvalitě lze čas inkubace zkrátit-celková doba inkubace doba by však neměla přesahovat 1 hodinu
- Potřebujeme-li zvýšit zisk, lze pro swim-up použít více zkumavek
- Lze upravit objem ejakulátu/média

- Metoda separace spermií by měla být volena také podle plánované metody fertilizace (např. plánujeme-li konvenční metodu oplození, rozhodně není vhodná metoda prosté centrifugace vzorku)
- Vyseparovaný vzorek spermií je vždy lepší naředit a neponechávat jej po separaci vysoce koncentrovaný - v takovém případě je produkováno mnoho metabolitů, včetně ROS a dochází k rychlejšímu poklesu kvality vzorku
- Pro metodu konvenčního oplození je kromě dostatečné koncentrace spermií důležitý i dostatečný podíl morfologicky normálních spermií a **vysoký podíl progresivních spermií**, samozřejmostí je také schopnost vazby k ZP, penetrace, fúze s oolemou, aktivace oocyту a formace pronuklea a funkční proximální centriol (pozor na morfologické defekty v oblasti krčku)

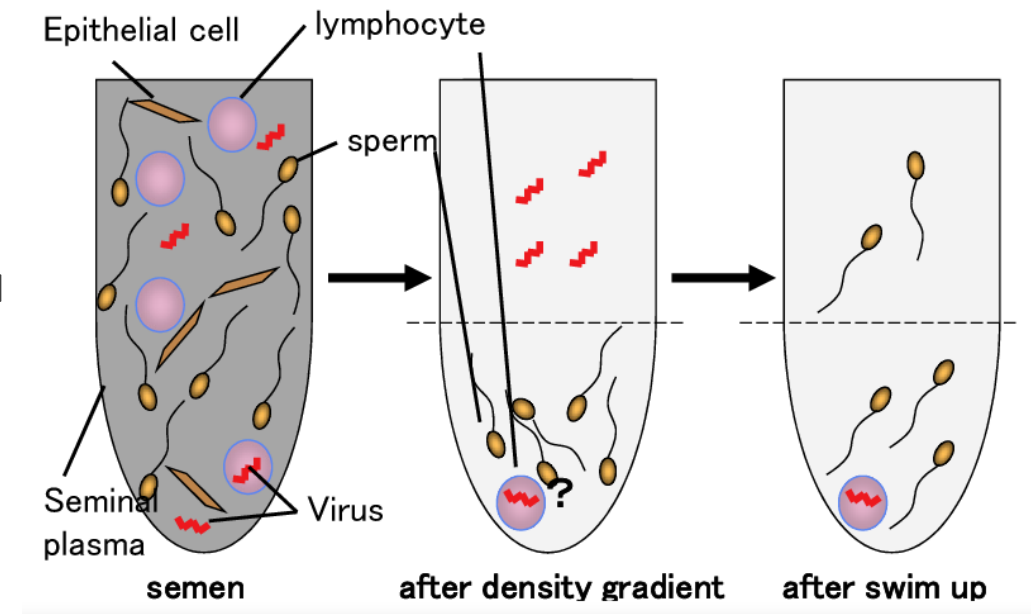
Zpracování kryokonzervovaného vzorku

- vzorek rozmrazíme v souladu s doporučením výrobce média (ředění vzorku po rozmrazení musí být velmi pomalé a plynulé)
- po jeho promytí (naředění s promývacím médiem následované centrifugací) můžeme zakoncentrovný vzorek zpracovat jakoukoliv zmíněnou metodou
- Ideálně, za účelem zvýšení kvality vzorku volíme swim - up (sekundární swim – up) nebo gradientní centrifugaci (rozmrazený a promytý vzorek lehce naředíme a nanese na kolonu)
- O volbě metody může rozhodovat i vstupní kvalita vzorku před a po rozmrazení



Zpracování sérologicky pozitivních pacientů

- Pacienti pozitivní na HIV, hepatitidu B nebo C, HTLV
- Zabránění křížovou kontaminaci a vertikálnímu přenosu infekce
- **kombinace gradientní centrifugace následovaná metodou swim-up** (WHO 2010), v současné době dostupných studiích, za použití této metody, dosud nedošlo k přenosu viru
- **stanovení virové nálože v kombinaci se zamrazením ejakulátu** → pokud negativní, lze vzorek zpracovat normálním způsobem



<https://www.semanticscholar.org/paper/Separation-of-human-immunodeficiency-virus-type-1-a-Kuji-Kato/a57b2e0bfcf693a470264e550b8eb575a996902e/figure/0>