

# Selekcja plemników do zabiegów wspomagane go rozrodu

dr Ricardo Faundez

Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką  
Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

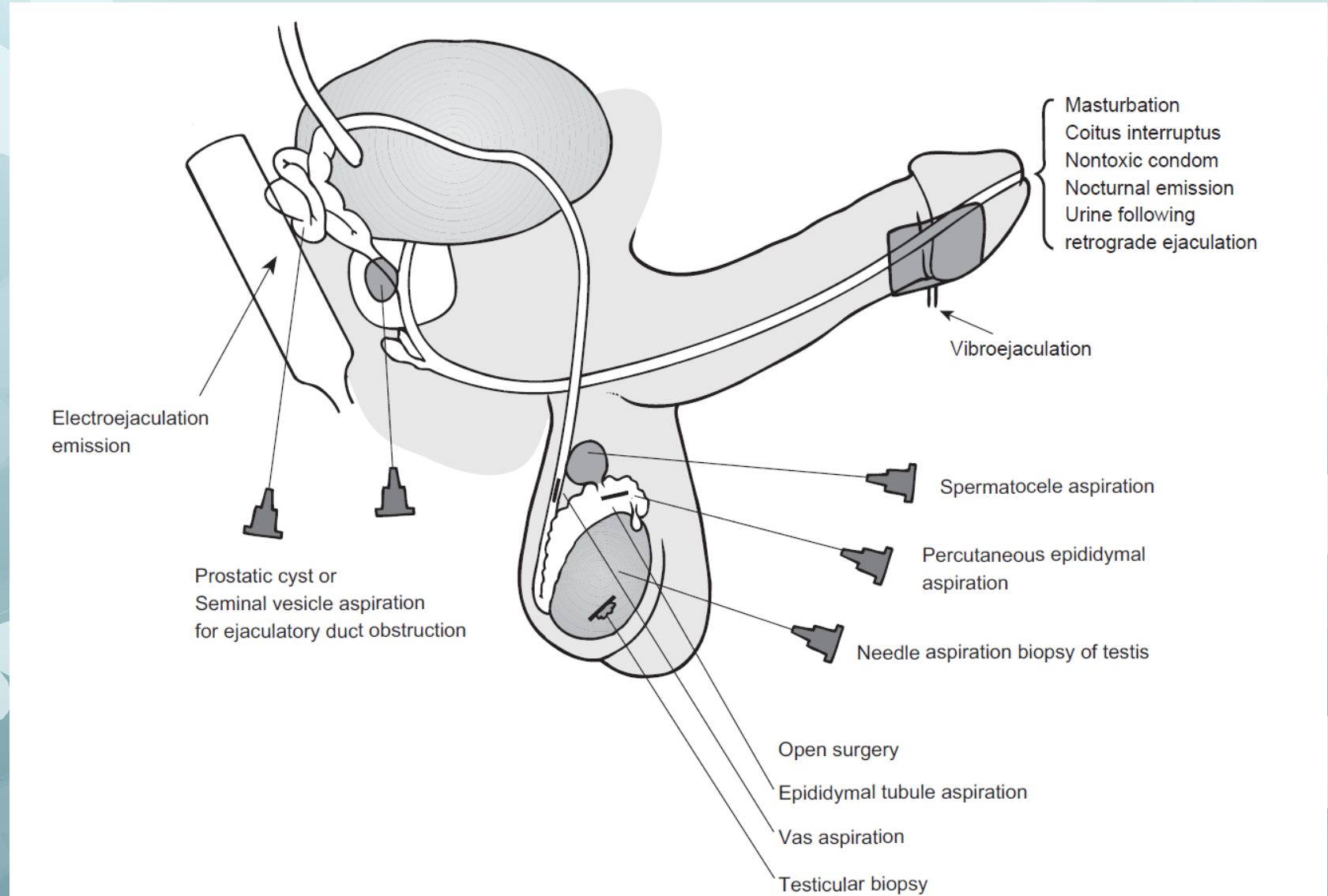
# Zastosowania technik przygotowania nasienia

- ❖ Przygotowywanie plemników do terapeutycznej inseminacji :
  - Inseminacja do szyjkowa
  - Inseminacja domaciczna
- ❖ Ocena ejakulacji wstecznej
- ❖ Inseminacja komórek jajowych *in vitro* - IVF
- ❖ Mikro chirurgiczne wspomagane zapłodnienia ICSI/IMSI
- ❖ Traktowanie plemników pokrytych przeciwciałami: Próby zmniejszania przeciwciał przeciwplemnikowych (ASA) związanych z powierzchnią plemników - próby uzyskania plemników wolnych od przeciwciał

# Kryteria wyboru różnych metod selekcji plemników

- ❖ Liczba plemników ruchliwych
- ❖ Stosunek między ruchliwymi a nie ruchliwymi plemnikami
- ❖ Objętość ejakulatu
- ❖ Obecność przeciwciał, leukocytów lub innych komórek w nasieniu oraz aglutynacji plemników

# Możliwe miejsca pobrania wydłużonych spermatyd lub plemników



# Metody selekcji plemników (1)

## ❖ Proste płukanie

## ❖ Techniki migracyjne

- Swim - Up z nasienia
- Swim - Up z osadu płukanego nasienia
- Swim - Up z zawiesiny spreparowanych plemników
- Swim - Down
- Sperm select – Select Medical Systems USA (hialuronan)
- Migracja - Sedymentacja

## ❖ Techniki selektywnego płukania nasienia

- Stopniowy gradient gęstości
  - Percoll
  - koloidalna zawiesina cząsteczek krzemionki pokrytych silanem

# Metody selekcji plemników (2)

## ❖ Techniki przylegania plemników

- Filtracja przez kolumnę wypełnioną watą szklaną
- Filtracja przez kolumnę wypełnioną szklanymi kulkami
- Filtracja przez żele - SpermPrep

# Wybór metody

- ❖ Wybór metody obróbki nasienia podyktowany jest charakterem próbki nasienia. Na przykład, Swim-Up jest techniką do wyboru często, gdy próbki nasienia są uważane za normalne
- ❖ W przypadku ostrej oligozoospermi lub Teratozoospermi, asthenozoospermi, gradienty gęstości są zazwyczaj korzystne ze względu na większą liczbę całkowicie ruchliwe plemniki odzyskane.
- ❖ Gradienty gęstości mogą być zmieniane w celu optymalizacji procedury dla specyficznych właściwości poszczególnych próbek: całkowita wielkość gradientu może być zmniejszona co ogranicza odległości migracji plemniki i maksymalizuje całkowitego odzysku ruchliwych plemników lub czas wirowania może być zwiększony dla próbek o wysokiej lepkości.
- ❖ Każde laboratorium powinno ustalić siłę odśrodkową i czas wirowania niezbędnego do uzyskania właściwego osadu plemników.
- ❖ Gdy liczba plemników jest bardzo niska, może być konieczne modyfikowanie lub siły odśrodkowej lub czas odwirowania, w celu zwiększania szanse na odzyskanie maksymalną liczbę plemników.
- ❖ Modyfikacje zalecanych czasów i sił odśrodkowych należy testować rygorystycznie przed klinicznym ich zastosowanie .

# Metody przygotowania nasienia do ART

- ❖ Plemniki, mogą być oddzielone od plazmy nasienia
- ❖ Plazma nasienia pomaga plemnikom wnikać przez śluz szyjkowy, jednak niektóre z jego składników (np. prostaglandyny, cynk) ujemnie wpływają na osiągnięcie ciąży, gdy naturalne bariery są pomijane przy pomocy ART., takie jak inseminacja domaciczna (IUI) lub in-vitro (IVF).
- ❖ Oddzielenie plemników od plazmy nasienia uzyskując zawiesinę zawierającą wysoką liczbę morfologicznie normalnych i ruchliwych plemników, wolne od zanieczyszczeń, mikroorganizmów i martwych plemników, jest istotne dla praktyki klinicznej.
- ❖ Rozcieńczenie nasienia z pożywkami i odwirowywanie jest nadal używany do przygotowania próbek normozoospermicznych do IUI.
- ❖ Jednak wirowanie próbki nasienia na gradiencie gęstości na ogół wpływa korzystnie na próbki z jednym lub więcej nieprawidłowości w parametrach nasienia
- ❖ Kolumny waty szklanej są tak skuteczne, jak gradienty gęstości do separacji plemników z nasienia w wykazujące suboptymalne cechy



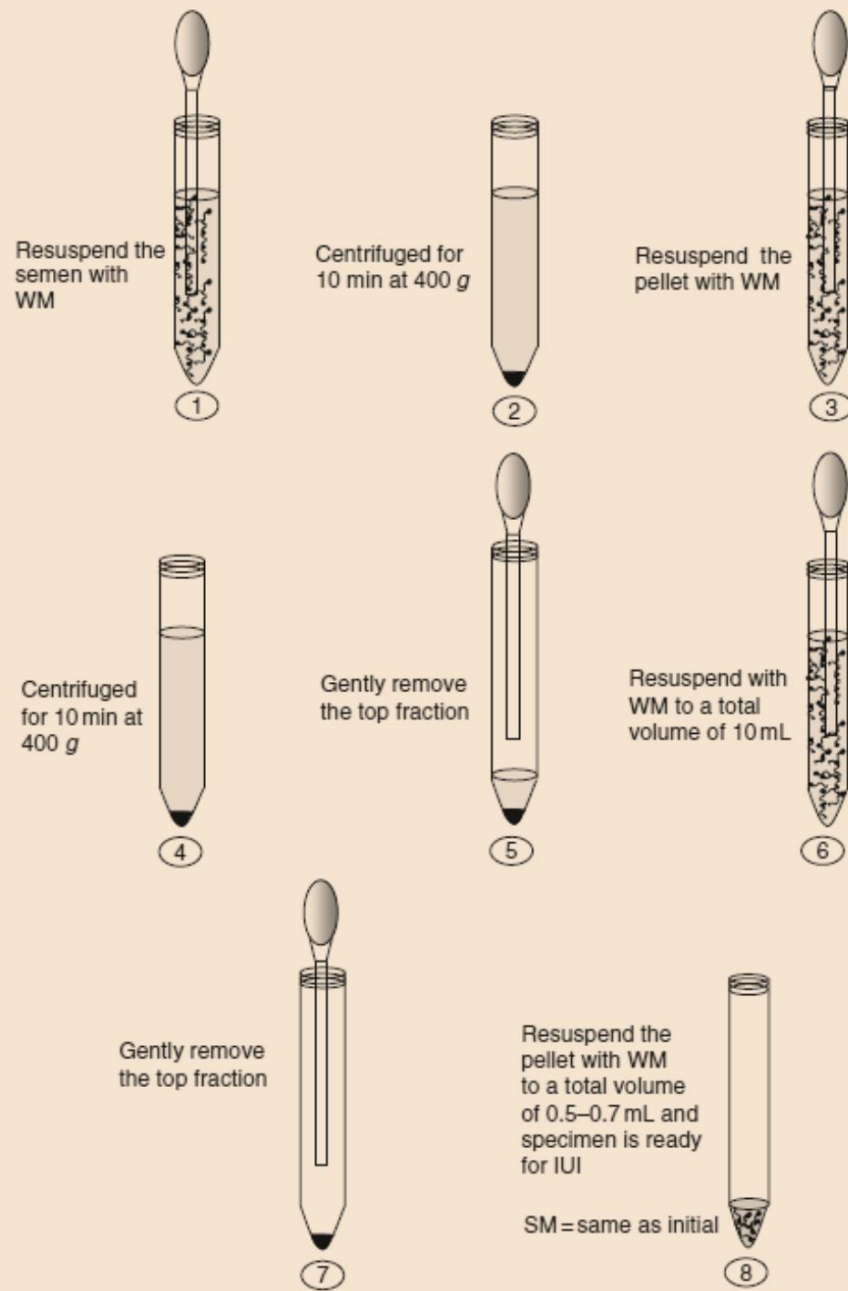
# Skuteczność metody oddzielenia plemników od plazmy nasienia i od czynników zakaźnych

- ❖ Skuteczność techniki selekcji plemników jest zwykle wyrażana jako bezwzględny numer plemników, całkowita liczba ruchliwych plemników lub liczba odzyskiwania morfologicznie normalnych ruchliwych plemników.
- ❖ Swim-up na ogół daje niższy odzyskiwania ruchliwych plemników (<20%) niż wirowanie w gradiencie gęstości (> 20%)
- ❖ Swim-up i odwirowanie w gradiencie gęstości również dają różne poziomy pozostałości różnych substancji w zawieszynie przygotowanych plemników.
- ❖ Przy użyciu metody do określenia poziomu cynku z prostaty jako marker rozpuszczalny w nasieniu wykazano, że zależny od czasu dyfuzji cynk od nasienia do wyższej warstwy pożywki w swim-up. Ostateczne stężenie cynku w swim-up było większe niż po przygotowaniu w gradiencie gęstości.  
Próbki nasienia może zawierać szkodliwe czynniki zakaźne, co personel przygotowujący go powinien obsługiwać nasienie jako biohazard z wyjątkową ostrożnością.
- ❖ Techniki przeróbki nasienia nie mogą osiągać 100% skuteczności usuwania czynników zakaźnych od nasienia.
- ❖ Wytyczne dotyczące bezpieczeństwa, jak przedstawiono w zaleceniach WHO 2010 powinni być ściśle przestrzegane.
- ❖ Dobra praktyka laboratoryjna jest podstawą bezpieczeństwa laboratoryjnego (WHO, 2010).

# Proste płukanie

- ❖ Ta prosta procedura płukania ejakulatu zapewnia najwyższą wydajność w postaci liczby ruchliwych uzyskanych plemników
- ❖ Procedura ta jest odpowiednia jeśli próbki nasienia są dobrej jakości .
- ❖ Jest często stosowana do przygotowania plemników do IUI

# Płukanie

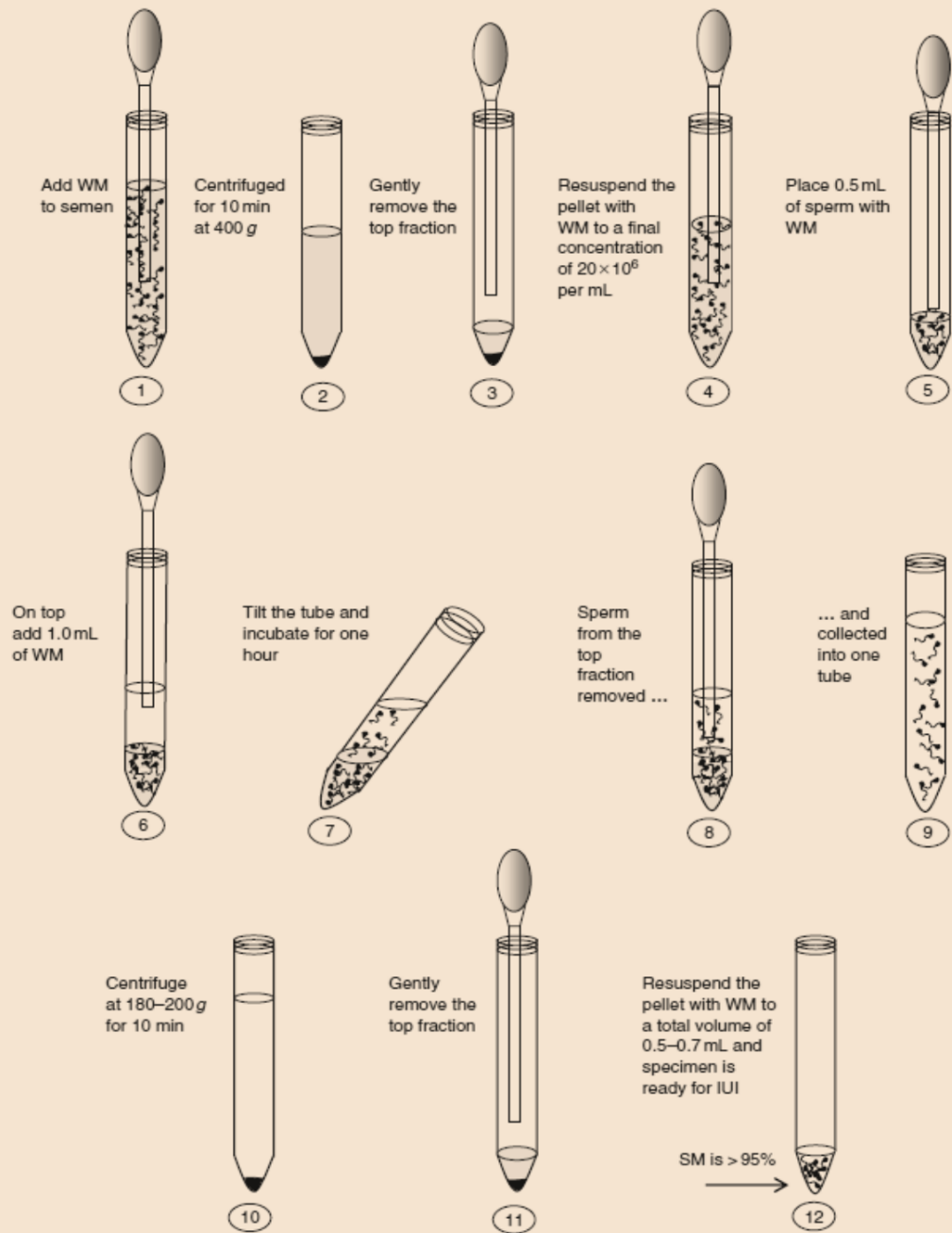


**Figure 6.2** Sperm preparation using the standard sperm wash (SSW) procedure. SM, sperm motility (%); WM, wash media.

# Bezpośredni swim-up

- ❖ Plemniki można wybrać na podstawie ich zdolności do pływania od osoczu nasiennego do podłoża hodowlanego . Jest to znane jako techniki "swim-up"
- ❖ Nasienie lepiej nie powinno być rozcieńczone przed odwirowaniem do swim-up, ponieważ może to spowodować uszkodzenia błony i plemników przez działanie nadtlenu.
- ❖ Tak więc, bezpośredni swim-up plemników z nasienia jest preferowaną metodą oddzielania plazmy od ruchliwych plemników.
- ❖ Technika bezpośredniego swim-up może być wykonana albo przez nawarstwianie pożywki upłynnionego nasienia lub przez umieszczenie nasienia upłynnianego pod pożywką.
- ❖ Ruchliwe plemniki następnie przepłyną do pożywki hodowlanej.
- ❖ Procedura ta daje niższą wydajność niż płukanie plemników, ale uzyskanie plemników przez ich własną ruchliwość jest użyteczny w przypadku, kiedy procent ruchliwych plemników w nasieniu jest niski, na przykład do IVF i ICSI.

# Swim up



R. Pyrzak 2009

**Figure 6.3** Sperm preparation using the swim-up (SWU) procedure. SM, sperm motility (%); WM, wash media.

**TABLE I**

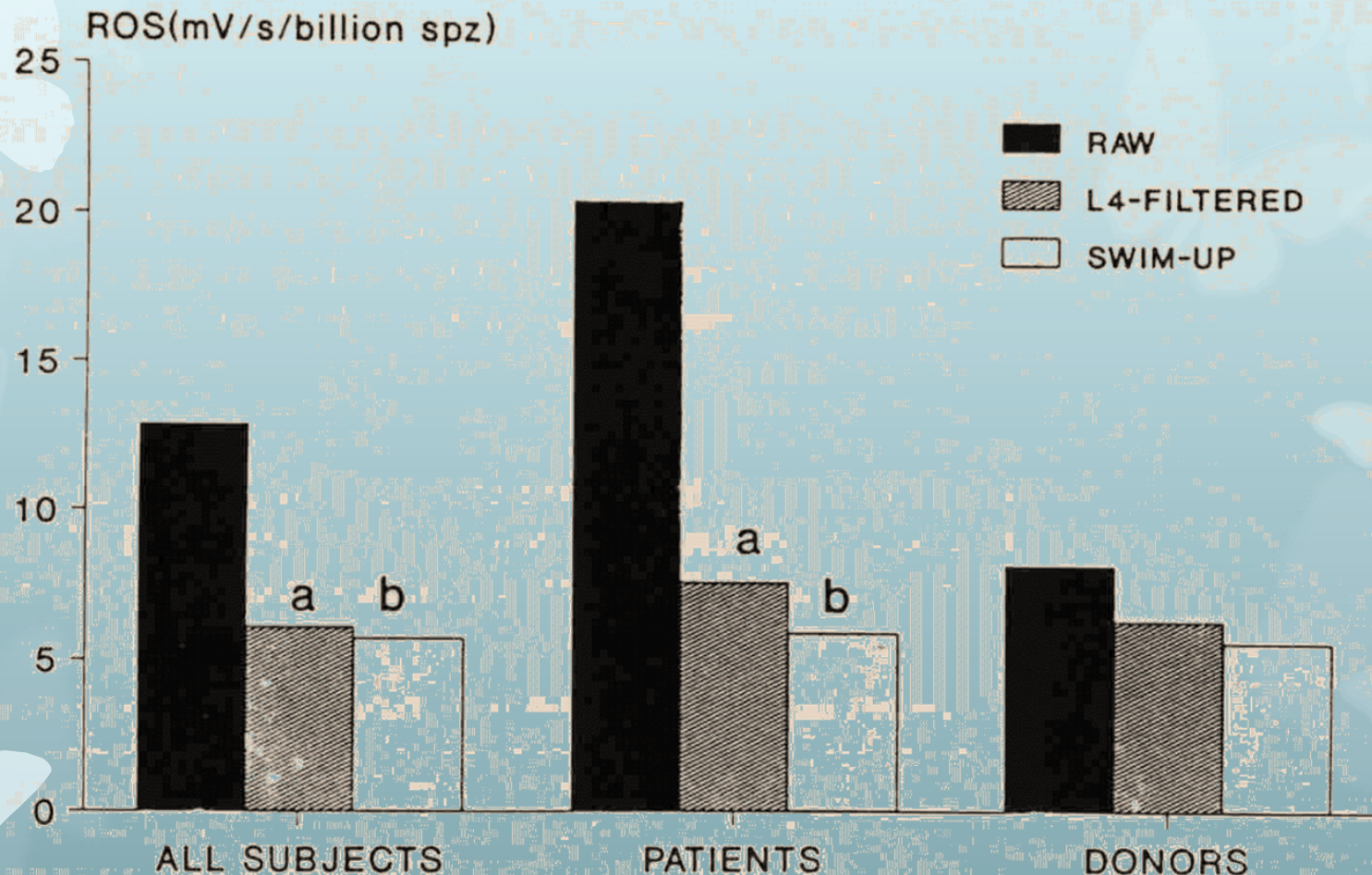
**Results of artificial insemination with fresh sperm and with sperm after swim-up and washing, in two groups of human subjects.**

	<i>Nontreated Semen</i>	<i>Sperm After Swim-up and Wash</i>	<i>Total</i>
Number of cases	22	27	49
Number of cycles of AIH	112	36	175
Conception	3*	7†	10
Conception rate	13.6%	25.9%	20.4%

\*1 conception for 37.3 treatment cycles

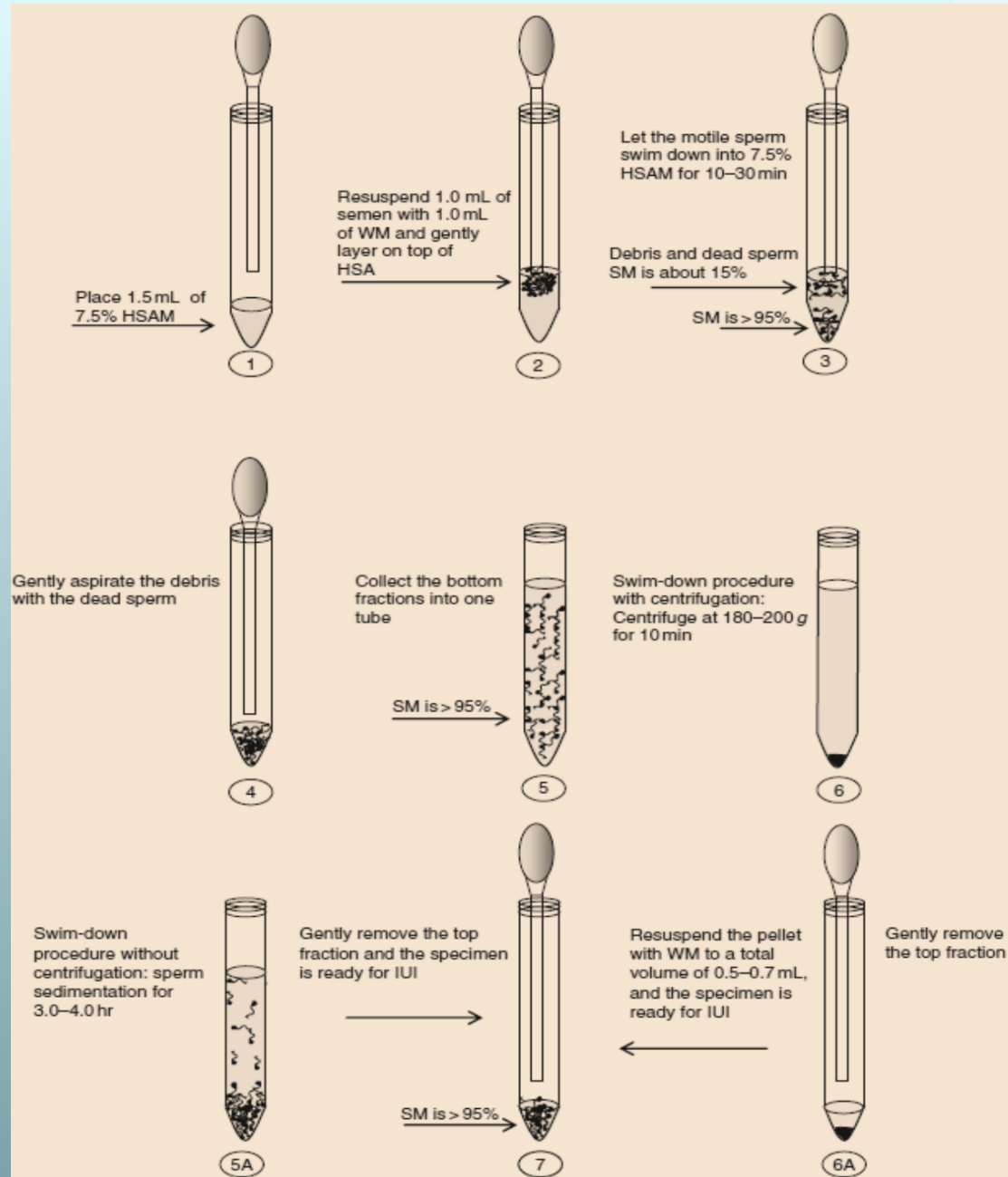
†1 conception for 9.0 treatment cycles

# Wolne rodniki przed i po swim-up



**FIGURE 1** Levels of reactive oxygen species (ROS) in unprocessed, L4-filtered, and swim-up semen specimens from patients with suspected subfertility and from donors with normal fertility. Each bar shows the mean of actual ROS values; spz, spermatozoa; <sup>a</sup> $p < .02$  and <sup>b</sup> $p < .01$  vs. value for unprocessed specimens.

# Swim down



R. Pyrzak 2009

**Figure 6.5** Sperm preparation using swim-down procedure, with or without centrifugation. HSA, human serum albumin; SM, sperm motility (%); WM, wash media.



**TABLE 1 Comparison Between the Swim-up and Swim-down Methods to Select Motile Spermatozoa**

Method	Medium	Sperm Motility Grades II + III	Sperm Recovery (%)
Swim-up	T <sub>6</sub>	56.1 ± 9.5	26.2 ± 8.8 <sup>a</sup>
Swim-down	Serum	84.8 ± 3.4 <sup>b</sup>	53.8 ± 8.6

*Note.* Data represent means ± SEM of 59 samples. Sperm motility grades III+II were defined as forward progression.

<sup>a</sup>*p* < .05 with respect to values obtained using the swim-down method and pure serum as culture medium.

<sup>b</sup>*p* < .02 with respect to values obtained using the swim-up technique.

**TABLE 2 HOS Test, Sperm Motility, and Sperm Recovery Percentage in Fresh Semen and After Swim-down Selection**

Treatment	Medium	HOS Score (%)	Sperm Motility Grades II + III	Sperm Recovery (%)
None	Semen	60.0 ± 6.0	59.1 ± 6.2	100
Swim-down	Serum	77.5 ± 5.1 <sup>a</sup>	84.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	46.5 ± 8.8
Swim-down	FF	87.9 ± 3.1 <sup>b</sup>	81.4 ± 3.8 <sup>b</sup>	22.1 ± 0.5 <sup>c</sup>
Swim-down	Semen	90.4 ± 3.6 <sup>a</sup>	21.6 ± 2.4 <sup>b</sup>	37.0 ± 9.7

*Note.* Data represent means ± SEM of 12 samples. Sperm motility grades II+III were defined as forward progression.

<sup>a</sup>*p* < .01.

<sup>b</sup>*p* < .001 with respect to values in intact semen (paired *t* test).

<sup>c</sup>*p* < .05 with respect to values obtained selecting spermatozoa with serum medium.

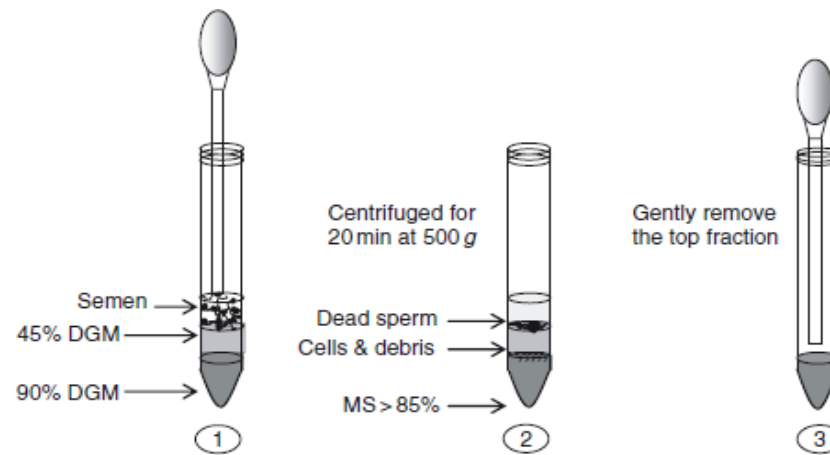
# Stopniowy gradient gęstości

- ❖ Stopniowy gradient gęstości może zapewnić najlepszy wybór dobrej jakości plemników, daje on dobrą odseparowania plemników od innych typów komórek i resztek.
- ❖ Łatwiej jest standaryzować tę metodę niż swim-up , a tym samym wyniki są bardziej powtarzalne.
- ❖ Technika ta jest stosowana w celu odzyskania i przygotowanie plemników do wykorzystania w IVF i ICSI.
- ❖ Metoda ta wykorzystuje wirowanie plazmy nasienia nad gradientami gęstości składających się z koloidalnej krzemionki pokrytej silanem, która oddziela komórki na podstawie ich gęstości i wielkości.
- ❖ Ponadto, ruchliwe plemniki potrafią pływać aktywnie przez materiał do tworzenia gradientu do miękkiego osadu na dnie próbówki.

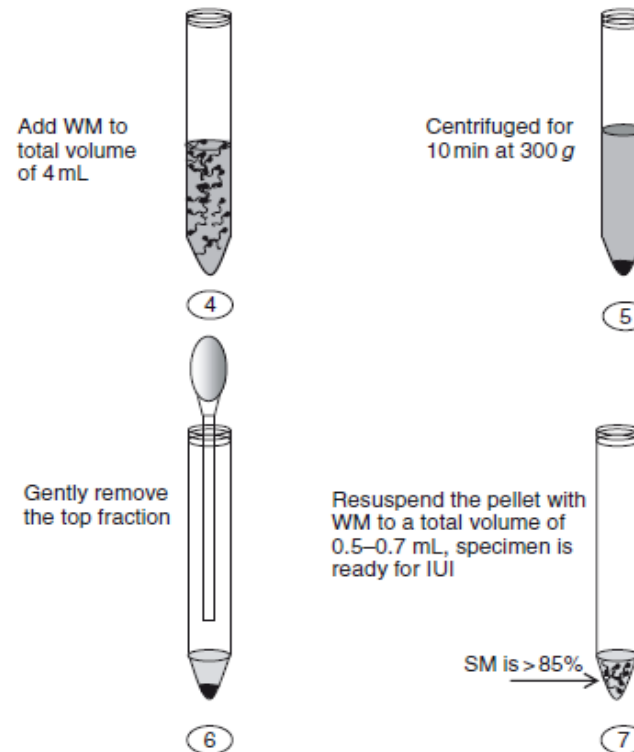
# Stopnowy gradient gęstości

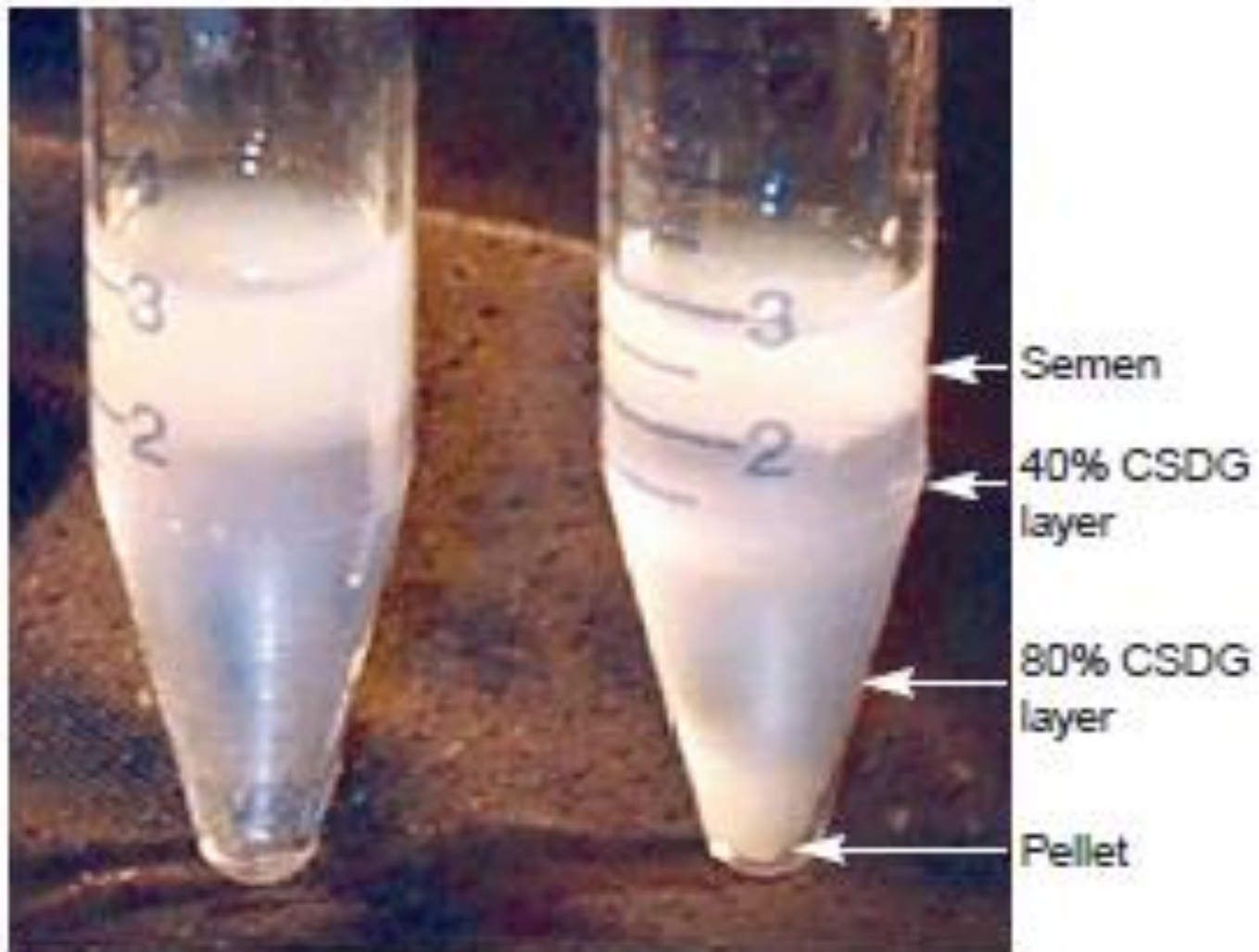
- ❖ Prosty dwuetapowy skokowy gradient gęstości jest najczęściej stosowany, zazwyczaj w 40% (v / v), gęstości górna warstwa i 80% (v / v) gęstość dolnej warstwy.
- ❖ Przygotowanie plemników przy wirowaniu w gradiencie gęstości pozwala zazwyczaj na uzyskanie bardzo ruchliwą frakcję plemników, wolnych od zanieczyszczeń, kontaminujących leukocytów, komórek spermatogenezy i degenerujących komórek rozrodczych.
- ❖ Liczba produktów handlowych dostępnych do wytwarzania gradienty gęstości jest znaczna i nadają się do obróbki nasienia. Produkty te są stosowane zgodnie z zaleceniami producenta. Wszelkie odstępstwa od zaleceń proceduralnych powinny być oparte na uprzednio przeprowadzonych testach.
- ❖ Większość mediów, gradient gęstości zawierają składniki o względnie wysokiej masy cząsteczkowej które mają naturalnie niską osmolalność, a więc zazwyczaj wytwarzają środowisku izoosmotyczny podobne do tego panujące w żeńskim układzie rozrodczym.

# Stopniowe gradient gęstości



**Figure 6.4** Sperm preparation using density gradient centrifugation (DGC) procedure. DGM, density gradient media; SM, sperm motility (%); WM, wash media.





Before centrifugation

After centrifugation

**Fig 5.4** Appearance of gradient tubes with overlaid semen prior to and after centrifugation. CSDG, colloidal silica density gradient.

# Odsetek odzysku, ruchliwość i morfologia (nasienie o normalnych parametrach)

Variable	Median (range) of samples prepared by indicated method			
	Raw	Percoll	Isolate	Ixaprep
Recovery rate (%)	—	6.7* (2.7–17.6)	10.6* (5.2–27.2)	15.7* (8–33.4)
Motile recovery rate (%)	—	10.8† (4–24.7)	16.3† (8.8–41)	16.9† (10.3–43)
Progressive motility (grades A and B) (%)	57 (40–73)	87‡ (73–95)	86‡ (69–95)	64‡ (36–85)
Normal morphology (World Health Organization criteria) (%)	36 (30–48)	49‡ (38–60)	49‡ (40–62)	38‡ (30–53)
Normal morphology (strict criteria) (%)	14 (10–23)	18‡ (12–34)	21‡ (13–32)	14‡ (8–27)

\*  $P < .05$  (Isolate versus Ixaprep versus Percoll within the same row).

†  $P < .05$  (Isolate and Ixaprep versus Percoll within the same row).

‡  $P < .05$  (Isolate and Percoll versus Ixaprep within the same row).

Makkar. *Sperm separation media*. Fertil Steril 1999.

# Odsetek odzysku, ruchliwość i morfologia (nasienie o nienormalnych parametrach)

Variable	Median (range) of samples prepared by indicated method			
	Raw	Percoll	Isolate	Ixaprep
Recovery rate (%)	—	3.5* (0.7–8.6)	5.6* (1.2–12.5)	9.5* (2.8–20.6)
Motile recovery rate (%)	—	5.5† (1.2–15.9)	10.2† (2.1–20.3)	10.5† (3.2–22.6)
Progressive motility (grades A and B) (%)	36 (24–67)	69‡ (44–91)	67‡ (30–89)	43‡ (13–74)
Normal morphology (World Health Organization criteria) (%)	22 (4–32)	32‡ (9–48)	30‡ (11–52)	23‡ (6–41)
Normal morphology (strict criteria) (%)	7 (0–13)	13‡ (3–21)	12‡ (3–23)	7‡ (1–14)

\*  $P < .05$  (Isolate versus Ixaprep versus Percoll within the same row).

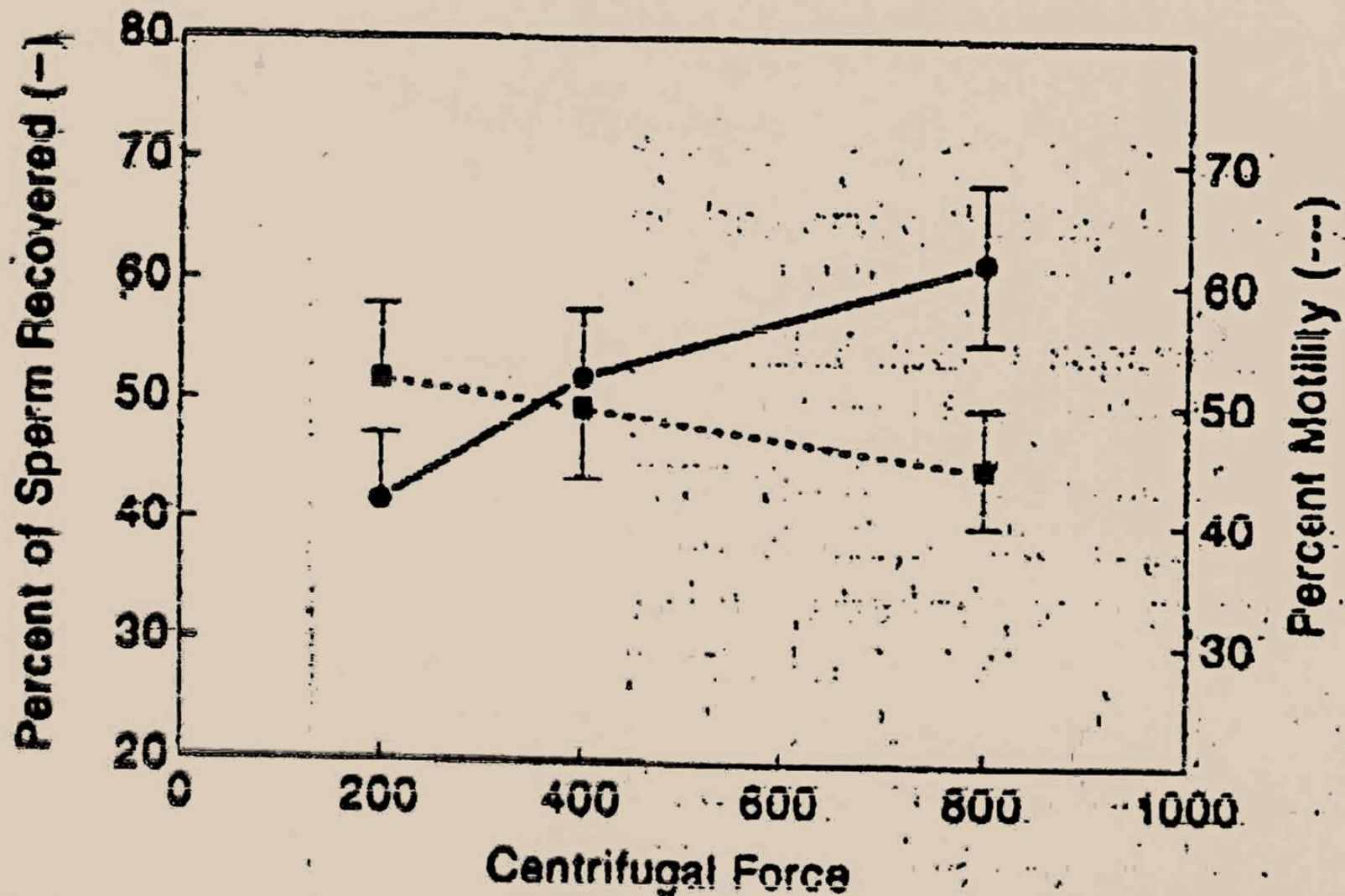
†  $P < .05$  (Isolate and Ixaprep versus Percoll within the same row).

‡  $P < .05$  (Isolate and Percoll versus Ixaprep within the same row).

Makkar. *Sperm separation media*. Fertil Steril 1999.



# Odsetek odzysku i ruchliwych plemników po odwirowaniu



# Gradient/Swim-up Method

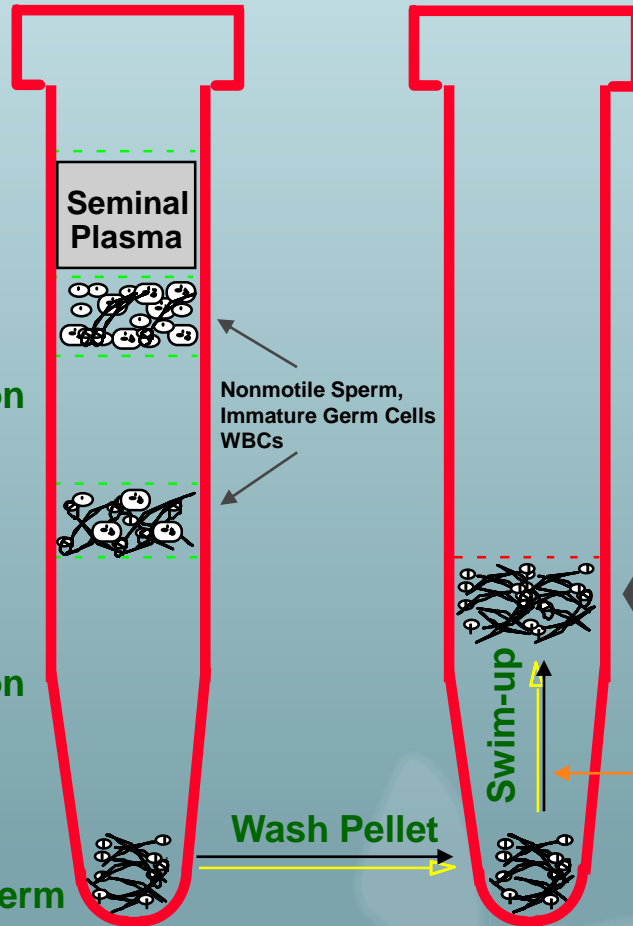
**Discontinuous Density Gradient**

**Swim-up**

**47% Separation Medium**

**90% Separation Medium**

**Motile Sperm**



Nonmotile Sperm,  
Immature Germ Cells  
WBCs

**Motile Sperm  
for Insemination**

**Sperm Wash  
Medium**

**Wash Pellet**

**Swim-up**

# Przygotowanie nasienia do ICSI lub IVF

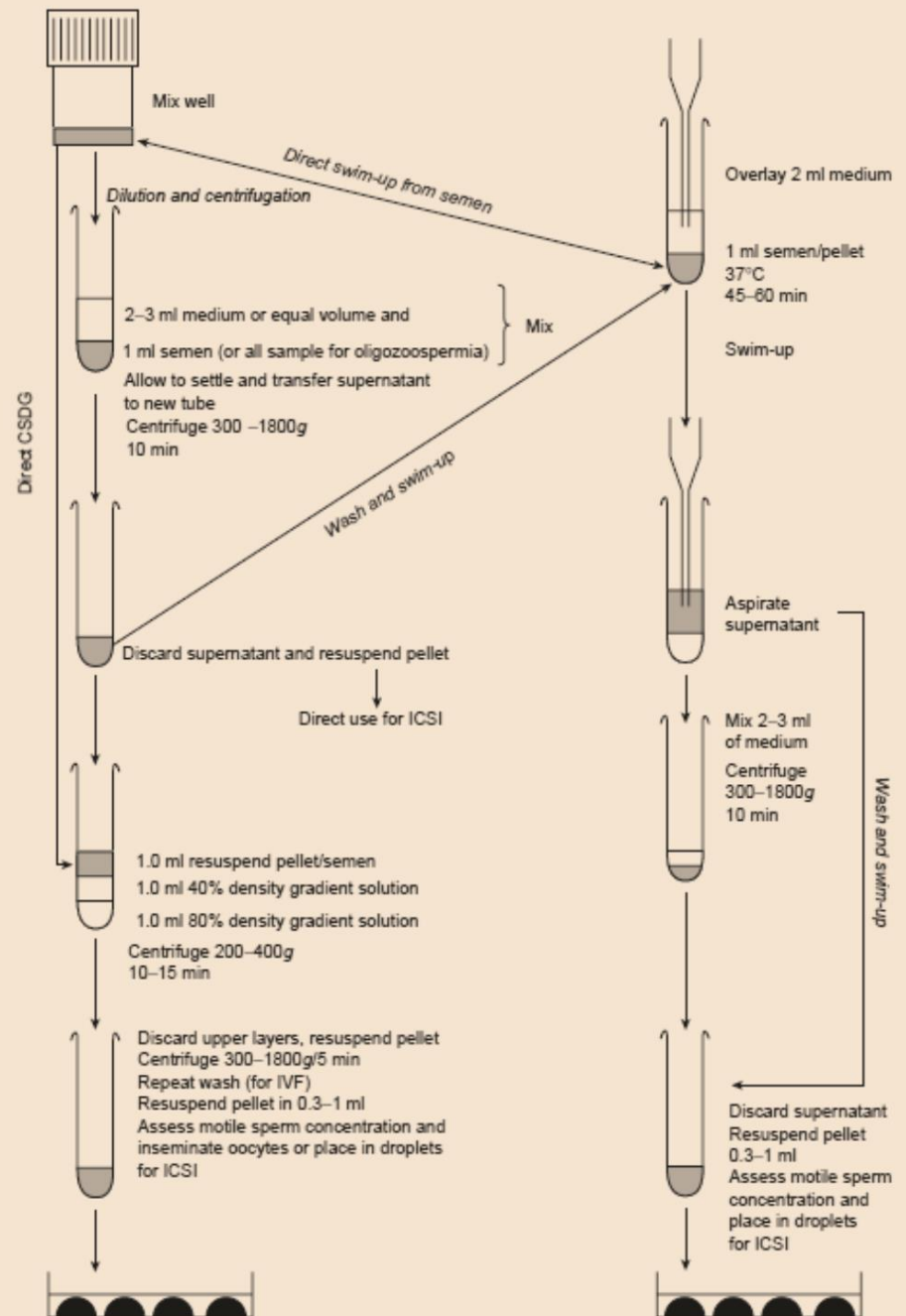
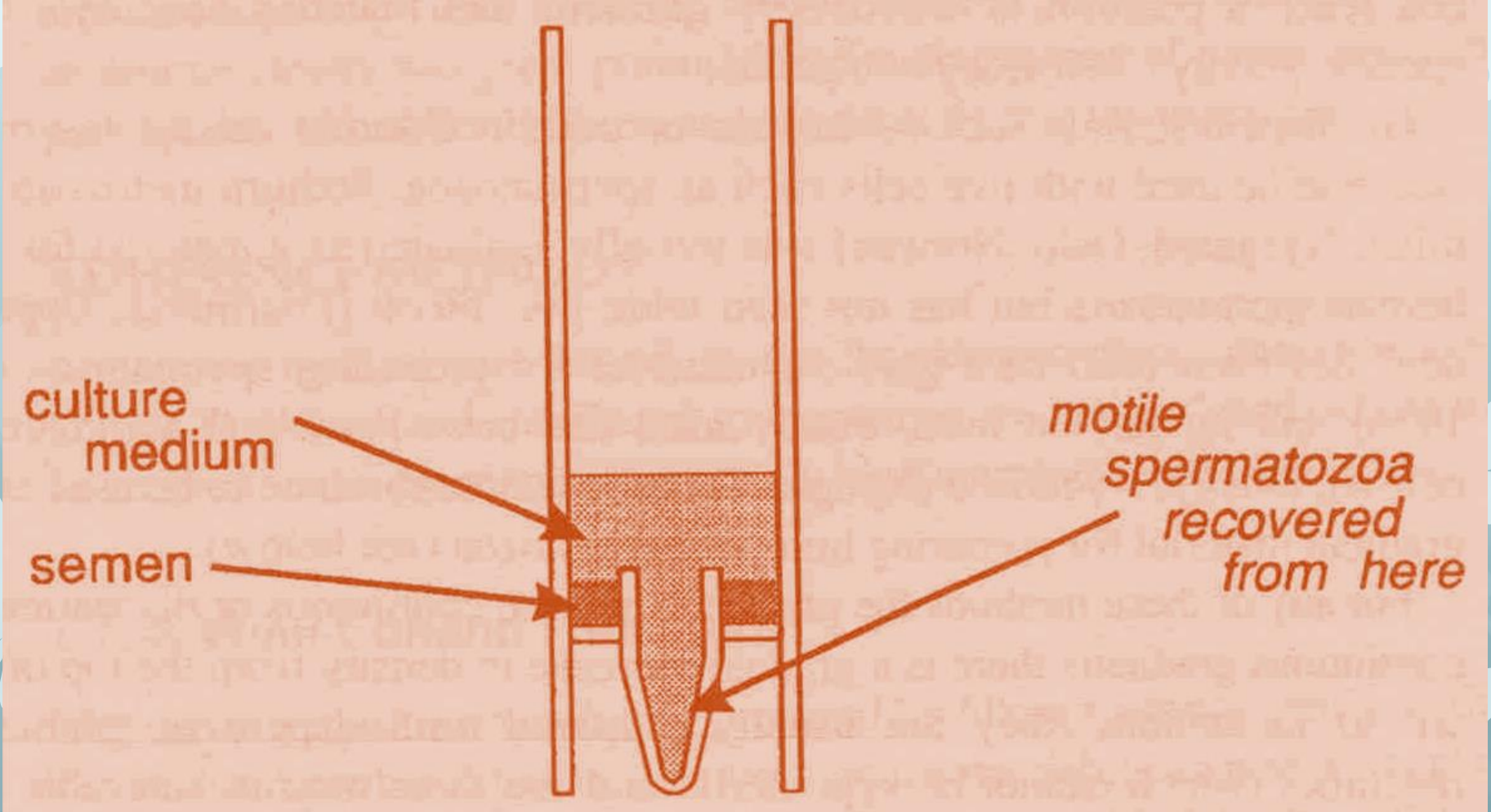
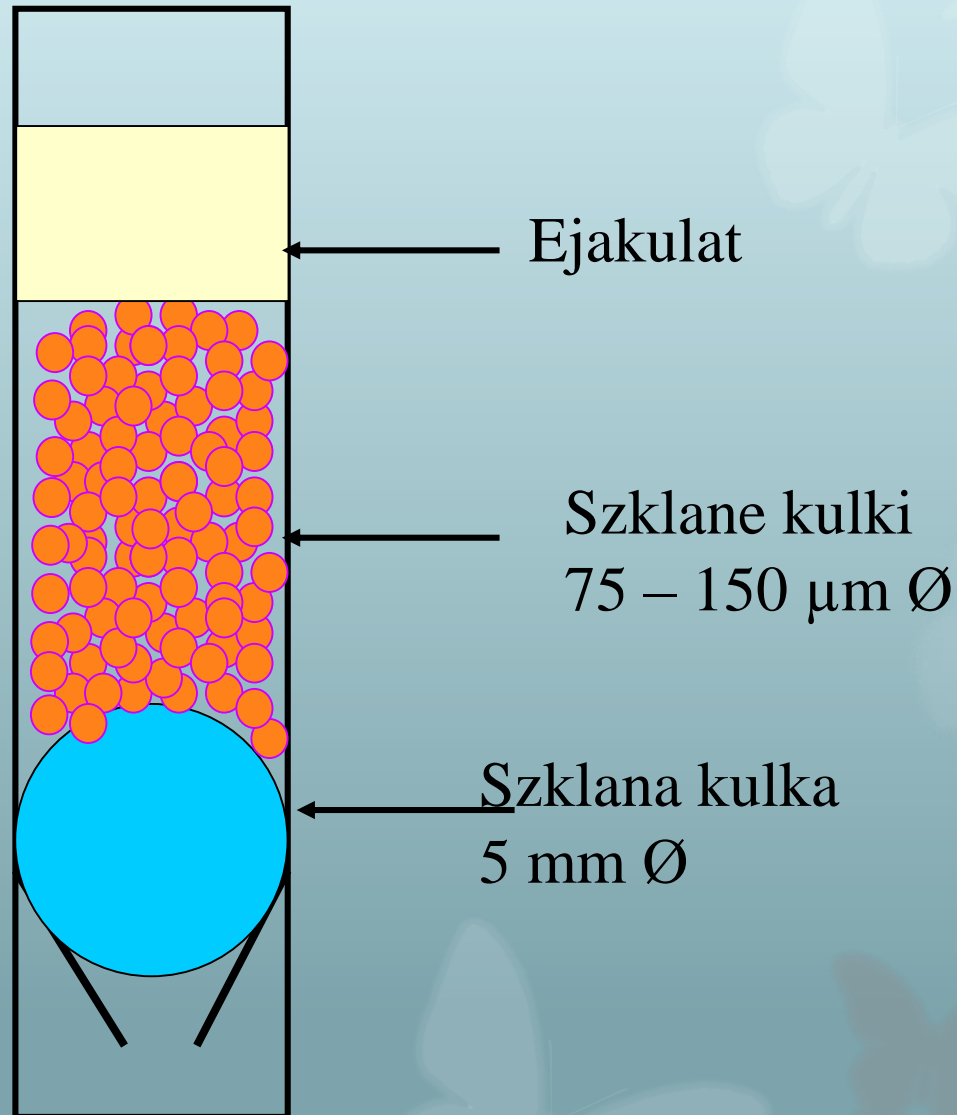


Fig 5.3 Methods of sperm preparation for ART. CSDG, colloidal silica density gradient; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, in vitro fertilization.

# Metoda sedymentacji i migracji plemników

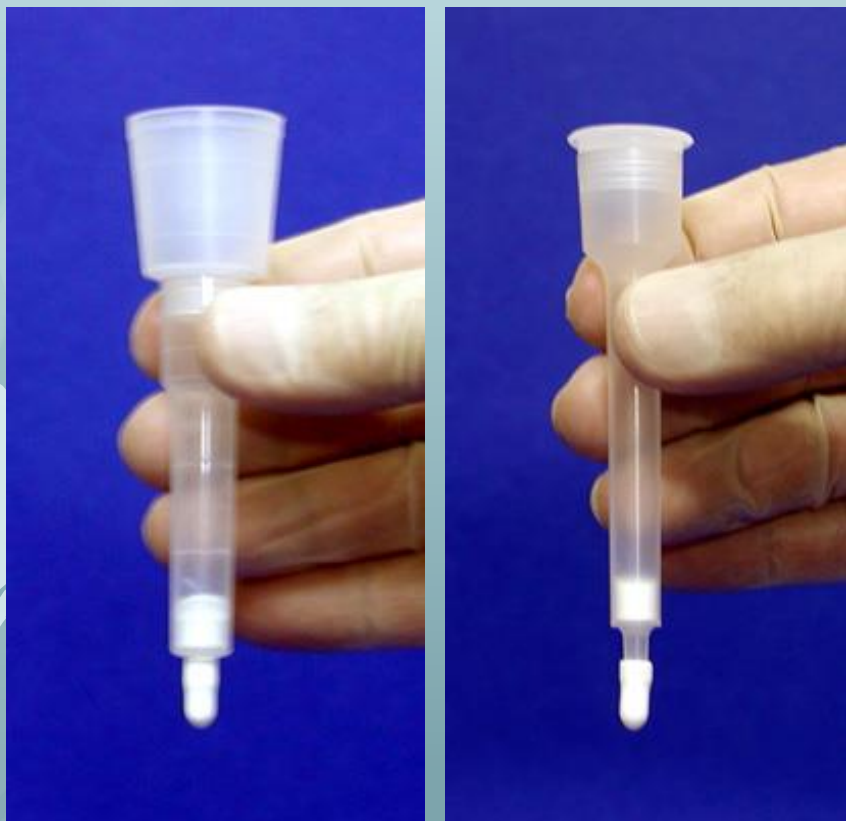
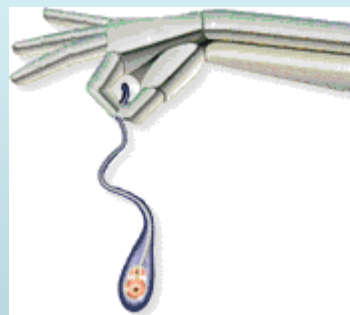


# Filtracja na kolumnie zawierająca szklane kulki



# Zavos Diagnostic Laboratories, Inc.

## SpermPrep™



❖ SpermPrep™ I- Oligospermiczne i odmrożone próbki: SpermPrep™ I jednorazowe kolumny filtracyjne znacząco poprawia odzyskania ruchliwych plemników w porównaniu do tradycyjnej techniki swim-up. Stosuje się do przygotowania nasienie do IUI u kobiet, które zostały poddane stymulacji hormonalnej.

❖ SpermPrep™ II - Normozoospermiczne, asthenozoospermiczne i teratozoospermiczne próbki: jest przeznaczony do stosowania z nasieniem o normalnych parametrach oraz do tych próbek wykazujących normalną liczbę plemników, ale z nieprawidłowymi parametrami ruchu. Ten system skutecznie w szybki sposób usuwa martwe komórki, inne plemniki z fragmentowanym DNA jak i plemniki opłaszczane przeciwciałami.

**Table 2 Results of Manipulation of Oligoasthenozoospermic Semen**

Treatment (n = 21)	Motility (%)		Yield of motile Sperm
	Original	Treated	
SpermPrep	31.5 ± 4.1	55.2 ± 4.8	42.7 ± 4.6
Percoll	37.2 ± 3.4	56.7 ± 4.2	22.1 ± 3.1*
Swim-up	28.7 ± 3.7	61.1 ± 5.1	13.8 ± 3.5*

# Przygotowanie zakażonych próbek nasienia z HIV

- ❖ Jeśli HIV jest obecny w nasieniu, RNA wirusa i DNA wirusowy mogą się znaleźć wolne w plazmie nasienia i w komórkach nie będących plemnikami.
- ❖ Ponieważ receptory na HIV (CD4, CCR5, CXCR4) są wyrażane tylko przez komórki nie będącymi plemnikami plemników komórek system łączący wirowanie materiału na gradiencie gęstością następnie przeprowadzenie swim-up został zaproponowany.
- ❖ System ten umożliwia w sposób skuteczny zapobieganie infekcji u niezainfekowanych partnerek
- ❖ Procedura ta została opracowana w celu oddzielenia zainfekowanych komórek nie plemnikowych zakażonych wirusem (będących w supernatancie gradientu gęstości) od wolnych od wirusa HIV ruchliwych plemników w swim-up (z osadu gradientu gęstości)
- ❖ Przygotowane próbki powinny być badane przez reakcję odwrotnej transkrypcji łańcucha polimerazy (RT-PCR) przed użyciem, a tylko próbki wolne od HIV mogą być wykorzystywane do ART.
- ❖ Wyniki tej procedury są zachęcające, ale nie ma jeszcze wystarczających dowodów eliminacji ryzyka zakażenia HIV, przez przygotowanie plemników.
- ❖ **Uwaga: Technika ta powinna być tylko w wykonana w izolowanych pracowniach w urządzeniach zapewniających bezpieczną pracę z materiałem zakaźnym (biohazard) aby zminimalizować ryzyko kontaminacji próbki wolna od HIV.**



# Przygotowanie plemniki od jąder i najądrza

- ❖ Plemniki odzyskane z tkanki jądra i najądrza wymagają specjalnego przygotowania.
- ❖ Typowe wskazanie do aspiracji najądrza jest azoospermia obstrukcyjna raczej niż dysfunkcja jąder. W konsekwencji, stosunkowo duża liczba plemników mogą być zbierane w celach terapeutycznych.
- ❖ Aspiraty najądrza mogą często zostać uzyskane przy minimalnym zanieczyszczeniu krwinkami czerwonymi i komórkami nie będącymi plemnikami , co izolacja i selekcja ruchliwych plemników najądrza jest stosunkowo prostą procedurą.
- ❖ Jeżeli otrzymujemy dużą liczbę plemników z najądrza, wirowanie w gradiencie gęstości jest skuteczną metodą przygotowania ich do późniejszego użycia .
- ❖ Jeśli liczba plemników jest niska, proste płukanie może być wykonywane .
- ❖ Plemniki z jąder mogą być pobierane przez otwartą biopsję lub przezskórnej biopsji igłowej. Próbkę z jąder są niezmiennie zanieczyszczone z komórkami nie będącymi plemnikami i licznymi czerwonymi krwinkami, więc dodatkowe etapy są potrzebne do przygotowania czystej zawiesiny plemników.
- ❖ W celu uwolnienia wydłużonych spermatyd z krętych kanalików nasiennych metody enzymatyczne lub mechaniczne są potrzebne.
- ❖ Plemniki są przygotowane w ten sposób jedynie do ICSI, ponieważ liczba plemników uzyskanych jest niska, a ich ruchliwość jest słaba

# Metody izolacji plemników

## ❖ Metoda enzymatyczna

- Inkubować tkankę jądra kolagenazą (np. 0,8 mg *Clostridium histolyticum*, typu 1A na ml pożywki) przez 1,5 - 2 godzin w temperaturze 37°C, mieszając zawiesiny co 30 minut przy pomocy worteksu.
- Odwirować przy 100g przez 10 minut, a zbadać osad

## ❖ Metoda mechaniczna

- Macerować tkanki jąder w pożywce stosując szkiełka nakrywkowe lub igieł do jednorazowych strzykawek insulinowych do momentu uzyskania drobną zawiesinę zdysocjowanej tkanki.

azoospermia

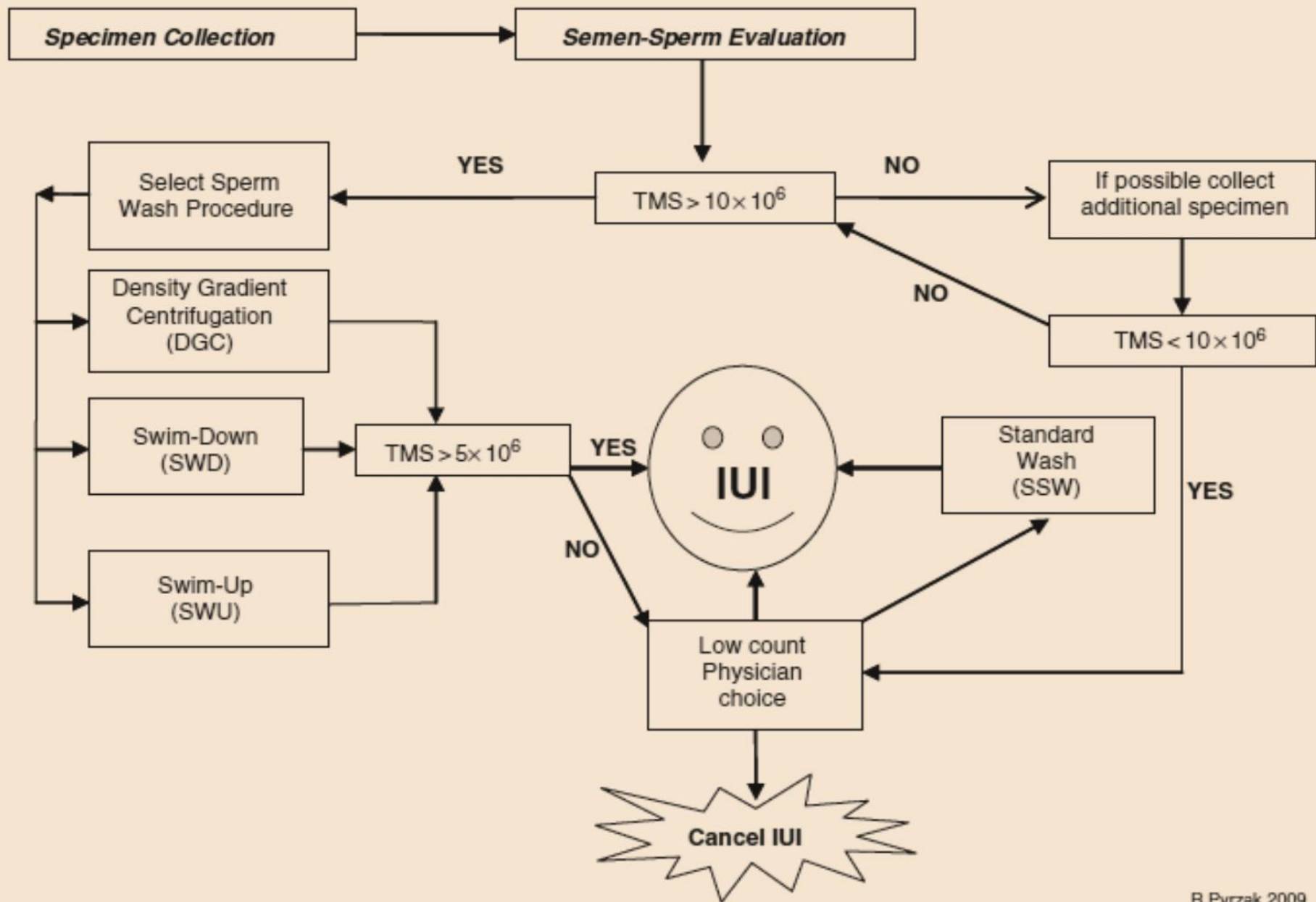
**Table 6.1.** Principal sperm preparation procedures compared

Procedure	Standard sperm wash (SSW)	Swim-up (SWU)	Density gradient centrifugation (DGC)	Swim-down (SWD)
Number of centrifugations	2–3	2–3	2	0–1 <sup>a</sup>
Speed of centrifugation ( <i>g</i> )	300–500	300–400	300–650	0–175
Spin time (min)	10	10–15	10–20	0–10
Processing time <sup>b</sup>	60–90	70–150	70–90	50–70
Total motile sperm (TMS) recovery (%)	90–95	10–25	30–45	35–50
Cost <sup>c</sup>	Low	Low	High	Low

<sup>a</sup> Centrifugation is required only in cases when the specimen for IUI needs to be ready in a short time.

<sup>b</sup> Processing time does not include sperm collection and liquefaction time.

<sup>c</sup> Includes only materials and disposables.



R.Pyrzak 2009

**Figure 6.1** Flow chart for selecting the sperm preparation method depending on the total motile sperm (TMS) in the initial semen specimen.



**Dziękuję za uwagę**