

## Niepłodność męska a nowe techniki selekcji plemników do zabiegu wspomaganego rozrodu

Prawidłowe wartości parametrów oceny nasienia, nie decydują ostatecznie o rzeczywistej płodności danego mężczyzny. Wyjątkami są pacjenci z azoospermią (brak plemników w nasieniu) i aspermią (brak nasienia). Wykazano m.in., że normozoospermia (prawidłowy ejakulat wg norm WHO 1999), nie jest synonimem płodności. Przykładem są badania, w których stwierdzono wśród pacjentów leczonych z powodu niepłodności z normozoospermią, znacząco więcej uszkodzeń DNA w porównaniu z płodnymi dawcami zaklasyfikowanymi do tej samej grupy. Powyższej opisany przypadek dotyczy pacjentów z zaburzeniami spermatogenezy, w efekcie, której powstają gamety, ale niezdolne do zapłodnienia (np. plemniki pozbawione akrosomów lub zaburzona struktura witki – brak ruchu plemnika).

Za pomocą rutynowego badania nasienia nie można ocenić m.in. dojrzałości cytoplazmatycznej i jądrowej plemników (Saleh i wsp., 2002), dlatego oprócz podstawowej oceny nasienia poszukuje się dodatkowych testów, które umożliwiłyby określić rzeczywistą płodność danego mężczyzny i zdolność jego plemników do zapłodnienia. Uzupełnieniem podstawowego badania nasienia może być test diagnostyczny oceniający dojrzałość plemników w świeżym nasieniu np. HBA (ang. hyaluronan binding assay). Selekcji dojrzałych plemników do zabiegów wspomaganego rozrodu można natomiast dokonać np. za pomocą szalek z mikrodołkami pokrytymi hialuronianem, tzw. szalki PISCI.

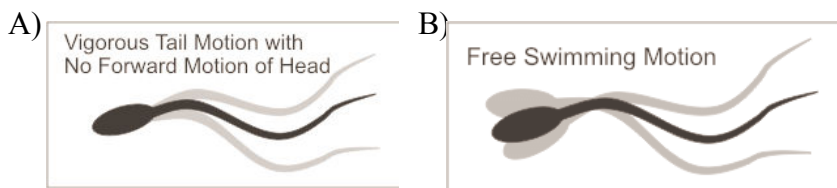
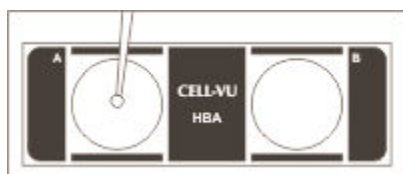
Hialuronian jest polisacharydem, występującym naturalnie w ludzkich komórkach, w tym także w przestrzeni otaczającej komórkę jajową. Podczas prawidłowego dojrzewania plemników wykształcają się na powierzchni jego główki miejsca, zdolne do wiązania hialuronianu. Obecność tych miejsc jest zatem niezbędne w procesie wiązania się główki plemnika do komórki jajowej podczas naturalnego zapłodnienia. Plemniki, które nie wykształciły miejsc wiążących hialuronian, są niezdolne do zapłodnienia oocytu w warunkach naturalnych, a nawet podczas rutynowych zabiegów wspomaganego zapłodnienia *in vitro*, co wynika z ich niedojrzałości cytoplazmatycznej i jądrowej.



Selekcja dojrzałych plemników przed zabiegiem ISCI przeprowadzona za pomocą hialuronianu będącego składnikiem mediów hodowlanych i szalek selekcyjnych, umożliwia uzyskanie wyższego odsetka ciąży i zredukowanie liczby poronień. Ten pozytywny efekt jest możliwy, ponieważ plemniki wyselekcjonowane *in vitro* za pomocą hialuronianu są dojrzałe, żywotne, wykazują niższy odsetek uszkodzeń kwasu DNA i normalną częstość występowania chromosomalnych aneuploidii (genetycznych zaburzeń). W rezultacie wyselekcjonowane plemniki za pomocą hialuronianu przed zabiegami wspomaganego rozrodu są odpowiednikami plemników, które z sukcesem uczestniczyłyby w procesie naturalnego zapłodnienia.

Ocena miejsc wiążących hialuronian występujących na powierzchni plemnika, może być najlepszym wskaźnikiem potencjału rozrodczego danego mężczyzny. Ostatnio pojawił się test HBA (hialuronian binding assay), umożliwiający ocenę dojrzałości plemników w świeżym nasieniu (Origio, Dania). Zestaw zawiera komplet szkiełek mikroskopowych, które miejscowo są pokryte hialuronianem. Po nakropleniu świeżego nasienia, embriolog liczy plemniki, które związały się główkami z hialuronianem (dojrzałe plemniki) i oblicza proporcję plemników związanych do niezwiązanych (niedojrzałe plemniki). Testy z wykorzystaniem hialuronianu, mają wysoką wartość diagnostyczną. Wykrycie w nasieniu pacjenta powyżej 40% plemników niedojrzałych umożliwia lekarzowi zaplanować leczenie danej pary, a także wyjaśnić przyczyny wcześniejszych niepowodzeń po zabiegach inseminacji. Poniżej znajdują się schematy przedstawiające szkiełko mikroskopowe oraz plemniki zdiagnozowane, jako dojrzałe i niedojrzałe za pomocą testu HBA.

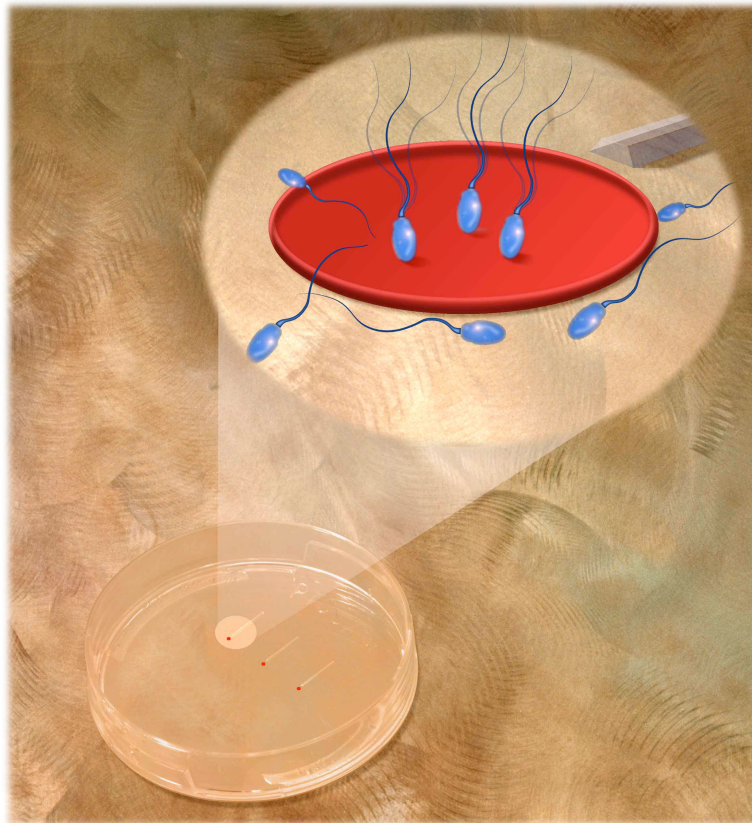
Test HBA



- A) Plemniki wiążące się z hialuronianem (dojrzałe plemniki) wykazują brak ruchu do przodu, brak ruchu główki, ale przy silnym ruchu witeki.
- B) Plemniki niewiążące się z hialuronianem – niedojrzałe plemniki (brak miejsc wiążących się z hialuronianem na powierzchni główki), wykazują ruch do przodu, zarówno główki i witeki



Do selekcji plemników dojrzałych w laboratorium IVF, Dr Gabor Huszar, pionier badań nad wykorzystaniem hialuronianu do oceny dojrzałości plemników do zabiegów wspomaganego rozrodu (Uniwersytet Medyczny Yale, Stany Zjednoczone), opracował szalki PISCI z nakroplonym na ich powierzchnię hialuronianem. Tylko plemniki dojrzałe łączą się z hialuronianem, natomiast reszta porusza się dalej i nie ulega związaniu. Embriolog wykonujący zabieg wspomaganego rozrodu w klinice wybiera do zabiegu docytoplazmatycznej iniekcji (ICSI) plemnik z grupy plemników związanych z hialuronianem na szalce PISCI (patrz schemat poniżej).



Szalka PISCI i dojrzałe plemniki wyselekcjonowane do docytoplazmatycznej iniekcji plemników (ICSI)

Użycie hialuronianu, który jest elementem testów diagnozujących dojrzałość, a także mediów hodowlanych i szalek PISCI służących do selekcji dojrzałych plemników do ICSI, umożliwia wzrost odsetka zapłodnionych oocytów, a także wzrost odsetka prawidłowo



rozwijających się zarodków *in vitro* (Parmegiani L i wsp., 2009). Wykorzystanie hialuronianu do zabiegów wspomaganego rozrodu ma zatem na celu polepszenie wyników wspomaganego rozrodu i co najważniejsze powiększenie szansy danej pary na posiadanie potomstwa, gdy jakość plemników w nasieniu jest bardzo słaba.

Ze względu na ciągły spadek jakości nasienia mężczyzn w wieku reprodukcyjnym, który jest obserwowany w ostatnich dekadach oraz ze względu na ograniczone możliwości oceny męskiej niepłodności, bazującej na podstawowym badaniu nasienia, niezbędny jest rozwój technik umożliwiających lepszą diagnozę. Hialuronian jest polisacharydem, występującym naturalnie w przestrzeni wokół osłonki przejrzystej, struktury otaczającej komórkę jajową. Zdolność wiązania się plemników *in vitro* do hialuronianu, będącego składnikiem mediów, testów diagnostycznych, a także szalek selekcyjnych jest porównywalna do naturalnego wiązania się plemników z osłonką przejrzystą podczas naturalnego zapłodnienia. Hialuronian, umożliwia zatem diagnostykę i selekcję plemników dojrzałych cytoplazmatycznie i jądrowo do zabiegu wspomaganego rozrodu *in vitro* (ISCI), co zwiększa szansę danej pary na posiadanie potomstwa, gdy jakość plemników w nasieniu jest bardzo słaba.



### **Piśmiennictwo:**

1. "WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction". 4th edition. Cambridge University Press 1999.
2. "WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen". 5th edition. Cambridge University Press 2000.
3. Huszar G., Ozkavukcu S., Jakab A., Celik-Ozenci C., Sati G.L., Cayli S. „Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for ISCI”. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006; 18: 260-267.
4. Huszar G., Willetts M., Corrales M. “Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens”. *Fertil Steril*, 1990; 54: 1127-1134.
5. Parmegiani L., Cognigni G.E., Bernardi S., Troilo E., Ciampaglia W., Filicori M. “Physiologic ICSI: Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality”. *Fertility and Sterility*, 2009.
6. Saleh i wsp., 2002

