

Селекция зрелых сперматозоидов с использованием гиалуроновой кислоты



origio

a CooperSurgical Company

Использование гиалуроновой кислоты для селекции зрелых сперматозоидов

Гиалуроновая кислота — глюкозамингликан, широко распространённый в эпителиальной, соединительной и нервной тканях.

Гиалуроновая кислота является главным компонентом ооцит-кумулюсного комплекса. Мембрана зрелого сперматозоида обязательно несёт рецепторы связывания с гиалуронатом.

Формирование сайтов связывания с гиалуроновой кислотой происходит на этапе созревания удлинённых сперматид одновременно с другими важными событиями: компактизацией ДНК, заменой гистонов на протамины, формированием участков связывания с зоной пеллюцида, экстррузией избыточной цитоплазмы.

Использование в циклах ИКСИ селекции, основанной на связывании с гиалуронатом, позволяет отобрать зрелые сперматозоиды, обладающие целым спектром качеств, необходимых для оплодотворения и для последующего развития эмбриона.

Экспериментально было подтверждено, что сперматозоиды, способные к связыванию с гиалуроновой кислотой (ГК), характеризуются:

- низким уровнем фрагментации ДНК
- низкой частотой анеуплодии
- отсутствием апоптотических маркеров
- способностью к связыванию с зоной пеллюцида
- нормальным количеством цитоплазмы

Клинические исследования эффективности селекции сперматозоидов с помощью гиалуроновой кислоты в циклах ИКСИ показали статистически достоверное увеличение частоты наступления беременности в группе пациентов с низким индексом зрелости сперматозоидов.

Оценка индекса зрелости сперматозоидов осуществляется с помощью экспресс метода HBA®, а отбор зрелых форм для процедуры ИКСИ — с помощью чашек PICSI®.

Экспериментальные данные (избранные публикации)

Авторы	Методы	Оцениваемые параметры	Результаты
Nasr-Esfahani et al., 2008	окрашивание CMA3	Наличие резидуальных гистонов	Негативная корреляция наличия резидуальных гистонов и связывания с ГК
Huscar et al., 2003	Окрашивание анилиновым синим		
Cayli et al., 2003	Hemizoma assay	Способность к связыванию с зоной пеллюцида	Корреляция связывания с ГК и с зоной пеллюцида
Huscar et al., 2002	Иммуноцитохимическое окрашивание	Объем цитоплазмы	Нормальный объем цитоплазмы у связывающихся с ГК сперматозоидов, повышенный — у неспособных к связыванию
Cayli et al., 2004		Экспрессия маркеров апоптоза (caspasa3, Bcl-xl)	Повышенная экспрессия апоптотических маркеров у сперматозоидов, не связывающихся с ГК
Yagci et al., 2010	Акридиновый оранжевый	Уровень фрагментации ДНК	Связывающиеся с ГК сперматозоиды обладают целостной ДНК
Nasr-Esfahani et al., 2008	Sperm Chromatin Dispersion		
Tarozzi et al., 2009	TUNEL		
Sati et al., 2004			
Jacob et al., 2006	FISH	Наличие анеуплодии	Снижение в разы уровня анеуплодии среди связавшихся с ГК сперматозоидов
WorriIow et al., 2009	HBA, PICS1, ICSI	Частота наступления беременности	Селекция сперматозоидов с помощью ГК статистически достоверно увеличивает частоту наступления беременности в случае низкого индекса степени зрелости сперматозоидов

Список научных публикаций, посвящённых селекции сперматозоидов с помощью гиалуроновой кислоты и клиническому применению HBA® и PICS1®, можно найти по адресу:

<http://medicultref.com/>

<http://www.origioref.com/reference.php?ref=46>

<http://www.origioref.com/reference.php?ref=47>

Чашки ПИКСИ —

отбор зрелых сперматозоидов для проведения ИКСИ
БЫСТРО ОБЪЕКТИВНО КАЧЕСТВЕННО



Выбор зрелого сперматозоида с лучшей морфологией и оплодотворяющей способностью на основе биохимического взаимодействия рецепторов на мембране сперматозоида и гиалуроновой кислоты.

- Культуральные чашки из полистирола.
- На внутреннюю поверхность нанесены три микрокапли гиалуроната размером 2*3 мм.
- Для облегчения поиска, на внешней поверхности чашки над каждой микрокаплей располагается рельефная линия.



Зрелые сперматозоиды связываются с гиалуроновой кислотой с помощью специфических рецепторов, находящихся на мембране. Связавшиеся сперматозоиды теряют прогрессивную подвижность, хотя их хвосты совершают частые активные колебания. Незрелые сперматозоиды не связываются с поверхностью микрокапель и продолжают двигаться беспрепятственно.

Гиалуронат-связанные сперматозоиды легко идентифицировать и отобрать с помощью микропипетки для ИКСИ.

- Чашки ПИКСИ стерилизованы с помощью радиации.
- Уровень эндотоксинов $\leq 1\text{EU/чашку}$.
- Отсутствие эмбриотоксичности доказано тестом MEA.

Инструкция по использованию чашек ПИКСИ

- Нанесите 7–10 мкл SpermPreparation Medium или другой подходящей среды на конец каждой линии, чтобы покрыть поверхность микрокапли и гидратировать гиалуроновую кислоту. Для гидратации гиалуроната, как правило, достаточно 5 минут, однако старые микрокапли требуют более длительного времени.

Капли PVP или другой среды, необходимой для манипуляций со сперматозоидами, могут быть нанесены в любое место на чашке. Аккуратно покройте чашку жидким парафином, оставьте при комнатной температуре и используйте в течение 2-х часов после гидратации микрокапли.

- Добавьте 1–2 мкл приготовленной суспензии сперматозоидов к первой микрокапле. Оставьте как минимум на 5 минут для связывания сперматозоидов с гиалуронатом.

- Поместите чашку под микроскоп и оцените плотность связанных сперматозоидов на микрокапле. Количество связанных сперматозоидов будет возрастать с течением времени, так как большее их количество сможет контактировать с гиалуронатом.

Хорошая плотность связанных сперматозоидов — много изолированных форм, которые хорошо засасываются в микропипетку. Если плотность сперматозоидов слишком мала или высока для проведения отбора, растворите или сконцентрируйте образец спермы и используйте отрегулированный объём для нанесения на следующую микрокаплю.

Для определения количества гиалуронат-связанных сперматозоидов рекомендовано проведение теста НВА. Результат теста определяет выбор концентрации сперматозоидов, помещаемых на микрокаплю, для достижения необходимой плотности.

- Отбор зрелых сперматозоидов производят пипеткой для ИКСИ в центральной части микрокапли. Отбор с периферии микрокапли нежелателен, так как микрокапля имеет рельефную форму с поднимающимися краями, и на её периферии может наблюдаться физическая иммобилизация сперматозоидов, не обусловленная связыванием с гиалуронатом.

- Закончите отбор, когда 20–50 сперматозоидов попадёт в пипетку. Добавьте выбранные сперматозоиды в каплю с PVP (инактивируйте хвост, проверьте подвижность и морфологию).

Из капли PVP отберите один сперматозоид для инъекции. Перенесите его в чашку для инъекции и проделайте стандартную процедуру ИКСИ.

Тест НБА (Sperm-Hyaluronan Binding Assay) — экспресс-анализ связываемости сперматозоидов с гиалуроновой кислотой в нативном эякуляте



В наборе 5 стекол на 10 исследований.

Инструкция по использованию

Получение эякулята и обработка спермы

1.Соберите эякулят в стерильный, сухой контейнер путем мастурбации после 2–3 дней полового воздержания.



2.Оставьте образец спермы при комнатной температуре (**18–28°C**) на **30–60 минут** для разжижения. Если через 60 минут разжижение образца спермы не наступило, добавьте равный объем среды для обработки спермы и перемешайте с помощью пипетки.



3.Проводите данный тест не позднее чем через 3 часа после сбора эякулята.

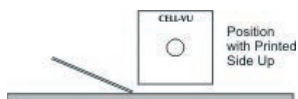
Проведение теста

1.Проводите тест при комнатной температуре, **20–30°C**. Температура не должна превышать 30°C.

2.Перемешайте образец спермы и добавьте 7–10 мкл рядом с центром камеры



3.Аккуратно накройте камеру покровным стеклом CELL-VU (надпись должна быть сверху), чтобы не сформировались пузырьки воздуха. Для этого покровное стекло необходимо опускать медленно под углом к предметному стеклу.

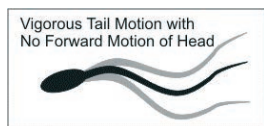


4.Оставьте полученный препарат при комнатной температуре не менее чем на 10 минут, но не более чем на 20 минут.

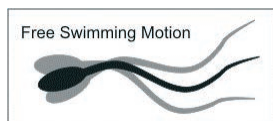


5.Посчитайте в одних и тех же квадратах количество **связанных подвижных сперматозоидов** и **несвязанных подвижных сперматозоидов** (см. ниже). Неподвижные сперматозоиды не учитывать.

связанные подвижные сперматозоиды



несвязанные подвижные сперматозоиды



6а.Быстро оцените в камере количество связанных и несвязанных форм сперматозоидов (связанные сперматозоиды посчитайте в первую очередь).

б.Оцените до 100 подвижных сперматозоидов или количество связанных подвижных сперматозоидов в 100 клетках.

с.Запишите полученные значения.

д.Повторите подсчет несвязанных подвижных сперматозоидов в тех же квадратах и запишите полученный результат.

е.Сложите полученные значения для подсчета общего количества подвижных сперматозоидов.

7.Рассчитайте % гиалуронат — связанных подвижных сперматозоидов следующим образом:

$$\% \text{ связанных сперматозоидов} = \frac{\text{количество связанных подвижных}}{\text{общее количество подвижных}} \times 100\%$$

Если индекс связывания менее 60% — пациентам рекомендовано проведение процедуры ИКСИ вне зависимости от параметров эякулята.



ООО «ОРИДЖИО» является эксклюзивным дистрибьютором культуральных сред MediCult, SAGE, микроинструментов Humagen, продукции MidAtlantic, а также настольного инкубатора Planer (GDBT37-01-ORIGIO) и лабораторного оборудования для ЭКО на территории России. Компания проводит консультационную поддержку эмбриологов, участвует в организации образовательных курсов и семинаров в России и за рубежом, обеспечивает комплексное оснащение лабораторий ЭКО и поддержку научных исследований.

По всем вопросам обращайтесь, пожалуйста, по адресу:
Санкт-Петербург, Пулковское шоссе, д.40/4, лит.А, БЦ Технополис

Тел.: +7 (812) 318-02-90

info-ru@origio.com

www.origio.ru