

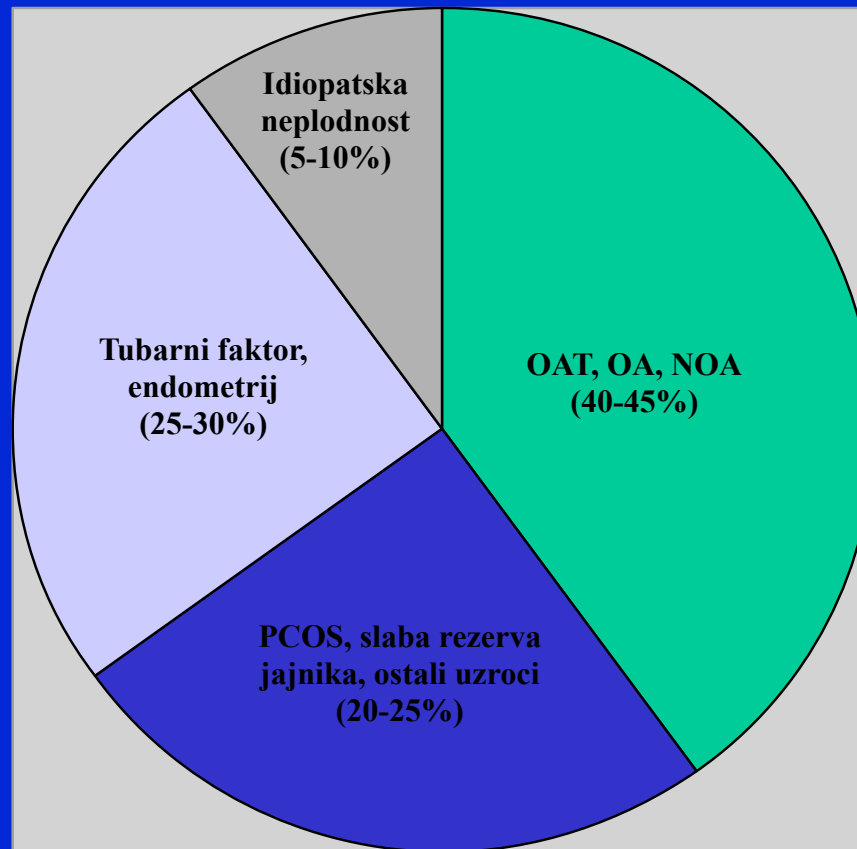
Priprema i obrada testikularnih spermija za TESE-ICSI

Patrik Stanić



Zavod za humanu reprodukciju
Klinike za ženske bolesti i porode
Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Uzroci neplodnosti (15 – 18% parova)

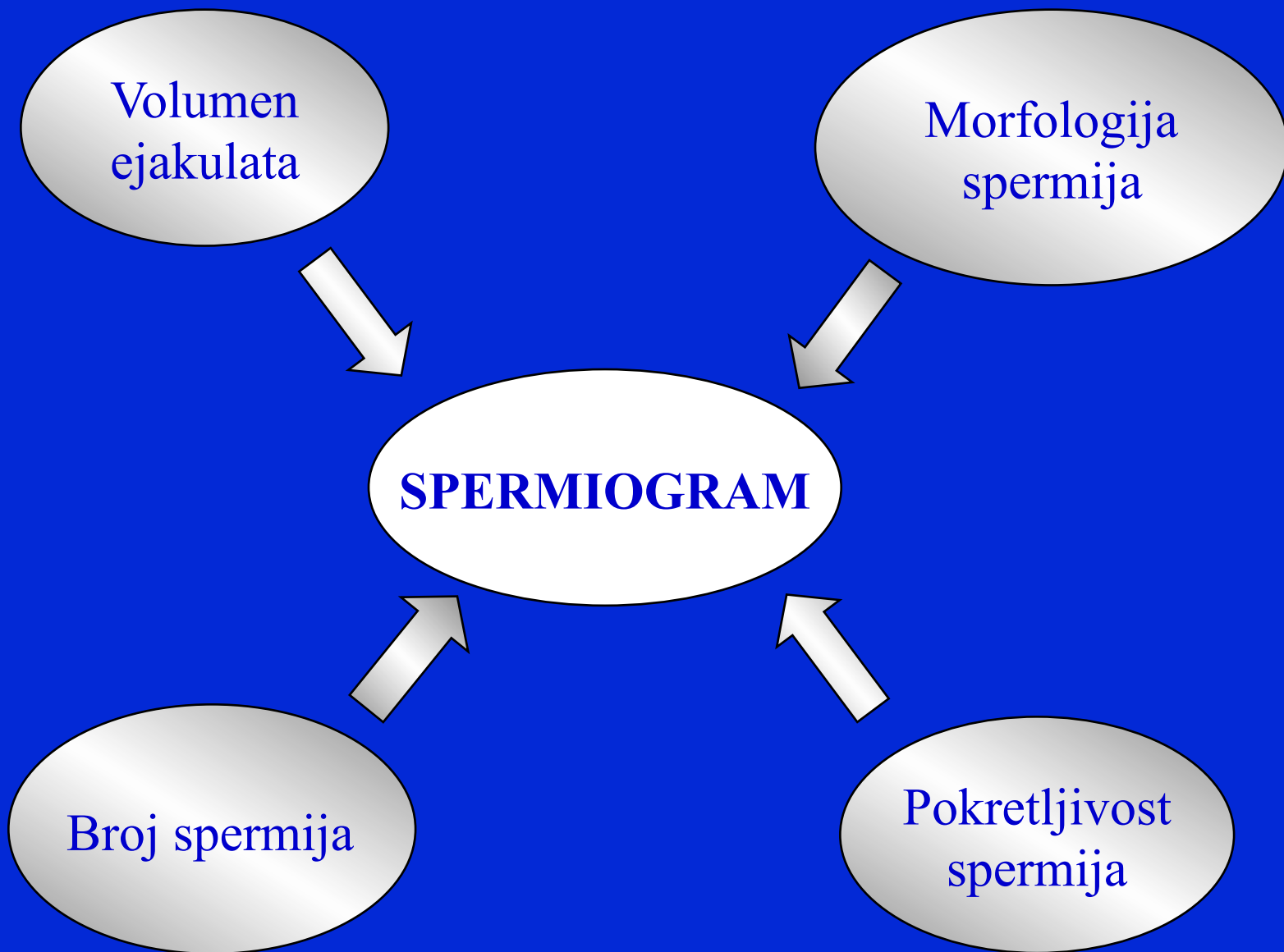


Uzroci muške neplodnosti

- Testikularni (čimbenici koji štetno djeluju na spermatogenezu)
 - prirodene abnormalnosti:
 - Klinefelterov sindrom (47 XXY)
 - mikrolecije Y kromosoma
 - kriptorhizam
 - varikokela
 - stečeni poremećaji:
 - orhitis
 - ionizirajuće zračenje
 - traume i torzije sjemenika
 - lijekovi (metotreksat, nitrofurantoin, hormonski preparati)
 - toksini iz okoliša (kadmij, olovo, živa)

- **Post-testikularni** (čimbenici koji oštećuju provodne kanale i spolna disfunkcija)
 - CBAVD i CUAVD
 - epididimitis
 - prostatitis
 - vazektomija

- **Pretestikularni** (hipotalamičko-hipofizni poremećaji i ostale endokrinopatije)
 - Kallmanov sindrom (KALIG-I na X-kromosomu)
 - hipogonadizam
 - tumori hipofize i hipotalamusa



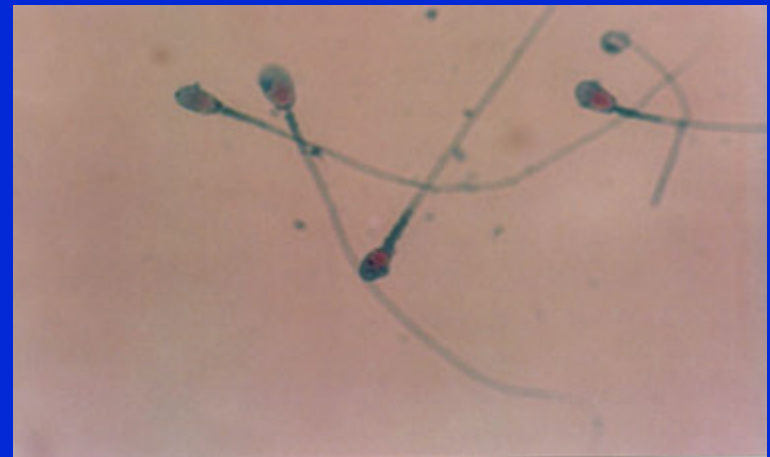
World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

ESHRE Monographs (2002). Manual on basic semen analysis.

Mikroskopska analiza sjemena

- koncentracija spermija
 - normalno - $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$
 - Polyzoospermia, Oligozoospermia, Cryptozoospermia, Azoospermia
- pokretljivost spermija
 - a – brza linearna progresivna gibljivost
 - b – progresivna gibljivost
 - c – na mjestu pokretni spermiji
 - d – nepokretni spermiji
 - normalno - $\geq 32\%$ spermija s progresivnom gibljivošću (a+b), ili $\geq 25\%$ linearno progresivnih spermija (a)
 - Asthenozoospermia
- građa spermija
 - normalno - 30% ili više spermija normalnih oblika prema kriterijima SZO (1999.)
 - normalno - $\geq 4\%$ prema striktnim kriterijima SZO (2010.)
 - Teratozoospermia

Određivanje građe spermija



- Građa spermija određivana metodom bojanja po Giemsi

- Građa spermija određivana metodom bojanja po Spermacu

Dijagnostički testovi za utvrđivanje muške plodnosti

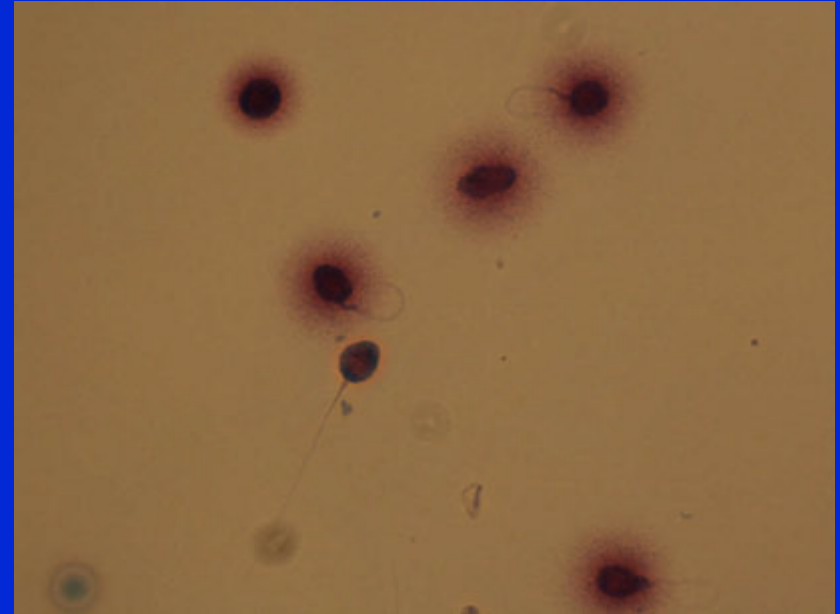
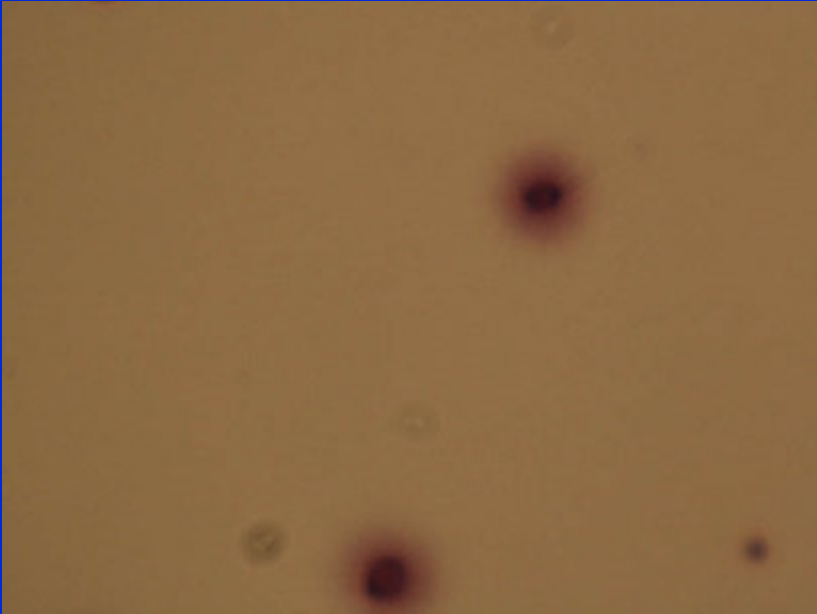
- Određivanje hormona
 - testosteron i FSH; LH, prolaktin i inhibin B
- Dodatni testovi sjemene analize
 - vitalnost
 - DNA fragmentacija
 - protuspermijska protutijela
 - mikrobiološka analiza
 - biokemijska analiza sjemene tekućine
 - prostata (kisela fosfataza, citrat, Zn i Mg)
 - sjemeni mjehurići (fruktoza, prostaglandini)
 - epididimis (neutralna α -glukozidaza)

Vitalnost spermija – eozin nigrozinski test



- Bijelo obojena glava spermija = eozin negativni spermij, cjelovita stanična membrana glave;
- Crveno obojena glava spermija = eozin pozitivni spermij, oštećena stanična membrana glave.

Analiza DNA fragmentacije u spermijima

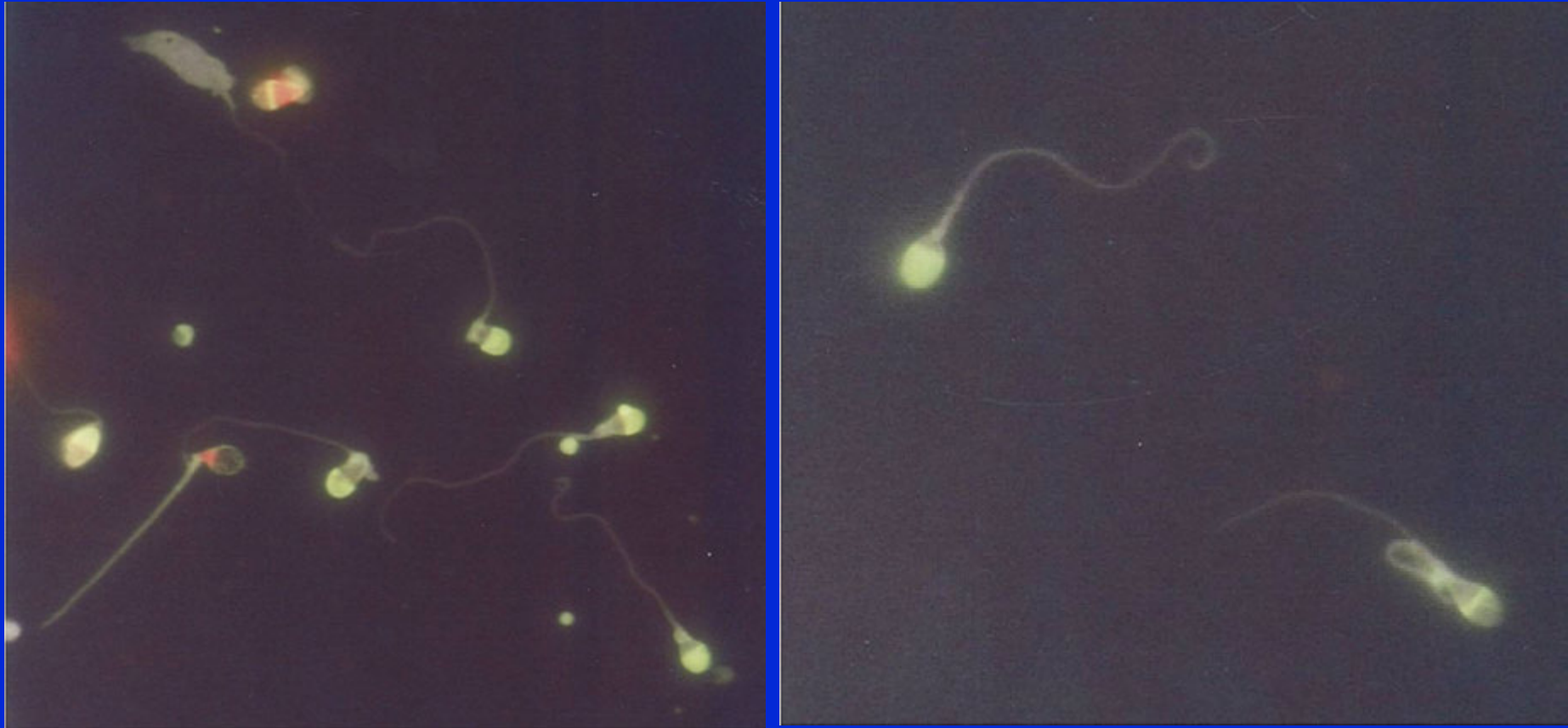


- **Halosperm test**
- **SPERMIJI BEZ DNA FRAGMENTACIJE**
 - spermiji s velikom aurom: širina aure jednaka ili veća od manjeg promjera jezgre
 - spermiji sa srednjom aurom: veličina aure između onih s velikom i onih s malom aurom
- **SPERMIJI S FRAGMENTIRANOM DNA**
 - spermiji s malom aurom: širina aure je jednaka ili manja od 1/3 manjeg promjera jezgre
 - spermiji bez aure i degradirani: koji ne pokazuju nikakvu auru i kod kojih je jezgra nepravilno ili slabo obojena

Dijagnostički testovi za utvrđivanje muške plodnosti

- Genetski testovi
 - kariogram
 - mikrolecije Y kromosoma
 - CFTR genotipizacija
- Specijalizirani testovi – testovi funkcije spermija
 - Computer-aided sperm analysis (CASA)
 - test jajnih polovica (hemi-zona test)
 - test za provjeru penetracijske sposobnosti spermija (zona-free hamster oocyte test)
 - određivanje stanja akrosoma

Određivanje stanja akrosoma



- Membrana akrosoma obojena pomoću *Pisum sativum* aglutinina konjugiranog s fluorescein izotiocijanatom (FITC-PSA) i etidij homodimera-1

AZOOSPERMIA

- Nema spermija u ejakulatu i nakon centrifugiranja
- Učestalost azoospermije - 8% neplodnih muškaraca

**Opstruktivna
azoospermija
(OA) – 40%**

spermiji >98%

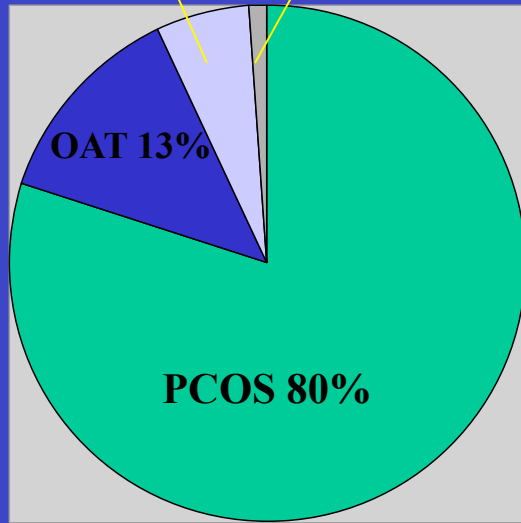
**Neopstruktivna
azoospermija
(NOA) – 60%**

spermiji ~50%

Primarni uzroci neplodnosti u trudnoćama nakon IVM, IVF i ICSI

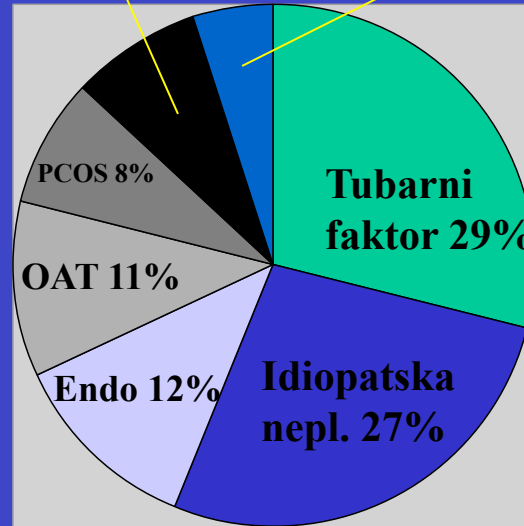
IVM

Idiopatska nepl. 6% Tubarni faktor 1%



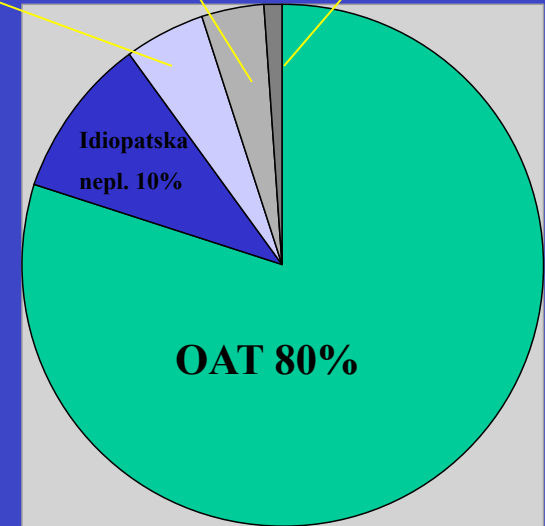
IVF

Slaba rezerva jajnika 8% Ostali uzroci 5%



ICSI

PGD 4% Endo 1%



Obrada spermija za metode MPO

- Ejakulat
- Pasjemenik (PESA i MESA)
- Sjemenik (TESA, TESE i Micro-TESE)
- Urin

- Cilj obrade spermija za MPO postupke:
 - odvojiti spermije od sjemene tekućine
 - izolirati pokretne spermije

- Tehnike obrade i pripreme spermija za metode MPO
 - metoda ispiranja
 - metoda isplivavanja (“swim-up”)
 - diskontinuirani gradijent gustoće

Oprema, materijali i mediji potrebni za obradu TESE uzoraka

- Oprema
 - besprašna komora
 - grijače ploče
 - lupa
 - invertni mikroskop
 - centrifuga
- Materijali
 - Petrijeve zdjelice 60x15 mm
 - mikropipete
 - serološke pipete
 - polistirenske epruvete s čepom
 - šprice i igle
- Mediji
 - HEPES mediji
 - HSA
 - PVP
 - mineralno/parafinsko ulje
 - gradijent gustoće

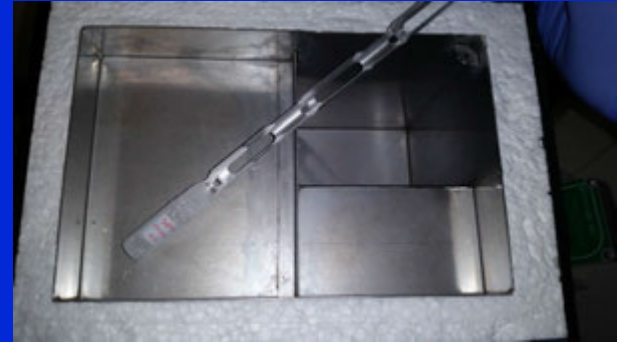
Strategija zamrzavanja tkiva testisa

- Pouzdana dijagnoza prije TESE-ICSI postupka
 - Izbjegava se stimulacija jajnika u partnerice kada nema spermija u dobivenom TESE uzorku
- TESE-ICSI postupak se može ponavljati
 - Kada su spermiji pronađeni budući postupak oplodnje može se provesti bez ponovne kirurške operacije (pohrana 10 TESE uzoraka)
- Posebno važno kod NOA pacijenata



Priprema zamrznutog TESE uzorka za ICSI postupak

- Otapanje zamrznutog TESE uzorka / uklanjanje krioprotektora / inicijalno ispiranje
- A) Maceracija TESE uzorka (15-30 min)
- B) Enzimatska razgradnja kolagenazom tip IV (4 h)
- Ispiranje u mediju / centrifugiranje / x 300g – 10 min



Obrada TESE uzorka u IVF laboratoriju

- Dio parenhima sjemenika dobivenog nakon TESE



- TESE uzorak pri povećanju x40

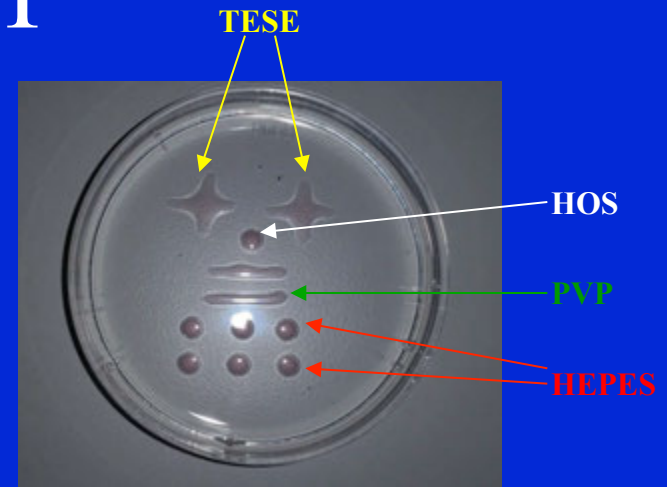


- Pregled sjemenskih kanalića



TESE - ICSI

- Priprema Petrijeve zdjelice za izolaciju testikularnih spermija
- Obradeni uzorak TESE nakon ispiranja pri povećanju x400
- Invertni mikroskop / HOS test / ICSI (OA-5 min; NOA-12 min)



Kako poboljšati oplodni potencial testikularnih spermija?

- Stimulatori pokretljivosti spermija
 - teofilin (GM501 SpermMobil)
 - pentoxifilin (toksičan, obavezno ispiranje)
- Odabir živih/nepokretnih spermija
 - HOS test
 - test fleksibilnosti repa spermija

TESE – ICSI postupci u KBC Zagreb (3/2013 – 6/2015)

Broj TESE pacijenata u postupcima	34
Broj stimuliranih postupaka	63
Godine pacijentica u postupcima	33,20 ± 2,82
Godine TESE pacijenata u postupcima	35,31 ± 4,94
Broj dobivenih oocita	6,93 ± 2,12
Broj MII oocita	5,12 ± 1,41
Broj ET zametaka	1,74
Broj postupaka s ET/broj TESE postupaka	47/60 (78%)
Broj pacijentica s krio oocitama	7
Broj pacijentica s krio zametcima	5

Rezultati ostvarenih trudnoća

Broj trudnoća/broj parova u postupcima	12/34 (35,3%)
Broj trudnoća/broj ET	12/47 (25,5%)
Broj trudnoća/TESE postupak	12/60 (20%)
Broj poroda	5
Broj živorođene djece	5
Broj trudnoća u tijeku (preko 20. tjedna gestacije)	4
Broj spontanih pobačaja	2 (17%)
Broj biokemijskih trudnoća	1 (8%)

Djeca rođena nakon TESE-ICSI?

- 530 djece rođene u postupku TESE/ICSI
- 194 djece rođene u postupku PESE/ICSI
- 2516 djece rođene u postupku sa spermijima iz ejakulata/ICSI

- Nije pronađena razlika usporedbom djece rođenih u postupcima sa spermijima dobivenim kirurškim putem i djece rođene u postupku ICSI sa spermijima iz ejakulata:
 - porođajni parametri
 - glavne anomalije
 - kromosomske aberacije

Rizici urođenih malformacija u djece začete TESE/ICSI postupkom?

- Kohortna studija; Danska (1995-2009)
 - Sva djeca rođena nakon TESE/PESA/TESA u svježem ET (466)
 - Kontrolna grupa:
 - Djeca rođena nakon IVF (17592)
 - Djeca rođena nakon ICSI/spermiji iz ejakulata (8967)
 - Prirodno začeta djeca (63854)
- Nije povećana učestalost malformacija u djece rođene nakon TESE/PESA/TESA postupaka u poredbi s djecom začetom u postupku IVF, ICSI ili nakon prirodnog začeća

Fedder et al. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study. *Hum Reprod* 2013.

Neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study

Table V

Total rates of congenital abnormalities and possible imprinting-related diseases after ICSI with epididymal or testicular sperm (Group A), ICSI with ejaculated sperm (Group B), conventional IVF (Group C) or NC (Group D).

	Group A	Group B	Group C	Group D	P-value ^a		
					A versus B	A versus C	A versus D
Total							
Congenital abnormalities	36, 7.73 (6.13-10.32)	850, 9.48 (8.83-10.13)	1468, 8.34 (7.90-8.79)	5140, 8.05 (7.81-8.29)	0.20	0.64	0.81
Neoplasms in bones and joint cartilage, including osteosarcoma	3, 0.64 (0.01-1.47)	11, 0.12 (0.05-0.20)	43, 0.24 (0.17-0.32)	122, 0.19 (0.16-0.23)	0.39	0.58	0.49
Singletons							
Congenital abnormalities	21, 7.24 (4.54-10.86)	467, 7.96 (7.28-8.68)	762, 6.89 (6.42-7.38)	1952, 5.77 (5.52-6.02)	0.74	0.81	0.31
Neoplasms in bones and joint cartilage, including osteosarcoma	1, 0.34 (0.01-1.91)	7, 0.12 (0.05-0.25)	29, 0.26 (0.18-0.38)	59, 0.17 (0.13-0.22)	0.32	0.54	0.40
Twins							
Congenital abnormalities	15, 8.52 (3.72-13.33)	383, 12.35 (11.00-13.70)	706, 10.81 (9.93-11.69)	3188, 10.63 (10.21-11.04)	0.13	0.36	0.39
Neoplasms in bones and joint cartilage, including osteosarcoma	2, 1.14 (0.09-6.85)	4, 0.13 (0.01-0.52)	14, 0.21 (0.10-0.33)	63, 0.21 (0.15-0.27)	0.03	0.08	0.04

The values are *n* % (95% CI).

^aSingletons: Fisher's exact test. Twins: binomial regression with adjustment for dependence between twins using the robust variance estimation when there were 10 or more events in each group, otherwise Fisher's exact test with Bonferoni's method adjustment for dependence between twins. The exact 95% CIs for rates were calculated using the F-distribution.

Kako poboljšati ishod trudnoća nakon TESE-ICSI postupaka?

- Kvaliteta kirurški dobivenog i preuzetog TESE uzorka
- Kontrolirani laboratorijski uvjeti tijekom obrade testikularnih spermija
 - izloženosti varijacijama temperature
 - snaga i trajanje centrifugiranja
 - kvaliteta laboratorijskog zraka
- QA i QC u IVF laboratoriju tijekom kultivacije zametaka

HVALA!

