

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Hana Pavlová

**Metody selekce spermií pro asistovanou reprodukci
v humánní a veterinární praxi**

Methods of sperm selection for human and veterinary
assisted reproduction

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 5. 2020

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce, RNDr. Kateřině Komrskové, Ph.D. a své konzultantce, RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D., za vstřícný přístup, cenné rady a čas, který mi během zpracovávání této bakalářské práce věnovaly.

Poděkování patří také mé rodině za neskonalou podporu při studiu.

Abstrakt

Selekce spermií je důležitým procesem ovlivňujícím průběh oplození a kvalitu vzniklých embryí. Kompetentní spermie mohou být ze vzorku ejakulátu izolovány dle různých kritérií. Standardní metody umožňují selekci spermií na základě konvenčních parametrů, především pohyblivosti a denzity. Pokročilými metodami jsou spermie selektovány dle molekulárních aspektů, zahrnujících například náboj na membráně, přítomnost specifických receptorů, molekul poukazujících na probíhající apoptózu, a dalších. Tyto novější postupy jsou široce uplatňovány zejména v humánní praxi. Ve veterinární praxi je jejich využití neekonomické a k selekci spermií hospodářských zvířat jsou tedy využívány především standardní metody zahrnující v postupu centrifugační krok. Spermie hospodářských zvířat jsou také často selektovány dle toho, zda nesou chromozom X nebo Y. Lze tak účinně determinovat pohlaví potomstva za účelem zvýšení efektivity zisku živočišných produktů. Tato práce představuje nejčastěji uplatňované metody selekce spermií pro účely oplození oocytů v humánním i veterinárním odvětví asistované reprodukce a diskutuje jejich vliv na parametry a fertilizační potenciál izolovaných buněk.

Klíčová slova: spermie, selekce spermií, asistovaná reprodukce, oplození, hospodářská zvířata

Abstract

Sperm selection is an important process influencing the progress of fertilization and the quality of resulting embryos. Competent sperm cells can be isolated from an ejaculate sample according to different criteria. Standard methods allow for sperm selection based on conventional parameters, particularly motility and density. Using advanced methods, sperm cells are selected according to molecular aspects including for instance membrane charge, presence of specific receptors, molecules indicating ongoing apoptosis, and others. The latter procedures are widely used particularly in human practice. Their use is uneconomical in veterinary practice and standard methods including the centrifugation step in the procedure are primarily used to select the sperm of livestock. Sperm cells of livestock are also often selected according to whether it carries the X or Y chromosome. Thus, the sex of the offspring can be effectively determined in order to increase the efficiency of the production of animal products. This thesis presents the most frequently used methods of sperm selection for the purpose of oocyte fertilization in human and veterinary sectors of assisted reproduction and discusses their impact on the parameters and fertilization potential of isolated cells.

Key words: sperm, sperm selection, assisted reproduction, fertilization, livestock

Seznam zkratek

AIF	apoptózu indukující faktor
CASA	počítačová analýza spermatu
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HA	kyselina hyaluronová
HOS	hypoosmotický test
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie
IMSI	intracytoplazmatická injekce morfologicky předvybrané spermie
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
MACS	magnetická separace spermií
MSOME	morfologické vyšetření organel motilních spermií
PISCI	fyzilogická intracytoplazmatická injekce spermie
PNA	lektin z podzemnice olejné
PSA	lektin z hrachu setého
PVP	polyvinylpyrrolidon
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCD	z angl. sperm chromatin dispersion test
SCSA	z angl. sperm chromatin structure assay
SDI	index deformace spermií
WHO	Světová zdravotnická organizace

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma swim-up metody selekce spermií.....	4
Obrázek 2: Schéma denzitní gradientové centrifugace	5
Obrázek 3: Schéma magnetické separace spermií	8
Obrázek 4: Schéma selekce spermií podle zeta potenciálu.....	10
Obrázek 5: Schéma čtyřkomorového elektroforetického zařízení pro selekci spermií.....	11
Obrázek 6: Schéma hydromechanického mikrofluidního zařízení	13
Obrázek 7: Schéma zařízení pro selekci spermií pomocí teplotního gradientu	14
Obrázek 8: Schéma zařízení pro selekci spermií na bázi reotaxe	15
Obrázek 9: Schéma selekce spermií vazbou na HA	17
Obrázek 10: Srovnání velikosti jaderných vakuol spermií metodou MSOME.....	18
Obrázek 11: Fluorescenční signál spermií izolovaných s využitím průtokové cytometrie.....	25

Obsah

1	Úvod	1
2	Metody selekce spermií v humánní praxi	3
2.1	Standardní metody selekce	3
2.1.1	Swim-up metoda.....	3
2.1.2	Denzitní gradientová centrifugace.....	5
2.1.3	Výhody a nevýhody standardních metod selekce.....	6
2.2	Pokročilé metody selekce	7
2.2.1	Magnetická separace spermií	8
2.2.2	Selekce spermií podle elektrokinetického potenciálu	9
2.2.3	Selekce spermií s využitím elektroforézy.....	11
2.2.4	Selekce spermií s využitím mikrofluidních systémů	12
2.2.5	Selekce spermií vazbou na kyselinu hyaluronovou.....	16
2.2.6	Morfologické vyšetření organel motilních spermií	17
3	Metody selekce spermií ve veterinární praxi	20
3.1	Standardní metody selekce	20
3.2	Pokročilé metody selekce	23
3.2.1	Mikrofluidní separace.....	23
3.2.2	Nanopurifikace spermií v magnetickém poli.....	24
3.2.3	Selekce spermií s využitím průtokové cytometrie.....	24
4	Závěr	26
	Seznam použité literatury	27

1 Úvod

Snížená fertilita mužů a žen je v lidské populaci konstantně rostoucím problémem. V celosvětovém měřítku se s poruchami v oblasti reprodukce potýkají desítky milionů párů, přičemž ve třetině případů je příčinou problémů s přirozenou koncepcí nedostatečná kvalita ejakulátu. Selektce kvalitních spermií vhodných pro následné oplození oocyty je tedy důležitým krokem předcházejícím asistované reprodukci nejen v praxi humánní, ale také ve veterinární, kde je zejména u hospodářských zvířat výběrem kompetentních spermií cíleně zvyšována efektivita rozmnožování jedinců s kvalitním genotypem. V humánní i veterinární praxi jsou rozlišovány tři techniky umělého oplození. Principem první z nich, intrauterinní inseminace (IUI), je zavedení předem vybraných spermií do dělohy ovulující samice. Fertilizace tak probíhá *in vivo* v reprodukčním traktu. Další technikou je *in vitro* fertilizace (IVF), při níž k oplození oocyty dochází navozením fyziologických podmínek na kultivačních miskách. Během obou zmíněných technik je využíváno většího počtu spermií a přirozená kompetice tak zůstává zčásti zachována. Poslední technikou je intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI), během které embryolog mikromanipulátorem vpravuje spermii přímo do cytoplazmy oocyty. Přestože je ICSI pro pacienty s mužským faktorem neplodnosti nejefektivnější variantou z hlediska úspěšnosti fertilizace, kvůli absenci přirozených selekčních principů, jež *in vivo* umožňují oplození oocyty nejkvalitnější spermií, musí být výběr injikované spermie velmi důkladný. S využitím novějších postupů, pomocí nichž je možné odhalovat defekty spermií na molekulární úrovni, lze však i z ejakulátu pacientů s vážnými poruchami plodnosti izolovat geneticky kompetentní spermie, které dávají vzniknout kvalitním embryím. Bakalářská práce se zabývá nejen těmito pokročilejšími metodami, ale diskutuje také metody standardní, pomocí nichž jsou spermie selektovány dle konvenčních parametrů, především motility a denzity. Standardní postupy jsou široce využívány v praxi veterinární, a to zejména pro svou schopnost zpracovat velký objem ejakulátu, jenž je u mnoha druhů zvířat potřebný k úspěšné fertilizaci. V humánní praxi jsou standardní postupy uplatňovány hlavně z důvodu snadného provedení a časové nenáročnosti selekce.

Cílem selekčních metod je izolace kvalitních spermií, které prokazují adekvátní progresivní i celkovou pohyblivost, disponují normální morfologií, neporušenou DNA, stabilním akrozomem a intaktní plazmatickou membránou. Mitochondriální membránový potenciál se u nich pohybuje ve vysokých hodnotách a je generováno pouze takové množství reaktivních forem kyslíku (ROS), které nemá dopad na jejich životaschopnost. Tyto parametry mají vliv nejen na úspěšnost fertilizace, ale také na následný embryonální vývoj. Jejich posouzení a tudíž zjištění efektivity provedené metody selekce je tak klíčové. S využitím počítačové analýzy spermatu (CASA, z angl. computer-assisted semen analysis) lze vyhodnocovat pohyblivost spermií. Morfologické parametry jsou pozorovány pod zvětšením optického mikroskopu. K určení míry fragmentace DNA v jádře slouží například TUNEL test detekující zlomy DNA pomocí fluorescenčně značeného enzymu terminální deoxynukleotidyltransferázy, dále pak testy

disperze chromatinu ve spermích – konkrétně sperm chromatin dispersion (SCD) test, sperm chromatin structure assay (SCSA), Halosperm test a kometový test analyzující pomocí gelové elektroforézy zlomy DNA na úrovni jedné buňky. Pro rozpoznání chromozomálních abnormalit je využívána fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Přítomnost ROS a změny mitochondriálního membránového potenciálu spermíí mohou být posuzovány průtokovou cytometrií. Celková vitalita spermíí a integrita plazmatické a akrozomální membrány je hodnocena s využitím fluorescenčně značených lektinů z podzemnice olejné (PNA) a hrachu setého (PSA), fluorescenčního interkalačního činidla propidiumjodidu, hypoosmotickým testem (HOS) nebo pomocí barviv eosinu a nigrosinu.

Cílem této bakalářské práce je představit nejvyžívanější metody selekce spermíí pro účely asistované reprodukce člověka a vybraných druhů hospodářských zvířat, diskutovat výhody a nevýhody použití, jakož i jejich odlišný vliv na vlastnosti izolovaných spermíí.

2 Metody selekce spermií v humánní praxi

2.1 Standardní metody selekce

Standardní metody selektují spermie na základě jejich konvenčních parametrů. Pro jednoduchost jejich provedení a také časovou a finanční nenáročnost jsou stále hojně využívány v laboratořích po celém světě. Jedná se o metody migrační, z nichž nejvyužívanější je metoda swim-up, pomocí níž jsou izolovány spermie s nejlepší pohyblivostí. Dále pak o metody centrifugační, zahrnující kontinuální a diskontinuální denzitní gradientovou centrifugaci. Tato metoda umožňuje výběr nejkvalitnějších spermií ze vzorku dle jejich odlišné hustoty.

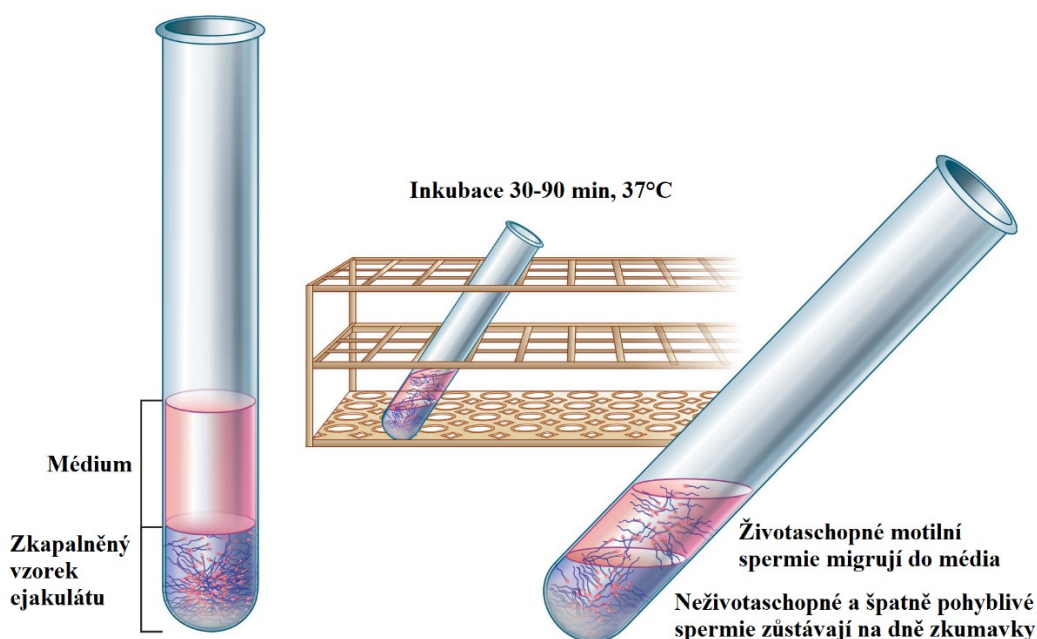
2.1.1 Swim-up metoda

Swim-up metoda selekce spermií byla prvně popsána již v 80. letech minulého století (Mahadevan a Baker, 1984) a i přes určité nedostatky, které budou dále nastíněny, patří tato metoda dodnes k nejvyužívanějším postupům selekce spermií v lidské asistované reprodukci. Cervikální hlen funguje jako síto, jímž projdou pouze spermie s dostatečnou pohyblivostí a normální morfologií (Katz et al., 1990). Principem swim-up metody je simulace tohoto fyziologického aktu, kdy do média aktivně migrují pouze nejpohyblivější spermie ze vzorku. Pro zlepšení účinnosti selekce je používané médium mnohdy obohacováno o lidský sérový albumin. V novějších postupech je albumin stále častěji nahrazován kyselinou hyaluronovou (HA), díky níž je docíleno selekce kvalitnějších spermií s lepší morfologií, motilitou, integritou DNA a bez známek probíhající apoptózy (Saylan and Duman, 2016).

Existují dva způsoby provedení této metody. První z nich, konvenční swim-up metoda, spočívá v migraci spermií z několikavrstevné pelety buněk ejakulátu do média, kterým je celá peleta překryta. Tento způsob selekce má však mnohé nedostatky. Hlavní nevýhodou je samotné vrstvení buněk v peletě, neboť do média pronikají spermie především z povrchu vzorku. Kvalitní spermie, jež se mohou nacházet ve spodních částech pelety, se v důsledku toho většinou do kontaktu s médiem vůbec nedostanou (shrnuto v: Henkel a Schill, 2003)*. Kromě toho se zdravé spermie v peletě ocitají v těsné blízkosti nezralých a poškozených spermií, zbytků buněk a také leukocytů, jež jsou hlavními zdroji nebezpečných reaktivních forem kyslíku (ROS; Plante et al., 1994). Před selekcí je za účelem odstranění semenné plazmy vzorek ejakulátu promyt a podroben centrifugaci. Pokud plazma není ze vzorku eliminována, je pozorováno snížení integrity jaderné DNA spermií (Tvrdá et al., 2018). Pomocí SCD testu bylo zjištěno, že počet spermií s fragmentovanou DNA rapidně vzrůstá především v prvních hodinách inkubace vzorků v přítomnosti plazmy (Tvrdá et al., 2018). Z tohoto důvodu je její včasné odstranění, nejlépe bezprostředně po obdržení vzorku ejakulátu, považováno za krok nezbytný k zachování kvality izolovaných buněk. Působením odstředivé síly však dochází k poklesu životaschopnosti a motility spermií (Grizard et al., 1999) a vlivem mechanického poškození během centrifugace také k vyšší produkci ROS (Aitken and Clarkson, 1988). V souvislosti s tímto jevem bylo zjištěno, že semenná plazma disponuje také protektivními účinky, neboť vlivem antioxidantů v ní obsažených chrání spermie

před působením těchto radikálů (Twigg et al., 1998; Potts et al., 2000). Je proto důležité nahradit před selekcí eliminovanou semennou plazmu vhodným kultivačním médiem s potřebnými antioxidanty, které simulují ty, jež jsou v plazmě obsaženy (Twigg et al., 1998). Semenná plazma také může plnit funkci kryoprotektantu. Je známo, že kryokonzervace vzorků za účelem jejich přechovávání po delší časové období má výrazný negativní dopad především na motilní parametry spermií, vlivem náročných teplotních změn dochází ale také ke vzniku morfologických abnormalit a poklesu mitochondriálního membránového potenciálu (O'Connell et al., 2002). Přidáním semenné plazmy do vzorku před zmrazením mohou být spermie před těmito negativními dopady kryokonzervačního procesu chráněny (Grizard et al., 1999) a jejich fertilizační schopnost tak zůstává po rozmrazení zachována.

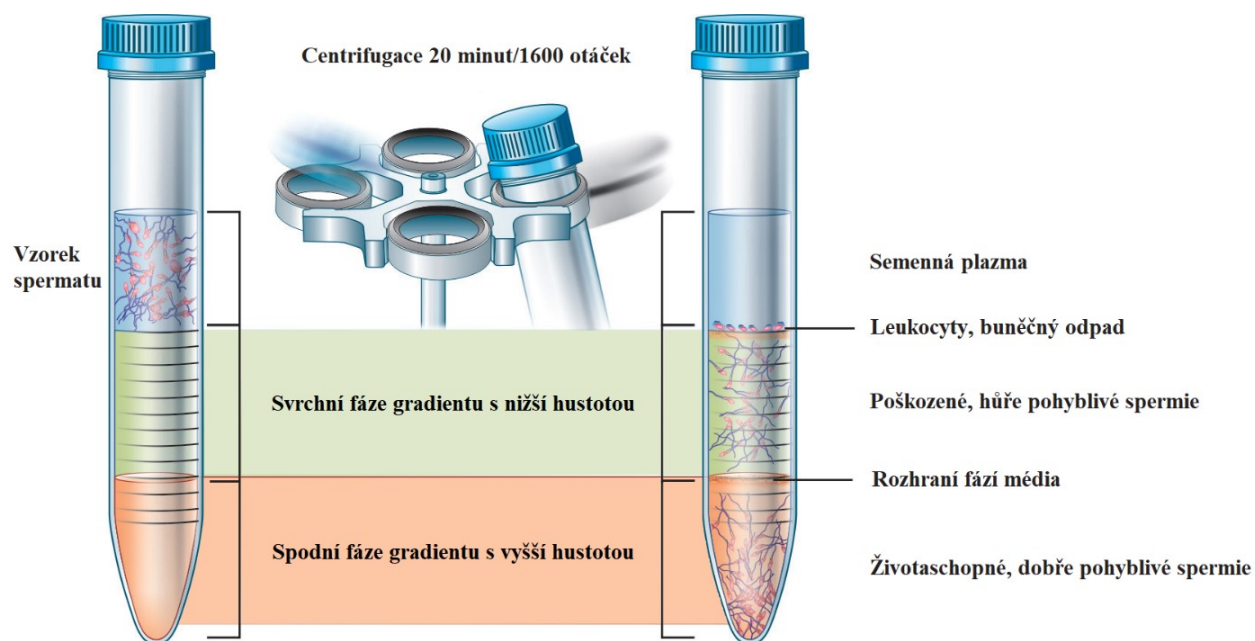
Druhý způsob provedení, přímá swim-up metoda, jejíž schéma je představeno na obrázku 1, je taktéž založen na schopnosti aktivní migrace nejpohyblivějších spermií. Do zkumavek jsou nejprve umístěny malé vzorky zkapalněného ejakulátu, které jsou následně překryty médiem. Po inkubaci spermie migrují do média přímo ze semenné plazmy (shrnutí v: Henkel a Schill, 2003)*. Doba, po kterou jsou vzorky s médiem inkubovány, má vliv na kvalitu selektovaných spermií. Standardní čas inkubace činí 60 až 90 minut. Bylo však zjištěno, že s délkou inkubace stoupá míra poškození DNA spermií. Zkrácení této doby na 30 minut vede k izolaci více spermií bez známek apoptózy a s neporušenou integritou chromatinu, než je tomu po 60 a 90 minutách inkubace (Saylan and Erimsah, 2019). Přímá swim-up metoda je v laboratořích využívána hojněji, neboť je v postupu možné vynechat centrifugační krok a zabránit tak poškození spermií. Také je v důsledku snížení objemu zpracovávaného ejakulátu možné izolovat větší množství kompetentních spermií, neboť nedochází k vrstvení buněk, jako je tomu u konvenčního provedení. Spermie tak mohou do média snáze migrovat z celého objemu vzorku.



Obrázek 1: Schéma swim-up metody selekce spermií (převzato a upraveno: Beydola et al., 2013).

2.1.2 Denzitní gradientová centrifugace

Technika denzitní gradientové centrifugace patří mezi nejvyužívanější způsoby izolace kvalitních savčích spermií. V prvním kroku selekce je ve zkumavce pomocí média vytvořen hustotní gradient. Tento gradient může být kontinuální, tedy s postupně se zvyšující hustotou média směrem shora do spodní části zkumavky, či diskontinuální, ve kterém jsou tvořena ostrá rozhraní mezi svrchní fází s nižší hustotou a spodní fází s vyšší hustotou. Častěji je využíváno diskontinuální rozložení gradientu, jehož schéma je znázorněno na obrázku 2. Po vytvoření gradientu je vzorek spermatu navrstven na médium a po krátkém procesu centrifugace dojde k usazení komponent ejakulátu v části gradientu, která odpovídá jejich hustotě. Zralé spermie bez známek morfologických defektů mají zpravidla vyšší hustotu, než spermie nezralé či vykazující určité abnormality v morfologii (Oshio et al., 1987), a proto se shlukují v dolní části gradientu, kde je médium nejhustější. Na rozhraní oblasti semenné plazmy a vrchní části gradientu, kde má médium nižší hustotu, se koncentrují leukocyty a zbytky buněk. Mezi svrchní a spodní fází jsou přítomny spermie s různými morfologickými abnormalitami a nedostatečnou pohyblivostí.



Obrázek 2: Schéma denzitní gradientové centrifugace (převzato a upraveno: Beydola et al., 2013).

K tvorbě gradientů jsou využívány různé typy médií, jež se liší svým složením. Nejčastěji se jedná o koloidní roztoky obsahující částice oxidu křemičitého. Příkladem je dříve plošně používané médium Percoll®. V současnosti již toto médium není pro lidskou asistovanou reprodukci povoleno, neboť i přes promytí zpracovaného vzorku ulpívají po selekci na spermiích drobné partikule látky polyvinylpyrrolidon (PVP), jímž jsou koloidní částice obaleny (Pickering et al., 1989). Tyto partikule mohou po styku se sliznicemi samičího reprodukčního traktu způsobovat zánětlivou reakci organismu. Adekvátní náhradou jsou média obsahující silanem obalené částice oxidu křemičitého (Perez et al., 1997), z nichž nejlepší kvality spermií lze dosáhnout s médiem PureSperm® (Mousset-Siméon et al.,

2004). Výhodou separace pomocí tohoto média je zejména rychlost, jednoduchost provedení a také snadné udržení spermií ve sterilních podmínkách (Brahem et al., 2011). Denzitní gradient vytvořený pomocí média PureSperm[®] umožňuje selekci velkého počtu zralých motilních spermií, jež jsou odolné vůči fyziologickým změnám odehrávajícím se například během kryokonzervace vzorků (Allamaneni et al., 2005).

2.1.3 Výhody a nevýhody standardních metod selekce

Swim-up metoda je považována za velmi účinný způsob izolace velkého počtu spermií s vynikající pohyblivostí (Jayaraman et al., 2012). Názory vědců na udržení integrity DNA po provedení zejména konvenčního způsobu metody se však značně liší. Dle starších studií dochází k produkci vyššího množství ROS, než je tomu u přímé migrace spermií do média (Aitken and Clarkson, 1988), následkem čehož se zvyšuje počet spermií s fragmentovanou a poškozenou DNA (Twiggy et al., 1998). Z novějších studií naopak vyplývá, že oproti přímé swim-up metodě a také denzitní gradientové centrifugaci je ve výsledném vzorku zpracovaném konvenční swim-up metodou přítomno méně spermií s fragmentovanou DNA (Volpes et al., 2016). Schopnost konvenční swim-up metody selektovat geneticky kompetentní spermie s nízkým podílem fragmentované DNA v jádře byla později prokázána další skupinou vědců (Kim et al., 2017). Vozdova et al. (2012) ve svém výzkumu popsali vysokou účinnost metody swim-up pro izolaci spermií s kondenzovaným chromatinem v jádře a také uvedli, že účinkem metody dochází ke snížení počtu spermií nesoucích chromozomové abnormality.

Celkové množství spermií v důsledku provedení swim-up metody značně klesá. V praxi se proto využívá pouze pro vzorky s dostatečně vysokou počáteční koncentrací spermií (Fácio et al., 2016). V případech pacientů s oligozoospermii, která je na základě referenčních hodnot stanovených Světovou zdravotnickou organizací (WHO) diagnostikována, pokud je koncentrace spermií v 1 ml ejakulátu nižší než 15 milionů (dle WHO, 2010), je nasnadě využití jiné metody selekce. Swim-up metoda je nejvíce uplatňována u normozoospermických mužů (Younglai et al., 2001), jejichž počet, morfologie a procento progresivně pohyblivých spermií v ejakulátu je v rozmezí stanovených referenčních hodnot (dle WHO, 2010). Spermie získané swim-up selekcí disponují vynikající morfologií (Fácio et al., 2016). Z tohoto důvodu má metoda využití také u pacientů s teratozoospermii, u nichž normální morfologii manifestuje méně než 4 % spermií v ejakulátu (dle WHO, 2010). Právě v těchto případech je metodou swim-up výrazně redukováno množství spermií s morfologickými abnormalitami a fragmentovanou DNA (Xue et al., 2014). Ještě lepších výsledků je u teratozoospermických pacientů dosaženo s využitím metody denzitní gradientové centrifugace (Xue et al., 2014). Efektivita selekce spermií s neporušenou integritou DNA metodou denzitní gradientové centrifugace je však obdobně jako u swim-up metody velmi diskutabilní. Z některých studií vyplývá, že metoda až dvojnásobně redukuje počet spermií s fragmentovanou DNA (Brahem et al., 2011) a abnormalitami ve struktuře chromatinu (Kim et al., 2017). Další poukazují na skutečnost, že i přímým vlivem procesu denzitní gradientové centrifugace může docházet ke vzniku nových poškození struktury DNA, která vedou ke snížení šance na úspěšné

oplození technikou IVF a ICSI (Muratori et al., 2016). Hlavní příčinou vzniku nových poškození je působení odstředivé síly během centrifugace, která mimo výše zmíněné defekty ve struktuře DNA způsobuje také četné změny v ultrastrukturální morfologii spermie, jako je poškození plazmatické membrány na hlavičce spermie či fragmentace bičíku (Zhu, 2018). Centrifugace vzorku má vliv také na proces kapacitace spermií, neboť destabilizuje membrány, a tím negativně ovlivňuje schopnost spermií reagovat na extracelulární vápník, jenž slouží jako kapacitační stimulans (Henning et al., 2015). Tato skutečnost může být problémem zejména při následné IUI, neboť spermie v důsledku předčasné destabilizace membrán ztrácí svou životaschopnost a jejich fertilizační potenciál rapidně klesá. Negativní dopad samotného procesu selekce na spermie byl v menší míře potvrzen také u metody swim-up (Muratori et al., 2019). Spermie separované gradientovou centrifugací však oproti swim-up metodě vykazují vyšší životaschopnost a lepší motilitu. To je nejspíše zapříčiněno právě kratší dobou centrifugace (Allamaneni et al., 2005). Defekty spermií vlivem selekce jsou často způsobovány nadměrným výskytem ROS, jejichž hlavními zdroji a tedy původci nadměrného oxidativního stresu jsou leukocyty (Saleh et al., 2002). ROS mohou být ale ve zvýšené míře tvořeny také přechodnými kovy obsaženými v médiích využívaných pro tvorbu gradientů (Aitken et al., 2014), vlivem nesprávného uspořádání chromatinu a přítomností dalších abnormalit spermií (Muratori et al., 2016). Bylo zjištěno, že spermie s odlišnostmi ve své struktuře generují vyšší hladiny ROS a zároveň mají nižší mitochondriální membránový potenciál. Je to nejspíše dáno tím, že ROS narušují integritu mitochondriální membrány, v důsledku čehož dochází k jejich zvýšené produkci (Wang et al., 2003). ROS jsou však v malém množství produkovány také samotnými spermii a jejich přítomnost má v ejakulátu důležitou fyziologickou úlohu, neboť superoxidový radikál podněcuje spermii k hyperaktivaci a kapacitaci (Lamirande and Gagnon, 1993). I přes uvedené negativní účinky odstředivé síly metoda denzitní gradientové centrifugace prokazatelně eliminuje poškozené spermie, a to i ze vzorku spermatu zhoršené kvality. Toto tvrzení je podloženo poznatky recentní studie (Dai et al., 2020), dle kterých nedochází ke zhoršení kvality spermií ani po provedení dvou po sobě následujících separací. Vynikajících výsledků je dosaženo také kombinací technik. V případě denzitní gradientové centrifugace následované metodou swim-up dochází k preciznějším výběru spermií s progresivní motilitou a sníženým výskytem poškozené DNA (Nadalini et al., 2014).

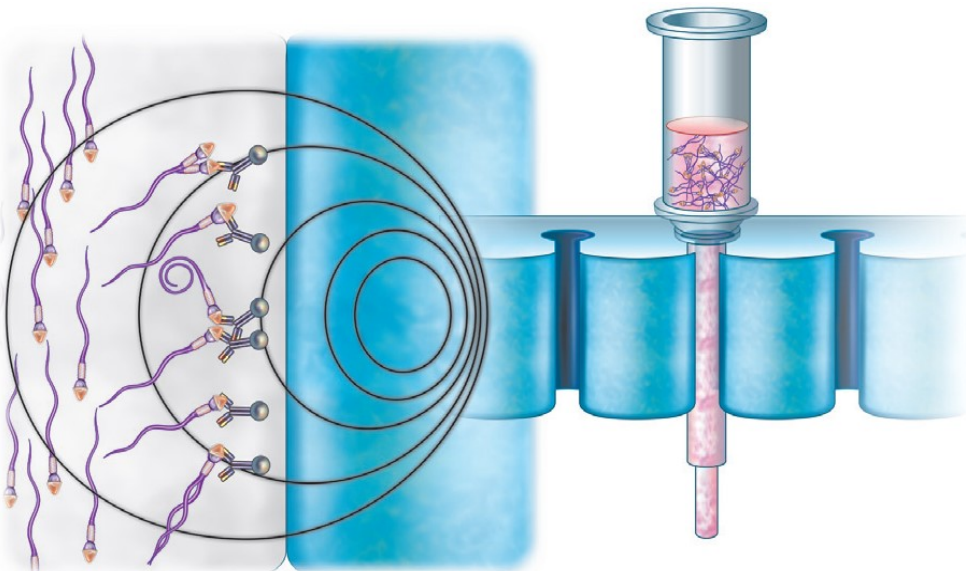
2.2 Pokročilé metody selekce

Přestože jsou standardní metody velmi účinné v selekci spermií bez abnormalit v konvenčních parametrech, negativní vnitřní procesy ve spermii probíhající na molekulární úrovni pomocí nich často není možné detekovat. V dnešní době je proto snaha o vývoj progresivnějších technik, které mají za úkol tyto procesy rozpoznat a nevhodné spermie v co nejkratším čase eliminovat.

2.2.1 Magnetická separace spermií

Hlavním problémem komplikujícím úspěšné oplození oocyty je v současné asistované reprodukci utajená apoptóza spermií. Novějšími postupy, například pomocí magnetické separace spermií (MACS), lze takto poškozené spermie detekovat a ze vzorku odstranit.

Spermie podléhající apoptóze lze rozpoznat na základě přítomnosti určitých molekul a neobvyklých dějů. Patří mezi ně především externalizace fosfatidylserinu, aktivace kaspáz, změna mitochondriálního membránového potenciálu a také výskyt některých proteinů, zejména pak apoptózu indukujícího faktoru (AIF), který se nachází nejen ve spermiích, ale také v somatických buňkách (Taylor et al., 2004). V raných stádiích apoptózy dochází v odumírající buňce k přesmyku molekul fosfatidylserinu z vnitřní vrstvy plazmatické membrány na vrstvu vnější. K rozpoznávání tohoto markeru na povrchu spermií jsou v laboratorní praxi využívány super-paramagnetické kuličky s navázaným annexinem-V, intracelulárním proteinem, jenž se k fosfatidylserinu silně váže. Tyto kuličky s annexinem-V se působením magnetického pole navážou na povrch apoptotických spermií s externalizovaným fosfatidylserinem a následně jsou takovéto spermie v separační koloně zachyceny. Spermie bez známek apoptózy, na něž se kuličky nenašly, volně prostupují skrz kolonu a jsou využity v asistované reprodukci (Grunewald et al., 2001). Schéma procesu je znázorněno na obrázku 3. S využitím fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) bylo zjištěno, že apoptotické spermie zachytávané v separační koloně vykazují vyšší procento chromozomálních aberací, než spermie kolonou volně procházející (Esbert et al., 2017). Tento poznatek vede k předpokladu, že spermie s abnormálními chromozomy v jádře manifestují zvýšený výskyt fosfatidylserinu na svém povrchu, díky čemuž jsou metodou MACS efektivně odstraňovány z ejakulátu (Esbert et al., 2017).



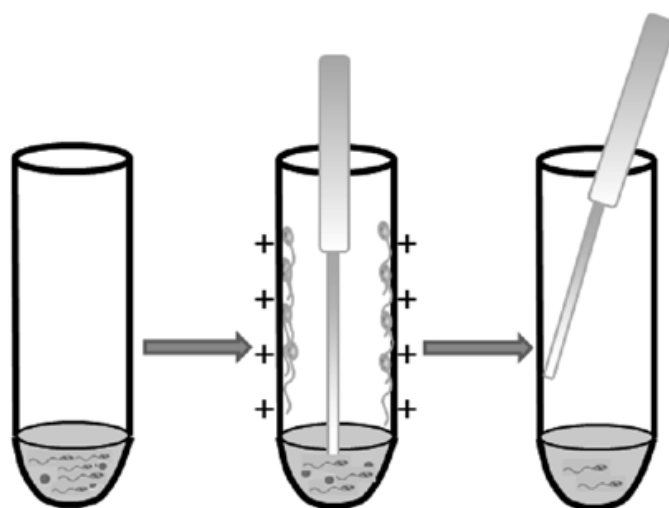
Obrázek 3: Schéma magnetické separace spermií (převzato: Beydola et al., 2013).

Zvýšený výskyt markerů apoptózy vykazují zejména spermie mužů se sníženou fertilitou. V těžkých případech teratozoospermie a také při kombinovaných poruchách plodnosti metoda MACS výrazně zvyšuje šanci na úspěšné oplození (Zahedi et al., 2013; Ziarati et al., 2018), neboť dokáže eliminovat spermie se skrytými vnitřními defekty, které mohou ovlivňovat jejich fertilizační potenciál a jsou možnou příčinou vzniku poškození embryí vedoucích k potratu (Sánchez-Martín et al., 2017). Naopak ve vážných případech asthenozoospermie, jež je diagnostikována, pokud je procento spermií v ejakulátu s progresivní motilitou hluboko pod 32 % (dle WHO, 2010), a také při těžké oligozoospermii, může důsledkem selekce metodou MACS docházet k narušení pohyblivosti spermií (Grunewald et al., 2009).

Selekce výhradně metodou MACS má za následek snížení celkového počtu spermií ve výsledném vzorku (Cakar et al., 2016; Esbert et al., 2017) a také dochází ke zhoršení jejich morfologických parametrů (Tavalaee et al., 2012). Dopad těchto jevů na úspěšnost oplození technikou ICSI je minimální, pro IVF a IUI však představuje velké omezení (Cakar et al., 2016). Často se proto MACS využívá ve spojení se standardními metodami, nejčastěji s denzitní gradientovou centrifugací (popsanou v podkapitole 2.1.2). Tento postup je považován za velmi úspěšný v selekci životaschopných spermií s minimální mírou fragmentace DNA, velmi dobrou progresivní motilitou (Bucar et al., 2015) a normální morfologií spermií (Dirican et al., 2008). MACS v kombinaci s denzitní gradientovou centrifugací také výrazně snižuje podíl spermií s narušeným mitochondriálním membránovým potenciálem (de Vantéry Arrighi et al., 2009), účinně odstraňuje nezralé i apoptotické spermie (Said et al., 2005) a izoluje spermie s neporušenými akrozomy (Zahedi et al., 2013). Poslední ze zmíněných benefitů metody MACS, tedy získání spermií s normální stavbou akrozomu, je důležitým předpokladem úspěšného oplození (Nasr-Esfahani et al., 2010), neboť akrozom a enzymy v něm obsažené ovlivňují interakci spermie se *zona pellucida* oocyty.

2.2.2 Selekcce spermií podle elektrokinetického potenciálu

Tento způsob selekce je často označován jako zeta metoda. Principem je separace maturovaných spermií ze vzorku na základě rozdílného elektrokinetického (zeta) potenciálu mezi jejich membránami a okolním prostředím. Elektrický náboj zralých spermií se nachází v rozmezí -16 až -20 V, přičemž spermie nesoucí Y chromozom vykazují až o 25% vyšší náboj oproti spermiím s X chromozomem (Ishijima et al., 1991). Negativní náboj na spermiích je udržován přítomností zbytků kyseliny sialové v povrchových glykoproteinech. Během kapacitace dochází ke ztrátě některých těchto proteinů z povrchu spermie, v důsledku čehož se náboj na membráně mění a stává se méně negativním (Focarelli et al., 1990). Principem separace je tedy zachycení silně záporně nabitých spermií s lepkavým povrchem na základě elektrostatického přitahování, zatímco spermie s nižším nábojem jsou spolu se zbytky buněk odplavovány z kolony ven (Chan et al., 2006). Na obrázku 4 se nachází zjednodušené schéma postupu selekce spermií touto technikou.



Obrázek 4: Schéma selekce spermií podle zeta potenciálu (převzato: Nasr-Esfahani a Marziyeh, 2015).

Výhody metody spočívají v rychlosti, finanční nenáročnosti a možnosti selekce spermií s výbornou morfologií, motilitou a integritou DNA (Chan et al., 2006). Podobně jako u swim-up metody (popsané v podkapitole 2.1.1) a metody MACS (popsané v podkapitole 2.2.1) však celkový výtěžek spermií zpracováním ejakulátu klesá. Pro izolaci optimálního počtu spermií pro oplození je tedy nutné, aby počáteční koncentrace ve vzorku byla dostatečně vysoká (Razavi et al., 2010). Z tohoto důvodu se nejedná o vhodnou alternativu selekce spermií oligoozoospermických pacientů (Chan et al., 2006).

Pro lepší účinnost je metoda obvykle prováděna v kombinaci s některým z dalších postupů selekce. V praxi je selekce podle zeta potenciálu nejčastěji aplikována na vzorky ejakulátu, které byly nejprve podrobeny denzitní gradientové centrifugaci (popsané v podkapitole 2.1.2). Spojením metod je docíleno izolace pohyblivějších spermií (Chan et al., 2006) s vynikající integritou DNA (Zahedi et al., 2013). V důsledku toho stoupá procento úspěšně oplozených oocytů (Kheirollahi-Kouhestani et al., 2009) a vzniklá embrya jeví zlepšené kvalitativní parametry (Duarte et al., 2017, Karimi et al., 2020). Zajímavým zjištěním je, že tento postup selekce ovlivňuje poměr pohlaví ve prospěch žen. Popsaný efekt je nejspíše dán vyšší odolností spermií nesoucích X chromozom vůči podmínkám, kterým jsou spermie během procesu separace vystaveny (Nasr Esfahani et al., 2016).

Oproti metodě MACS dochází k účinnější eliminaci spermií s fragmentovanou DNA, počet spermií s normální strukturou akrozomu je však nižší (Zahedi et al., 2013). Redukce fragmentované DNA je výraznější také v porovnání s izolací spermií vazbou na kyselinu hyaluronovou (Razavi et al., 2010), široce využívanou metodou, která bude dále představena. Taktéž v porovnání s metodou denzitní gradientové centrifugace se selekce na základě zeta potenciálu jeví jako efektivnější v zisku zralých spermií s neporušenou DNA (Khajavi et al., 2009).

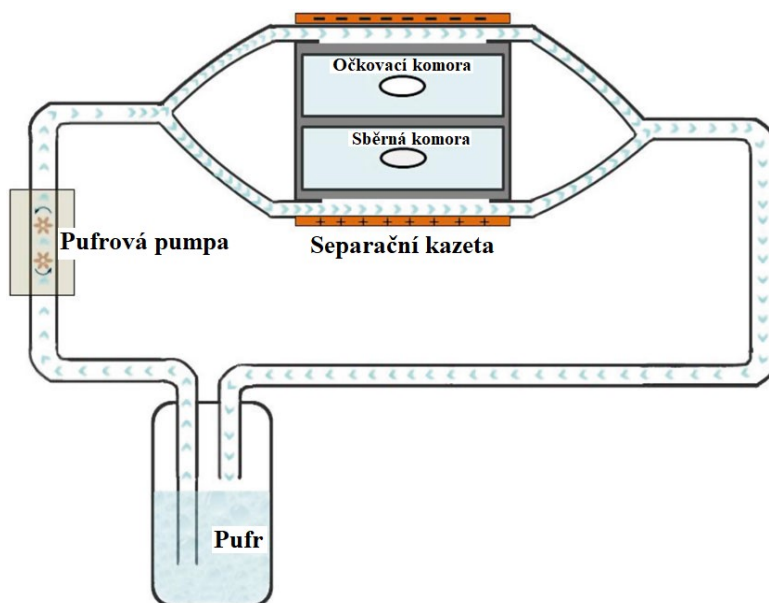
Přestože je metoda využívána především pro zpracování čerstvého spermatu, svá pozitiva prokazuje i během aplikace na spermie ze zmrazených vzorků, jež jsou pro účely asistované reprodukce

uchovávají ve spermabankách. Po rozmrazení a zpracování ejakulátu dochází ke zlepšení morfologie a poklesu počtu nekrotických buněk. Je však pozorován značný pokles progresivní motility spermií, který je zapříčiněn kryokonzervačním postupem (Kam et al., 2007).

2.2.3 Selektce spermií s využitím elektroforézy

Podstatou elektroforetické metody je izolace spermií na základě jejich velikosti a negativního náboje na membráně. Skrze póry separační membrány zařízení umístěného v elektrickém poli prochází pouze velikostně vyhovující spermie. Příliš velké spermie a také leukocyty jsou tímto způsobem vyloučeny. Získané spermie jsou životaschopné, dobře pohyblivé, mají nízký index deformace (SDI) a z toho vyplývající vyšší fertilizační schopnost. V porovnání s denzitní gradientovou centrifugací (popsanou v podkapitole 2.1.2) spermie vykazují nižší míru poškození DNA, méně abnormalit v morfologii a sníženou tvorbu ROS. Také je selektce méně časově náročná a šetrnější, neboť není nutné vzorek podrobovat centrifugaci (Ainsworth et al., 2005). Uvedené benefity metody byly zjištěny nejen po zpracování čerstvého spermatu zdravých jedinců, ale také po selekci spermií ze zmrazeného vzorku pacientů, u nichž ostatní postupy selektce selhaly z důvodu velkého poškození struktury DNA (Ainsworth et al., 2007).

Klasický typ elektroforetického zařízení, jehož schéma se nachází na obrázku 5, sestává ze dvou vnějších a dvou vnitřních komor oddělených polyakrylamidovými membránami. Zatímco ve vnějších komorách jsou umístěny elektrody, vnitřní sestávají z očkovací, do které je vpravováno sperma a sběrné, jež funguje jako zásobárna roztoku pufru (Ainsworth et al., 2005). Nej kvalitnější spermie s negativním nábojem se v tomto čtyřkomorovém systému shlukují v části, kde je umístěna anoda. Právě spermie z této oblasti se dále využívají při IVF procedurách (Ainsworth et al., 2011).



Obrázek 5: Schéma čtyřkomorového elektroforetického zařízení pro selekci spermií (převzato: Nasr-Esfahani a Marziyeh, 2015).

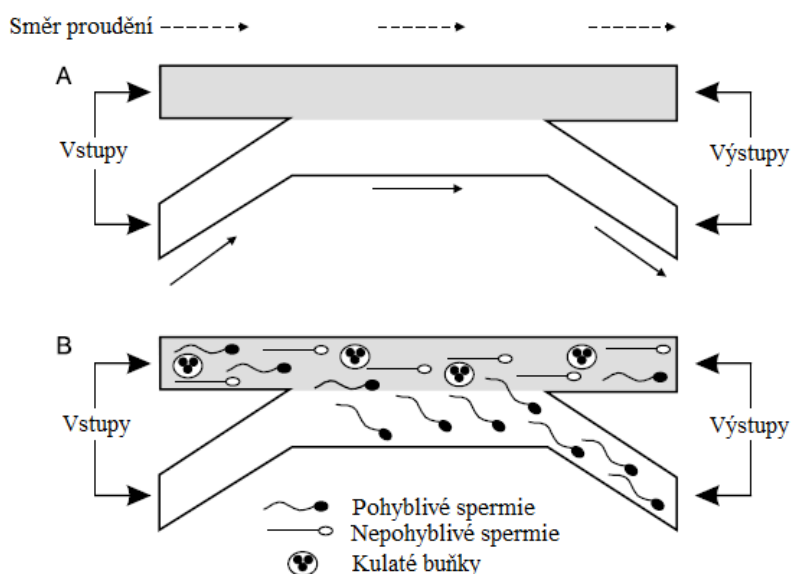
Intenzita elektrického pole, kterému jsou spermie v průběhu elektroforézy vystaveny, má přímý dopad na jejich kvalitu a počet. Při působení silnějšího elektrického pole množství izolovaných spermií stoupá, děje se tak však na úkor jejich motility (Aitken et al., 2011). Je proto důležité najít určitou rovnováhu, aby nedocházelo ke zhoršování žádného z důležitých parametrů. Přestože nadměrně silné elektrické pole či jeho delší působení signifikantně narušuje pohyblivost spermií, nedochází k nárůstu oxidativního stresu, který by vedl k poškození DNA (Aitken et al., 2011). Tento poznatek je v souladu s předchozími studii (Ainsworth et al., 2005), ve které byla v elektroforeticky separovaném vzorku spermií pomocí chemiluminiscence zjištěna minimální míra kontaminace leukocyty. Právě leukocyty generují ROS, jež jsou za poškození DNA zodpovědné (Saleh et al., 2002).

Kromě klasického způsobu popsaného výše je elektroforéza využívána v několika dalších obdobích lišících se způsobem provedení nebo stavbou elektroforetického zařízení. Fleming et al. (2008) pro svůj výzkum použil zařízení obsahující pouze 2 komory, namísto klasických čtyř. Tento typ selekce spermií porovnal s denzitní gradientovou centrifugací a prokázal, že obě metody jsou srovnatelně efektivní v izolaci spermií pro účely IVF a ICSI (Fleming et al., 2008). Simon et al. (2014) popsal využití takzvané mikro-elektroforézy, která pracuje na podobném principu jako klasický model, dokáže však v elektrickém poli separovat spermie jednotlivě. Tomuto způsobu separace předchází zpracování ejakulátu denzitní gradientovou centrifugací, která zajistí oddělení spermií od zbytků buněk a poskytne určitý předvýběr spermií s vyhovující motilitou pro následnou selekci v elektrickém poli. Slouží také k odstranění molekul z povrchu spermií, jež jsou zodpovědné za negativní náboj, který však není u všech spermií v ejakulátu stejně silný. Elektronegativními proto zůstanou pouze spermie se silným záporným nábojem, zatímco původně slabě elektronegativní spermie získají náboj pozitivní (Simon et al., 2016). Během následného elektroforetického procesu jsou pomocí inverzní fáze mikroskopu, jenž se běžně používá při technice ICSI, posuzovány morfologické parametry jednotlivých spermií a je sledován jejich pohyb k elektrodám. Obdobně jako u klasického elektroforetického procesu, elektropozitivní spermie směřují ke katodě a spermie se záporným nábojem se shlukují u anody. Jak již bylo výše nastíněno, právě spermie s nejsilnějším záporným nábojem disponují nejlepšími parametry pro účely umělého oplození, a to především minimálním podílem fragmentované DNA v jádře (Simon et al., 2016).

2.2.4 Selekcce spermií s využitím mikrofluidních systémů

Mikrofluidika je vědní obor zabývající se mechanikou kapalin v malých objemech. Zařízení pracující s malými objemy, takzvané „laboratoře na čipu“, jsou v současné vědě stále populárnější, a to v mnoha biotechnologických odvětvích. Výjimkou není ani asistovaná reprodukce, kde jsou používány pro posouzení kvality spermií a jejich následnou selekci. Z důvodu omezení malými objemy ejakulátu jsou tato zařízení většinou využívána k selekci spermií pro následné oplození ICSI. Existují však také „čipy“ sestávající ze separačních kanálků s vyšší propustností. Právě ty umožňují izolaci většího počtu spermií, které mohou být dále použity při IVF či IUI technikách. Kromě svého vnitřního uspořádání se mikrofluidní systémy liší principy, jimiž jsou spermie selektovány.

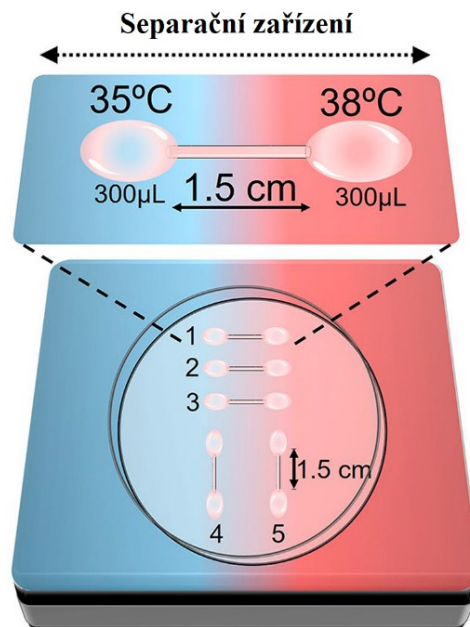
První skupina mikrofluidních zařízení využívá hydromechanických jevů, především laminárního proudění kapalin. Separace probíhá na základě aktivního pohybu spermií, přičemž stabilní průtok zařízením je zde udržován působením gravitační síly a povrchového napětí kapalin. Vzorek spermatu protéká zařízením paralelně s médiem a nedochází tak k vzájemnému promíchávání. Pouze vysoce pohyblivé spermie jsou schopny změny směru proudění a migrace do média, zatímco nezralé spermie a takzvané kulaté buňky (například leukocyty) zůstávají v původním proudu (Cho et al., 2003). Schéma tohoto typu zařízení se nachází na obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma hydromechanického mikrofluidního zařízení (převzato: Schuster et al., 2003).

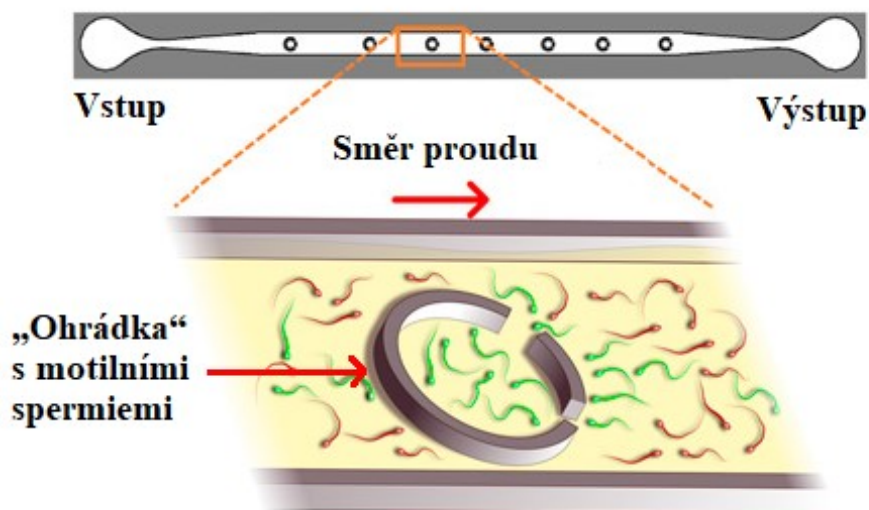
S využitím zařízení, která selektují buňky na základě jejich aktivního pohybu, lze docílit izolace velkého množství spermií s vynikající motilitou a morfologií, a to bez nutnosti vzorek nejprve podrobit centrifugaci. Metoda je tak vhodnou alternativou i pro pacienty se sníženým množstvím, či narušenou pohyblivostí spermií v ejakulátu (Schuster et al., 2003). Testem SCSA založeném na analýze integrity DNA pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že oproti metodě swim-up (popsané v podkapitole 2.1.1) a denzitní gradientové centrifugaci (popsané v podkapitole 2.1.2) prokazují vzorky selektované hydromechanickými mikrofluidními „čipy“ nižší procento spermií s fragmentovanou DNA (Shirota et al., 2016). V důsledku toho jsou vhodnější alternativou zejména pro účely techniky ICSI, při které je nízká míra fragmentace DNA stěžejním parametrem pro výběr spermií. Zákonů laminárního proudění využívá také zařízení vyvinuté k zachycení a analýze spermií na úrovni jedné buňky (de Wagenaar et al., 2015). Sestává ze dvou hlavních kanálů, které jsou propojeny dvaceti vedlejšími. Pokud je vytvořen tlak v hlavních kanálech, dochází ve vedlejších k zachycení jednotlivých spermií, které mohou být dále podrobeny neinvazivnímu posouzení parametrů. Novější zařízení analyzující jednotlivé spermie jsou často spojeny s fázovými mikroskopy, díky nimž je posouzení morfologie spermií určené k oplodnění oocyty metodou ICSI důslednější (Eravuchira et al., 2018).

Mnohá mikrofluidní zařízení jsou sestavována za účelem imitace anatomické stavby samičího reprodukčního traktu a simulace dějů v něm probíhajících po proniknutí ejakulovaných spermii. Lze tak například navozovat fyziologickou chemotaxi, při které se spermie *in vivo* pohybují ve směru gradientu chemických látek uvolňovaných vajíčkem. Chemoatraktantem v mikrofluidních systémech jsou nejčastěji kumulární buňky oocyty uvolňující progesteron (Xie et al., 2010), či vytvořený koncentrační gradient progesteronu. Tento hormon kromě přitahování kapacitovaných spermii dokáže samotný proces kapacitace navozovat, a to jak ve vzorcích normospermických, tak v ejakulátu subfertilních jedinců s nízkým procentem kapacitovaných spermii (Gatica et al., 2013). Zvýšení míry kapacitace v izolovaných vzorcích je pro účely asistované reprodukce příznivým jevem, jelikož pouze kapacitované spermie dokážou proniknout skrz *zona pellucida* oocyty. Spermie selektované touto metodou jsou životaschopné, dobře pohyblivé, jejich integrita DNA je zachována a také dochází k nižší produkci ROS (Gatica et al., 2013). Kromě chemotaxe je v mikrofluidních systémech využívána také termotaxe, která působí na větší vzdálenost. Zatímco chemické signály vylučované oocytem jsou spermii vnímány až ve vejcovodu, u termotaxe teplotní gradient kontinuálně stoupá již od dělohy a maxima dosahuje v bezprostřední blízkosti vajíčka. Systémy na principu termotaxe lze izolovat spermie s nízkou mírou fragmentace DNA (Pérez-Cerezales et al., 2018), v důsledku čehož je možné zvýšit procento úspěšných oplození metodou ICSI. Schéma separačního zařízení pracujícího na bázi termotaxe se nachází na obrázku 7. Některé „laboratoře na čipu“ v sobě spojují oba mechanismy popsané výše, tedy chemotaxi s termotaxí, a jsou velmi efektivní v izolaci vysoce motilních spermii (Ko et al., 2018).



Obrázek 7: Schéma zařízení pro selekci spermii pomocí teplotního gradientu (termotaxe; převzato: Pérez-Cerezales et al., 2018). Dvě kapky média jsou spojeny úzkou trubičkou a je mezi nimi vytvořen teplotní gradient. Do média v první kapce je vpraven vzorek spermatu. Nejlepší spermie, které mají specificky umístěné termoreceptory na svém povrchu, migrují do druhé kapky média o vyšší teplotě.

Spermie mohou být selektovány také na principu reotaxe, jež je jejich hlavním orientační mechanismem v genitálním traktu ženy. Jedná se o tendenci spermií pohybovat se proti proudu oviduktální tekutiny, která je zvýšeně sekretována v reakci na pohlavní styk a zajišťuje pročištění vejcovodů od hlenu a buněčné kontaminace. Zatímco chemotaxe i termotaxe jsou považovány za aktivní procesy, při nichž spermie účelně reagují na okolní podněty, princip reotaxe není zcela jasný. Některé studie předpokládají, že je umožněn rotačními pohyby bičíku a úhlem hlavičky (Miki and Clapham, 2013). Další uvádí, že se jedná o děj pasivní, jehož podstatou je vzájemné hydrodynamické působení bičíku a proudu oviduktální tekutiny (Zhang et al., 2016). Podobně jako termotaxe, také reotaxe působí na velkou vzdálenost. Systémy pracující na bázi reotaxe mají mnoho podob. Zaferani et al. (2018) ve své studii popsali jednoduchý způsob izolace spermií, při které dochází k pasivní selekci spermií na speciálně upraveném zařízení s „ohrádkami“, ve kterých jsou po navození reotaxe shromažďovány pouze ty spermie, jež vykazují dostatečnou celkovou i progresivní pohyblivost. Schéma selekce pomocí tohoto „čipu“ je představeno na obrázku 8. Spermie mohou být tříděny po navození reotaxe také na difuzorovém typu zařízení (Wu et al., 2017; Hwang et al., 2019). Difuzorovými „čipy“ je možné zpracovat velký objem ejakulátu za krátký časový úsek. Díky tomu jsou vhodnou alternativou selekce spermií nejen pro účely oplození ICSI, ale také IVF a IUI. Přínosem je i skutečnost, že v porovnání se standardními metodami selekce, tedy se swim-up a denzitní gradientovou centrifugací, disponují spermie izolované difuzorovým zařízením lepší pohyblivostí (Wu et al., 2017).

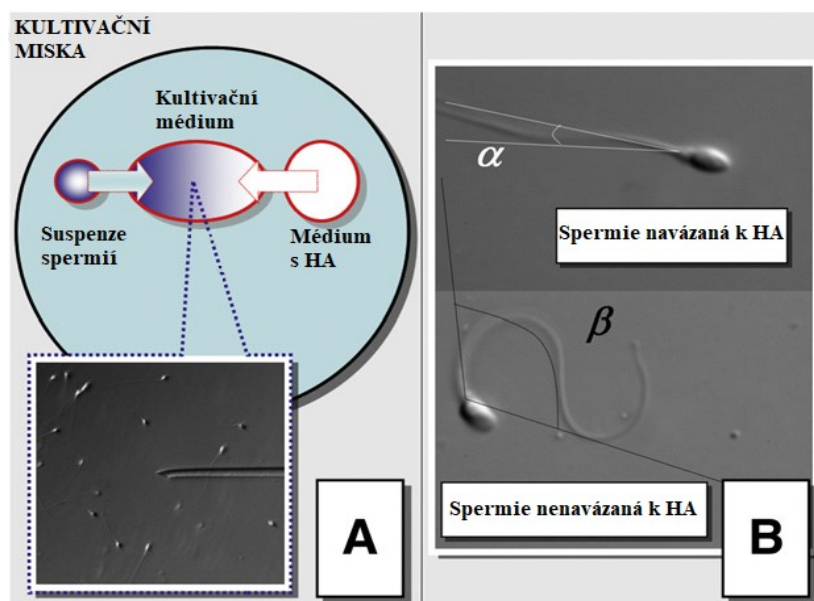


Obrázek 8: Schéma zařízení pro selekci spermií na bázi reotaxe (převzato a upraveno: Zaferani et al., 2018). Červeně jsou značeny spermie, které se po vytvoření zóny reotaxe před „ohrádkou“ nedokáží pohybovat proti proudu tekutiny. Nejpohyblivější spermie, které jsou na obrázku zvýrazněny zelenou barvou, se po navození reotaxe orientují, prostupují proudem a následně jsou zachytávány v „ohrádce“.

2.2.5 Selekcce spermií vazbou na kyselinu hyaluronovou

Během spermiogeneze je plazmatická membrána samčích pohlavních buněk významně přeskupována a v průběhu zrání se na spermiích vytváří vazebná místa, jimiž se poté vážou k *zona pellucida* oocytu. Zároveň jsou formovány receptory pro interakci s HA, jež je podstatnou složkou extracelulární matrix kumulárních buněk obklopujících oocyt (Dandekar et al., 1992). Receptory HA jsou tedy přítomny pouze na zralých spermiích, u nichž došlo ke změně uspořádání plazmatické membrány a jejichž akrozomy jsou v neporušeném stavu, neboť se udává, že lidské spermie po proběhlé akrozomální reakci vazebnou schopnost k HA ztrácí (Huszar et al., 2003). Spermie schopné vazby k HA také exprimují dostatečně vysoké hladiny chaperonového proteinu HspA2. Tento protein je velmi důležitý pro správnou stavbu genomu, neboť nezralé spermie produkují menší množství HspA2, v důsledku čehož jsou náchylnější ke vzniku chromozomálních aberací (Jakab et al., 2005). Vazba spermií na HA *in vitro* zajišťuje selekci spermií s nižším počtem těchto aberací, zejména u pacientů s normálními parametry spermií, ale také u oligozoospermických mužů. Počet spermií s abnormální genetickou informací díky selekci klesne na 0,04 % až 0,10 %, tedy na srovnatelnou frekvenci vyskytující se ve zdravé mužské populaci (Jakab et al., 2005).

V laboratořích jsou využívány dva způsoby provedení selekce vazbou na HA. Obě varianty spočívají v simulaci přirozené selekce probíhající v ženském reprodukčním traktu, kdy pouze zralé spermie s parametry popsány výše jsou schopny vazby k HA v matrix kumulárních buněk oocytu. První možností je aplikace několika kapek HA na dno speciálních plastových misek. Do blízkosti kapek s hyaluronanem se umístí vzorek spermií, který byl předem promyt či podroben centrifugaci. Při druhém způsobu je na misku umístěn malý vzorek spermií a kapka média obsahujícího HA. Jak je znázorněno na obrázku 9, do kultivačního média, které je vpraveno na dno misky, se pipetou přesune malý vzorek spermií a média s HA. Tyto dvě varianty provedení se liší způsobem zachycení zralých spermií. Zatímco v prvním případě se spermie k HA vážou svými receptory na hlavičkách a bičikem kolem hlavičky svižně kmitají, při druhém způsobu selekce jsou spermie v důsledku viskózních vlastností použitého média zpomaleny, zachyceny a využity pro oplození oocytu (Parmegiani et al., 2010). Po provedení ICSI selektovanými spermii nebyly z hlediska fertilizačního potenciálu, kvality embrya či rizika potratu po úspěšné fertilizaci pozorovány žádné zásadní rozdíly ve variantách provedení selekce (Parmegiani et al., 2012).



Obrázek 9: Schéma selekce spermii vazbou na HA (převzato a upraveno: Parmegiani et al., 2012). Spermie jsou selektovány pomocí média s obsahem HA. Na obrázku A je metoda zobrazena schematicky, na obrázku B jsou znázorněny rozdíly v pohybu bičíku spermie navázané k HA oproti té, jež se během selekce nenavázala.

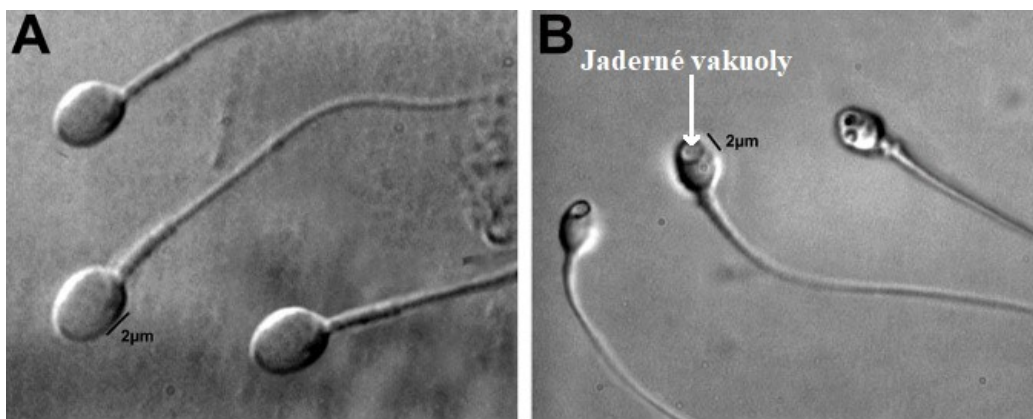
Umělé oplození oocyty spermii selektovanou vazbou na HA je označováno jako fyziologická intracytoplazmatická injekce spermie (PICSI). Jedná se o obdobu klasické techniky, při které v důsledku přísného výběru spermie dochází ke zlepšení kvality embrya a zvýšení úspěšnosti jeho implantace do děložní sliznice (Parmegiani et al., 2009). Bylo prokázáno, že riziko samovolného potratu po oplození metodou PICSI je výrazně nižší, než je tomu u standardní ICSI procedury (Miller et al., 2019). Z poznatků recentní rozsáhlé studie vyplývá, že u pacientů s vážnými případy teratozoospermie, u nichž počet morfologicky normálních spermii nepřesahuje 1 % (dle WHO, 2010), je metoda PICSI výrazně účinnější v počtu úspěšně oplozených oocytů a kvalitě vzniklých embryí (Kim et al., 2019).

2.2.6 Morfologické vyšetření organel motilních spermii

K odhalení i těch nejmenších defektů ve struktuře, které by mohly mít vliv na úspěšnost oplození technikou ICSI, slouží precizní morfologické vyšetření motilních spermii (MSOME) pomocí inverzního optického mikroskopu se zabudovaným digitálním zobrazením. Zatímco během rutinního vyšetření před provedením ICSI je embryolog schopen posoudit abnormality v morfologii pouze se zvětšením 200× až 400×, mikroskop využívaný během MSOME umožňuje v reálném čase zvětšit sledovaný objekt až 6300× (Bartoov et al., 2002).

Metodou MSOME jsou posuzovány morfologické parametry pěti hlavních organel spermie, a to akrozomu, postakrozomálního segmentu, bičíku, mitochondriální oblasti a především jádra, jehož kvalita nejvíce ovlivňuje úspěšnost oplození oocyty. Z tohoto důvodu je u jádra sledován nejen tvar a struktura, ale také uspořádání chromatinu, které je považováno za atypické, pokud oblast vakuol přesahuje 4 % z celkové velikosti jádra (Bartoov et al., 2002). Za takzvané spermie s velkými jadernými

vakuolami jsou pak považovány ty, jejichž vakuoly zaujímají více než 50 % jaderného prostoru. Rozdíl ve velikosti vakuol mezi normálními spermii a těmi, jež disponují velkými jadernými vakuolami, je vyznačen na obrázku 10. Právě neobvykle rozsáhlá oblast vakuol v chromatinu je dle vědců hlavní příčinou zhoršených morfologických parametrů spermií (Perdrix et al., 2012) a také zvýšeného výskytu fragmentace DNA (Oliveira et al., 2010a). Počet spermií s velkými vakuolami v jádře stoupá úměrně s věkem muže (Silva et al., 2012) a je často důvodem neúspěšných pokusů o přirozenou koncepci. Metoda MSOME dokáže tento defekt odhalit a zabránit tak oplození oocyty abnormální spermií, jež by mohlo vést až ke vzniku atypického či neživotaschopného embrya.



Obrázek 10: Srovnání velikosti jaderných vakuol metodou MSOME (převzato a upraveno: Oliveira et al., 2010b). Na obrázku A jsou pomocí vysokého zvětšení zobrazeny spermie se standardní velikostí oblasti jaderných vakuol, na obrázku B se nachází spermie s velkými jadernými vakuolami zabírajícími více než 50 % celkové velikosti jádra.

Proces výběru morfologicky kompetentní spermie pomocí MSOME a následné oplození metodou ICSI je souhrnně označován jako intracytoplazmatická injekce morfologicky předvybrané spermie (IMSI). Efektivita selekce metodou MSOME, její vliv na fertilizační potenciál spermie a důsledky inkorporace do protokolu ICSI jsou velmi diskutabilní a dosud provedené studie se ve svých poznatcích značně rozcházejí. Bartoov et al. (2003) uvedli, že právě detailní posouzení morfologie jádra, a tedy i integrity DNA během MSOME, vede až ke zdvojnásobení počtu těhotenství sledovaných žen v porovnání s konvenční metodou ICSI, a u subfertilních párů, jež předtím opakovaně neúspěšně podstoupily standardní oplození metodou ICSI, dokonce dochází již po prvním provedení IMSI k úspěšnému početí u poloviny žen. K podobným poznatkům dospěl i pozdější výzkum (Wilding et al., 2011), ve kterém byla metoda IMSI shledána za efektivnější v počtu úspěšně oplozených oocytů a následné implantaci a kvalitě embryí. Naopak Gatimel et al. (2016) ve své studii došli k protichůdnému faktu, a to takovému, že metody IMSI a ICSI mají srovnatelné klinické výsledky. Žádné benefity metody IMSI nepozorovali ani u párů, jež v minulosti bez úspěchu absolvovaly oplození metodou ICSI (Gatimel et al., 2016).

Přestože je efektivita selekce spermií metodou MSOME dle vědeckých výzkumů stále rozporuplná, zdá se, že své využití nachází zejména u pacientů s vážnými poruchami plodnosti, a to především

u oligoasthenoteratozoospermických mužů, u nichž se koncentrace, pohyblivost a morfologie spermií nachází pod dolními limity stanovenými WHO (dle WHO, 2010). Právě v těchto případech totiž pečlivý výběr spermií pro následné oplození metodou IMSI výrazně zvyšuje šanci na úspěšné těhotenství (Goswami et al., 2018; Schachter-Safrai et al., 2019; Mangoli et al., 2019).

3 Metody selekce spermií ve veterinární praxi

Asistovaná reprodukce je u hospodářských zvířat na vzestupu především díky tendenci zvyšovat efektivitu rozmnožování užitkových druhů a snaze o zachování kvalitní genetické výbavy vybraných jedinců do dalších generací. Z ekonomických důvodů také často dochází k cílené produkci potomstva konkrétního pohlaví. Selektce spermií dle přítomnosti X či Y chromozomu je tak důležitou součástí veterinární praxe. Separační postupy u zvířat jsou často velmi podobné metodám humánní praxe, jejich vliv na parametry izolovaných spermií je však odlišný. Důvodem je skutečnost, že k úspěšnému oplození většiny druhů hospodářských zvířat je zapotřebí několikanásobně větších objemů ejakulátu, než je tomu v lidském odvětví asistované reprodukce. Sperma je také častěji zmrazováno a uchováváno po delší časové období. Před procesem kryokonzervace je sperma ředěno, a to nejen z důvodu zisku více inseminačních vzorků, ale také za účelem ochrany spermií a snížení jejich metabolické aktivity během skladování. Je tedy zcela zásadní zvolit takovou metodu selekce, s níž je možné izolovat dostatečný počet kvalitních spermií, a to i ze vzorku, který byl vystaven náročným podmínkám.

3.1 Standardní metody selekce

Mezi široce využívané postupy selekce kompetentních spermií patří metody zahrnující ve svém postupu centrifugační krok. V lidské asistované reprodukci je jednou z nejvyužívanějších technik denzitní gradientová centrifugace (popsaná v podkapitole 2.1.2). U hospodářských zvířat jsou široce uplatňovány její obdoby s jednou, či dvěma vrstvami koloidního roztoku. Pro účely jednovrstevné koloidní centrifugace jsou využívány druhově specifické koloidy, které obsahují částice oxidu křemičitého obalené silanem (AndrocollTM, BoviPureTM, OviPureTM, EquipureTM). Gradientu naopak může být dosaženo navrstvením koloidu s částicemi obalenými PVP (nejčastěji se jedná o komerčně dostupný roztok Percoll[®]).

U hřebců lze těmito postupy izolovat spermie s vynikající integritou plazmatické i akrozomální membrány, vysokým membránovým potenciálem, minimální mírou fragmentace DNA, bez abnormalit v morfologii a s velmi dobrou pohyblivostí (Johannisson et al., 2009; Morrell et al., 2011; Heutelbeck et al., 2015; Al-Essawe et al., 2018). V nativních vzorcích ejakulátu, jež jsou přechovávány v chladných podmínkách, s časem rapidně roste procento odumřelých spermií. Zpracováním jednovrstevnou koloidní centrifugací je tento jev výrazně potlačen (Johannisson et al., 2009) a doba použitelnosti spermií pro následné oplození oocyty tak může být značně prodloužena (Morrell et al., 2011).

Metoda jednovrstevné koloidní centrifugace je využívána také k selekci býčích spermií. Na rozdíl od spermií hřebců, kde izolace touto technikou vedla ke zlepšení jak celkové, tak progresivní pohyblivosti (Johannisson et al., 2009), u býků tento jev pozorován není. Motilita spermií zůstává po zpracování nezměněna a s využitím propidiumjodidu bylo zjištěno, že selekčním procesem nedošlo ve vzorku k výraznému zvýšení procenta životaschopných spermií. Byl však pozorován významný pokles počtu

spermií s poškozenou DNA v genomu a mitochondriální membránový potenciál spermií se po selekci pohyboval ve vysokých hodnotách (Goodla et al., 2014). Dle vědců právě vysoký mitochondriální membránový potenciál koreluje s kvalitou selektovaných spermií (Marchetti et al., 2002). Výše uvedené poznatky byly zjištěny po selekci spermií ze spermatu přechovávaného v chladných podmínkách. Spermie tak byly izolovány s časovou prodlevou. Ve studii (Nongbua et al., 2017), která měla za cíl posoudit dopad zpracování čerstvě odebraného vzorku na vlastnosti spermií po jejich rozmrazení, byl zjištěn odlišný efekt. Vlivem selekčního procesu spermie generují větší množství superoxidového radikálu, který je v úměrných koncentracích zodpovědný za iniciaci procesů hyperaktivace a kapacity probíhajících ve spermiu uvnitř samičího reprodukčního traktu (Lamirande a Gagnon, 1993). Pokud však dochází k jeho nadměrné produkci, začne se přeměňovat na peroxid vodíku, který způsobuje vážná poškození spermií. Tvorba peroxidu vodíku spermii je v důsledku selekce jednovrstevnou centrifugací buď zcela potlačena, jako je tomu při bezprostřední selekci z čerstvého vzorku (Nongbua et al., 2017), nebo dochází k jeho generování ve snížení míře, což se děje v případě prodlevy mezi odebráním a zpracováním spermatu (Goodla et al., 2014). Přestože v druhém případě k určité tvorbě peroxidu vodíku dochází, vliv na kvalitu spermií je minimální. Abraham et al. (2016) ve své studii popsali selekci býčích spermií také ze vzorku po rozmrazení. Selekcce probíhala s využitím tří variant jednovrstevné koloidní centrifugace lišících se v objemu použitého koloidu, jímž byl Androcoll™. Dopad jednotlivých variant na spermie byl následně porovnán a zjistilo se, že snížením množství koloidu stoupá v izolovaném vzorku počet kvalitních spermií s výbornou pohyblivostí a integritou membrány a zároveň nedochází k poklesu fertilizačního potenciálu (Abraham et al., 2016). Tyto poznatky jsou velmi užitečné pro zjednodušení postupů a snížení finančních nákladů pro selekci býčích spermií v laboratořích.

Koloidní centrifugace je efektivní metodou selekce spermií také u kozlů, jejichž sperma je často zmrazováno a uchováváno pro účely pozdějšího oplození. Před procesem kryokonzervace je vhodné odstranit ze vzorku semennou plazmu. V důsledku tohoto kroku zůstává kvalita izolovaných spermií, především jejich pohyblivost, zachována (Kozdrowski et al., 2007). Odstranění plazmy je docíleno právě centrifugačními metodami, které jsou u kozlů nejčastěji prováděny s využitím koloidu specifického pro býčí spermie (např. BoviPure™). Selekcce jednovrstevnou koloidní centrifugací může být prováděna před zmrazením či po rozmrazení vzorku. Druhou z variant, tedy izolací spermií z rozmrazeného vzorku, je možné odstraňovat spermie, které byly poškozeny v průběhu kryokonzervace. Celkový výtěžek spermií je tak oproti selekci před zmrazením nižší, kvalita spermií v izolovaném vzorku je však zvýšena (Jiménez-Rabadán et al., 2012).

U kanců jsou jednovrstevná a gradientová koloidní centrifugace srovnatelně efektivní v izolaci spermií s vynikající pohyblivostí (Morrell et al., 2009). Právě pohyblivost spermií je obdobně jako u hřebců a kozlů vlivem centrifugace zachována po delší časový úsek, než je tomu v nezpracovaných (nativních) vzorcích spermatu. Přestože se varianty mezi sebou příliš neliší v dopadu na kvalitativní vlastnosti

spermií, metoda jednovrstevné koloidní centrifugace je upřednostňována z důvodu snazšího provedení a také možnosti zpracovat najednou větší objem ejakulátu potřebného k úspěšnému oplození samice (Morrell et al., 2009). Během jednovrstevné koloidní centrifugace však dochází k oddělení spermií od semenné plazmy, která obsahuje důležité bílkovinné složky. Na povrchu kančích spermií jsou navázány spermadheziny PSP-I a PSP-II, které se podílejí na zachování mitochondriální aktivity, životaschopnosti spermií a také jejich pohyblivosti (Centurion et al., 2003). S využitím primárních protilátek bylo zjištěno, že vlivem centrifugace dochází k odstraňování těchto důležitých proteinů a tím ke snižování fertilizačního potenciálu spermií. Řešením tohoto problému je opětovná aplikace malého objemu semenné plazmy do již zpracovaného vzorku kančích spermií. V důsledku toho se spermadheziny znovu naváží a kvalita spermií pro oplození tak zůstává zachována (Kruse et al., 2011). Se zlepšujícími se kvalitativními vlastnostmi a tedy fertilizačním potenciálem spermií selektovaných pomocí koloidu však u kanců stoupá riziko vzniku polyspermie (Sjunnesson et al., 2013). Polyspermie je označení pro průnik více než jedné spermie do oocyty. Tento jev je častou příčinou nižšího počtu získaných blastocyst, tedy zvýšené ztráty embryí, a to především při vyšší koncentraci spermií a jejich delší inkubaci s oocytem během IVF. Kvalita embryí vzniklých oplozením oocyty spermiemi selektovanými jednovrstevnou koloidní centrifugací je však i přes zvýšené riziko polyspermie na dobré úrovni (Sjunnesson et al., 2013).

Za účelem selekce spermií beranů je jednovrstevná koloidní centrifugací prováděna nejčastěji s využitím koloidu OviPure™ a gradientová koloidní centrifugace skrze PVP-koloid Percoll® (Bergstein et al., 2016; Bergstein-Galan et al., 2018). Přestože jsou obě varianty centrifugační metody efektivní v izolaci kvalitních spermií, bylo zjištěno, že skrze jednu vrstvu druhově specifického koloidu Ovipure™ lze izolovat lépe pohyblivé spermie (Bergstein et al., 2016), které nejeví známky probíhající apoptózy a zároveň disponují intaktními akrozomy (Bergstein-Galan et al., 2018). Těchto výsledků bylo obdobně jako při selekci býčích spermií (Abraham et al., 2016) dosaženo zejména při použití menšího objemu koloidu během procesu centrifugace. Výhodou snížení objemu koloidního roztoku je taktéž již výše zmíněný pokles finančních nákladů spojených se separačním procesem (Bergstein-Galan et al., 2018).

I přes značné výhody mají metody zahrnující v postupu krok centrifugace svá úskalí. Stejně jako v humánní praxi, také ve veterinární indukuje odstředivá síla zvýšenou míru oxidativního stresu, který je zodpovědný za nevratná poškození spermií. V posledních letech byla proto snaha o nalezení šetrnějších metod, které by minimalizovaly negativní dopad separace na kvalitu gamet. Příkladem je modifikovaná swim-up metoda popsána u koní, při které spermie migrují do média skrze Androcoll-E, tedy koloid specifický pro hřebce (Hidalgo et al., 2017). Ten je běžně využíván také při zpracování ejakulátu během koloidní centrifugace, jež byla popsána výše. Studie však prokázala, že i přes využití odstředivé síly je jednovrstevná koloidní centrifugace stále výrazně účinnější v selekci lépe pohyblivých spermií s nižší mírou fragmentace DNA (Hidalgo et al., 2017). Další možností separace, která umožňuje

centrifugační krok z postupu vynechat, je zpracování vzorku ejakulátu vybraných druhů hospodářských zvířat v mikrofluidních systémech. Příklady některých mikročipů konstruovaných pro veterinární praxi budou dále popsány.

3.2 Pokročilé metody selekce

3.2.1 Mikrofluidní separace

Mikrofluidní systémy umožňují obdobně jako v humánní praxi preciznější separaci spermií zejména pro oplození oocyty technikou ICSI. Vnitřní uspořádání „čipů“ a principy, které jsou pro selekci využívány, se ve veterinární praxi příliš neliší od těch, jež jsou konstruovány pro zpracování lidského spermatu.

Mikrofluidní separaci koňských spermií lze provádět například pomocí konvenčního „čipu“ běžně používaném v lidské praxi, jehož separační membrána je speciálně upravena pro průchod spermií hřebců. V porovnání s jednovrstevnou koloidní centrifugací lze pomocí tohoto mikrofluidního systému izolovat signifikantně více životaschopných spermií s normální morfologií a nižší mírou fragmentace DNA (Gonzalez-Castro and Carnevale, 2019). Vědci také srovnali efekt obou selekčních metod na vývoj embrya po oplození technikou ICSI. Významné rozdíly během rýhování vajíčka a tvorby blastocysty však nebyly nalezeny (Gonzalez-Castro and Carnevale, 2019).

Mikrofluidní zařízení určené k selekci býčích spermií bylo popsáno skupinou vědců Li et al. (2016). Principem selekce je v tomto systému chemotaxe a jako chemoatraktant slouží hormon progesteron uvolňovaný kumulárními buňkami oocyty. Bylo zjištěno, že se jedná o velmi šetrnou metodu, neboť velké procento izolovaných spermií disponuje akrozomy v neporušeném stavu a se zachovanou aktivitou mitochondrií. V důsledku toho stoupá počet úspěšně oplozených oocytů a také je výrazně zlepšován embryonální vývoj (Li et al., 2016). Dalším typem mikrofluidního zařízení, jež se využívá u býků, je difuzorový separační „čip“ pracující na bázi laminárního proudění. Tímto zařízením lze izolovat životaschopné spermie s neporušenou integritou DNA, díky čemuž je následně dosaženo úspěšné fertilizace i při využití pouze malého počtu selektovaných spermií během asistované reprodukce (Nagata et al., 2018). Jedná se tak o velmi účinnou metodu umožňující rozmnožování jedinců nesoucích vynikající genetickou výbavu, u nichž je však počet fertálních spermií v ejakulátu omezený a jejich plodnost tedy snížena. Pomocí tohoto mikročipu lze izolované spermie rozdělit dle typu jejich pohybu do dvou skupin. První tvoří spermie s progresivní motilitou a pravidelným lineárním pohybem bičíku. Druhou skupinou jsou pomalejší spermie s výchyly v linearitě pohybu. Tento poznatek je velmi užitečný v asistované reprodukci, neboť indikuje, v jakém časovém horizontu je proces oplození nejefektivnější. První zmiňovaná skupina spermií má nejvyšší fertilizační potenciál v rané fázi estrálního cyklu (7 až 9 hodin po začátku), zatímco u druhé tato chvíle nastává až těsně před ovulací samice, tedy mezi 19. a 27. hodinou po začátku říje (Nagata et al., 2018).

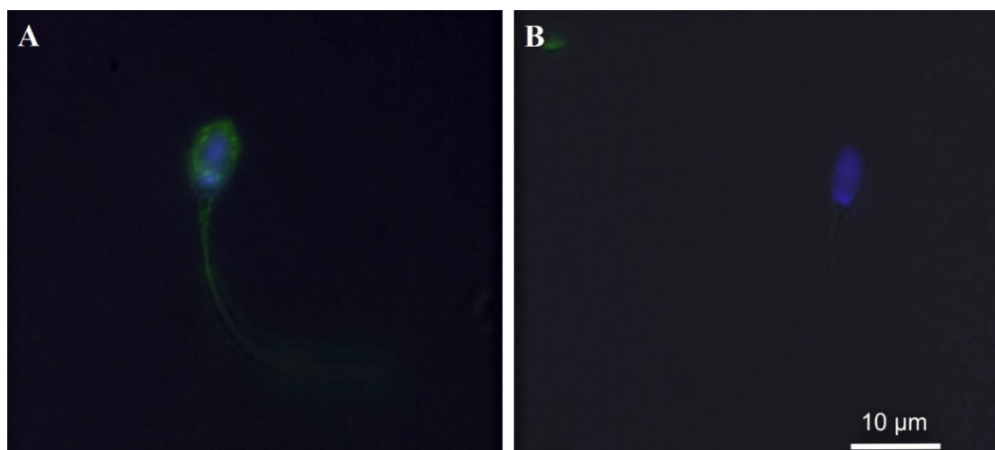
3.2.2 Nanopurifikace spermií v magnetickém poli

Další metodou selekce spermií ve veterinárním odvětví asistované reprodukce je takzvaná nanopurifikace spermií v magnetickém poli s využitím nanočástic. Jedná se o modifikaci metody MACS využívané v humánní praxi (popsané v podkapitole 2.2.1). Na rozdíl od paramagnetických kuliček používaných při metodě MACS, byly pro nanopurifikaci vyvinuty speciální nanočástice, které v důsledku svého zploštělého tvaru poskytují větší plochu pro případné navázání spermií během separace (Odhiambo et al., 2014). U býků lze pomocí těchto nanočástic konjugovaných s protilátkami proti ubiquitinu či s navázanými lektiny efektivně odstraňovat nezralé, poškozené či předčasně kapacitované spermie ze vzorku. Chaperonový protein ubiquitin má v reprodukci savců velký význam, neboť zajišťuje značení defektních proteinů spermií pro následnou degradaci v proteasomech. Kromě ubiquitinových značek jsou na poškozených spermiích ve vyšší míře exprimovány také sacharidy, jež je možné rozpoznávat a vázat pomocí specifických lektinů. Nejčastěji jsou k detekci využívány lektiny z podzemnice olejné (PNA) a hrachu setého (PSA), které značí vnější akrozomální membránu a jejich navázáním na spermii je tak možné rozpoznat nežádoucí změny ve struktuře akrozomu, a to nejen defekty různého typu, ale také již proběhlou akrozomální reakci (Cross a Watson, 1994; Odhiambo et al., 2011). Odhiambo et al. (2014) nanopurifikační metodu ve svém výzkumu posoudili z hlediska kvality izolovaných býčích spermií a jejich vlivu na úspěšné oplození. Bylo zjištěno, že úspěšnost asistované reprodukce se liší s ohledem na konkrétní postup metody. Zatímco pro účely IVF je nejvhodnější možností selekce s využitím anti-ubiquitinových protilátek, v případě inseminace *in vivo* je nejlepšími výsledky dosaženo separací spermií pomocí nanočástic obalených lektinem PNA.

U kanců byl popsán dvoufázový postup nanopurifikační metody (Durfey et al., 2019). V prvním kroku jsou použity nanočástice s navázaným annexinem-V a vlivem magnetického pole dojde nejprve k redukci spermií vykazujících známky apoptózy. V druhém kroku se proces opakuje, ale místo annexinu-V jsou nanočástice obaleny lektiny PNA či PSA, jejichž navázání na akrozomální membránu, jak již bylo výše uvedeno, signalizuje poškozený akrozom. V důsledku tohoto procesu jsou izolovány životaschopné fertilitní spermie s vynikající celkovou i progresivní motilitou, které dávají vzniknout kvalitním prasečím embryím (Durfey et al., 2019).

3.2.3 Selekcce spermií s využitím průtokové cytometrie

Defektní spermie mohou být rozpoznávány metodou průtokové cytometrie, která s využitím fluorescenčně značených protilátek umožňuje třídít spermie dle přítomnosti specifických antigenů na jejich povrchu. Metoda byla popsána například u prasat, kde takto selektované spermie mohou poté sloužit pro oplození oocytů technikou ICSI. S využitím primárních a sekundárních anti-ubiquitinových protilátek lze značit extracelulárně vázaný ubiquitin na povrchu kančích spermií a podle intenzity fluorescenčního signálu tak posuzovat míru poškození jednotlivých spermií (Petelák a Krylov, 2016). Na obrázku 11 je znázorněna rozdílná intenzita fluorescence spermií, jež koreluje s množstvím molekul ubiquitinu přítomných na jejich povrchu.



Obrázek 11: Fluorescenční signál spermií izolovaných s využitím průtokové cytometrie (převzato: Petelák a Krylov, 2016). Zeleně jsou pomocí protilátky značeny molekuly ubiquitinů na povrchu spermií, modře chromatin v jádře. Na obrázku A je zobrazena spermie s velkým množstvím vázaných molekul ubiquitinů, na obrázku B se ubiquitin na spermii téměř nevyskytuje.

Touto metodou lze spermie selektovat nejen v závislosti na přítomnosti určitého markeru značícího abnormalitu ve struktuře, jež by mohla mít vliv na fertilizační potenciál, ale také dle toho, zda nesou chromozom X či Y. Pomocí průtokové cytometrie je tak možné spermie dle rozdílů ve struktuře DNA třídit do dvou skupin, a to na chromozom X nesoucí a chromozom Y nesoucí (Johnson et al., 1987). Spermie jsou následně využity v asistované reprodukci s úmyslem účinné determinace pohlaví hospodářských zvířat. Značná nevýhoda procesu spočívá v omezeném počtu spermií, které lze průtokovým cytometrem najednou izolovat. Tato skutečnost činí z metody neekonomickou variantu sexování spermií pro účely konvenční IUI, jelikož inseminační dávky spermatu většiny druhů hospodářských zvířat několikanásobně převyšují separační kapacitu využívaných cytometrů. Metoda je tedy vhodná zejména pro izolaci spermií určených k následnému oplození oocyty technikami IVF, ICSI či hlubokou intrauterinní inseminací, při které dochází k aplikaci sníženého počtu spermií do rohů děložních (Seidel et al., 1997; Morris et al., 2000; Martinez et al., 2001). Kromě nízkého výtěžku patří k nedostatkům metody také nepříznivý vliv samotného separačního procesu na kvalitu spermií. Zhoršení pohyblivosti vlivem selekce bylo s využitím CASA popsáno u býků (Carvalho et al., 2010) i koní (Mari et al., 2010; Balao da Silva et al., 2016). U hřebců také dochází v důsledku nárůstu oxidativního stresu během selekce k narušení integrity DNA spermií a zvýšení počtu spermií s nízkým mitochondriální membránovým potenciálem (Balao da Silva et al., 2016). U prasat motilní parametry zhoršeny nejsou, separačním procesem však dochází ke snížení schopnosti penetrovat oocyty během IVF (del Olmo et al., 2013). Naopak u býků není fertilizační potenciál narušen a pozorovány nebyly ani odchylky ve vývoji embryí po provedení IVF (Carvalho et al., 2010). Z těchto poznatků vyplývá, že metoda průtokové cytometrie nenese potenciál pro širší využití v odvětví sexování spermií a v současnosti je tak pozorována vzrůstající tendence o vývoj rychlejších, levnějších a především šetrnějších postupů.

4 Závěr

Bakalářská práce měla za cíl popsat nejčastěji uplatňované selekční metody a s využitím relevantní literatury diskutovat jejich odlišný vliv na kvalitu izolovaných spermií. Vhodná metoda je volena s ohledem na počáteční parametry spermií a techniku následné fertilizace. Ze standardních postupů jsou v humánní i veterinární praxi nejrozšířenější metody centrifugační. Zatímco v humánním odvětví tyto metody často slouží k předzpracování vzorku ejakulátu pro následnou selekci některou z pokročilejších technik, ve veterinárním se pro svou efektivitu, praktičnost a finanční nenáročnost využívají samostatně a spermie jsou jimi izolovány nejčastěji. Důvodem širokého uplatnění centrifugačních postupů ve veterinární praxi je také skutečnost, že u hospodářských zvířat k oplození dochází nejčastěji *in vivo* pomocí inseminace spermii. Inseminační dávky zvířat často mnohonásobně převyšují ty lidské a širší využití pokročilejších metod by tak bylo časově i finančně nevýhodné. Pokročilejší postupy jsou proto doménou spíše humánní praxe.

Vývoj nových a zdokonalování stávajících postupů selekce spermií za účelem zefektivnění asistované reprodukce lidí i hospodářských zvířat je velmi aktuálním tématem. V humánní praxi je udržována snaha o alespoň částečné zachování přirozené kompetice mezi spermii. Z tohoto důvodu jsou IUI a IVF techniky zpravidla prvními možnostmi při snaze o koncepci u většiny pacientů reprodukčních klinik. Technika ICSI je pro oplození volena po opakovaném selhání fertilizace gamet během IUI a IVF, či ve specifických případech, například při těžkých poruchách mužské plodnosti, kdy je šance na úspěšné oplození některou ze standardnějších technik velmi nízká. Výběr spermií kompetentní k využití při technice ICSI musí být z důvodu naprosté absence selekčních bariér velice precizní. Důraz je kladen především na neporušenou genetickou informaci a vnitřní uspořádání spermií bez patologických struktur a abnormálních dějů. Velký potenciál v tomto směru nesou mikrofluidní systémy, pomocí nichž je možné velice účinně simulovat přirozené procesy odehrávající se v samičím reprodukčním traktu po průniku spermií a izolovat tak buňky, jež by pravděpodobně prošly i selekčními mechanismy *in vivo*.

Významným odvětvím veterinární praxe je takzvané sexování spermií. Přestože selekce průtokovou cytometrií představuje dosud jedinou efektivní možnost sexování spermií hospodářských zvířat, vysoké finanční náklady a snížená kvalita spermií jsou hlavními příčinami jejího omezeného použití v asistované reprodukci. V praxi humánní se selekce spermií dle chromozomu využívá jen ve specifických případech, neboť je značně zatížena etickými dilematy. Dochází totiž k cílenému narušení přirozeného poměru X : Y chromozomů, jenž je v nativním neselektovaném ejakulátu zhruba 1 : 1. Metoda má proto uplatnění především u párů, u nichž je vysoké riziko dědičnosti těžkých, geneticky podmíněných onemocnění vázaných na pohlaví potomka. Rozvoj nových technik sexování spermií vedoucích k účinnější predeterminaci pohlaví potomstva by v budoucnu mohly přispět také ke snaze o záchranu ohrožených druhů zvířat.

Seznam použité literatury

Hvězdičkou (*) jsou značeny přehledové články.

Abraham, M. C., Johannisson, A., and Morrell, J. M. (2016). Effect of sperm preparation on development of bovine blastocyst *in vitro*. *Zygote*, 24(6), 825–830.

Ainsworth, C., Nixon, B., and Aitken, R. J. (2005). Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(8), 2261–2270.

Ainsworth, C., Nixon, B., Jansen, R. P. S., and Aitken, R. J. (2007). First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Human Reproduction*, 22(1), 197–200.

Ainsworth, C. J., Nixon, B., and Aitken, R. J. (2011). The electrophoretic separation of spermatozoa: an analysis of genotype, surface carbohydrate composition and potential for capacitation. *International Journal of Andrology*, 34(5Pt2), 422–434.

Aitken, R. J., and Clarkson, J. S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9(6), 367–376.

Aitken, R. J., Hanson, A. R., and Kuczera, L. (2011). Electrophoretic sperm isolation: optimization of electrophoresis conditions and impact on oxidative stress. *Human Reproduction*, 26(8), 1955–1964.

Aitken, R. J., Finnie, J. M., Muscio, L., Whiting, S., Connaughton, H. S., Kuczera, L., Rothkirch, T. B., and De Iuliis, G. N. (2014). Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Human Reproduction*, 29(10), 2136–2147.

Al-Essawe, E. M., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., and Morrell, J. M. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*, 81, 145–152.

Allamaneni, S. S. R., Agarwal, A., Rama, S., Ranganathan, P., and Sharma, R. K. (2005). Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 7(1), 86–92.

Balao da Silva, C. M., Ortega-Ferrusola, C., Morrell, J. M., Rodriguez Martínez, H., and Peña, F. J. (2016). Flow cytometric chromosomal sex sorting of stallion spermatozoa induces oxidative stress on mitochondria and genomic DNA. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 18–25.

Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y., and Barak, Y. (2002). Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of Andrology*, 23(1), 1–8.

Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosovsky, A., Yagoda, A., Lederman, H., Artzi, S., Gross, M., and Barak, Y. (2003). Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1413–1419.

Bergstein, T. G., Bicudo, L. C., Rodello, L., Weiss, R. R., and Bicudo, S. D. (2016). Kinematic and spermatic recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(6), 1539–1547.

Bergstein-Galan, T. G., Bicudo, L. C., Rodello, L., Weiss, R. R., and Bicudo, S. D. (2018). Sperm membrane integrity and stability after selection of cryopreserved ovine semen on colloidal solutions. *Andrologia*, 50(2), e12867.

- Beydola, T., Sharma, R. K., Lee, W., and Agarwal, A. (2013). Sperm preparation and selection techniques. In: Rizk, B., Aziz, N., Agarwal, A and Sabanegh, E. (eds.): *Male Infertility Practice*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 244–251.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., and Saad, A. (2011). Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. *Andrologia*, 43(3), 196–202.
- Bucar, S., Gonçalves, A., Rocha, E., Barros, A., Sousa, M., and Sá, R. (2015). DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), 147–154.
- Cakar, Z., Cetinkaya, B., Aras, D., Koca, B., Ozkavukcu, S., Kaplanoglu, İ., Can, A., and Cinar, O. (2016). Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(8), 1059–1065.
- Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., and Dode, M. A. N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, 74(9), 1521–1530.
- Centurion, F., Vazquez, J. M., Calvete, J. J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., Garcia, E. M., and Martinez, E. A. (2003). Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*, 69(2), 640–646.
- Cross, N. L., and Watson, S. K. (1994). Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology*, 42(1), 89–98.
- Dai, X., Wang, Y., Cao, F., Yu, C., Gao, T., Xia, X., Wu, J., and Chen, L. (2020). Sperm enrichment from poor semen samples by double density gradient centrifugation in combination with swim-up for IVF cycles. *Scientific Reports*, 10(1), 2286.
- Dandekar, P., Aggeler, J., and Talbot, P. (1992). Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Human Reproduction*. 7(3), 391–398.
- de Vantéry Arrighi, C., Lucas, H., Chardonens, D., and de Agostini, A. (2009). Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1.
- de Wagenaar, B., Berendsen, J. T. W., Bomer, J. G., Olthuis, W., van den Berg, A., and Segerink, L. I. (2015). Microfluidic single sperm entrapment and analysis. *Lab on a Chip*, 15(5), 1294–1301.
- del Olmo, D., Parrilla, I., Gil, M. A., Maside, C., Tarantini, T., Angel, M. A., Roca, J., Martinez, E. A., and Vazquez, J. M. (2013). Handling of boar spermatozoa during and after flow cytometric sex-sorting process to improve their in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, 80(4), 350–356.
- Dirican, E. K., Özgün, O. D., Akarsu, S., Akin, K. O., Ercan, Ö., Uğurlu, M., Çamsari, Ç., Kanyilmaz, O., Kaya, A., and Ünsal, A. (2008). Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, 25(8), 375–381.
- Duarte, C., Núñez, V., Wong, Y., Vivar, C., Benites, E., Rodriguez, U., Vergara, C., and Ponce, J. (2017). Impact of the z potential technique on reducing the sperm DNA fragmentation index, fertilization rate and embryo development. *JBRA Assisted Reproduction*, 21(4), 351–355.

- Durfey, C. L., Swistek, S. E., Liao, S. F., Crenshaw, M. A., Clemente, H. J., Thirumalai, R. V. K. G., Steadman, C. S., Ryan, P. L., Willard, S. T., and Feugang, J. M. (2019). Nanotechnology-based approach for safer enrichment of semen with best spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 14.
- Eravuchira, P. J., Mirsky, S. K., Barnea, I., Levi, M., Balberg, M., and Shaked, N. T. (2018). Individual sperm selection by microfluidics integrated with interferometric phase microscopy. *Methods*, 136, 152–159
- Esbert, M., Godo, A., Soares, S. R., Florensa, M., Amorós, D., Ballesteros, A., and Vidal, F. (2017). Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology*, 5(4), 807–813.
- Fácio, C. L., Previato, L. F., Machado-Paula, L. A., Matheus, P. C., and Araújo Filho, E. (2016). Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation. *JBRA Assisted Reproduction*, 20(4), 206–211.
- Fleming, S. D., Ilad, R. S., Griffin, A.-M. G., Wu, Y., Ong, K. J., Smith, H. C., and Aitken, R. J. (2008). Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Human Reproduction*, 23(12), 2646–2651.
- Focarelli, R., Rosati, F., and Terrana, B. (1990). Sialylglycoconjugates release during *in vitro* capacitation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 11(2), 97–104.
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Unates, D. R., Molina, R. I., and Giojalas, L. C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 559–569.
- Gatimel, N., Parinaud, J., and Leandri, R. D. (2016). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(3), 349–355.
- Gonzalez-Castro, R. A., and Carnevale, E. M. (2019). Use of microfluidics to sort stallion sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Animal Reproduction Science*, 202, 1–9.
- Goodla, L., Morrell, J. M., Yusnizar, Y., Stålhammar, H., and Johannisson, A. (2014). Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2204–2212.
- Goswami, G., Sharma, M., Jugga, D., and Gouri, D. M. (2018). Can intracytoplasmic morphologically selected spermatozoa injection be used as first choice of treatment for severe male factor infertility patients? *Journal of Human Reproductive Sciences*, 11(1), 40-44.
- Grizard, G., Chevalier, V., Griveau, J. F., Le Lannou, D., and Boucher, D. (1999). Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *International Journal of Andrology*, 22(3), 190-196.
- Grunewald, S., Paasch, U., and Glander, H.-J. (2001). Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell and Tissue Banking*, 2(3), 127–133.
- Grunewald, S., Reinhardt, M., Blumenauer, V., Said, T. M., Agarwal, A., Hmeidani, F. A., Glander, H.-J. and Paasch, U. (2009). Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertility and Sterility*, 92(2), 572-577.

- * Henkel, R. R., and Schill, W.-B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 22(1), 108.
- Henning, H., Ngo, T. T., and Waberski, D. (2015). Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. *Andrology*, 3(5), 834–842.
- Heutelbeck, A., Oldenhof, H., Rohn, K., Martinsson, G., Morrell, J., and Sieme, H. (2015). Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: perform sperm selection directly after collection or after storage? *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 76–83.
- Hidalgo, M., Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J. M., Gosálvez, J., Consuegra, C., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., and Crespo, F. (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal Reproduction Science*, 185, 83–88.
- Huszar, G., Ozenci, C. C., Cayli, S., Zavaczki, Z., Hansch, E., and Vigue, L. (2003). Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility*, 79, 1616–1624.
- Hwang, B., Lee, D., Hwang, S.-J., Baek, J.-H., and Kim, B. (2019). Rheotaxis based high-throughput motile sperm sorting device. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 20(6), 1037–1045.
- Chan, P. J., Jacobson, J. D., Corselli, J. U., and Patton, W. C. (2006). A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertility and Sterility*, 85(2), 481–486.
- Cho, B. S., Schuster, T. G., Zhu, X., Chang, D., Smith, G. D., and Takayama, S. (2003). Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Analytical Chemistry*, 75(7), 1671–1675.
- Ishijima, S. A., Okuno, M., and Mohri, H. (1991). Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *International Journal of Andrology*, 14(5), 340–347.
- Jakab, A., Sakkas, D., Delpiano, E., Cayli, S., Kovanci, E., Ward, D., Ravelli, A., and Huszar, G. (2005). Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 84(6), 1665–1673.
- Jayaraman, V., Upadhyay, D., Narayan, P. K., and Adiga, S. K. (2012). Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(6), 557–563.
- Jiménez-Rabadán, P., Morrell, J. M., Johannisson, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Álvaro-García, P. J., Pérez-Guzmán, M. D., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., Soler, A. J. (2012). Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. *Animal Reproduction Science*, 136(1-2), 47–54.
- Johannisson, A., Morrell, J. M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.-M., and Rodriguez-Martinez, H. (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, 116(1-2), 119–128.
- Johnson, L. A., Flook, J. P., Look, M. V., and Pinkel, D. (1987). Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Research*, 16(1), 1–9.
- Kam, T. L., Jacobson, J. D., Patton, W.C., Corselli, J. U., and Chan, P. J. (2007). Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(9), 429–434.

- Karimi, N., Mohseni Kouchesfehiani, H., Nasr-Esfahani, M. H., Tavalae, M., Shahverdi, A., and Choobineh, H. (2020). DGC/Zeta as a new strategy to improve clinical outcome in male factor infertility patients following intracytoplasmic sperm injection: a randomized, single-blind, clinical trial. *Cell Journal*, 22(1), 55–59.
- Katz, D. F., Morales, P., Samuels, S. J., and Overstreet, J. W. (1990). Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 54(3), 513–516.
- Khajavi, N. A., Razavi, S., Mardani, M., Tavalee, M., Deemeh, M. R., and Nasr-Esfahani, M. H. (2009). Can Zeta sperm selection method, recover sperm with higher DNA integrity compare to density gradient centrifugation? *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 7(2), 73–77.
- Kheirollahi-Kouhestani, M., Razavi, S., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Mardani, M., Moshtaghian, J., and Nasr-Esfahani, M. H. (2009). Selection of sperm based on combined density gradient and zeta method may improve ICSI outcome. *Human Reproduction*, 24(10), 2409–2416.
- Kim, S. J., Kim, H., Kim, T. H., Jeong, J., Lee, W. S., and Lyu, S. W. (2019). Effect of sperm selection using hyaluronan on fertilization and quality of cleavage-stage embryos in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles of couples with severe teratozoospermia. *Gynecological Endocrinology*, 36(5), 456–459.
- Kim, S. W., Jee, B. C., Kim, S. K., and Kim, S. H. (2017). Sperm DNA fragmentation and sex chromosome aneuploidy after swim-up versus density gradient centrifugation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 44(4), 201–206.
- Ko, Y.-J., Maeng, J.-H., Hwang, S. Y., and Ahn, Y. (2018). Design, fabrication, and testing of a microfluidic device for thermotaxis and chemotaxis assays of sperm. *Slas Technology*, 23(6), 507–515.
- Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., and Dzięcioł, M. (2007). Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted Semen analysis system. *Acta Veterinaria Brno*, 76(4), 601–604.
- Kruse, R., Dutta, P. C., and Morrell, J. M. (2011). Colloid centrifugation removes seminal plasma and cholesterol from boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(7), 858–865.
- Lamirande, E. De, and Gagnon, C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(1), 21–25.
- Li, J., Ning, B., Cao, X., Luo, Y., Guo, L., Wei, G., Liu, S., Zhang, Y., Zhang, A., Wu, R., Li, Y. (2016). Separation of motile sperm for in vitro fertilization from frozen-thawed bull semen using progesterone induction on a microchip. *Animal Reproduction Science*, 172, 52–59.
- Mahadevan, M., and Baker, G. (1984). Assessment and preparation of semen for *in vitro* fertilization. In: Wood, C., and Trounson, A. (eds.): *Clinical In Vitro Fertilization*. London: Springer, 83–97.
- Mangoli, E., Khalili, M. A., Talebi, A. R., Agha-Rahimi, A., Soleimani, M., Faramarzi, A., and Pouretezari, M. (2019). IMSI procedure improves clinical outcomes and embryo morphokinetics in patients with different aetiologies of male infertility. *Andrologia*, 51(8), e13340.
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., and Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*, 17(5), 1257-1265.

- Mari, G., Rizzato, G., Merlo, B., Iacono, E., Bucci, D., Seren, E., Tamanini, C., Galeati, G., and Spinaci, M. (2010). Quality and fertilizing ability in vivo of sex-sorted stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 331–335.
- Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M. A., Parrilla, I., Vazquez, J. L, and Day, B. N. (2001). Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *Reproduction*, 122(2), 289–296.
- Miki, K., and Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*, 23(6), 443–452.
- Miller, D., Pavitt, S., Sharma, V., Forbes, G., Hooper, R., Bhattacharya, S., Kirkman-Brown, J., Coomarasamy, A., Lewis, S., Cutting, R., Brison, D., Pacey, A., West, R., Brian, K., Griffin, D., Khalaf Y. (2019). Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): a parallel, two-group, randomised trial. *The Lancet*, 393(10170), 416–422.
- Morrell, J. M., Saravia, F., Van Wienen, M., Wallgren, M., and Rodriguez-Martinez, H. (2009). Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypolytrimethoxysilane-coated silica colloid. *Journal and Reproduction and Development*, 55(5), 547–552.
- Morrell, J. M., Garcia, B. M., Pena, F. J., and Johannisson, A. (2011). Processing stored stallion semen doses by single layer centrifugation. *Theriogenology*, 76(8), 1424–1432.
- Morris, L. H., Hunter, R. H., and Allen, W. R. (2000). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 95–100.
- Mousset-Siméon, N., Rives, N., Masse, L., Chevallier, F., and Mace, B. (2004). Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. *Journal of Andrology*, 25(6), 881–884.
- Muratori, M., Tarozzi, N., Cambi, M., Boni, L., Iorio, A. L., Passaro, C., Luppino, B., Nadalini, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., Forti, G., Maggi, M., Baldi, E., Borini, A. (2016). Variation of DNA fragmentation levels during density gradient sperm selection for assisted reproduction techniques. *Medicine*, 95(20), e3624.
- Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F. M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A., Baldi, E. (2019). Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 7492.
- Nadalini, M., Tarozzi, N., Di Santo, M., and Borini, A. (2014). Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 1045–1051.
- Nagata, M. P. B., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., Egashira, J., Katafuchi, N., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Goto, Y., Sakatani, M., Hojo, T., Nishizono, H., Yotsushima, K., Takenouchi, N., Hashiyada, Y., Yamashita, K. (2018). Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(14), 3087–3096.
- Nasr-Esfahani, M. H., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Arbabian, M., and Parrington, J. (2010). Can assessment of total acrosin activity help predict failed or low fertilization rate ICSI for implementation of artificial oocyte activation? *The Open Andrology Journal*, 2(1), 19–26.

- Nasr-Esfahani, M. H., and Marziyeh, T. (2015). Sperm selection based on surface electrical charge. In: Agarwal, A., Borges, A., and Setti, A. S. (eds): *Non-invasive sperm selection for in vitro fertilization*. New York: Springer, 41–50.
- Nasr Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., Tavalace, M., Sekhavati, M. H., and Gourabi, H. (2016). Zeta sperm selection improves pregnancy rate and alters sex ratio in male factor infertility patients: a double-blind, randomized clinical trial. *International Journal of Fertility & Sterility*, 10(2), 253–260.
- Nongbua, T., Johannisson, A., Edman, A., and Morrell, J. M. (2017). Effects of single layer centrifugation (SLC) on bull spermatozoa prior to freezing on post-thaw semen characteristics. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 596–602.
- O'Connell, M., McClure, N., and Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709.
- Odhiambo, J. F., Sutovsky, M., DeJarnette, J. M., Marshall, C., and Sutovsky, P. (2011). Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. *Theriogenology*, 76(6), 1168–1176.
- Odhiambo, J. F., DeJarnette, J. M., Geary, T. W., Kennedy, C. E., Suarez, S. S., Sutovsky, M., and Sutovsky, P. (2014). Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biology of Reproduction*, 91(4), 1–10.
- Oliveira, J. B. A., Massaro, F. C., Baruffi, R. L. R., Mauri, A. L., Petersen, C. G., Silva, L. F. I., Vagnini, L. D., and Franco, J. G. (2010a). Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1937–1940.
- Oliveira, J. B. A., Petersen, C. G., Massaro, F. C., Baruffi, R. L., Mauri, A. L., Silva, L. F., Ricci, J., and Franco, J. G. Jr. (2010b). Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): intervariation study of normal sperm and sperm with large nuclear vacuoles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 56.
- Oshio, S., Kaneko, S., Iizuka, R., and Mohri, H. (1987). Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Archives of Andrology*, 19(1), 85–93.
- Parmegiani, L., Cognigni, G. E., Ciampaglia, W., Pocognoli, P., Marchi, F., and Filicori, M. (2009). Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(1), 13–16.
- Parmegiani, L., Cognigni, G. E., Bernardi, S., Troilo, E., Ciampaglia, W., and Filicori, M. (2010). “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*, 93(2), 598–604.
- Parmegiani, L., Cognigni, G. E., Bernardi, S., Troilo, E., Taraborrelli, S., Arnone, A., Maccarini, A. M., and Filicori, M. (2012). Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm–hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSi vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertility and Sterility*, 98(3), 632–637.
- Perdrix, A., Saïdi, R., Ménard, J. F., Gruel, E., Milazzo, J. P., Macé, B., and Rives, N. (2012). Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *International Journal of Andrology*, 35(4), 491–498.
- Perez, S. M., Chan, P. J., Patton, W. C., and King, A. (1997). Silane-coated silica particle colloid processing of human sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 14(7), 388–393.

- Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., de Castro, A. C., Sánchez-Calabuig, M. J., Cano-Oliva, E., de Castro-Pita, F. J., Montoro-Buils, L., Pericuesta, E., Fernández-González, R., and Gutiérrez-Adán, A. (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 2902.
- Petelák, A., and Krylov, V. (2016). Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination. *Czech Journal of Animal Science*, 61(7), 310–316.
- Pickering, S. J., Fleming, T. P., Braude, P. R., Bolton, V. N., and Gresham, G. A. G. (1989). Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use? *Fertility and Sterility*, 51(6), 1024–1029.
- Plante, M., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and Sterility*, 62(2), 387–393.
- Potts, R. J., Notarianni, L. J., and Jefferies, T. M. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutation Research*, 447(2), 249–256.
- Razavi, S. H., Nasr-Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., Shayesteh, M., and Tavalae, M. (2010). Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia*, 42(1), 13–19.
- Said, T. M., Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H.-J., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., and Agarwal, A. (2005). Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(6), 740–746.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R. K., Thomas, A. J., Nada, E. A., Evenson, D. P., and Alvarez, J. G. (2002). Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 78(6), 1215–1224.
- Sánchez-Martín, P., Dorado-Silva, M., Sánchez-Martín, F., Martínez, M. G., Johnston, S. D., and Gosálvez, J. (2017). Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate. *Reproductive Biomedicine Online*, 34(5), 506–512.
- Saylan, A., and Duman, S. (2016). Efficacy of hyaluronic acid in the selection of human spermatozoa with intact DNA by the swim-up method. *Cell Journal*, 18(1), 83–88.
- Saylan, A., and Erimsah, S. (2019). High quality human sperm selection for IVF: a study on sperm chromatin condensation. *Acta Histochemica*, 121(7), 798–803.
- Seidel, G. E., Allen, C. H., Johnson, L. A., Holland, M. D., Brink, Z., Welch, G. R., Graham, J. K., and Cattell, M. B. (1997). Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48(8), 1255–1264.
- Shirota, K., Yotsumoto, F., Itoh, H., Obama, H., Hidaka, N., Nakajima, K., and Miyamoto, S. (2016). Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. *Fertility and Sterility*, 105(2), 315–321.
- Schachter-Safrai, N., Karavani, G., Reuveni-Salzman, A., Gil, M., and Ben-Meir, A. (2019). Which semen analysis correlates with favorable Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) outcomes? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 234, 85–88.

- Schuster, T. G., Cho, B., Keller, L. M., Takayama, S., and Smith, G. D. (2003). Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(1), 75–81.
- Silva, L. F., Oliveira, J. B. A., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Massaro, F. C., Cavagna, M., Baruffi, R. L., and Franco, J. G. Jr. (2012). The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 19.
- Simon, L., Murphy, K., Aston, K. I., Emery, B. R., Hotaling, J. M., and Carrell, D. T. (2014). Microelectrophoresis: a noninvasive method of sperm selection based on membrane charge. *Fertility and Sterility*, 103(2), 361–366.
- Simon, L., Murphy, K., Aston, K. I., Emery, B. R., Hotaling, J. M., and Carrell, D. T. (2016). Optimization of microelectrophoresis to select highly negatively charged sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(6), 679–688.
- Sjunnesson, Y. C. B., Morrell, J. M., and González, R. (2013). Single layer centrifugation-selected boar spermatozoa are capable of fertilization in vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 20.
- Tavalaee, M., Deemeh, M. R., Arbabian, M., and Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), 31–38.
- Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S., and Beebe, S. J. (2004). Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction*, 10(11), 825–834.
- Tvrda, E., Arroyo, F., and Gosálvez, J. (2018). Dynamic assessment of human sperm DNA damage I: the effect of seminal plasma-sperm co-incubation after ejaculation. *International Urology and Nephrology*, 50(8), 1381–1388.
- Twigg, J., Irvine, D. S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L., Aitken, R. J. (1998). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Molecular Human Reproduction* 4(5), 439–445.
- Volpes, A., Sammartano, F., Rizzari, S., Gullo, S., Marino, A., and Allegra, A. (2016). The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(6), 765–770.
- Vozdova, M., Kasikova, K., Oracova, E., Prinosilova, P., Rybar, R., Horinova, V., Gaillyova, R., and Rubes, J. (2012). The effect of the swim-up and hyaluronan-binding methods on the frequency of abnormal spermatozoa detected by FISH and SCSA in carriers of balanced chromosomal translocations. *Human Reproduction*, 27(3), 930–937.
- Wang, X., Sharma, R. K., Gupta, A., George, V., Thomas, A. J., Falcone, T., and Agarwal, A. (2003). Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertility and Sterility*, 80, 844–850.
- Wilding, M., Coppola, G., di Matteo, L., Palagianò, A., Fusco, E., and Dale, B. (2011). Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(3), 253–262.
- World Health Organization (2010). *WHO laboratory manual for the examination of human semen*. 5th edn. Geneva: WHO Press.

- Wu, J.-K., Chen, P.-C., Lin, Y.-N., Wang, C.-W., Pan, L.-C., and Tseng, F.-G. (2017). High-throughput flowing upstream sperm sorting in a retarding flow field for human semen analysis. *Analyst*, 142(6), 938–944.
- Xie, L., Ma, R., Han, C., Su, K., Zhang, Q., Qiu, T., Wang, L., Huang, G., Qiao, J., Wang, J., Cheng, J. (2010). Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. *Clinical Chemistry*, 56(8), 1270–1278.
- Xue, X., Wang, W.-S., Shi, J.-Z., Zhang, S.-L., Zhao, W.-Q., Shi, W.-H., Guo, B.-Z., and Qin, Z. (2014). Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(9), 1161–1166.
- Younglai, E. V., Holt, D., Brown, P., Jurisicova, A., and Casper, R. F. (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction*, 16(9), 1950–1953.
- Zaferani, M., Cheong, S. H., and Abbaspourrad, A. (2018). Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(33), 8272–8277.
- Zahedi, A., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Azadi, L., Fazilati, M., and Nasr-Esfahani, M. H. (2013). Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(9), 1181–1186.
- Zhang, Z., Liu, J., Meriano, J., Ru, C., Xie, S., Luo, J., and Sun, Y. (2016). Human sperm rheotaxis: a passive physical process. *Scientific Reports*, 6(1), 23553.
- Zhu, W.-J. (2018). Preparation and observation methods can produce misleading artefacts in human sperm ultrastructural morphology. *Andrologia*, 50(7), e13043.
- Ziarati, N., Tavalae, M., Bahadorani, M., and Nasr Esfahani, M. H. (2018). Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI. *Human Fertility*, 22(2), 118–125.