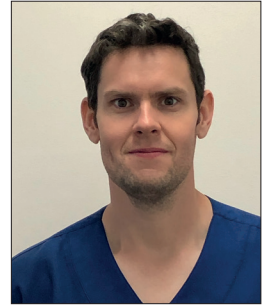


Spermiumdiagnosztikai- és -szelekciós eljárások



Máté Gábor dr., Török Attila dr.

Pannon Reprodukciós Intézet, Tapolca (igazgató: Dr. Török Attila, egyetemi magántanár)

A férfieredetű meddőség a meddőségi kezelésben résztvevő párok mintegy felénél fellelhető probléma, az esetek 30%-ában pedig önmagában fordul elő. Ennek ellenére a legtöbb intézet sokkal nagyobb figyelmet fordít a női oldalra, holott a spermiumok megfelelő kezelése és szelekciója legalább olyan fontos, mint a petesejteké. Ráadásul a spermiumokban zajló folyamatok megismerése, diagnosztizálása hozzásegíthet megfelelő terápiás eljárások kiválasztásához, illetve az embriológiai munkát is eredményesebbé teheti. Kéziratunkban szeretnénk bemutatni a konvencionális spermiumkezelési-, diagnosztikai technikákat, néhány nem konvencionális analitikai eljárást, illetve néhány új szeparációs módszert, amelyekkel javíthatunk a termékenyítéshez használt minta minőségén, hozzájárulva a jobb terhességi mutatókhoz.

Kulcsszavak: meddőség, spermiumszeparálás, asszisztált reprodukció

Sperm diagnostic and selection procedures

Male factor-related infertility is a problem in about half of couples involved in infertility treatment, and occurs alone in 30% of cases. Nevertheless, most institutes pay much more attention to the female side, although proper treatment and selection of sperm is at least as important as that of oocytes. In addition, understanding and diagnosing the processes in sperm can help to select appropriate therapeutic procedures and make embryological work more effective. In our manuscript, we would like to present conventional sperm treatment and diagnostic techniques, some unconventional analytical procedures, and some new separation methods to improve the quality of the sample used for fertilization, contributing to better pregnancy rates.

Keywords: infertility, sperm separation, assisted reproduction

Bevezetés

Egy meddőségi kezelési ciklus sikerességéhez több dologra van együttesen szükség:

- elsősor a páciensnél megfelelően kontrollált szuperovuláció indukciós kezelésre;
- a petesejtek leszívását követő szakszerű embriológiai munkára, ami magába foglalja az ivarsejtek és embriók megfelelő manipulációját, tenyésztését, klasszifikációját és a vélhetően legjobb minőségű embrió(k) kiválasztását, visszaültetését;
- illetve az ezt támogató nőgyógyászati háttérmunkára, ami a méhnyálkahártya megfelelő előkészítését jelenti.

A szakirodalmi adatok nagy része vagy a szuperovuláció indukcióra, vagy pedig az embriótenyésztésre, klasszifikációra koncentrál, azonban be kell lássuk, hogy az embriológia munka szempontjából a hímivarsejt szakszerű előkészítése és felhasználása legalább olyan fontos, mint az imént említett faktorok. Ez általában annyiban kimerül, hogy eldöntjük in vitro fertilizációra (IVF) vagy intracitoplazmatikus spermiuminjektálásra (ICSI) van szükség. Ennél azonban sokkal több lehetőség rejlik a spermiumok kezelésében, egy-egy új eljárással, akár több százalékkal is javítható lenne a meddőségi intézetek terhességi statisztikája. Az alábbiakban a hagyományos minta feldolgozási- és analitikai eljárások mellett néhány új trendet szeretnénk bemutatni a teljesség igénye nélkül.

Érkezett: 2020. augusztus 24. Közlésre elfogadva: 2020. szeptember 10. Received: 24 August 2020. Accepted: 10 September 2020

Levelezési cím: dr. Máté Gábor, Pannon Reprodukciós Intézet, 8300 Tapolca, Bartók Béla u. 1–3., Tel.: 06 87 510 365. Email: mate.gabor@pri.hu

Absztinencia és mintakezelési hőmérséklet

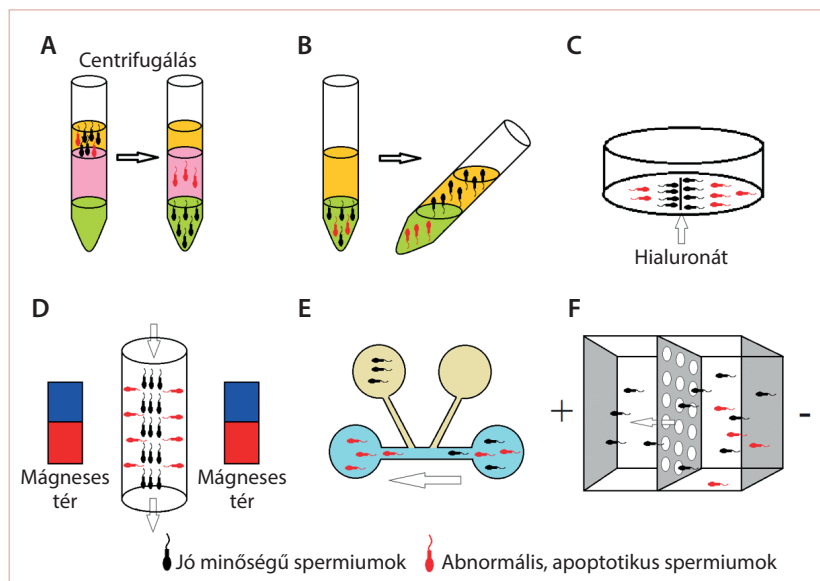
Mielőtt tárgyalnánk a mintafeldolgozás, analízis és szeparálás különféle technikáit, fontos megemlíteni, hogy nem mindegy hány napos absztinenciát tartatunk férfi betegekkel. A legújabb kutatási eredmények szerint egy rövidebb, 2-7 napos absztinenciával szignifikánsan magasabb terhességi ráta érhető el ICSI alkalmazását követően, 7 napnál hosszabb absztinenciához viszonyítva. Periyasamy és mtsai munkájában [1] a rövidebb önmegtartóztatás mellett az implantációs ráta 8,2%-kal emelkedett, míg a klinikai terhességi ráta 11,7%-kal. Mindazonáltal nyilvánvaló tény, hogy az absztinencia rövidülésével egyenes arányban csökken az ejakulált ondó mennyisége, illetve a milliliterenkénti spermium/hímivarsejt koncentráció is. Más kutatásokban még rövidebb, 1-3 órás absztinenciát hasonlítottak össze 3-7 nappal és hasonló eredményeket tapasztaltak, illetve ezen felül javulást tapasztaltak a spermiumok vitalitásában, morfológiájában, acrosoma reakciójában, teljes antioxidáns kapacitásában és csökkent a DNS-fragmentáltság mértéke is [2, 3].

Másik fontos faktor az absztinencia hossza mellett, hogy a nyert ondót milyen hőmérsékleten dolgozzuk fel. A jelenleg is érvényben lévő WHO-ajánlás szerint 37 °C javasolt a mintaelőkészítés során [4], azonban a legújabb kutatások sokkal inkább a szobahőmérséklet alkalmazása mellett szólnak. Összehasonlítva a szobahőmérsékletet a 37 °C-kal, a 37 °C-os inkubáció hatására időfüggő növekedés tapasztalható a DNS fragmentációjában, az apoptotikus sejtek számában és az elhalt spermiumok számában, ezzel párhuzamosan csökken a motilitás, a morfológiai érték, az életképesség, illetve a minta pH-ja [5-8].

Konvencionális mintakezelési technikák

A spermiumkezelésben leggyakrabban használt két konvencionális technika a sűrűség gradiens centrifugálás, illetve a „swim-up” technika (1. ábra). Előbbi a hímivarsejt „sűrűségét”, tömegét használja fel, mint a minőség egy mérőszámát. A centrifugálást követően a vélhetően legjobb minőségű spermiumok gyűlnek össze a centrifuga cső alján, míg az elhalt sejtek és a törmelék jó része a felülúszóban reked; alkalmazása elsősorban súlyosabb oligozoospermia, teratozoospermia vagy asthenozoospermia esetén javasolt. A „swim-up” technikánál az ondómintára rétegezzük valamilyen mosó- vagy tenyésző oldatot, majd ezt követően hagyjuk az oldatban felúszni a spermiumok motilis szub-populációját, illetve egyes laborokban a felúszott sejteket lecentrifugálják, hogy eliminálják a törmelékét; elsősorban normozoospermia esetén használják [4]. A sűrűség gradiens centrifugálás

egyik lehetséges gyengepontja a centrifugálási lépés, amely reaktív oxigénszármazékok (ROS) képződéséhez vezethet, amely ROS-ok képesek reakcióba lépni az élő sejteknek gyakorlatilag bármilyen összetevőjével (lipidek, cukrok, fehérjék, illetve maga az örökítő anyag). A spermiumokat körülölelő plazmamembrán nagymértékben tartalmaz többszörösen telítetlen zsírsavakat, amely támadási felületet ad a ROS-oknak, lipidperoxidációs folyamatokat indukálva [9]. A lipidperoxidáció a telítetlen lipidek oxidatív károsodása. Elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavakat érinti, de kisebb eséllyel az egyszeresen telítetlen vagy akár a telített zsírsavak, és a membrán koleszterinje is oxidálódhat. A folyamat elindításáért elsősorban a szabadgyökök felelősek, de természetes folyamatként enzimatis úton is végbemehet [10]. A szabadgyökök egyrészt a telítetlen kötés felszakításával képesek hozzákapcsolódni a zsírsavakhoz, másrészt pedig hidrogénatomot képesek elvonni a metilén csoportról, létrehozva egy lipidgyököt. A keletkezett lipidgyök reakcióba lép oxigénmolekulával és peroxilgyök keletkezik. Ekkor beindul egy láncreakció szerű folyamat, a peroxilgyök hidrogént von el egy másik zsírsavtól, újabb lipidgyököt létrehozva, ő maga pedig lipidperoxiddá (lipid-hidroperoxid) alakul [11]. Bár a lipid-hidroperoxid nem gyökös molekula, kiindulásul szolgálhat egyéb reaktív gyökök (pl. peroxilgyök vagy epoxil-allil-peroxil-gyök) keletkezéséhez [12]. A „swim-up” technika alkalmazásával szignifikánsan alacsonyabb lehet az apoptotikus és elhalt spermiumok száma a sűrűség gradiens centrifugáláshoz viszonyítva, ráadásul a magasabb hőmérsékleten történő (35 °C) inkubáció megnövelheti a két módszer között tapasztalt különbségeket [8]. Mindazonáltal fontos külön megemlítenünk, hogy a sűrűség gradiens centrifugálás esetében a ROS-képződési folyamat nagymértékben függ a megválasztott centrifugálási időtől, azzal egyenes arányban nő, nem túl hosszú centrifugálás esetén a ROS-képződés csak kismértékű [13], ne-



1. ábra: Spermiumszeparálási technikák

A: sűrűség gradiens centrifugálás, B: „swim-up” technika, C: hialuronát-specifikus szeparálás, D: mágneses spermium szeparálás, E: mikrofluiditáson alapuló spermium szeparálás, F: elektroforetikus spermiumszeparálás

gativ hatást nem fejt ki a spermiumok életfolyamataira [14]. Mindezek mellett olyan publikációk is napvilágot láttak, amelyek megkérdőjelezzik az összefüggést a centrifugálás és a ROS-képződési folyamatok között, sőt pont a centrifugálás eliminálhatja a ROS-okat [15].

Analitikai eljárások

CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

A számítógép-asszisztált spermianalízis már több mint 40 éves múltra tekint vissza, lényege, hogy a mikroszkóp által rögzített fotókat egy számítógépes algoritmus kiértékel, rendkívül felgyorsítva a diagnosztikai eljárást. Alapja a szinte minden laboratóriumban elérhető fénymikroszkóp (fáziskontraszt-mikroszkóp), vagy valamilyen fluoreszcens mikroszkóp. A CASA-rendszerek segítségével meghatározható a mintában a spermiumok koncentrációja, motilitása, morfológiája, a minta pH-ja, a mintában lévő leukociták aránya, a spermiumok életképessége, acrosoma reakciója, illetve a sejtek DNS-fragmentáltsága [16, 17]. Napjainkban már teljesen automatizált formában is létezik, mindösszesen a minta előkészítéshez és festéshez szükséges manuális munka. Talarczyk-Desole és mtsai 2017-es munkájukban [18] összehasonlították a hagyományos analitikai módszert a CASA-rendszerrel és a legtöbb vizsgált paraméternél szignifikáns eltérést tapasztaltak a két módszer között, ráadásul a szórás a CASA-méréseknél sokkal nagyobb volt. Habár kisebb-nagyobb fejlesztések még ráférnek a CASA-rendszerre, de ettől eltekintve nagy segítségére lehet minden IVF-labornak. A DNS-fragmentáció meghatározáshoz az egyik legjobb eszköz.

Áramlási citometria

Az áramlási citometriás mérések során egy sejtpopuláció valamilyen fiziko-kémiai tulajdonságát vizsgáljuk. A vizsgálandó sejteket szuszpendálják egy hordozó folyadékban, majd a mintát úgy fókuszálják, hogy egyszerre egy sejt haladjon el egy lézernyaláb előtt, így másodpercek alatt több ezer individuális sejt vizsgálható. A vizsgálandó sejtpopuláció fluoreszcensen jelölhető, így a lézer előtt elhaladó sejtek (az azon lévő fluorofór) először fényt nyelnek el, gerjesztett állapotba kerülnek, majd egy meghatározott hullámhossz-tartományban fényt emittálnak, ami detektálható. Spermiumok esetén a módszer alkalmas szex-determinációra is, kihasználva az X- és Y-kromoszómák eltérő DNS-tartalmát. A nagyobb méretű X-kromoszómához több fluoreszcens jelölő (Hoechst 33342) kötődik, mint a kisebb Y-hoz, így UV-gerjesztést követően az X-szexkromoszómát hordozó spermiumok több fluoreszcens fényt emittálnak. Ráadásul a két kromoszómatípusú spermium eltérő elektromos töltésű lesz, ezáltal szeparálhatóak egymástól [19].

Ezen felül az áramlási citometria alkalmas lehet egy CASA-rendszer kiváltására is (sőt, messze felülmúlja azt), mert rendelkezésre áll számos olyan fluorofór, amivel vizsgálható a spermiumoknak gyakorlatilag bármilyen tulajdonsága. A csökkent életképességű, apoptotizáló, nekrotizáló spermiumok esetében lecsökken a plazmamembrán permeabilitása, aminek köszönhetően a propidium-jodid jelölőmolekula be tud jutni ezekbe a sejtekbe és fluoreszcensen detektálhatóak. Ugyan ezzel a módszerrel kimutatható a DNS fragmentáltságának mértéke is [20]. Számos szignáltranszdukciós molekula mellett egyik jellemzője az apoptózisnak a foszfatidil-szerin áthelyeződése a foszfolipid kettősréteg belső rétegéből a külsőbe, aminek köszönhetően egy annexin V nevű jelölőhöz konjugált fluorofórral könnyen azonosíthatóak az ilyen sejtek [21]. Az örökítő anyagban bekövetkező sérülések, mutáció, fragmentáció gyakran visszavezethető a ROS-okra és oxidatív stresszfolyamatokra. Napjainkban már a legtöbb ROS kimutatására speciális fluorofór vásárolható, az intracelluláris peroxidok a dihidrorodamin 123 jelölővel, a szuperoxid a dihidroetidinnel, a teljes intracelluláris ROS-mennyiség pedig 2'7'-diklorofluo-rescein-diacetáttal mutatható ki [22, 23]. Ahhoz, hogy a petesejt megfelelően termékenyüljön, a hímivarsejteknek át kell esniük a kapacitáción, fel kell ismerniük a zona pellucidát és kötődniük ahhoz, illetve végbe kell mennie az acrosomareakciónak. Az acrosomareakció során számos olyan strukturális változás megy végbe az acrosomamatrixban, amelyeknek köszönhetően a fluorofórral konjugált próbák képesek hozzáférni az ott elhelyezkedő mannózhoz és galaktózhhoz [21]. Mivel a próbák nem képesek átjutni az intakt acrosomán, így csak az aktivált spermiumok és a sérült spermiumok jelölődnek, viszont a sérült spermiumok kiszűrhetőek egy kettős jelöléssel (propidium-jodid).

Raman-spektroszkópia

A Raman-spektroszkópia egy nem invazív, nem romboló kémiai elemzési technika, amely részletes információt nyújt egy molekula kémiai szerkezetéről, fázisáról, vagy akár a molekuláris kölcsönhatásokról. Ennek alapja a fény és az anyagon belüli kémiai kötések kölcsönhatása. A Raman-spektroszkópia egy fényszórási technika, amely során a molekula szétszórja a nagy intenzitású lézerefényforrásból származó fényt. A szétszórt fény nagy része ugyanolyan hullámhosszon (energiával vagy színben) marad, mint a lézereforrás, és nem nyújt hasznos információt – ezt Rayleigh-szórásnak hívják –, azonban kis mennyiségű fény (általában 0,0000001%) különböző hullámhosszon (energiával vagy színben) szóródik, amit Raman-szórásnak hívnak. Ily módon molekulák vibrációs ujjlenyomatát vehetjük fel és azonosíthatunk bármilyen változást az adott molekulában. DNS-fragmentáció esetén alkalmas a nukleotid bázisok megváltozott dimerizációjának kimutatására, illetve a fehérje-DNS-interakciók megváltozásának kimutatására [24].

Szelekciós eljárások

Az áramlási citometria szolgálhat mind analitikai módszerként, mind pedig szelekciós eljárásaként is, ahogy ezt már fentebb ismertettük, ebből kifolyólag nem szeretnénk újra bemutatni ebben a fejezetben is.

Mágneses spermiumszeparálás

Az előzőekben már tárgyaltuk, hogy az apoptotikus sejtek könnyen azonosíthatóak annexin V jelölést követően, e nélkül szimplán morfológiai alapon sajnos azonosíthatatlanok. A MACS (magnetic-activated cell sorting) spermiumszeparáló rendszerben 50 nm-es mágnesgyöngyöket kapcsoltak az annexin V jelölőhöz, egy rövid inkubációt követően a jelölő bekötődik az apoptotikus sejtekhez, majd mágneses térben átfolyatva a mintát az apoptotikus sejtek megkötődnek egy elválasztó oszlopon, így csak a normális, jó minőségű sejtek jutnak tovább (1. ábra). A szeparációs technika alkalmazását követően növekszik a mintában a normál morfológiájú sejtek aránya, javul a sejtekben mérhető mitokondriális membránpotenciál, javul a sejtek motilitása és csökken a DNS-fragmentáció mértéke [25, 26]. Sőt, MACS-kezelést követően a fagyasztott spermiumok túlélési aránya is javul [27]. Mindezek eredményeként szignifikánsan emelkedhet az embriók osztódási rátája, minősége, valamint a biokémiai- és klinikai terhességi ráták [28, 29]. Esbert és mtsai [30] a szeparáló oszlopon visszamaradt apoptotikus sejteket összehasonlították az átfolyt, jó minőségű sejtekkel és azt tapasztalták, hogy a vizsgált 17 kromoszóma mindegyikénél magasabb volt az abnormalitások aránya az oszlopon visszatartott mintában. Az országban elsőként sikerült intézetünknek bevezetni a MACS-szeparálási rendszert és bár a jelenlegi csekély esetszám miatt saját eredményeinket még nem tudjuk publikálni, de több ponton is meg tudjuk erősíteni a szakirodalomban olvasottakat.

Mikrofluiditáson alapuló spermiumszeparálás

A konvencionális preparációs eljárások során alkalmazott centrifugális erő – mint korábban tárgyaltuk – oxidatív stresszfolyamatokat, DNS-fragmentációt indukálhat. Ezt kiküszöbölendő születtek a mikrofluiditáson alapuló spermiumszeparációs lemezek, amelyek az oviductus felépítését, szerkezetét próbálják leutánozni, így csak a legjobb motilitással rendelkező, legjobb minőségű spermiumok képesek elérni és átjutni a lemezen található membránon (1. ábra). Ennek köszönhetően a szeparátorral nyert minta DNS-fragmentációs indexe szignifikánsan alacsonyabb a kiindulási mintához viszonyítva, mivel csak a legjobb motilitású sejtek képesek megfelelően áthaladni a lemezen, így a kezelt mintában a spermiumok motilitása megközelíti a 95-96%-ot, illetve javul a sejtek morfológiája is, azonban a sejszám lecsökken [31, 32].

Hialuronát-specifikus kötődést alkalmazó szelekciók

Az ICSI-hez használt PVP-vel (polivinilpirrolidon) kapcsolatban több aggály is felmerül. Több „mellékhatása” is ismeretes a PVP-nek, úgy, mint a spermiumokat körülvevő membrán sérülése, az acrosomareakció megváltozása, csökkent fertilitáció, osztódás, blasztoméra szám és klinikai terhességi ráta [33]. Mindazonáltal kevés alternatíva létezik a spermiumok immobilizációjára, viszont számos pozitív eredményt publikáltak a hialuronátot tartalmazó oldatokkal kapcsolatban. A hialuronát egy háromdimenziós hálót képez, amelyhez a hialuronátreceptorral rendelkező érett spermiumok bekötődnek, lelassulnak; a receptorral nem rendelkező éretlen spermiumok továbbra is szabadon mozoghatnak (1. ábra). A PVP alkalmazásával összehasonlítva több mint felére csökken a DNS-fragmentáció mértéke, megnő a jó minőségű embriók aránya, az embriók osztódási rátája, illetve a terhességi ráta is [34]. Ugyanezen az elven működik – gyakorlatilag az összes intézetben használt – PICSI (pre-szelektív ICSI) is, ahol nem egy médium tartalmazza a hialuronátot, hanem az egy speciális Petri-csészére van feljuttatva. PICSI esetén is az előzőekhez hasonló eredményeket publikáltak, ráadásul minél magasabb a vizsgált mintában a hialuronát bekötődési arány, annál markánsabb a különbség a módszerek között [35–37]. Sajnálatos módon nem ennyire egyértelmű a PICSI-módszer használata, Avalos-Durán [38] több ezer vizsgálatot áttekintő szisztematikus review munkájában nem talált szignifikáns különbséget az ICSI és PICSI között. Megegyező eredményt publikáltak Miller és mtsai is [39].

Elektroforetikus spermiumszeparálás

Az elektroforézis töltött részecskék vándorlása elektromos erőter hatására. A DNS gélen történő szétválasztása is ezen a módszeren alapszik. A konstrukció két elektródból, egy pozitív anódból és egy negatív katódból épül fel, amelyek között két kamra helyezkedik el, egy inokulációs a beinjektált mintának és egy szeparációs a „végterméknek”, a két kamra között pedig egy szeparációs poliakrilamid membrán (1. ábra). Elektromos erőter határa a spermiumok az anód felé indulnak el, áthaladva a szeparációs membránon, amely visszatartja a leukocitákat, neutrofileket, egyéb sejttermeléket. Alkalmazásával kiküszöbölhetjük a centrifugálásból adódó ROS-képződést, aminek köszönhetően csökken a spermiumok DNS-fragmentáltsága, javul az életképességük [40, 41]. A módszer hátránya, hogy a beállításokra nagyon érzékeny, ha az alkalmazott erőter túl nagy vagy túl hosszú ideig alkalmazzuk, akkor szuperoxid-gyököt generálhat a mintában, oxidatív stresszfolyamatokat indukálva, ami ahelyett, hogy csökkentené a DNS-fragmentáció mértékét, növelni fogja azt [41].

Következtetések

Az előzőekben több minta feldolgozási módszert, diagnosztikai eljárást és szeparációs technikát tárgyaltunk. Talán az már mindenki számára egyértelmű, hogy amikor egy beültetésre váró embriót vizsgálunk, annak genetikai hátterét, aneuploidiját, akkor a befolyásoló faktorok között nem csak az anyai életkort, a helytelenül megválasztott és kivitelezett embriómanipulációt kell keresnünk. A nem megfelelő spermiumkezelés legalább ennyire fontos faktor lehet és hozzájárulhat a képződő embrió(k) kromoszómális abnormalitásaihoz. Napjainkra számos diagnosztikai módszer rendelkezésre áll (CASA, fluoreszcens mikroszkópia, áramlási citometria, Raman-spektroszkópia), amelyekkel a spermiumok különféle paraméterei vizsgálhatóak (pl. DNS-fragmentáció), az alkalmazott módszernek gyakorlatilag csak az ár-érték arány szab határt, illetve nyilván az, hogy néhány esetben speciális képzettség kell a módszer kivitelezéséhez. Mindemellett számos szeparációs technika is rendelkezésre áll, amelyekkel csökkenthető a felhasznált spermiumok DNS-fragmentációs indexe (mikrofluiditáson alapuló szeparálás, mágneses szeparálás, elektroforetikus szeparálás vagy hialuronát-specifikus kötődést alkalmazó szeparációs technikák). Ha ezeket a módszereket megfelelően alkalmazzuk, akkor egy konvencionális ICSI-hez viszonyítva egy-egy intézet több százalékkal is növelhetné a sikeres terhességek számát, amely éves szinten országunkban akár több százal több gyermek megszületését eredményezhetné.

A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

IRODALOM

- Periyasamy AJ, Mahasampath G, Karthikeyan M, et al. Does duration of abstinence affect the live-birth rate after assisted reproductive technology? A retrospective analysis of 1,030 cycles. *Fertil Steril* 2017; 108: 988–992.
- Ayad BM, Horst GV, Plessis SSD. Revisiting The Relationship between The Ejaculatory Abstinence Period and Semen Characteristics. *Int J Fertil Steril* 2018; 11: 238–246.
- Shen ZQ, Shi B, Wang TR, et al. Characterization of the sperm proteome and reproductive outcomes with in vitro, fertilization after a reduction in male ejaculatory abstinence period. *Mol Cell Proteomics* 2019; 18: S109–S117.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization; 2010.
- Appell RA, Evans PR, Blandy JP. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. *Br J Urol* 1997; 49: 751–756.
- Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl* 2010; 12: 753–759.
- Hahn K, Failing K, Wehrend A. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Vet Res* 2019; 15: 355.
- Thijssen A, Klerkx E, Huyser C, et al. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 436–442.
- Agarwal A, Plessis SSD, Durairajanayagam D, et al. Strategies to Ameliorate Oxidative Stress during Assisted Reproduction; Berlin/Heidelberg: Germany: Springer; 2014. p. 7.
- Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem Phys Lipids* 2008; 153: 47–56.
- Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39: 1529–1542.
- Wang G, Hong Y, Johnson MK, et al. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*. Protective roles of peroxiredoxins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1596–1603.
- Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol* 1995; 28: 31–35.
- Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients Percoll and BoviPure: Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 2017; 17: 126–132.

- Takehima T, Yumura Y, Kuroda S, Kawahara T, Uemura H, Iwasaki A. Effect of density gradient centrifugation on reactive oxygen species in human semen. *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63: 192–198.
- Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis CASA: capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014; 81: 5–17.
- Larsen L, Scheike T, Jensen TK, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* 2000; 15: 1562–1567.
- Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, et al. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?. *Ginek Pol* 2017; 88: 56–60.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, et al. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* 2005; 72: 273–279.
- Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, et al. Analysis of DNA fragmentation using propidium iodide PI staining after ethanol fixation. *CSH Protoc* 2006. pdb.prot4431.
- Barroso G, Alvarez A, Valdespin C. Sperm Flow Cytometry: Beyond Human Fertilization and Embryo Development. In *Flow Cytometry—Select Topics*; InTech: London, UK, 2016.
- Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leuko Biol* 1994; 55: 253–258.
- Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochim Biophys* 1993; 302: 348–355.
- Da Costa R, Amaral S, Redmann K, et al. Spectral features of nuclear DNA in human sperm assessed by Raman Microspectroscopy: Effects of UV-irradiation and hydration. *PLoS One* 2018; 13: e0207786.
- Aziz N, Said T, Paasch U, et al. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; 22: 1413–1419.
- de Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonens D, et al. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 1.
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, et al. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 99–104.
- Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, et al. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 375–381.
- Sheikhi A, Jalali M, Gholamian M, et al. Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. *Andrology* 2013; 6: 845–849.
- Esbert M, Godo A, Soares SR, et al. Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. *Andrology* 2017; 5: 807–813.
- Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018; 33: 1388–1393.
- Parrella A, Keating D, Cheung S, et al. A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *J Assist Reprod Genet* 2019; 10: 2057–2066.
- Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod Med Biol* 2012; 11: 165–76.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, et al. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid HA favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010; 93: 598–604.
- Worriolow KC, Eid S, Woodhouse D, et al. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection ICSI: significant improvement in clinical outcomes – multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2013; 28: 306–314.
- Mokánszki A, Tóthné EV, Bodnár B, et al. Is sperm hyaluronic acid binding ability predictive for clinical success of intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. ICSI? *Syst Biol Reprod Med* 2014; 60: 348–354.
- Oseguera-López I, Ruiz-Díaz S, Ramos-Ibeas P, et al. Novel techniques of sperm selection for improving IVF and ICSI outcomes. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7: 298.
- Avalos-Durán G, Cañedo-Del Ángel AME, et al. Physiological ICSI PICSI vs. conventional ICSI in couples with male factor: A systematic review. *JBRA Assist Reprod* 2018; 22: 139–147.
- Miller D, Pavitt S, Sharma V, et al. Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment HABSelect: a parallel, two-group, randomised trial. *Lancet* 2019; 393: 416–422.
- Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 2261–2270.
- Aitken RJ, Hanson AR, Kuczera L. Electrophoretic sperm isolation: optimization of electrophoresis conditions and impact on oxidative stress. *Hum Reprod* 2011; 26: 1955–1964.