

PICSI®-Schale und SpermSlow™-Medien

Steven Fleming PhD

Direktor der Embryologie, CooperSurgical

Einführung

Der Weg zur normalen Befruchtung *in vivo* und *in vitro* wird eng von der Oozyte und den sie umgebenden Follikelzellen, der *Corona radiata* und dem *Cumulus oophorus* überwacht, die zusammen auch als Cumulus-Oocyten-Komplex (COC) bezeichnet werden. Um diesen Weg erfolgreich zu bewältigen, benötigen lebensfähige Spermatozoen ausreichende Beweglichkeit, um zum COC zu gelangen und eine geeignete Morphologie und Physiologie zur Bindung an die *Zona pellucida* (ZP), um diese zu durchdringen sowie die anschließende Bindung an das Oolemma, um mit diesem zu verschmelzen und die Oozyte zu aktivieren. Sobald die Oozyte aktiviert ist, bildet sie die männlichen und weiblichen Pronuklei, die die genetischen Beiträge der Gameten zum Zygoten enthalten und beginnt mit der Teilung zur Bildung eines Embryos. Gleichzeitig ist die Oozyte dafür verantwortlich, die komprimierte Chromatinstruktur im männlichen Pronukleus zu entwirren und etwaige geschädigte DNA rechtzeitig für die Aktivierung des embryonalen Genoms bis zur 8-Zell-Teilungsphase zu reparieren, was eine weitere Entwicklung bis zum Blastozysten-Stadium ermöglicht. Im Wesentlichen haben sich diese Mechanismen entwickelt, um sicherzustellen, dass eine normale Oozyte von einem normalen Spermatozoon befruchtet wird und somit die Wahrscheinlichkeit steigt, dass eine Blastozyste über ausreichende Lebensfähigkeit verfügt, um sich einzunisten und eine fortlaufende Schwangerschaft mit einer gesunden Lebendgeburt die Folge sein kann.

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wurde eingeführt, um unfähigen Spermatozoen zu ermöglichen, deren Einschränkungen bei der Befruchtung von Oozyten zu umgehen. Dabei umgeht sie jedoch die Torwächter der Oozyten, die normalerweise dazu beitragen würden, die Qualität der Spermien zu überprüfen. ICSI-Operateure müssen die Rolle der Oozyte in der Qualitätskontrolle der Spermien übernehmen, können sich aber nur auf die Spermienbeweglichkeit und -morphologie stützen, die nur wenig über die genomische Integrität der Spermien aussagt. Tatsächlich weisen selbst morphologisch normale Spermatozoen bei Männern mit Oligoasthenoteratozoospermie höhere Aneuploidieraten¹ auf. Daher wurden verschiedene Techniken entwickelt, um genetisch gesunde Spermatozoen besser zu identifizieren. Eine dieser Methoden, ursprünglich als physiologische ICSI² bezeichnet, basiert auf der unterschiedlichen Bindung von Spermatozoen an das natürlich vorkommende Glycosaminoglykan, Hyaluronan (HA), auch als Hyaluronat oder Hyaluronsäure bekannt.

Biologische Grundlage für die Spermienauswahl unter Verwendung von Hyaluronan

Endogene HA ist ein Hauptbestandteil der Follikelflüssigkeit und des COC und kommt im gesamten weiblichen Fortpflanzungstrakt vor, von den Eileitern bis zum Gebärmutterhals³. Im Gegensatz zu anderen Glycosaminoglykanen ist HA nicht kovalent an ein Kernprotein gebunden, sondern wird an der Plasmamembran synthetisiert und existiert als freies Polysaccharid in der extrazellulären Matrix des COC.

Während der späten Spermiogenese geht der Restkörper durch eine zytoplasmatische Ausstoßung verloren, begleitet von einer reifungsbedingten Umgestaltung des Spermien-Plasmalemmas. Damit wird die Bildung spezifischer Bindungsstellen für ZP (Zona Pellucida) und HA (Hyaluronan) an der reifen Spermatozoen-Zellmembran⁴ ermöglicht. Tatsächlich ist das Hyaluronan-bindende Protein 1 (HABP1) auf den Spermatozoen vieler Arten vorhanden und beteiligt sich über seine Mannose-Reste an der Spermatozoen-Oozyte-Interaktion. Es wurde auch in Zusammenhang mit der Spermienbeweglichkeit⁵ gebracht. Tatsächlich führte diese Beziehung zur Entwicklung des Spermien-HA-Bindungstests (HBA)⁶. In dieser Hinsicht sind unreife Spermatozoen nicht in der Lage, sich an HA zu binden. Ihre verringerte Reife korreliert mit meiotischen Defekten, abnormer Spermienkopfmorphologie, verringerter Bindung an die ZP, erhöhter Lipidperoxidation und Fragmentierung der Spermien-DNA (SDF).⁷ Im Gegensatz dazu korreliert die Fähigkeit der Spermatozoen, sich an HA zu binden, mit ihrer Reife, verringerten Aneuploidien, erhöhter Chromatinintegrität und verringerter SDF. Die Unfähigkeit einer Bindung an HA könnte daher in Bezug auf beeinträchtigten reproduktiven Erfolg von Bedeutung sein, einschließlich von frühzeitigem Schwangerschaftsverlust, der mit SDF in Verbindung gebracht wird.⁸ Eine auf HA basierende Spermienauswahl sollte daher die klinischen Ergebnisse verbessern.

Hyaluronan-bindende Spermienauswahl

Zwei unterschiedliche, aber verwandte Ansätze wurden entwickelt, um die Spermienauswahl anhand ihrer Fähigkeit zur Bindung an Hyaluronan (HA) durchzuführen: die PICSI®-Schale (Abb. 1) und das SpermSlow™-Medium (Abb. 2).

Die PICSI®-Schale besteht aus Polystyrol und hat drei mikroskopische Punkte aus dehydriertem HA auf dem Boden der Schale, deren Position durch drei Pfeilspitzen auf der Außenfläche der Schale gekennzeichnet ist. Die Vorbereitung der PICSI®-Schale erfolgt bei Raumtemperatur kurz vor der Verwendung durch Rehydratation der HA-Mikropunkte mit einem geeigneten Medium (wie einem gepufferten HEPES/MOPS-Holding Medium) und einer Konzentration von 5 mg/ml⁻¹ Human Serum Albumin (HSA), das unmittelbar mit Mineralöl überzogen wird. Die Rehydratation und Schwellung der HA-Mikropunkte beginnt normalerweise nach fünf Minuten. Zu diesem Zeitpunkt können unterschiedliche Konzentrationen der Spermprobe am Rand jedes Mikropunkts hinzugefügt werden, so dass die Spermatozoen gezwungen sind, sich zum Mikropunkt hin zu bewegen, einem sekundären Auswahlparameter zur Optimierung der Spermienauswahl. Die Bindung der Spermien an HA kann sofort beobachtet werden, wobei die maximale Bindung nach 30 Minuten erfolgt. Da die PICSI®-Schale auch für die ICSI verwendet werden kann, ist es wichtig sicherzustellen, dass die PICSI®-Schale 37 °C erreicht hat, bevor die ICSI durchgeführt wird. Bei einer höheren Temperatur kann jedoch aufgrund einer größeren Spermienbeweglichkeit eine geringere Bindung der Spermien beobachtet werden. Die an HA gebundenen Spermien werden durch das Drehen des Kopfes an einer fixen Stelle aufgrund der Beweglichkeit des Schwanzes deutlich identifiziert und können leicht mit einer ICSI-Mikropipette aufgenommen werden. Nach der Übertragung in ein viskoses Medium kann die Spermienmorphologie vor dem Bruch des Spermien-Plasmalemmas und der Mikroinjektion in eine Oozyte beurteilt werden.

SpermSlow ist ein halbviskoses Medium, das eine hohe Konzentration von HA in Lösung enthält. Daher kann es sowohl für die Spermienauswahl als auch für die Manipulation vor der Mikroinjektion verwendet werden. Die Anordnung der ICSI-Schale mit SpermSlow erfolgt wie bei der Standard-ICSI-Schalen-Vorbereitung. Der einzige Unterschied besteht darin, dass ein Mikrotropfen SpermSlow und ein Mikrotropfen der Spermprobe mit dem gleichen Medium zusammengeführt wird, das für die ICSI verwendet wird, bevor es sofort mit Mineralöl überzogen wird.

Die Spermatozoen sind dann über das Verbindungsmedium gezwungen, sich zum SpermSlow hin zu bewegen. Diejenigen, die sich an HA binden können, bleiben im dreidimensionalen Netz von SpermSlow hängen. Diejenigen Spermatozoen, die frei durch das SpermSlow gelangen, werden somit ignoriert, während diejenigen, deren Vorankommen an der Grenzfläche zwischen SpermSlow und Verbindungsmedium gestoppt wird, ausgewählt und auf normale Morphologie überprüft werden, bevor sie für die Mikroinjektion manipuliert werden.



Abb. 1: Die PICSI®-Schale: Pfeilspitzen zeigen die Lage der drei HA-Mikropunkte an

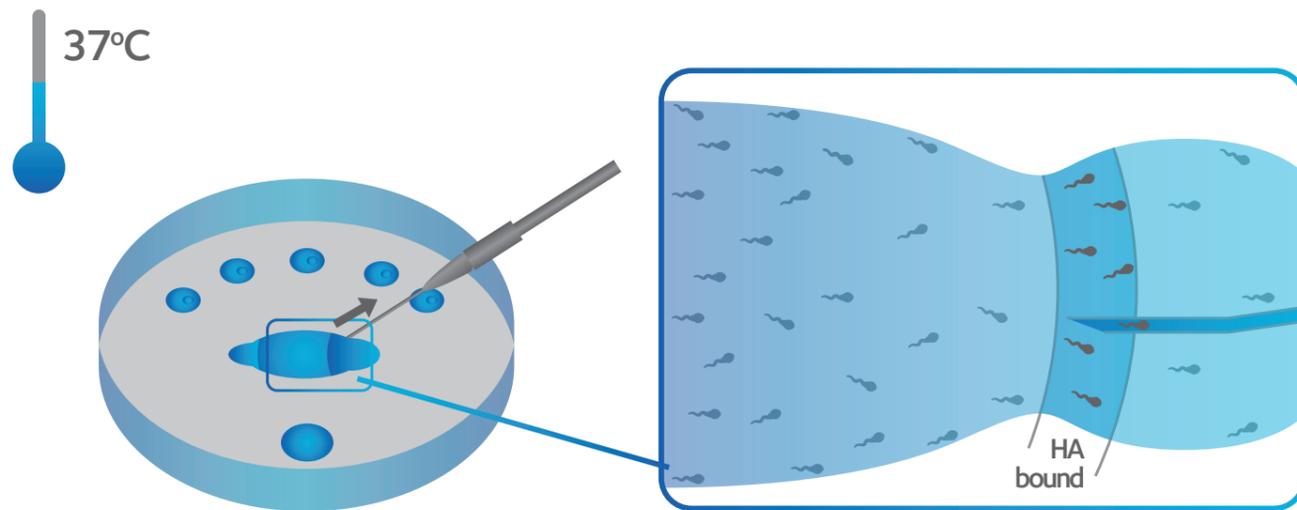


Abb. 2: Anordnung des SpermSlow™-Mediums: Spermienauswahl an der Schnittstelle mit Zusammenführungstropfen in der ICSI-Schale

Klinische Anwendung

In einer prospektiven, randomisierten Studie wurde die Anwendung von physiologischem ICSI und SpermSlow verglichen, wobei vergleichbare klinische Ergebnisse erzielt wurden, wie zu erwarten war. Jedoch dauerte das physiologische ICSI etwa drei Minuten länger als das SpermSlow-Verfahren.⁹ Die Ergebnisse von ICSI können zwischen verschiedenen, in Fachzeitschriften veröffentlichten Studien variieren, jedoch deutet der allgemeine Trend auf einen Vorteil der HA-basierten Spermienauswahl hin (Tabelle 1).

Bislang ist die HABSelect-Studie, die an 16 assistierten Reproduktionseinheiten in Großbritannien¹⁷ durchgeführt wurde, die größte und maßgeblichste prospektive, randomisierte Studie. Darin wurde aufgezeigt, dass physiologisches ICSI einen hochsignifikanten Einfluss auf einen der sekundären Endpunkte dieser Studie hatte, indem es die Fehlgeburtenrate (MR) bei

Patientinnen mit fortgeschrittenem Alter deutlich reduzierte. Angesichts des deutlichen Zusammenhangs zwischen HA-Bindung und der genomischen Integrität von Spermien sowie der bekannten Beziehung zwischen Spermien-DNA-Fragmentierung und Fehlgeburten, ist eine Verringerung der Fehlgeburtenrate durch physiologisches ICSI genau das, was zu erwarten wäre. Interessanterweise zeigte eine Untergruppenanalyse der HABSelect-Studie, dass die Fehlgeburtenrate stärker mit dem weiblichen Alter als mit der Hyaluronan-Bindungszahl (HBS) zusammenhängt.²³ Tatsächlich zeigte eine parallele mechanistische Analyse der Daten aus dieser Studie, dass physiologisches ICSI den typischen altersbedingten Rückgang der Lebendgeburtenrate bei ICSI herabmildern kann (Abb. 3).²⁴ Darüber hinaus zeigte die mechanistische Analyse, dass der Effekt des physiologischen ICSI mit der Qualität der Spermien-DNA zusammenhängt.

Veröffentlichung	Studiendesign	Zyklen	Primärer Endpunkt	Wichtigste Ergebnisse
Elraouf et al., 2023 ¹⁰	Vergleichend, nicht-randomisiert	200	FR, EQ, IR, CPR	Signifikant bessere EQ bei teratozoospermischen Patienten mit SpermSlow ($p=0,030$)
Emirdar et al., 2023 ¹¹	Vergleichend, nicht-randomisiert	2815	FR, EQ, MK, BPR, CPR, MR	Kein signifikanter Unterschied bei allen Endpunkten
Erberelli et al., 2017 ¹²	Vergleichend, nicht-randomisiert	56	FR, CR, CPR, MR	Signifikant höhere CPR bei PICSI ($p=0,009$)
Hasanen et al., 2020 ¹³	Prospektiv randomisiert (MACS/ICSI vs PICSI)	413	OPR	Trend zu höherer IR ($p=0,051$), CPR ($p=0,078$) und OPR ($p=0,097$) bei Patienten im Alter von 30-35 Jahren bei PICSI
Kim et al., 2020 ¹⁴	Längsschnittstudie, nicht-randomisiert	152	FR, EQ	Signifikant höhere FR ($p=0,001$) und bessere EQ bei PICSI
Liu et al., 2019 ¹⁵	Geschwister-Oozyten-Split-Kohorte	21	FR, Zeitablauf-Parameter	Signifikant niedrigere, abnormale FR ($p=0,017$) mit SpermSlow
Majumdar & Majumdar, 2013 ¹⁶	Prospektiv randomisiert	156	FR, EQ, IR, CPR, LBR, MR	Trend zu höherer MR bei ICSI vs. PICSI (25 % vs. 12 %, $p=0,227$)
Miller et al., 2019 ¹⁷	Multizentrische, parallele, zweigruppige, randomisierte Studie	2752	Vollzeit-LBR	Signifikant niedrigere MR bei PICSI ($p=0,003$)
Mokánszki et al., 2014 ¹⁸	Vergleichend, nicht-randomisiert zu ICSI (HBS >60 %) oder PICSI (HBS ≤60 %)	250	FR, IR, CPR, LBR, MR	Signifikant ($p<0,05$) höhere FR (HBS >60 %), IR (HBS ≤60 %), CPR (HBS >≤60 %), LBR (HBS ≤60 %) und niedrigere MR (HBS >≤60 %) bei PICSI
Nasr-Esfahani et al., 2008 ¹⁹	Geschwister-Oozyten-Split-Kohorte	50	FR, EQ	Signifikant höhere FR mit HA-selektierter ICSI ($p<0,05$)
Novoselsky Persky et al., 2021 ²⁰	Geschwister-Oozyten-Split-Kohorte	45	FR, EQ	Signifikant höhere FR ($p=0,008$) und bessere EQ ($p<0,01$) bei PICSI
Parmegiani et al., 2010 ²	Prospektiv randomisiert (nach italienischem Recht werden nur drei Oozyten injiziert)	232	FR, EQ, IR, CPR	Signifikant bessere EQ mit SpermSlow ($p=0,046$)
Scaruffi et al., 2022 ²¹	Längsschnittstudie, prospektiv, nicht-randomisiert	205	FR, CR, EQ, IR, CPR, LBR, MR	Signifikant höhere CR ($p=0,026$), bessere EQ ($p=0,034$), höhere CPR ($p<0,001$) und IR ($p<0,0001$) mit SpermSlow
Worilow et al., 2013 ²²	Multizentrische, randomisierte, kontrollierte Doppelblind-Studie	318 (HBS ≤65 %)	CPR	Signifikant niedrigere MR bei PICSI ($p=0,016$)

BPR: Biochemische Schwangerschaftsrate; CPR: Klinische Schwangerschaftsrate; CR: Teilungsrate; EQ: Embryo-Qualität; FR: Befruchtungsrage; HBS: Hyaluronan-Bindungswert; IR: Implantationsrate; LBR: Lebendgeburtenrate; MK: Morpho-Kinetik; MR: Fehlgeburtenrate; OPR: Fortlaufende Schwangerschaftsrate

Tabelle 1: Studien zum Vergleich der klinischen Ergebnisse von ICSI und HA-selektierter ICSI

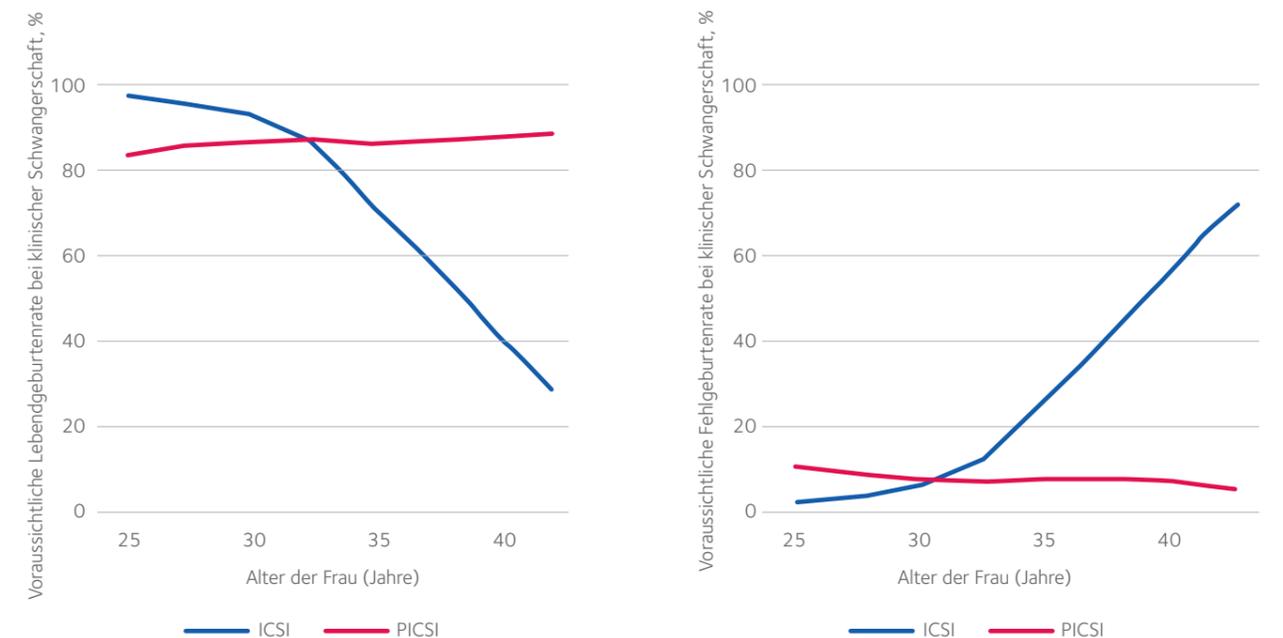


Abb. 3: Datenaggregiertes Modell zur Vorhersage der ICSI- und physiologischen ICSI-Lebendgeburtenrate in Abhängigkeit vom Alter

Zusammenfassung

Die normale Reifung der Spermien geht mit der Integrität des Genoms und der Bildung von Bindungsstellen mit HA (Hyaluronan) einher. Methoden wie physiologisches ICSI und das SpermSlow™-Medium nutzen diese Verbindung, um Spermien mit reduzierten SDF-Werten auszuwählen. Die Prävalenz von SDF nimmt mit dem Alter zu, und die Fähigkeit des Oozytes, geschädigte Spermien-DNA nach der Befruchtung zu reparieren, nimmt mit dem Alter ab. Die Spermienauswahl durch physiologisches ICSI reduziert signifikant die Fehlgeburtenrate und verbessert die Lebendgeburtenrate bei Paaren fortgeschrittenen Alters.

Literatur

1. Burrello, N. et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2298-2302.
2. Parmegiani, L. 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.
3. Salustri, A. et al. Hyaluronan und Proteoglykane in Ovarialfollikeln. *Hum Reprod Update.* 1999; 5: 293-301.
4. Cayli, S. et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 462-468.
5. Fouladi-Nashta, AA. et al. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction. *Reproduktion.* 2017; 153: R43-R58.
6. Huszar, G. et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003; 79 (Suppl 3): 1616-1624.
7. Jakab, A. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.* 2005; 84: 1665-1673.
8. Sakkas, D. & Alvarez, JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010; 93: 1027-1036.
9. Parmegiani, L. et al. 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. *Fertil Steril.* 2012; 98: 632-637.
10. Elraouf, AA. et al. Comparative study between SpermSlow™ hyaluronan and traditional sperm selection in ICSI outcome. *Zygote.* 2023; 31: 180-187.
11. Emirdar, V. et al. Influence of a hyaluronan-binding system for sperm selection in intracytoplasmic sperm injection cycles on embryo morphokinetic parameters and in vitro fertilization cycle outcomes. *Arch Gynecol Obstet.* 2023 (im Druck).
12. Erberelli, RF. et al. Hyaluronan-binding system for sperm selection enhances pregnancy rates in ICSI cycles associated with male factor infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2017; 21: 2-6.
13. Hasanen, E. et al. PICSI vs. MACS for abnormal sperm DNA fragmentation ICSI cases: a prospective randomized trial. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37: 2605-2613.
14. Kim, SJ. et al., 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. *Gynecol Endocrinol.* 2020; 36: 456-459.
15. Liu, Y. et al. Intracytoplasmic sperm injection using hyaluronic acid or polyvinylpyrrolidone: a time-lapse sibling oocyte study. *Hum Fertil.* 2019; 22: 39-45.
16. Majumdar, G. & Majumdar, A. A prospective randomized study to evaluate the effect of hyaluronic acid sperm selection on the intracytoplasmic sperm injection outcome of patients with unexplained infertility having normal semen parameters. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30: 1471-1475.
17. Miller, D. et al. Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): a parallel, two-group, randomised trial. *Lancet.* 2019; 393: 416-422.
18. Mokánszki, A. 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.
19. Nasr-Esfahani, MH. et al. Evaluation of sperm selection procedure based upon hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25: 197-203.
20. Novoselsky Persky, M. et al. Conventional ICSI vs. physiological selection of spermatozoa for ICSI (picsi) in sibling oocytes. *Andrology.* 2021; 9: 873-877.
21. Scaruffi, P. et al. Hyaluronic acid-sperm selection significantly improves the clinical outcome of couples with previous ICSI cycles failure. *Andrology.* 2022; 10: 677-685.
22. Worrilow, KC. 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.
23. Kirkman-Brown, J. et al. Sperm selection for assisted reproduction by prior hyaluronan binding: the HABSelect RCT. Efficacy and Mechanistic Evaluation. 2019; 6: 1-110.
24. West, R. et al. Sperm selection with hyaluronic acid improved live birth outcomes among older couples and was connected to sperm DNA quality, potentially affecting all treatment outcomes. *Hum Reprod.* 2022; 37: 1106-1125.



Steven Fleming PhD

Dr. Steven Fleming ist der Direktor für Embryologie bei CooperSurgical Fertility Solutions. Zuvor war er Gründungsdirektor von Assisted Conception Australia und Senior Fellow an der University of Queensland. Nach Abschluss seines Doktorats im Jahr 1987 forschte er als Postdoktorand am Royal North Shore Hospital in Sydney. Von 1993 bis 1997 war er als Dozent für Geburtshilfe und Gynäkologie an der University of Nottingham in England tätig, wo er zusammen mit Dr. Simon Fishel den weltweit ersten Master-Studiengang in assistierter Reproduktionstechnologie etablierte. Von 1998 bis 2008 war Steven Fleming wissenschaftlicher Direktor des Westmead Fertility Centre in Sydney und wurde zum Senior Lecturer in Geburtshilfe und Gynäkologie ernannt. Anschließend war er ehrenamtlicher Mitarbeiter in der School of Medical Sciences an der University of Sydney. Er ist Empfänger zahlreicher Forschungszuschüsse und Autor sowie Herausgeber mehrerer Bücher, Buchkapitel und Fachartikel. Stevens Forschungsinteresse gilt unter anderem der Kryokonservierung, der endometrialen Physiologie sowie Endometriose und Oozytenreifung.

