

Spermium izolálási technikák összehasonlító vizsgálata

NAGY BÁLINT DR., CORRADI GYULA DR., PULAY TAMÁS DR.,
GIMES REZSŐ DR., CSÖMÖR SÁNDOR DR.

A Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Női Klinikája (igazgató: Csömör Sándor dr., egyetemi tanár) és Urológiai Klinikája (igazgató: Frang Dezső dr., egyetemi tanár)¹ közleménye

Összefoglalás: a szerzők 35 férfi ondóját (15 normozoospermiás és 20 oligozoospermiás) vizsgálták meg a hagyományos sperma paraméterekre, majd három spermium izolálási technikával (egyszeri felülúsztatás, kétszeri centrifugálás és azt követő felülúsztatás, és a nátrium hialuronátos kezelés) nyert spermiumok számát, motilitását és morfológiáját hasonlították össze. A spermium izolálási technikák közül a nátrium hialuronátos (Sperm Select) kezelést találták a legalkalmasabbnak a nagyszámú, jó motilitású és morfológiájú spermiumok izolálására. A szerzők javasolják a fenti technikák valamelyikének bevezetését a rutin andrológiai és megtermékenyítő-képességi vizsgálatok sorába.

Kulcsszavak: spermium, felülúsztatás, centrifugálás, izolálás

A spermiumok izolálását számos kórkép kezelésére használjuk, az oligozoospermia, a retrograd ejakuláció, a hypospadiasis, a vaginizmus, a cervikális nyák hiánya, a sperma-antitestek okozta immunológiai eredetű meddőség, a sperma plazma kóros összetétele, a pszichológiai eredetű és gyógyszerfüggő impotencia, nem beszélve az in vitro fertilizáció (IVF) és gaméta intrafallopian transferről (GIFT), amely programok csak a tápoldattal előkezelt spermiumok felhasználásával működhetnek. A genitális traktuson végighaladó spermiumok mentesek lesznek a sperma plazmától és megtermékenyítésre alkalmas állapotba kerülnek, vagyis a kapacitáció és az akroszóma reakció lezajlik. A sperma plazma olyan anyagokat tartalmaz, amelyek gátolják a kapacitációt [4] vagy mint a prosztaglandinok, a méh izomzatának görcsös összehúzódását okozzák. Kimosásukra, eltávolításukra gyakran alkalmazzák a human és az állatorvosi gyakorlatban is a tápoldattal való centrifugálást, a szűréseket, a migrációs eljárásokat [11,12,19]. Mortimer és Templeton 0-22.000 spermium jelenlétét detektálták a méh üregében közösülés után [16], a különböző spermium izolálási technikákkal ennél jóval magasabb sejtszámú oldat juttatható a méh üregébe, s növelhető a megtermékenyítés esélye, in vitro megtermékenyítéshez legalább 200.000 spermium /petesejt szükséges

Gyakran alkalmazott módszer a tápoldattal való mosás és centrifugálás. Az irodalomban eltérőek a vélemények, Jones szerint az intracelluláris organellumok a spermiumokban károsodhatnak [9] ekkor, Makler és Jakobi viszont azt állítja, hogy az alacsony fordulatszámon történő centrifugálás nem befolyásolja a motilitást és a túlélést [13]. Mindenesetre az ilyen kezeléseknél nagyarányú a veszteség a sejtszámban, az eredeti 0,1-0,2—ed részére csökken a mozgó sejtek aránya [7].

Vannak olyan migrációs eljárások, amelyek nagyobb mozgó spermium arány kinyerését teszik lehetővé. Ilyenek az albumin oszlopos elválasztások, a human nyákban való penetráltatás és az utóbbi időben került

alkalmazásra a nátriumhialuronátos elválasztás. Az utóbbi anyag a human cervikális nyákot utánozza, széles felépítésű, a viszkozitása magas és így csak a jó motilitású és szerkezetű spermiumok képesek benne a felhatolásra. Penetrációs tesztként is alkalmas a felhasználásra.

Vizsgálataink során háromféle laboratóriumi technikát alkalmaztunk, a tápoldatban való felülúsztatást, a kétszeri centrifugálást követő felülúsztatást és a nátrium hialuronátos kezelés után kapott eredményeket hasonlítottuk össze.

Anyag és módszer

35 férfi ondóját vizsgáltuk meg, a besorolást a WHO előírásainak megfelelően végeztük el [20]. Az ondót öt nap carientia után onaniációval ürítették a betegek, majd félóra elfolyósodási idő után a sejtszámot, motilitást, szerkezetet, biokémiai vizsgálatokat elvégeztük.

Felülúsztatásos módszer, 1 ml spermára 0,75 ml Ham's F—10 tápoldatot (Seromed, NSZK) 10% fótálsavóval kiegészítve rétegeztünk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Kétszeri centrifugálás és felülúsztatás, 1 ml spermához 3 ml 10%-os fótálsavóval kiegészített Ham's F—10 tápoldatot mértünk, majd összekeverés után lecentrifugáltuk 500 g-vel 10 percig, majd a csapadékot 3 ml tápoldatba vettük fel, a centrifugálást megismételtük. A felülúsztot leszívtuk, majd 0,75 ml tápoldatot rétegeztünk óvatosan a csapadékra és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, itt a sperma plazmától tökéletesen megtisztul az anyag.

Nátrium hialuronátos kezelés (Sperm Select, Pharmacia, Svédország), 1 ml spermára 0,5 ml 1 mg/ml nátrium hialuronátot tartalmazó Ham's F-10 oldatot rétegeztünk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Mind a három eljárás után meghatároztuk a sejtszámot, motilitást és morfológiát, az adatokat BMDP programcsomag segítségével dogoztuk fel, a szignifikancia szintjét $P=0,05$ értékben határoztuk meg [6].

Eredmények

A három spermium szétválasztási módszerrel kapott eredményeinket az I. táblázat mutatja. A felülúsztatá-

I. táblázat
A különböző spermápreparálási eljárások összehasonlítása

A vizsgált paraméter	Felül- úsztatás	2×centrifu- gálás és felülúsz- tatás	Hialuronát kezelés
Sejtszám (millió/ml)	0,1–2,0	0,1–2,0	0,2–4
Motilitás (%)	40–50	40–50	70–80
Morfológia (%)	40–50	40–50	50–60
Normozoospermia (20–30 millió spermium/ml)			n=15
Sejtszám (millió/ml)	0,5–2,0	0,1–2,0	0,5–15
Motilitás (%)	70–90	70–80	80–95
Morfológia (%)	70–80	70–80	80–90
Oligozoospermia (10–20 millió spermium/ml)			n=15
Sejtszám (millió/ml)	0–0,25	0	1,0–2,0
Motilitás (%)	30–50	0	40–50
Morfológia (%)	30–40	0	50–60

Oligozoospermia (10 millió spermium/ml) n=5

A két felülúsztatási módszer és a hialuronát kezelés között minden paraméterben és mind a 3 csoportban lényeges különbségek adódtak ($p=0,05$)

sos technika esetében a 20 millió/ml-nél nagyobb sejtszám esetében az eredeti szám tizede, huszada nyerhető vissza, a motilitásban és a morfológiában 10–20%-os javulás érhető el. Az oligozoospermias csoportban rosszabbak az eredmények mind a mozgó spermiumok számában, mind azok minőségében. A kétszeri centrifugálás és az azt követő felülúsztatás után az eredmények az előzőekkel megegyezőek, itt a sperma-plazmától a tökéletes elválasztás az előny.

A harmadik módszer a nátrium hialuronátos kezelés, amellyel meglepően jó eredményeket értünk el. Legalább 50%-kal több mozgó spermiumot nyertünk vissza, mint az előző két módszerrel, a jól mozgó sejtek aránya és szerkezete is kedvezőbb.

A vizsgált három elválasztási technikánál a nátrium hialuronátos kezelés bizonyult a legjobbnak, de volt olyan ondó amelynél ezzel a módszerrel sem sikerült javulást elérni.

Megbeszélés

A spermiumok a genitális traktuson való áthaladás során olyan érési folyamaton mennek keresztül, hogy alkalmassá válnak a megtermékenyítésre. A sperma plazma jelenléte gátolja a spermium membrán átrendeződését, így az akroszóma reakciót, kapacitációt. A spermiumok izolálása a sperma plazmából és bizonyos adalék anyagok hozzáadásával segíti ezeket a folyamatokat, lehetővé teszi a jól mozgó spermiumok nagyarányú kinyerését és a petesejtekhez közelebb juttatását, de az in vitro fertilizáció, a gaméta intrafallopian transfer és más modern reprodukzív technikák csak ilyen eljárások után végezhetőek el. A különböző sperma előkészítő eljárások közül bizonyos esetekben a minőségjavítás, más esetekben a „tisztítási” funkció (sperma antitest, baktérium, baktérium toxin) áll előtérben. A sperma prezervációs technikák megválasztása során ezen érdekek egyeztetése szükséges. A várható ered-

mények előjelzésére egyre kevésbé használhatók a hagyományos módszerek. A spermiumok életképességéről is jó képet lehet nyerni, egyre inkább az a nézet van elterjedőben, hogy a hagyományos sperma kép nem ad elég felvilágosítást a spermiumok megtermékenyítő képességéről, s szükséges a funkcionális próbák elvégzése is (penetrációs tesztek, hypoozmotikus duzzadási teszt, 24 órás tápoldatban való túlélési próba). Funkcionális próbának tekintjük magukat az általunk használt szeparálási módszereket, u.n. próbádúsításokat. A legismertebb spermium izolálási, dúsítási módszerek a centrifugálás, felülúsztatás, szűrés, albumin oszlopon való elválasztás [1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 19].

A vizsgálataink során három spermium elválasztási technikát hasonlítottunk össze, három féle andrológiai csoportnál. A legtöbb jól mozgó spermium a nátrium hialuronátos (Sperm Select) felülúsztatás után nyerhető, a motilitás normozoospermiasok esetében 90–95%-ra növelhető, a sejtszám kb. 50%-al magasabb, mint a tápoldatba való felülúsztatás és a kétszeri centrifugálás után. A szerkezetben is jelentős javulás érhető el.

A nátrium hialuronát molekuláris felépítése a human nyákot szimulálja, a viszkozitása is hasonló, így a jó szerkezetű és motilitású spermiumok képesek csak benne a felhatolásra [15]. A csak tápoldatba való migrációkor nem érvényesül ilyen szűrő hatás. Műanyagszalmába töltve 20–30 fokos szögben az ondóba állítva funkcionális tesztként is jól alkalmazható, helyettesítheti a bovinnyák penetrációs tesztet. Nem igényel centrifugálást, a spermiumok minimális károsodást sem szenvednek az izoláláskor, ugyanakkor a hialuronát elősegíti a megtermékenyítést is. A műszerezettség igény minimális. A szükséges engedélyeztetési eljárások birtokában intrauterin inszeminációra is alkalmazható lesz.

Az általunk összehasonlított spermium elválasztási módszerekkel nyert sejtek felhasználhatók intrauterin, intracervikális, valamint in vitro és in vivo (GIFT, POST) inszeminációkra, megtermékenyítésekre, az immunológiai valamint pszichológiai eredetű meddőség, egyes andrológiai kórképek és ismeretlen eredetű meddőség segítségükkel jól kezelhetők.

IRODALOM

- Allen, N. C., Herbert, C. M., Maxon, W. S., Rogers, B. J., Diamond, M. P., Wentz, A. C.: Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil. Steril.* 44, 569–581 (1985).
- Bognár Z., Csaba I., Arany A., Török A., Bódis J., Révész P., Than G.: Ivarsejtek petevezetőbe ültetésével létrehozott terhesség. *Orv. Hetil.* 129, 1913–17 (1988).
- Corradi Gy., Gimes R.: Új bovin penetrációs teszt. *Urol. Nephrol. Szle.* 11, 215–216 (1984).
- Chang, E. C., Murillo, O., Huszar, G., Tarlatzis, B., DeCherney, A.: Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. *Int. J. Androl.* 7, 71–78 (1984).
- Daniore, V., Querci-Daniore, R.: A comparative study in sperm penetration tests. *Scandinavian ESHRE Congress* 25–28. Jún. 1989. Malmö, MPM2. — 6. Dixon W. J.: *BMDP. Statistical Software Manual.* University of California Press, Berkeley, CA. 1983.
- Fishel, S.: Time dependent motility changes of human spermatozoa after preparation for in vitro fertilization. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 2, 233–235 (1985).
- Horváth, P., Beck, M., Bohrer, M. K., Shelden, R. M., Kemman, E.: A prospective study on the lack of development of antisperm antibodies in women undergoing intrauterine insemination. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 160, 677–684 (1989).
- Jones, R. C., Holt, W. W.: The effect of washing on ultrastructure and cytochemistry of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 41, 159–162 (1974).
- Kő-

rösi T., Baksai I., Bazsáné Kassai Zs., Smid I.: Penetrációs dysmucorrhoea kezelése intrauterine inszeminációval. Magyar Nőorvos Társaság Meddőségi Sectiójának 1989. Évi Ülése május 20. Összefoglaló 21—22. 11. Lopata, A., Patullo, M., Chang, A., James, B.: A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil. Steril.* 17, 677—684 (1976). — 12. Lopata, A., McMaster, R., McBain, J. C., Johnston, W. I. H.: In vitro fertilization of preovulatory human eggs. *J. Reprod. Fertil.* 52, 339—342 (1978). — 13. Makler, A., Jakobi, P.: Effects of shaking and centrifugation on human sperm motility. *Archiv. Androl.* 7, 2—6 (1981). — 14. Wakler, A., Murillo, O., Huszar, G., Tarlatzis, B., DeCherney, A.: Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. *Int. J. Andrology* 7, 71—78 (1984). — 15. Mathieu, C., Guerin, J. F., Lornage, J., Pinatel, M. C.: Comparison of two methods for preparing semen in vitro: swim up migration in hyaluronic acid and centrifugation on a discontinuous Percoll gradient. Scandinavian ESHRE Congress 25—28. Jún. 1989. Malmö, MPM3. — 16. Mortimer, D., Templeton, A. A.: Sperm transport in the human female reproductive tract in relation semen analysis characteristics and time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 64, 401—405 (1982). — 17. Nagy, B., Gimes, R., Veres, I., Czuppon, A.: The occurrence of sperm—antibodies in the cervical mucus of donor inseminated patients. Scandinavian ESHRE Congress 25—28. jún. 1989. Malmö, M4:3. — 18. Szöllösi J., Daru J., Sas M.: Immunológiai meddőség kezelése intrauterine inszeminációval. M. N. T. Meddőségi Sectiójának 1989. Évi Ülése

május 20. Összefoglaló 23—24. — 19. Wikland, M., Wik, O., Steen, Y., Qvist, K., Söderlund, B., Janson, D. O.: A self-migration method for preparation of sperm for in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 2, 191—195 (1987). — 20. World Health Organization: Laboratory manual for the Examination of Human Semen and Semen—Cervical Mucus Interaction. Eds. Belsey M. A., Eliasson R., Gallegos A. J. Singapore Press Concern, Singapore, 1980.

Nagy B., Corradi Gy., Pulay t., Gimes R., Csömör S.: Comparison of sperm preparation techniques.

The authors examined the semen of 35 men (15 normozoospermic and 20 oligozoospermic) to determine the classical semen parameters (cell count, motility, morphology) and to compare three sperm preparation techniques, the simple swim up, twice centrifugation and swim up, and natrium hyaluronate (Sperm Select) treatment. They found that the most favorable results could be obtained by Sperm Select treatment. The authors suggest to make sperm isolation treatment as functional probe in the routine andrological examinations.

Key words: sperm cell, isolation, swim up, centrifugation, Sperm Select

Közlésre elfogadva: 1990. január 8.