

Bovinnyák penetrációs teszt a megtermékenyítőképeség megítélésére és a kóros szerkezetű spermiumok kiszűrésére

CORRADI GYULA DR., NAGY BÁLINT DR.,
GIMES REZSŐ DR.

*A Semmelweis Orvostudományi Egyetem Urológiai Klinikája
(igazgató: Frang Dezső dr., egyetemi tanár) és I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati
Klinikája (igazgató: Papp Zoltán dr., egyetemi tanár) közleménye*

Összefoglalás: A szerzők az általuk korábban kifejlesztett in vitro penetrációs tesztben bovinnyák segítségével szelektálták a kóros és normális szerkezetű spermiumokat. A kiértékelés spermatocitogramok segítségével történt. Az eredmények azt mutatják, hogy bovinnyák segítségével javítható az ondó szerkezete, a javulás mértéke esetenként meghaladta a 30-40%-ot, de még a legkisebb javulás foka is több mint 20%. Az elvégzett vizsgálatok alapján a bovinnyák alkalmasnak tűnik a spermiumok szelektálására és megfelelő szűrési modell kidolgozása esetén alkalmassá válhat a sperma dúsítására.

Kulcsszavak: spermadúsítás, bovinnyák, penetráció

A sperma minőségének javítása régóta foglalkoztatja a szakembereket. A human reprodukciós-biológiában egyre több új módszert vezetnek be a homológ inszeminációs, az in vitro fertilizációs, az ivarsejtek petevezetőbe ültetése programok elterjedésével az ondók megtermékenyítő képességének a fokozására [1, 3, 5, 7]. Ezek a módszerek a spermák tápoldattal való centrifugálása, majd az ezt követő felülúsztatás, a centrifugálás nélküli felülúsztatás és a natrium-hialuronátos felülúsztatás, mely eljárások alkalmasak a spermiumok életképességének a megítélésére is. Funkcionális próbaként is javasolható az elvégzésük - rutin andrológiai kivizsgálások során [8, 9, 10, 11] - ugyanis a klasszikus sperma paraméterek (sejtszám, motilitás, morfológia) nem adnak elegendő információt a megtermékenyítő-képesség megítélésére. A funkcionális próbák közé sorolhatók még a penetrációs tesztek is [6], amikoris bovin, vagy human cervikális nyákban a spermiumok penetrációs távolságát olvassuk le. E

próbák közé sorolható még a hypoosmotikus duzzadási teszt, amely a spermium membrán működéséről ad jól használható információt [10].

Az általunk kifejlesztett in vitro standardizált bovin nyák penetrációs teszt alkalmas funkcionális próbaként a penetrációs képesség megítélésére, valamint a spermiumok szelektálására [3]. Állatorvosi gyakorlatban alkalmas lehet a morfológiailag károsodott spermiumok kiszűrésére, valamint az ivari szelekcióra is.

Anyag és módszer

Az általunk kifejlesztett in vitro penetrációs tesztben a bovin nyákot vékony műanyag csövekbe szívtuk. A penetrációs vizsgálathoz a nyákot tartalmazó csöveket egy órára a human ejakulátumot tartalmazó kémcsőbe helyeztük. A penetráció mikroszkópos értékelésekor minden esetben megállapítottuk, hogy különböző távolságra hány spermium jutott

el. Ezt követően a kiindulási ponttól számított 1, 2, 3, 4, 5, 6 cm-re elvágtuk a műanyagcsövet, majd a csőből kinyomott nyákot a festési módszerünkkel [2] megfestettük. A festett készítményt a hagyományos módon kiértékeljük (1. ábra) és az eredményt összehasonlítottuk a penetráció előtt mért adatokkal. Az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy legalább 4 cm hosszúságú nyákoszlop szükséges ahhoz, hogy a kóros spermiumokat kiszűrjük, így 20 olyan kóros ejakulátum morfológiai kiértékelését (spermatocitogram) végeztük el penetráció előtt és után, amelyek penetrációs távolsága meghaladta a 4 cm-t.

Eredmények

Az I. táblázatban ismertetjük a penetráció előtt ill. utáni spermatocitogramok eredményeit. Jól látható, hogy a vizsgálatra került ejakulátumban a normális szerkezetű spermiumok aránya 22-50% között változott. A bovin nyákban történt vándoroltatás után a

normális szerkezetű spermiumok aránya lényegesen megemelkedett, minden esetben elérte a normálisnak tekinthető 75%-os határt, sőt bizonyos esetekben elérte a 92-95%-os egészen kiválóknak tekinthető eredményt is. A kóros spermium félék előfordulási gyakorisága is jelentősen változott, míg a penetráció előtt gyakorlatilag minden kóros alak megtalálható, addig a penetráció után csak 7 féle, a körte alakú, a gömbölyű, a nagy orsó, a hiperkrom, a citoplazma maradványos, a vas-tag testű és a dupla fordult elő.

Megbeszélés

Vizsgálataink megkezdésekor abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a bovin nyák szelektíven szétválasztja a kóros és a normális szerkezetű spermiumokat. A vizsgálatok során a saját [3] standardizált bovin penetrációs modellt használtuk, és megállapítottuk, hogy egy órás penetrációs idő alatt 4 cm-nél nagyobb távolságra nagyrészt csak a jó moti-

I. táblázat

Spermatocitogram penetráció előtt és penetráció után

| Be- te- gek szá- ma | Sejtszám millió/ml | Spermatocitogram penetráció előtt | | | | | | | | | | | | | | | | | Spermatocitogram penetráció után | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------|----|---|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|----|---|---|----|----|----|---|
| | | Norm. % | * kóros sejtformák % | | | | | | | | | | | | | | | | Norm. % | * kóros sejtformák % | | | | | | | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 | 13 | 14 | 21 | 22 | 23 | 31 | | 32 | 35 | O | S | E | 2 | 4 | 5 | 9 | 21 | 22 | 35 | |
| 1 | 16-17 | 48 | — | 14 | — | 8 | — | 4 | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 2 | 4 | 2 | — | — | 14 | — | 2 | 84 | 13 | — | 1 | — | — | 2 | — |
| 2 | 12-14 | 40 | — | 8 | — | — | — | 4 | 12 | — | 12 | — | — | 8 | — | — | 8 | 4 | — | 4 | — | — | — | — | 90 | 10 | — | — | — | — | — | — |
| 3 | 10-12 | 42 | 2 | 4 | — | 2 | — | 10 | — | — | 4 | — | 6 | 12 | 2 | — | 6 | 4 | 2 | — | 4 | — | — | 88 | 12 | — | — | — | — | — | — | |
| 4 | 13-15 | 48 | — | 12 | — | — | 4 | 4 | — | — | — | — | — | 4 | 4 | — | — | — | — | — | 6 | 2 | — | 92 | 8 | — | — | — | — | — | — | |
| 5 | 10-12 | 32 | — | — | — | 20 | 8 | — | — | — | — | — | — | 4 | 4 | — | — | — | — | — | 12 | — | — | 95 | — | — | 4 | — | 1 | — | — | |
| 6 | 13-15 | 48 | — | — | — | 4 | 4 | — | — | — | — | — | — | 4 | — | 12 | — | — | — | — | 16 | — | — | 92 | — | — | — | — | — | 8 | — | |
| 7 | 8-10 | 24 | — | — | — | 10 | 16 | 8 | — | — | — | — | — | 18 | 2 | 10 | 8 | — | — | 20 | — | — | 88 | — | — | — | 2 | — | 10 | — | — | |
| 8 | 17-18 | 44 | — | — | — | — | 4 | 2 | — | — | — | — | — | 2 | 10 | 8 | 2 | — | — | 20 | — | — | 90 | — | — | — | 1 | — | 9 | — | — | |
| 9 | 14-15 | 40 | — | 10 | — | 4 | — | — | 8 | — | — | — | — | — | 6 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | — | — | 88 | 3 | — | — | — | — | 8 | 1 | — | |
| 10 | 14-15 | 44 | — | — | — | 6 | 6 | — | — | 4 | 4 | 10 | — | — | 2 | 6 | 4 | 4 | 4 | 2 | 6 | — | 88 | — | — | — | — | — | 12 | — | — | |
| 11 | 8-10 | 22 | 2 | 10 | — | 32 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | 4 | 10 | 6 | 2 | — | 4 | — | — | 76 | 10 | — | — | — | — | 14 | — | — | |
| 12 | 12-14 | 32 | — | 20 | 4 | 8 | 8 | — | 4 | — | 4 | — | — | — | — | — | 4 | — | — | 4 | — | — | 80 | 19 | 1 | — | — | — | — | — | — | |
| 13 | 8-10 | 24 | — | 24 | — | 4 | — | 16 | — | — | 20 | — | — | — | 4 | 4 | — | — | — | 4 | — | — | 82 | 16 | — | — | — | — | 2 | — | — | |
| 14 | 17-19 | 48 | 2 | 18 | 2 | 18 | 2 | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 2 | — | 2 | — | — | — | — | 94 | 5 | — | — | — | — | 1 | — | — | |
| 15 | 14-15 | 40 | — | 12 | — | 16 | 8 | — | — | — | — | — | — | — | 4 | — | 8 | 12 | — | — | — | — | 90 | 10 | — | — | — | — | — | — | — | |
| 16 | 8-10 | 28 | — | 16 | — | 16 | 8 | — | — | — | — | — | — | 8 | 4 | — | 4 | 12 | 4 | — | — | — | 85 | 15 | — | — | — | — | — | — | — | |
| 17 | 14-15 | 32 | — | 14 | — | 4 | 12 | 12 | 2 | — | 6 | — | — | — | 4 | — | — | 6 | 6 | — | 2 | — | 86 | 14 | — | — | — | — | — | — | — | |
| 18 | 19-20 | 40 | — | 18 | — | — | — | 12 | — | 2 | 4 | — | — | — | 6 | 6 | 6 | 4 | 2 | — | — | — | 92 | 3 | — | — | — | — | 5 | — | — | |
| 19 | 19-20 | 50 | — | 20 | 2 | 10 | — | 4 | — | — | — | — | — | 4 | — | 2 | 4 | — | — | 2 | — | — | 88 | 8 | 1 | — | — | — | 3 | — | — | |
| 20 | 17-20 | 40 | — | 14 | 2 | 6 | 14 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | 4 | 8 | 2 | — | — | 6 | — | 87 | 8 | — | — | — | — | 5 | — | — | |

* Az előforduló kóros sejtformák elnevezését ld. a spermatocitogram ábráján

előnye, hogy olcsó és könnyen beszerezhető „hazai termék”.

Irodalom

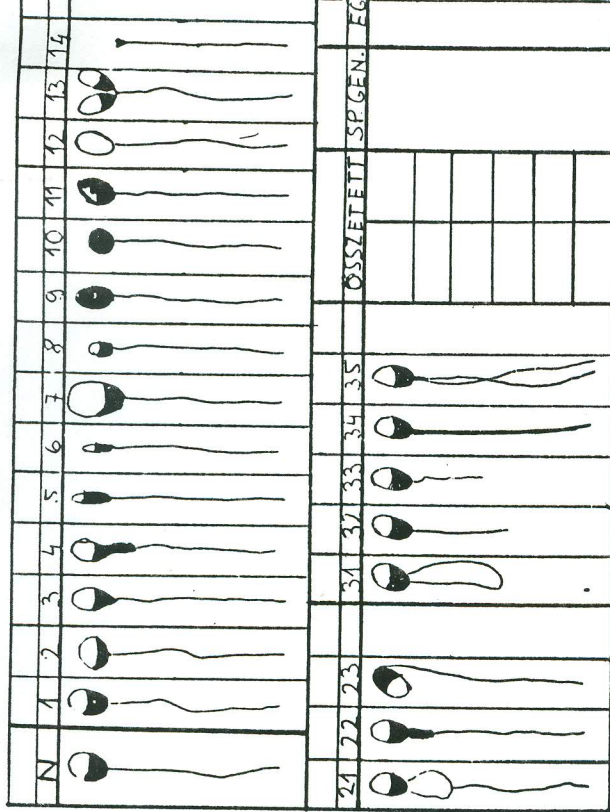
- Allen, N. C., Herbert, C. M., Maxon, W. S., Rogers, B. J., Diamond, M. P., Wentz, A. C.: Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil. Steril.* 44, 569-581 (1985).
- Berényi M., Corradi Gy.: A simple staining method of morphologic classification of spermatozoa. *Int. Urol. Nephrol.* 14, 185-1888 (1982).
- 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 G.: 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. Andrology* 7, 71-78 (1984).
- Ericson, R. J., Langevin, C. N., Nishimo, M.: A comparative study in sperm penetration tests. *Nature*, 241, 236-241 (1973).
- 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).
- Makler, A., Murillo, O., Huszar, G., Tarlatzis, B., DeCherney, A.: Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. *Int. J. Andrology* 7, 71-778 (1984).
- Mortimer, D., Templeton, A. A.: Sperm transport in the human female reproductive tract in relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 64, 401-405 (1982).
- Nagy, B., Corradi Gy., Gimes R., Pulay T., Csömör S.: Spermium izolálási módszerek összehasonlító vizsgálata *Magy. Nőorv. L.* 53, 227-231 (1990).
- 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).

Corradi Gy., Nagy B., Gimes R.: *Bovine mucus penetration test for determination of fertilizing ability and screening out pathological sperms*

The separation of abnormal spermatozoa was performed in an in vitro penetration model, earlier published by the author, using mid-cycle bovine mucus. Results were calculated by making spermatocytograms prior to and after the penetration. Morphology had better qualities after bovine mucus penetration. In some cases the improvement amounted to more than 30-40%, the lowest recovery being also more than 20%. Our investigations suggest that bovine mucus seems to be a convenient material for sperm separation and in a suitable filtering model it could be used in the practice.

Key-words: sperm separation, bovine mucus, penetration.

Közlésre elfogadva: 1991. december 23.



1. ábra SPERMATOCITOGRAM N.: normál. Fejrendellenességek, 1: vakuolizált, 2.: gömbölyű, 3.: alul hegyesedő, 4.: körte alakú, 5.: nagy orsó, 6.: kis orsó, 7.: makro, 8.: mikro, 9.: hiperkróm, 10.: kerek hiperkróm, 11.: amorf, 12.: üres, 13.: dupla, 14.: fejiány. Testrendellenességek, 21.: citoplazma-maradvány, 22.: vastag test, 23.: megtört. Farokrendellenességek, 31.: nem egyenesedett ki, 32.: törött, rövid, 33.: csökevényes, 34.: vastag, 35.: dupla. Összetett rendellenességek (példák): 1,35: vakuolizált fej és dupla farok, 4,21: körte alakú fej és citoplazma maradvány, 10,34: kerek hiperkróm fej és vastag farok.

litású, jó felépítésű és normális szerkezetű spermiumok jutnak el.

Meggyőzőnek tűnik, a szerkezet javulásának a mértéke is, ez esetenként meghaladta a 30-40%-ot is, de még a legkisebb javulás foka is több mint 20%.

Eredményeink alapján jól látható, hogy a durvább szerkezeti hibában szenvedő spermiumok általában nem penetráltak, továbbá az is feltűnő, hogy nem csak számszerűleg csökkent a penetráció után a kóros spermiumok aránya, hanem minőségileg is. Penetráció után egyáltalán nem látunk bizonyos típusú kóros sejtformákat, így pl. makrofejű, mikrofejű, összetett szerkezeti hibákat, üresfejű, vagy amorf fejű spermatozoát.

Összegezve tapasztalatainkat, az elvégzett vizsgálatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a bovin cervikális nyák alkalmasnak tűnik a spermiumok szelektálására, és a megfelelő szűrési modell kidolgozása esetén alkalmassá válhat a sperma dúsítására és a szex-szelekcióra. Az utóbbinak inkább az állatorvosi gyakorlatban lenne nagyobb szerepe. A bovin cervikális nyák nagy mennyiségben viszonylag könnyen begyűjthető és folyékony nitrogénben, kapilláris csövekbe töltve szinte korlátlan ideig jól eltartható, a másik