

## USPOREDBA POKRETLJIVOSTI SJEMENA I OPLODNJE *IN VITRO*

### COMPARISON OF SPERM MOTILITY AND FERTILISATION *IN VITRO*

Tamara Tramišak-Milaković<sup>1</sup>, Dejan Ljiljak<sup>1</sup>

#### SAŽETAK

*Cilj:* Cilj ovog rada bio je ispitati povezanost kompjutorske analize spermija (engl. computer-aided sperm analysis, CASA), posebno parametara koncentracije i pokretljivosti progresivnih spermija, s postizanjem oplodnje *in vitro*. *Metode:* Analiza kvalitete sjemena napravljena je pomoću CASA sistema. Analizirano je 36 bolesnika kod kojih je napravljena *in vitro* oplodnja (engl. in vitro fertilization, IVF) i embrio transfer (ET). Karakteristike spermija prije i nakon 'swim up' metode pročišćavanja uspoređene su između 23 ciklusa s oplodnjom  $\leq 50\%$  i 13 ciklusa bez oplodnje. *Rezultati i zaključak:* Ispitivanje pokazuje da parametri brzine i pokretljivosti spermija iz nativnog sjemena i spermija pročišćenih 'swim up' metodom koreliraju s oplodnjom *in vitro*, što ukazuje da ovi parametri mogu biti dobar pokazatelj ishoda oplodnje.

*Ključne riječi:* kompjuterska analiza spermija, pokretljivost spermija, oplodnja *in vitro*

#### ABSTRACT

*Aim:* The aim of this study was to investigate the relationships between computer-aided sperm analysis (CASA), especially the concentration and movement characteristics of progressively motile spermatozoa and fertilization rates *in vitro*. *Methods:* Analysis of semen quality was performed using CASA in 36 in vitro fertilization – embryo transfer (IVF-ET) cycles with at least 2 oocytes collected. Sperm quality before and after swim-up procedure was compared between 23 cycles with fertilization rate  $\leq 50\%$  and 13 cycles without fertilization. *Results and conclusion:* Our study demonstrated that velocity parameters and motility characteristics of sperms from freshly obtained semen and those after swim up procedure correlated with fertilization rates, indicating that these parameters could be good predictors of the fertilization outcome.

*Key words:* Computer-aided sperm analysis, sperm motility, fertilization *in vitro*

#### UVOD

Standardna analiza sjemena je subjektivna tehnika. Zbog razlika u načinu rada laboratorija, gotovo je nemoguće uspoređivati pokretljivost spermija analiziranu u različitim laboratorijima<sup>1</sup>. Kako bi se procjena pokretljivosti sjemena učinila što

objektivnijom i detaljnijom, razvijena je računalna analiza pokretljivosti spermija (engl. computer-aided sperm analysis, CASA). CASA analizom dobije se nekoliko specifičnih parametara pokretljivosti spermija<sup>2</sup>, što je čini objektivnijom od standardne analize sjemena. Također, ova analiza ima veću točnost i reproducibilnost broja i pokretljivosti spermija<sup>3</sup>. Razvijanje CASA analize, koja može identificirati i pratiti humane spermije, predstavlja veliki napredak u istraživanju pokretljivosti humanog sjemena. Paralelno s pokušajima unapređivanja tehničkih karakteristika CASA sistema, važno je istražiti biološku važnost CASA

<sup>1</sup> Klinika za ginekologiju i porodništvo, KBC Rijeka

Primljeno: 27. 9. 2007.

Prihvaćeno: 25. 10. 2007.

Adresa za dopisivanje: Tamara Tramišak-Milaković, Laboratorij za biologiju reprodukcije, Odjel za humanu reprodukciju, Klinika za ginekologiju i porodništvo, KBC Rijeka. E-mail: ivf@kbc-rijeka.hr, web: www.kbc-rijeka.hr/ivf

parametara u smislu predviđanja oplođujućeg potencijala spermija. Ova znanja su od velike važnosti za razumijevanje biologije oplodnje kao i za dijagnosticiranje i liječenje muške neplodnosti<sup>2</sup>.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost kvalitete spermija dobivene CASA analizom s učestalošću oplodnje *in vitro*. Želimo ustanoviti mogu li CASA parametri i koje njihove vrijednosti ukazivati na prenisku oplođujuću sposobnost spermija koja zahtijeva korištenje mikroinjekcije (engl. intracytoplasmatic sperm injection, ICSI) pri oplodnji oocita.

## ISPITANICI

Prosječna dob žena uključenih u postupak IVF/ET bila je 32,8 godina, dok je prosječna dob muškaraca bila 33,7 godina. Indikacije za upotrebu u klasičnim IVF-ET postupcima bile su: tubarni faktor, muški faktor, uterini faktor i nerazjašnjena neplodnost.

## METODE

Ukupno 36 svježih uzoraka sjemena analizirano je CASA metodom. Spermiji su pripremljeni 'swim up' metodom i upotrijebljeni za izvantjelesnu oplodnju oocita dobivenih u 36 IVF ciklusa.

### CASA parametri

Kvaliteta sjemena određena je CASA analizom (HTM-IVOS, Version 12, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly MA, USA). Spermiji iz svježeg sjemena prebrojeni su, a zatim je određena koncentracija spermija, pokretljivost i parametri pokretanja spermija. Parametri pokretanja spermija su VAP (prosječna brzina kretanja), VSL (brzina pravocrtnog kretanja), VCL (brzina nepravilnog kretanja), ALH (amplituda postraničnog pomicanja glave spermija), BCF (učestalost udaraca repom), STR (pravocrtnost), LIN (linearnost).

### Obrada sjemena

Količina od 0,5-1 ml sjemena dobivenog masturbacijom podsložena je ispod 1-2 ml medija za pročišćavanje spermija (Sperm Preparation Medium, MediCult, Danska) i inkubirana 40 minuta na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> u inkubatoru. Supernatant s pokretnim spermijima je sakupljen i centrifugiran 10 minuta na 1500 okretaja (Hettich Universal 32R). Talog je resuspendiran u 0,3 ml univerzalnog medija (Universal IVF Medium, MediCult) i karakteristike pokretljivosti spermija određene su CASA sistemom.

## Stimulacija

Kontrolirana ovarijska stimulacija započeta je u sredini lutealne faze kombinacijom gonadotropin releasing hormon (GnRH) agonista (GnRHa; Decapeptyl, Ferring, Njemačka) i rekombinantnog folikul stimulirajućeg hormona (r-FSH; Gonal-F, Serono, Švicarska). Kada je vodeći folikul dosegao 17 mm u dijemetru, bolesnice su dobile 250mg rekombinantnog humanog korionskog gonadotropina (hCG; Ovitrelle, Serono). Tridesettri do tridesetšest sati nakon davanja hCG, napravljena je ultrazvučno vođena aspiracija oocita.

## Oplodnja oocita i uzgoj embrija

Oocyte su izolirane iz folikularne tekućine dobivene aspiracijom folikula, isprane u hranilištu za ispiranje (Syn Vitro Flush, MediCult, Danska) te stavljene u univerzalno hranilište (IVF Universal, MediCult) i pohranjene na 37°C i 5% CO<sub>2</sub> u inkubator. Nakon 2-3 sata oocyte su prebačene u kapi univerzalnog hranilišta pod uljem (Tissue Culture Oil, MediCult) i inseminirane sa cca. 100 000 spermija/ml. Oplodnja je provjerena 18-20 sati nakon inseminacije, a nakon 24-28 sati ocijenjena je rana dioba embrija.

Svih 36 postupaka inseminacije *in vitro* (engl. *in vitro* fertilization, IVF) klasificirano je u dvije skupine: bez oplodnje (13 ciklusa) i sa  $\leq 50\%$  oplodnje (23 ciklusa).

Cilj ovog rada je odrediti koji CASA parametri mogu poslužiti kao indikatori potencijala spermija za oplodnju, tj. pomoći pri odluci koja će se metoda oplodnje koristiti, IVF ili ICSI.

## REZULTATI

U 36 IVF ciklusa prosječan broj sakupljenih jajnih stanica bio je 10,3. Cjelokupan postotak oplodnje bio je 47,2%. U 13 ciklusa nije došlo do oplodnje. CASA parametri u svježem ejakulatu i nakon pročišćavanja bili su uspoređivani između 23 ciklusa s postotkom oplodnje  $\leq 50\%$  i 13 ciklusa bez oplodnje (tablica 1, slika 1).

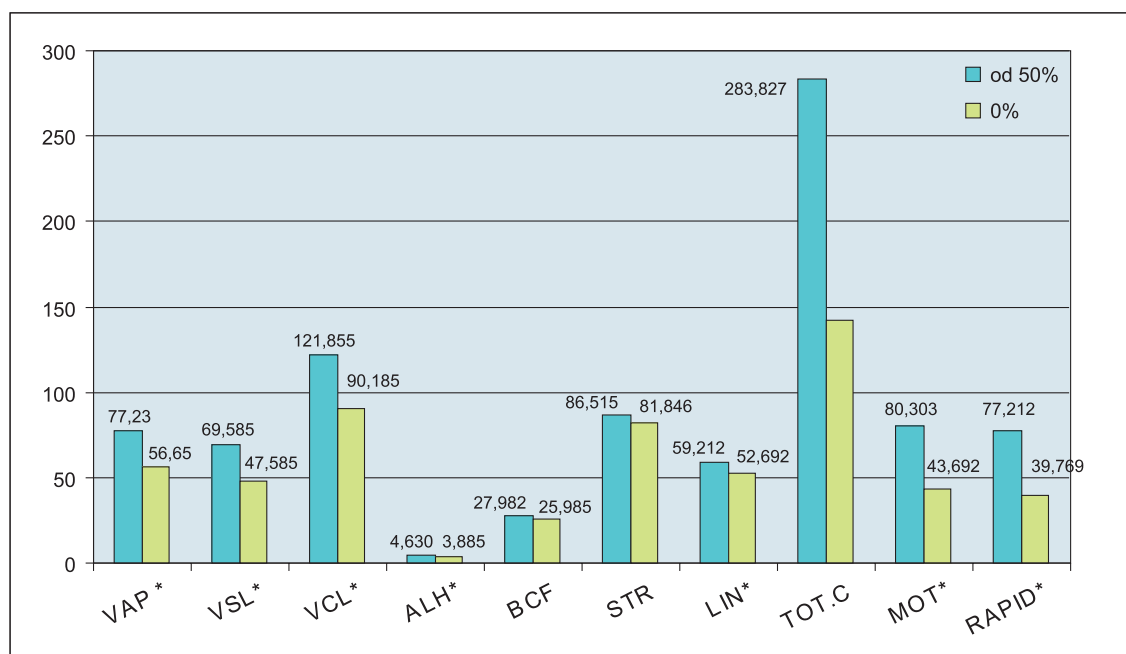
## RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Budući da fertilizacija ovisi ne samo o spermiju nego i o kvaliteti jajne stanice, teško je bilo odrediti njihov udio značajnosti u fertilizacijskom procesu. U našoj studiji analizirali smo CASA parametre humanog sjemena, ali nismo kvantificirali i kvalitetu jajne stanice. Objektivnije bi bilo kada bismo odredili i kvalitetu jajne stanice, kao i CASA

Tablica 1. Usporedba CASA parametara između fertilizacijskih skupina s 0% i ≤50% oplodnje.

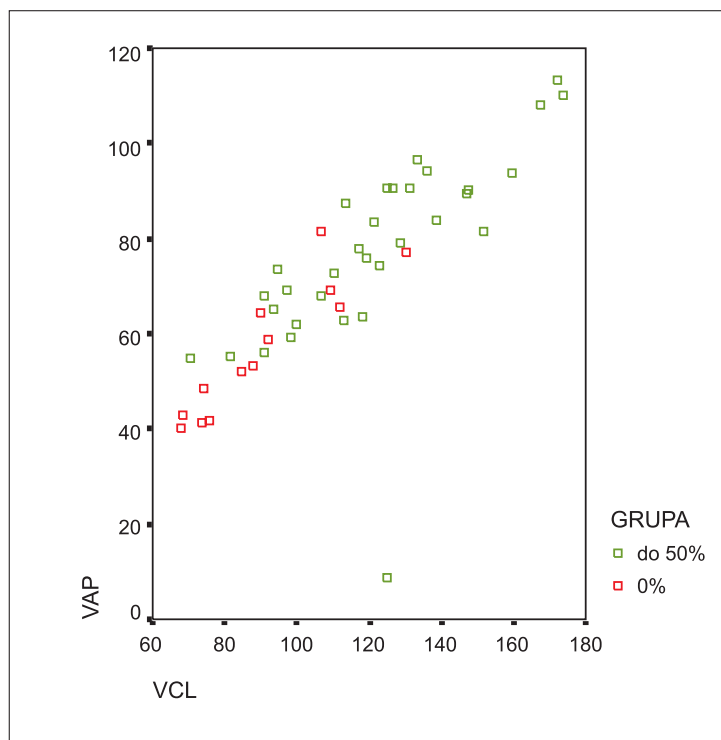
Table 1 Comparison of CASA parameters in fertilisation groups (0% and ≤ 50% fertilisation)

	Skupina	N	M	SD
VAP	0%	13	56,646	13,993
	od 50%	33	77,233	20,005
VSL	0%	13	47,585	15,169
	od 50%	33	69,585	14,330
VCL	0%	13	90,185	19,217
	od 50%	33	121,855	26,029
ALH	0%	13	3,885	0,835
	od 50%	33	4,630	0,916
BCF	0%	13	25,985	5,255
	od 50%	33	27,982	3,954
STR	0%	13	81,846	9,155
	od 50%	33	86,515	4,381
LIN	0%	13	52,692	9,920
	od 50%	33	59,212	7,781
TOT.C	0%	13	142,454	196,591
	od 50%	33	283,827	250,900
MOT	0%	13	43,692	21,769
	od 50%	33	80,303	17,426
RAPID	0%	13	39,769	21,339
	od 50%	33	77,212	17,996



Slika 1. Odnos fertilizacijskih skupina s 0% i ≤50% oplodnje.

Figure 1 Relation between fertilisation groups (0% and ≤ 50% fertilisation)



Slika 2. Odnos VAP i VCL u fertilizacijskim skupinama s 0% i  $\leq 50\%$  oplodnje.

Figure 2 *VAP and VCL in study groups with (0% and  $\leq 50\%$  fertilisation)*

parametre spermija s ciljem da odredimo kojoj ćemo fertilizacijskoj metodi pristupiti: IVF ili ICSI. Naša studija demonstrira da CASA parametri VAP, VSL i VCL, kao i MOTILITY i RAPID CELLS parametri svježeg sjemena koreliraju s fertilizacijom, što indicira njihovu prediktivnu moć za uspješnost oplodnje. Parametri VAP i VCL su u pozitivnoj korelaciji, kako je i prikazano na slici 2. Morat će se učiniti daljnja istraživanja koja će uključiti još neke metode, poglavito molekularne, i više slučajeva, kako bismo došli do konačnog zaključka i sveobuhvatne slike.

#### LITERATURA

1. Jorgensen N, Auger J, Giwercman A et al. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl* 1997;20:201-8.
2. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A and The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod* 2000;7:1562-67.
3. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa, S, Yamaguchi, C i sur. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. *J Assist Reprod Genet* 2001;4:213-8.