

Semenbewerking in het laboratorium: tijd telt

P.M.W. JANSSENS¹ en E. BLOKZIIL²

Intra-uteriene inseminatie (IUI) is een van de eerste behandelingen die wordt toegepast bij fertilitiestoornissen, onder meer omdat het weinig invasief en relatief goedkoop is. Bewerkt semen wordt bij de vrouw geïnsemineerd rondom het tijdstip van ovulatie, al dan niet na stimulatie van de ovaria ter bevordering van de follikelgroei en eisprong. IUI wordt verricht voor welomschreven indicaties als onvoldoende of spermatozoën-inhiberend cervixslijm, onvoldoende motiele spermatozoën, antistoffen tegen spermatozoën, retrograde ejaculatie, onmogelijkheid van intravaginale ejaculatie of toepassing van gedoneerd semen. Daarnaast wordt IUI ook regelmatig toegepast voor minder welomschreven indicaties in het geval dat zwangerschap uitblijft langer dan wenselijk. Er zijn vele variatiemogelijkheden in de eventueel toegepaste ovariële stimulatiemethoden, de wijze van semenbewerking en inseminatie, omdat nog allerminst is uitgemaakt wat het beste is.

Bij toepassing van IUI dient het vers verkregen semen te worden bewerkt, want onbewerkt semen veroorzaakt uteruscontracties. Door bewerking worden het semenplasma, debris, dode, niet motiele en abnormale spermatozoën en leukocyten verwijderd. De goede spermatozoën raken in een hyper-geactiveerde staat ('gecapaciteerd'), worden geconcentreerd in een klein volume en kunnen aldus worden ingebracht in de uterus of eileiders. De meest gebruikte semenbewerkingsmethoden bestaan uit centrifugatie van het semen over een gradiëntmedium, gevolgd door wassen van het sediment met een wasmedium. Daarnaast worden soms ook zogeheten opzwemtechnieken gebruikt om beweeglijke spermatozoën te selecteren, alhoewel minder frequent vanwege de lage spermatozoënopbrengst. Zinnvolle toepassing van IUI vereist een voldoende groot aantal beweeglijke spermatozoën; gehanteerd wordt thans als richtlijn 2-5 miljoen goed motiele spermatozoën per inseminatie.

Onzekere resultaten

Veel van de bij IUI en semenopwerking toegepaste werkwijzen zijn gebaseerd op redelijke aannames en waarnemingen in het laboratorium, doch niet op systematische inventarisatie van verkregen zwanger-

schappen. Dit hangt samen met het feit dat scoren van zwangerschappen tijdrovend is, en met de complexiteit van het vraagstuk van verminderde fertiliteit, waarbij een groot aantal fysiologische karakteristieken van zowel de vrouw als man een rol kunnen spelen. De verschillende richtlijnen die de afgelopen jaren zijn uitgebracht stellen weinig concreets voor over de toe te passen werkwijzen - de wijze van semenopwerking, (was)media of de acceptabel te achten bewerkingstijden (1, 2). De bekende WHO-richtlijn en ook het praktische handboek *Practical Laboratory Andrology* bijvoorbeeld, stellen dat semen bij voorkeur geproduceerd wordt in een privéruimte nabij het laboratorium, en in ieder geval binnen 1 uur na productie in het laboratorium dient te zijn afgeleverd (3, 4). In de praktijk wordt echter ten behoeve van de patiënten en om praktische of logistieke redenen vaak ruim met deze richtlijnen omgegaan. In veel gevallen wordt thuisproductie van semen geaccepteerd en niet zo strikt op de snelheid van opwerking en daaropvolgende inseminatie gelet. Een schatting gemaakt voor onze kliniek is dat het zo'n 2-3,5 uur duurt na semenproductie voordat het bewerkte semen geïnsemineerd is. Rondvraag onder een aantal collega's in andere klinieken geeft aan dat de controle op de logistieke verwerking van semen veelal weinig strikt is en bewerking binnen 1 uur na productie waarschijnlijk vaak niet gehaald wordt. Vergoelijkend ten aanzien hiervan wordt aangevoerd dat weliswaar de motiliteit van spermatozoën geleidelijk terugloopt, maar dat acceptabele motiliteit van spermatozoën in vitro gemakkelijk 12 uur en langer na ejaculatie waarneembaar is (5, 6). Dit wekt de suggestie dat handelingen met semen niet zo kritisch zijn als de gepubliceerde aanbevelingen suggereren. Dit was vol te houden bij gebrek aan harde gegevens.

Nieuwe bevindingen

Recentelijk is door de Amerikanen Yavas en Selub een onderzoek bij ruim zestig paren, met 132 inseminatie-cycli, gepubliceerd over de invloed van de plaats van semenproductie (thuis of in de kliniek) en het tijdsinterval tussen semenproductie en inseminatie op het aantal verkregen zwangerschappen (7). Apart werd gekeken naar het tijdsinterval tussen semenproductie en semenopwerking (+ wassen) versus semenopwerking en IUI. Ter voorbereiding op de intra-uteriene inseminatie werd bij de vrouwen ovariële stimulatie met humegon (humaan menopauaal gonadotropine, hMG) of clomifeencitraat (CC) toegepast, en ovulatie-inductie met hCG. Als opwerkmedium en

Ziekenhuis Rijnstate, afdeling Klinische Chemie¹ en Gynaecologie², Arnhem

Correspondentie: dr. P.M.W. Janssens, Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Rijnstate, Postbus 9555, 6800 TA Arnhem. E-mail : pjanssens@alysis.nl

wasmedium voor spermatozoën werden PureSperm respectievelijk Quinn's sperm washing medium gebruikt. De gerapporteerde resultaten mogen worden omschreven als indrukwekkend.

Aanmerkelijk hogere zwangerschapspercentages werden verkregen indien het semen snel na productie werd bewerkt: bewerking 15-30 min. na productie leverde 29% zwangerschappen en 30-60 min. 13%. Wanneer bewerking langer dan 60 min. werd verricht ontstond er geen enkele zwangerschap! Dit werd gezien bij beide stimulatieprotocollen, alhoewel bij stimulatie met hMG meer uitgesproken. Ook inseminatie snel na de semenbewerking leverde beduidend meer zwangerschappen op, althans bij ovariële stimulatie met hMG: 63% zwangerschappen bij inseminatie binnen 30 min. na de semenopwerking, 39% bij 30-60 min. en 8% bij langer dan 60 min. na de opwerking. De tijd na productie tot aan semenopwerking, en vanaf semenopwerking tot aan inseminatie tezamen genomen leverde bij stimulatie met hMG bij inseminatie binnen 90 min. na productie 55% zwangerschappen, tussen 90-120 min. 13%, en langer dan 120 min. 8% zwangerschappen. In lijn met deze resultaten leverde (bij stimulatie met hMG) productie van semen in de kliniek aanzienlijk meer zwangerschappen op (27%) dan thuisproductie (13%). Een monster geproduceerd in de kliniek is tenslotte veel eerder na productie bewerkt: zo'n 25-50 min. in Yavas en Selub's onderzoek (7). Thuisproductie betekent tijdverlies en het gevaar dat het semen aan condities worden blootgesteld die de vitale eigenschappen ongunstig beïnvloeden. Vastgesteld is bijvoorbeeld dat spermatozoën die worden blootgesteld aan temperaturen van 4 of 37 °C binnen enkele uren aanzienlijk verlies aan motiliteit vertonen (5, 6). Het beste behouden spermatozoën hun motiliteit indien het semen bij 20 °C wordt bewaard (5, 6). Opmerkelijk in dat verband is dat de aanbevelingen voor het transporteren van semen óf zeer ruim zijn (met ranges van 20-40 °C), óf adviseren het monster te dragen nabij het lichaam (dus rond lichaamstemperatuur) (3, 4). Thuisproductie aldus kan moeilijk de reproduceerbaarheid en de kwaliteit van het werk met semen ten goede komen.

De door Yavas en Selub beschreven effecten van semenproductieplaats en -opwerking waren met name zichtbaar bij ovariële stimulatie van de vrouwen met hMG (7). Dit is terug te voeren op het feit dat stimulatie met hMG aanzienlijk meer zwangerschappen opleverde dan stimulatie met CC (31% respectievelijk 9%). Bij de matige zwangerschapsresultaten met CC kwamen bij het relatief kleine aantal waarnemingen de genoemde effecten vermoedelijk gewoon onvoldoende tot uiting, en mogelijk traden andere factoren die de zwangerschapskans beïnvloeden meer op de voorgrond. Nadere gegevens over het resultaat van beide stimulatieprotocollen, bijvoorbeeld het aantal verkregen meerlingzwangerschappen, worden in het artikel (7) niet gegeven, zodat verdere beoordeling van beide protocollen niet goed mogelijk is. Het teruglopen in kwaliteit van de spermatozoa in de periode voor het wassen verklaren de onderzoekers door het nadelige effect van verlengde blootstelling

van de zaadcellen aan decapacitiefactoren en/of reactieve zuurstofradicalen in het semenplasma. Het is sinds lang bekend dat semenplasma factoren bevat die de functie en mogelijk het bevruchtend vermogen van spermatozoën remmen (8-11).

Gevolgen voor de praktijk

De waarnemingen van Yavas en Selub (7) geven de grenzen aan waarbinnen zinvol met opgewerkt semen IUI kan worden verricht. Dit heeft implicaties voor de praktijk. Standaard werkwijze dient te worden dat semen voor bevruchtingsdoeleinden wordt geproduceerd in de kliniek, althans de plaats waar normaliter het laboratorium gevestigd is. Met de bewerking van semen dient voorts zo spoedig als mogelijk na productie te worden begonnen, als het even kan binnen 30 min. na productie, direct na de liquefactie (die normaliter binnen 15 min. plaatsvindt; 3, 4). Daarop aansluitend dient ook de inseminatie (IUI) weer zo spoedig als mogelijk te geschieden, doch in ieder geval binnen 60 min. De hele procedure, van productie tot aan inseminatie zou binnen 90 min. na de productie te zijn afgerond, zoals de onderzoekers aangeven (7).

De aanscherping van de eisen met betrekking tot de timing rondom de semenopwerking resulteert in een dringende opdracht voor laboratorium zowel als behandelaars. Zij zullen hun werkzaamheden op elkaar moeten afstemmen om geen tijd te verliezen. Veelal zal dit betekenen dat er meer planmatig wordt gewerkt, met afspraken van patiënt met laboratorium zowel als met behandelaar. Thuisproductie van semen dat zal worden gebruikt voor kunstmatige inseminatie in de kliniek moet in principe worden afgeschaft - goed gemotiveerde uitzonderingen daargelaten. Dat betekent dat klinieken ruimte dienen te creëren voor de productie van semen op nette en hygiënische wijze, ongestoord en met respect voor privacy.

Bewerking van semen in het laboratorium wordt behalve voor IUI ook toegepast voor andere doeleinden: voor gebruik bij in-vitrofertilisatie/intracytoplasmatische spermmainjectie (IVF/ICSI) en ten bate van semenopslag (in een semenbank). Alhoewel de invloed van semenproductieplaats en -verwerkingstijd op de zwangerschapskans voor deze werkzaamheden niet door Yavas en Selub (7) werd onderzocht, ligt het voor de hand dat hierbij soortgelijke effecten een rol spelen als bij de bewerking van semen voor IUI. De eisen hierboven opgesomd zouden dus waarschijnlijk ook moeten gelden voor semenbewerking voor IVF/ICSI en cryopreservatie van semen. Eventueel zou voor de semenanalyse misschien wat minder strikt met de eisen zoals hier opgesomd kunnen worden omgegaan, dat houdt namelijk niet direct behandeling in, en ook lijken de resultaten van het semenonderzoek niet zeer drastisch te worden beïnvloed door factoren als thuisproductie en de verwerkingstijd van het semen, althans zolang adequaat op de bewaar- en transportcondities, waaronder temperatuur, van het semenmonster wordt gelet.

In Yavas en Selub's onderzoek werden slechts één type opwerk- en wasmedium, en twee stimulatieprotocollen gebruikt. Op de uitgebreide literatuur hierover is in deze beschouwing niet ingegaan. Yavas en

Selubs' publicatie (7) is er uiteraard maar één, en hun bevindingen vereisen bevestiging en uitbreiding. Hun resultaten echter zijn indrukwekkend en suggestief en verdienen daarom serieus te worden genomen. Het lijkt geen twijfel dat verscherping van de eisen aanzienlijke praktische en financiële gevolgen zal hebben, doch wat anders valt er te zeggen over Yavas en Selub's bevindingen dan: 'als dit waar is, moet het praktische gevolgen hebben!'

Literatuur

1. Intra-uteriene inseminatie (IUI). Ned Ver Obstet Gynaecol (NVOG) richtlijn nr. 29. Januari 2000.
2. Landelijk protocol laboratorium-fase intra uteriene inseminatie. Richtlijn Ned Ver Klin Chem Labgeneesk (NVKC) en Ver Klin Embrol (KLEM). Januari 2005. www.nvkc.nl/kwaliteitsborging/documents/RichtlijnIUIversie1.pdf
3. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4-ed, Cambridge, UK. Cambridge University Press 1999.
4. Mortimer D. Hoofdstuk 3, Semen analysis, en hoofdstuk 13, Therapeutic insemination procedures. In: Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Oxford: Oxford Univ Press 1994: blz. 43-87 en 287-299.
5. Appell RA, Evans PR, Blandy JP. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. *Br J Urol* 1977; 49: 751-756.
6. Jeulin C, Serres C, Jouannet P. The effects of centrifugation, various synthetic media and temperature on the motility and vitality of human spermatozoa. *Reprod Nutr Dev* 1982; 22: 81-91.
7. Yavas Y, Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fert Steril* 2004; 82: 1638-1647.
8. Sanada S, Arai E, Ueda M, Ogura K, Yoshida O. Long-term effects of human seminal plasma from whole semen and from different fractions of split ejaculate on motility of human ejaculated spermatozoa. *Hinyokika Kyo* 1988; 34: 1965-1972.
9. Han HL, Mack SR, Jonge C de, Zaneveld LJ. Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fertil Steril* 1990; 54: 1177-1179.
10. Kanwar KC, Tanagimachi R, Lopata A. Effects of seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1997; 31: 321-327.
11. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 2139-2146.