23 *Spermie-preparation*

PETER SJÖBLOM · BENGT FREDRICSSON

Preparation av spermier för assisterad befruktning

För såväl intrauterin insemination som in vitro-fertilisering är det nödvändigt att separera spermier från seminalplasma. I det förra fallet kan uterus reagera genom kontraktioner med smärta som följd, endometriet kan skadas och infektionsrisken är inte obetydlig. Vid IVF är det absolut nödvändigt att avlägsna seminalplasman, eftersom dess komponenter är skadliga för äggen. Ett annat syfte med spermiepreparation är att selektera fram de mest befruktningsdugliga spermierna.

Det enklaste sättet att preparera spermier är att späda sperman med en saltlösning och därefter centrifugera ned spermierna. Nackdelen med denna metod är att viabla spermier skadas av nära kontakt med döda och döende spermier som genererar reaktiva syreformer, "syreradikaler".

Spermier kan också separeras från seminalplasman med hjälp av sin egen rörelseförmåga. Vanligen görs detta genom så kallad "swim-up"- preparation. Härvid skiktas ett par volymer saltlösning, lämpligen med tillsats av en kolloid (oftast albumin), ovanpå en volym sperma i ett provrör. Motila spermier i sperman får simma upp i det övre skiktet av saltlösningen som skördas efter en lämplig tid, vanligen 45–60 minuter. Processen utförs vanligtvis vid en temperatur av 37 °C. Härigenom selekteras spermierna efter rörlighet.

Genom centrifugering på densitetsgradient kan man eliminera spermier och andra spermakomponenter som genererar membranskadande reaktiva syreformer. Ett ofta använt gradientmedium är Percoll. Om tillgången på spermier är god kan man kombinera gradientcentrifugering med en "swim-up"-procedur.

Spermiepreparationen kan också involvera enzymbehandling med amylas eller kymotrypsin om likvefieringsprocessen är störd. Vid förekomst av antikroppar har det föreslagits att ejakulation direkt i en buffertlösning eller att proteasbehandling av ejakulatet skulle vara av värde, men hittills publicerade resultat ger endast ett svagt om ens något stöd för denna uppfattning.

För spermiepreparation för insemination i öppen vård med begränsade laboratorieresurser finns för närvarande kommersiellt tillgängliga kit. Dessa bygger på selektion med avseende på spermiernas rörlighet, i ett fall genom "swim-up" i ett visköst medium (hyaluronsyra), i ett annat genom migration genom partiklar av dextranpolymerer. Dessa kit är användarvänliga, men erfarenheten av dem är ännu begränsad.

Selektion av X- och Y-kromosombärande spermier

"Könsselektion" av spermier kan motiveras på flera grunder, t.ex. sociala, personliga och medicinska. Det absolut tyngst vägande skälet är att minska risken för lidande hos barnet om kvinnan i ett par är bärare av anlag för en könsbundet nedärvd sjukdom. I Sverige drabbas uppskattningsvis 20 gossebarn årligen av olika former av hemostasrubbningar, muskeldystrofier m.m.

Selektion av han- och honbestämmande spermier förutsätter könsskiljande egenskaper hos spermierna. Eftersom det haploida genomet knappast kommer till uttryck under spermatogenesen är det mindre sannolikt att det på spermien finns könsspecifika ytantigener. DNA-mängden är emellertid större hos honbestämmande spermier och detta kan utnyttjas för att separera X- och Y-kromosombärande spermier. Bland annat på kanin kan "X-" och "Y-spermier" separeras genom DNA-färgning och fluorescensaktiverad cellsortering (FACS) i flödescytometer, och dessa spermier kan framgångsrikt användas för att ge avkomma med en kraftigt förskjuten könskvot. Man har även prövat olika sedimentationsprocedurer med densitetsgradienter. Emellertid visar kontrollerade studier att dessa centrifugeringsmetoder inte är tillräckligt effektiva för att selektera fram spermier av det ena eller andra "könet".

Spermiefrysning

Bakgrund

Spallanzani noterade 1776 att spermier kunde fås att sluta röra sig om de kyldes med is, och att de "reanimerades" vid uppvärmning. Detta ledde till spekulationer över möjligheten att använda fryst sperma, främst i samband med husdjursavel, men under vissa omständigheter också i humanmedicinen. Metodik för praktiskt användbar frysning av humana spermier beskrevs först av Polge och medarbetare 1949, och Bunge och Sherman rapporterade 1953 om de första graviditeterna som etablerats med frysta spermier. Frysförvaring av spermier för användning vid donatorinsemination har sedan dess tillämpats i ökande utsträckning. Under 80-talet har riskerna för smittspridning med donatorsperma uppmärksammats särskilt. Av detta skäl undersöks presumtiva donatorer med avseende på infektioner (lues, gonorré, klamydia, hepatit, HIV) vid donationstillfället samt ytterligare en gång sex månader senare. Om infektion kan uteslutas vid bägge tillfällena kan den nedfrysta sperman användas. Med denna bakgrund får i Sverige endast fryst sperma användas vid donatorinsemination.

En annan viktig tillämpning av spermafrysning rör män som har drabbats av malign sjukdom och därigenom står inför kemo- eller radioterapi eller kirurgi som riskerar att påverka spermatogenesen. Härvid är det angeläget att spermaprov lämnas innan eller i alla fall tidigt i behandlingen. I denna grupp kan förvaringstider på mer än fem år bli aktuella. Ingenting tyder på att spermier skadas av frysförvaring under dessa tidsrymder.

En tredje grupp där spermafrysning kan vara värdefull är män med ejakulationsstörningar eller avflödeshinder, dvs. de fall där spermier endast kan erhållas genom invasiva procedurer såsom elektroejakulation eller punktion av vas deferens eller epididymis. Antalet spermier som kan erhållas på detta sätt är i allmänhet mycket litet.

I det följande ges en översiktlig beskrivning av principiella problem vid frysning av spermier och principiella lösningar på dessa problem. Härutöver ges praktiska exempel på användbara procedurer för spermiefrysning.

Kryobiologisk problematik

Till skillnad från somatiska celler har könsceller och i synnerhet spermier mycket begränsa-

de möjligheter att genom syntesverksamhet reparera skador. Spermien är vidare en reaktiv cell, och för att den skall kunna fullgöra sin funktion får t.ex. akrosomreaktionen inte initieras för tidigt.

Frysning och tining medför att en stor del av spermierna (20–70%) förlorar sin rörelseförmåga (men ej i lika hög grad sin vitalitet, dvs. förmågan hos cellmembranen att utestänga vissa färgämnen). De flesta överlevande spermier har dessutom en förkortad livslängd. Orsakerna till dessa störningar kan sökas på många håll. Fasomvandlingar hos lipiderna leder till förändringar i struktur och funktion hos cellernas organeller. Permeabiliteten för olika joner ändras och genom störningar i subcellulära membranstrukturer kan spermiens oxidativa system komma att generera reaktiva syreformer ("syreradikaler"), som i sin tur genom bl.a. peroxidation kan skada membranlipiderna. Slutligen kan också iskristaller bildas intracellulärt och medföra skador på cellulära strukturelement.

Metodik

För att motverka de problem som frysning och tining medför har medier med olika sammansättning prövats och givetvis har olika temperatur- och tidgradienters inverkan på spermiens överlevnad vid nedkylning undersökts. Frysmediernas sammansättning är i mycket stor utsträckning grundad på empiri med utgångspunkt från rimliga vetenskapliga hypoteser. Med hänsyn till kända mekanismer för frysskador kan ett frysmedium innehålla följande komponenter:

- Kryoprotektant, som kan tränga in i cellen och förhindra intracellulär isbildning (t.ex. glycerol).
- Buffert med liten temperaturkoefficient (t.ex. HEPES, TES).
- Chelator för Ca^{2+} + för att förhindra "clustering" av membranproteiner (t.ex. citrat).
- Antioxidant för att förhindra skadliga verkningar av reaktiva syreformer (t.ex. α-tokoferol).
- Äggula (verkningsmekanism okänd).

Ett medium med dessa komponenter finns kommersiellt tillgängligt. Ofta nöjer man sig dock med att tillsätta glycerol till sperman till en slutlig koncentration av 7–10%. Skillnaden i effektivitet mellan olika frysmedier är liten men dock statistiskt, ehuru kanske inte alltid kliniskt, signifikant. I de fall där tillgången på spermier är begränsad kan dock även dessa skillnader vara betydelsefulla.

Vid nedkylning och frysning utsätts spermierna för osmotisk stress. Mediets innehåll av kryoprotektant, t.ex. glycerol, gör det hyperosmolärt. Vid kontakt med frysmediet krymper spermierna och sväller sedan igen när kryoprotektanten tränger in i cellen. När suspensionen kylts till mediets fryspunkt kan extracellulär isbildning initieras, medan det intracellulära vattnet blir underkylt. Det intracellulära vattnet har då en högre kemisk potential än det extracellulära och, under förutsättning att kylningen är tillräckligt långsam, rör sig vatten ut ur cellen. Denna dehydrering av cellen skyddar den från intracellulär isbildning. Den optimala frysprofilens utseende avgörs av fysikalisk-kemiska och biofysiska egenskaper hos frysmedium respektive spermie. Dessa egenskaper (cellmembranens permeabilitet för vatten, aktiveringsenergi för vattentransport över membranen m.m.) är i dagsläget ofullständigt kända och aktuella temperaturprofiler vilar på empirisk grund. Följande temperaturprofil för frysning av humana spermier har prövats och befunnits ge befruktningsdugliga spermier:

- Blandning med kryoprotektant i cirka 15 minuter i rumstemperatur.
- Kylning 0,5 °/minut till +5 °C.
- Kylning 2,5 °/minut till –5 °C.
- Kylning 10 °/minut till –80 °C.
- Överföring till flytande kväve.

Förenklade frysprocedurer, t.ex. förvaring i kylskåp någon timme, följt av förvaring i

–70 °C över natt och därefter överföring till flytande kväve, ger väsentligt sämre överlevnad än de mer komplicerade procedurerna.

Kunskapsbristen rörande spermiernas osmotiska egenskaper har också försvårat en optimering av tiningsproceduren från teoretiska utgångspunkter. Erfarenhetsmässigt förefaller dock en långsam upptining, t.ex. i luft i rumstemperatur, vara att föredra.

Innan spermierna kan användas för insemination eller IVF måste de separeras från frysmediet. Detta görs lämpligen genom centrifugering på densitetsgradient (isoton Percoll i steg på 90%, 65% och 40%). I samband härmed kan spermierna exponeras för motilitetsstimulerande medel såsom pentoxyfyllin med en koncentration av 0,1%. Eftersom frysning/tining förkortar spermiens livslängd är det av stor vikt att upptining och insemination anpassas mycket väl till ovulation respektive äggens eftermognad efter follikelaspiration vid IVF.

Spermier fryses ofta i PVC-strån som, när de laddas, doppas ned i sperma–kryoprotektantblandningen. Härigenom kontamineras stråets utsida och följaktligen föreligger en teoretisk risk för smittspridning i frysförvaringskärlet. Av detta skäl bör särskilda kärl användas för prov i karantän. Om någon av männen, vars sperma förvaras i kärlet, visar sig vara smittbärare bör man överväga att betrakta alla prov i det aktuella kärlet som infekterade och oanvändbara och en sanering av kärlet kan bli nödvändig.

Tillämpning

Spermakvaliteten skiljer sig kraftigt mellan de i inledningen nämnda grupperna, dvs. spermadonatorer, män med malign sjukdom och män med ejakulationsstörningar eller avflödeshinder. Donatorerna kan selekteras bl.a. genom undersökning av spermiernas förmåga att överleva frysning och tining, medan man i de båda andra grupperna får reda sig med vad som finns att tillgå. Härav följer att donatorspermier med framgång kan användas för intrauterina inseminationer, medan IVF skall användas i de andra situationerna, i extremfall i kombination med mikrofertiliseringstekniker.

Donatorinsemination av gynekologiskt friska kvinnor ger i stora material en graviditetsfrekvens per cykel på omkring 15%. Om spermakvaliteten är låg och/eller om det föreligger gynekologiska problem försämras resultaten drastiskt. Vid användning av frysta spermier från män som behandlats för malign sjukdom kan man vänta sig goda resultat av in vitro-fertilisering, även om endast mycket få spermier kan återvinnas efter frysning och tining samt preparation.

Klinisk handläggning

Män som står inför behandling som irreversibelt kan komma att påverka fortplantningsförmågan skall upplysas om möjligheten att frysa spermier för eventuell senare användning. Vid flera cancerformer som ofta drabbar män i åldrar då familjebildningen ännu inte är genomförd, t.ex. testikelcancer, lymfom, vissa former av leukemi samt aplastisk anemi, är utsikterna till överlevnad idag goda. Resultaten vid assisterad befruktning med frysta spermier är utmärkta och vetskapen om att möjligheten till faderskap finns bevarad kan ha stor betydelse för patientens psykologiska bearbetning av sin situation och därigenom kanske även för läkningsförloppet.

Spermaprov bör inlämnas för infrysning snarast möjligt innan behandling ges. Kvaliteten på sperman är ofta indirekt påverkad av grundsjukdomen, särskilt i fall av morbus Hodgkin, men detta behöver inte nödvändigtvis påverka dess användbarhet. Azoospermi uppstår inte ögonblickligen när behandling startas, men destruktionen av det germinativa epitelet går fort. Ändå ses fall där spermieproduktionen återhämtat sig, även mycket lång tid efter avslutad behandling.

Vid användning av de frysta spermierna bör patienten i princip vara frisk, ehuru innebörden av detta begrepp inte är självklar i de fall

mannen har behandlats för malign sjukdom. Den etiska och psykologiska problematiken kring dessa frågor är svår och insatser av kurator kan vara mycket värdefulla.

Litteratur

BUNGE, R.G. & SHERMAN, J.K.: Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature 172*: 767, 1953.

CRITSER, J.K., ARNESSON, B.W., ASKER, D.V., HUSE-BENDS, A.R. & BALL, G.D.: Cryopreservation of human spermatozoa. II Postthaw chronology of motility and zona-free hamster ova penetration. *Fertil. Steril. 47*: 980, 1987.

DAMEWOOD, M.D. & GROCHOW, L.B.: Prospects for fertility after chemotherapy or radiation for neoplastic disease. *Fertil. Steril. 45*: 443, 1986.

HAMMIT, D.G., BEDIA, E., ROGERS, P.R., SYROP, C.H., DONOVAN, J.F. & WILLIAMSON, R.A.: Comparison of motility stimulants for cryopreserved semen. *Fertil. Steril. 52*: 495, 1989.

KHALIFA, E., OEHNINGER, S., ACOSTA, A., MORSHEDI, M., VEECK, L., BRZYSKI, R. & MUASHER, S.: Successful fertilization and pregnancy outcome in IVF using cryopreserved-thawed spermatozoa from patients with malignant diseases. *Human. Reprod. 7*:105, 1992.

LELANNOU, D. & LANSAC, J. Artificial procreation with frozen donor semen: experience of the French Federation CECOS. *Human. Reprod. 4*: 757, 1989.

NOILES, E.E., MAZUR, P, WATSON, P.F., KLEINHAUS, F.W. & CRITSER, J.K.: Determination of water permeability coefficients for human spermatozoa and its activation energy. *Biol. Reprod. 48*: 99, 1993.

POLGE, C., SMITH, A.U. & PARKES, A.S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature 164*: 666, 1949.

PRINS, G.S. & WEIDEL, L.: A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertil. Steril. 46*: 147, 1986.

SANGER, W.G., OLSON, J.H., SHERMAN, J.K.: Semen cryobanking for men with cancer – criteria change. *Fertil. Steril. 58*: 1024, 1992.