

**Κλινικοεργαστηριακές
μελέτες**

Εφαρμογή της τεχνικής “mini swim up” στην επεξεργασία σπέρματος για ενδο-ωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI)

Β. Παλαπέλας
Α. Δανηλίδης
Π. Πετρόπουλος
Al Hasani¹
Β. Καραγιάννης

Περίληψη

Οι διαταραχές της παραγωγής, των λειτουργικών χαρακτηριστικών και της μεταφοράς του σπέρματος αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες υπογονιμότητας. Τα τελευταία χρόνια, η ευρεία εφαρμογή της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίων (ICSI), που λαμβάνονται από εκσπερμάτιση ή από βιοψία όρχεως και επιδιδυμίδας, έδωσε τη δυνατότητα για τεκνοποίηση ακόμη και σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η παρουσίαση των κλινικών αποτελεσμάτων της ICSI μετά από προετοιμασία του σπέρματος με την τεχνική “mini swim up”.

Εξετάσθηκαν αναδρομικά 152 κύκλοι ICSI που πραγματοποιήθηκαν από το 1999 έως το 2003. Η ένδειξη για την εφαρμογή της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίων ήταν ο σοβαρός ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας. Η μέση ηλικία των ανδρών της μελέτης ήταν $35,02 \pm 6,92$ έτη. Σε 26 περιπτώσεις, η λήψη σπερματοζωαρίων έγινε μετά από TESE και κατάψυξη - απόψυξη ορχικού ιστού. Στο εργαστήριό μας, η προετοιμασία των σπερματοζωαρίων εκτελείται με την τεχνική “mini swim up”. Το σπέρμα υποβάλλεται σε διπλή φυγοκέντρηση και στη συνέχεια επωάζεται στους 37°C για μία με δύο ώρες. Η ωθητική διέγερση έγινε με GnRH-αγωνιστή και HMG στο μακρύ πρωτόκολλο.

Στους 152 κύκλους ελήφθησαν συνολικά 1.779 ωάρια ($11,70 \pm 7,57$ ανά κύκλο). Το 64,47% των ωαρίων ήταν ώριμα και υποβλήθηκαν σε ICSI ($n=1147$). Το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 73,3% (841/1147). Το συνολικό ποσοστό κηύσεων ήταν 36,8% (56/152). Στην υποομάδα που εφαρμόστηκε TESE-ICSI οι κηύσεις ήταν 26,92% (7/26).

Η ICSI οδηγεί σε υψηλά ποσοστά γονιμοποίησης και κηύσεων παρά την πτωχή ποιότητα των σπερματοζωαρίων. Η προετοιμασία του σπέρματος με την τεχνική “mini swim up” είναι ταχεία, αποτελεσματική και δεν παρουσιάζει επιπλοκές.

Όροι ευρητήριο: εξωσωματική γονιμοποίηση, ενδοωαριακή σπερματέγχυση, υπογονιμότητα, προετοιμασία σπέρματος.

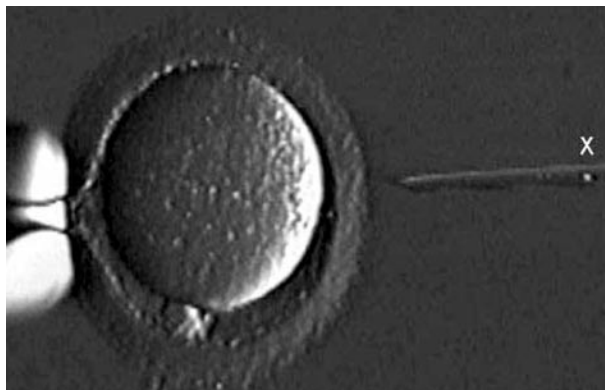
Εισαγωγή

Η ενδοωαριακή έγχυση του σπερματοζωαρίου έχει σαν αποτέλεσμα αφενός μεν την παράκαμψη πιθανών φραγμών του ωαρίου, αφετέρου την τοποθέτηση του σπερματοζωαρίου απευθείας μέσα στο κυτταρόπλασμα. Μετά τις πρώτες ανακοινώσεις επιτυχημένων εγκυμοσύνων και τοκετών, παρατηρήθηκε μία αλματώδης αύξηση της χρήσης της ενδοωαριακής σπερματέγχυσης σε

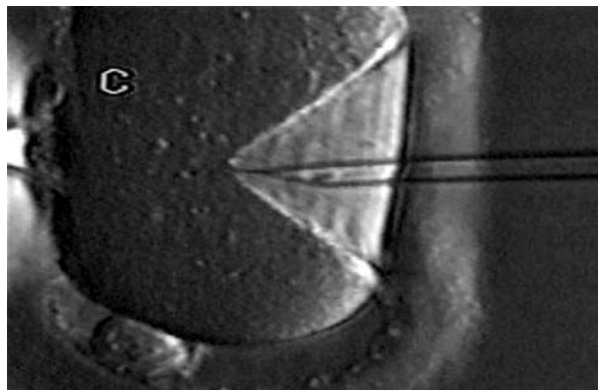
Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική
Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης
¹Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική,
Πανεπιστήμιο του Lübeck, Germany

Αλληλογραφία:

Β. Παλαπέλας
Γ' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική
Α.Π.Θ.
Γ.Ν.Θ., Ιπποκράτειο
Κωνσταντινουπόλεως 49
546 42 Θεσσαλονίκη
Τηλ. 2310 892120, Fax. 2310 992950.



Εικόνα 1. Προετοιμασία έγχυσης του σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο. Πιπέτα στήριξης στα αριστερά και βελόνα ICSI στα δεξιά.



Εικόνα 2. Η βελόνη προωθείται και η μεμβράνη του ωαρίου είναι έτοιμη να ραγεί.

περιπτώσεις αποτυχημένων IVF (εξωσωματικών γονιμοποιήσεων) και σε ασθενείς με σοβαρότατη ολιγοασθενοτερατοσπερμία. Σήμερα, τα αποτελέσματα ICSI σε ασθενείς με βαριά ολιγοασθενοτερατοσπερμία πλησιάζουν αυτά της φυσιολογικής γονιμοποίησης (36% θετική hCG και 28% τοκετού για κάθε κύκλο θεραπείας). Έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, με επιτυχία σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας αλλά και μετά από αποτυχημένες προσπάθειες IVF. Κατά τη χρήση της ICSI δεν αποτελούν τροχοπέδη ούτε η κινητικότητα ούτε η μορφολογία του σπέρματος, ενώ τα ποσοστά γονιμοποίησης και εγκυμοσύνης είναι ανεξάρτητα από την ποιότητα του σπέρματος. Η εισαγωγή της χρήσης της ICSI μετά από FNA ή TESE αποτέλεσε σημαντικότερη επιλογή για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας σε περιπτώσεις συγγενούς απλασίας των σπερματικών πόρων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές επιλογής των κατάλληλων σπερματοζωαρίων. Φαίνεται πως η πιο διαδεδομένη μέθοδος επιλογής του σπερματοζωαρίου για ενδοωαριακή έγχυση είναι η καταρχήν μηχανική ακινητοποίηση του σπερματοζωαρίου και στη συνέχεια η αναρρόφησή του μέσα σε ειδική πιπέτα μικροέγχυσης. Είναι προφανές πως η τεχνική ικανότητα και τα κατάλληλα μικροεργαλεία (ιδανικό μέγεθος και σχήμα των μικροπιπετών) αποτελούν θεμέλιους λίθους για την επιτυχία της ICSI. Σαφώς είναι απαραίτητη η συνεργασία της έμπειρης ομάδας εξωσωματικής γονιμοποίησης με το μικροχειρουργό ουρολόγο καθώς και το εργαστήριο της IVF ώστε να επιτευχθούν τα καλύτερα αποτελέσματα.

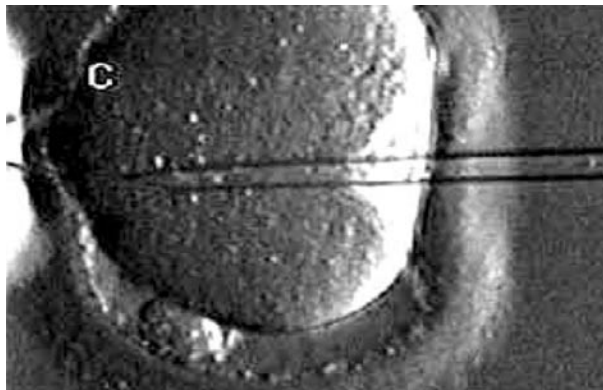
Υλικό και μέθοδος

Εξετάσθηκαν αναδρομικά 152 κύκλοι ICSI που πραγματοποιήθηκαν από το 1999 έως το 2003. Η ένδειξη για την εφαρμογή της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίων ήταν ο σοβαρός ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας. Η μέση ηλικία των ανδρών της μελέτης ήταν

35,02 ± 6,92 έτη. Σε 26 περιπτώσεις, η λήψη σπερματοζωαρίων έγινε μετά από TESE και κατάψυξη - απόψυξη ορχικού ιστού. Στο εργαστήριό μας, η προετοιμασία των σπερματοζωαρίων εκτελείται με την τεχνική “mini swim up”. Το σπέρμα υποβάλλεται σε διπλή φυγοκέντρωση στα 500G για δύο λεπτά και, στη συνέχεια, επωάζεται στους 37°C για μία με δύο ώρες. Η ωθητική διέγερση έγινε με GnRH-αγωνιστή και HMG στο μακρύ πρωτόκολλο. Η πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας έγινε με χορήγηση 10.000 HMG όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ήταν 20 με 22 mm. Τα ωοθυλάκια προετοιμάζονται με 0.5% υαλουρονιδάση για 30 δευτερόλεπτα. Κάτω από μεγέθυνση 50 φορές, αφαιρούνται κύτταρα από τη διαφανή ζώνη με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ. Καθαρίζεται η ωριμότητα των ωαρίων και χρησιμοποιούνται αυτά που βρίσκονται σε μετάφαση II. Για την πραγματοποίηση της ICSI τοποθετούνται σε δισκίο Petri έξι μικροσταγονίδια που περιέχουν τα ωάρια και ένα με τα σπερματοζωάρια. Αυτά τα μικροσταγονίδια καλύπτονται από 3-5 ml παραφινελαίου χαμηλού μοριακού βάρους. Σε 200 φορές μεγέθυνση ακινητοποιούμε ένα σπερματοζωάριο με ελαφρά πίεση στο μέσο τμήμα του με την πιπέτα έγχυσης. Το ακινητοποιημένο σπερματοζωάριο αναρροφάται έτσι ώστε να εισέρχεται στην πιπέτα με πρώτη την ουρά του. Στη συνέχεια, η πιπέτα που περιέχει το σπερματοζωάριο προωθείται προς το ωάριο. Μεγεθύνουμε το ωάριο 100 φορές, το περιστρέφουμε ώστε το πολικό σωματίο να βρεθεί στη 12^η ή 6^η ώρα και το σταθεροποιούμε με ειδική πιπέτα συγκράτησης με εσωτερική διάμετρο 20 μm. Προωθούμε την πιπέτα με το σπερματοζωάριο στο κέντρο του ωαρίου, διαπερνώντας τη διαφανή ζώνη και την κυτταρική μεμβράνη όσο το δυνατό ατραυματικά. Στη συνέχεια γίνεται έγχυση του σπερματοζωαρίου μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (εικόνες 1,2,3). Συνήθως, χρησιμοποιούμε τρία με τέσσερα ωάρια τα οποία και τοποθετούνται σε θρεπτικό υλικό Ham's F-10. Τα ωάρια εξετάζονται 16 με 18 ώρες μετά

Πίνακας 1. Αποτελέσματα της ICSI με χρήση της μεθόδου mini swim up.

Αριθμός κύκλων	Αριθμός ωαρίων που λήφθηκαν	Αριθμός ώριμων ωαρίων	Αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων	Συνολικός αριθμός κηύσεων	Αριθμός κηύσεων μετά από TESE-ICSI
152	1.779	1.147/1.779 (64.47%)	841/1.147 (73.3%)	56/152 (36.8%)	7/26 (26.92%)

**Εικόνα 3.** Η βελόνη της ICSI έχει διαπεράσει τη μεμβράνη του ωαρίου και ένα σπερματοζώαριο έχει απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου.

για την παρουσία δύο προπυρήνων. Τα έμβρυα, μέχρι τρία, μεταφέρονται στην ενδομήτρια κοιλότητα μετά από 48 ώρες, ενώ τα υπόλοιπα έμβρυα καταψύχονται στους -196 βαθμούς Κελσίου.

Αποτελέσματα

Στους 152 κύκλους ελήφθησαν συνολικά 1.779 ωάρια ($11,70 \pm 7,57$ ανά κύκλο). Το 64,47% των ωαρίων ήταν ώριμα και υποβλήθηκαν σε ICSI ($n=1147$). Το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν 73,3% (841/1147). Το συνολικό ποσοστό κηύσεων ήταν 36,8% (56/152). Στην υποομάδα που εφαρμόστηκε TESE-ICSI οι κηύσεις ήταν 26,92% (7/26) (πίνακας 1). Σε δύο περιπτώσεις υπήρξε αυτόματη έκτρωση. Μία ICSI οδήγησε σε τρίδυμη κήση.

Συζήτηση

Την τελευταία δεκαετία έχουν αλλάξει σημαντικά οι ενδείξεις χρήσης της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η διάγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας κερδίζει συνέχεια έδαφος. Έτσι, ενώ στις αρχές του 1980 η ανδρική υπογονιμότητα αποτελούσε μόνο το 3% των ενδείξεων για IVF, τώρα ξεπερνάει το 30% χωρίς να υπολογίζονται οι περιπτώσεις μεικτής υπογονιμότητας. Έως την ανακάλυψη των νέων τεχνικών όπως της SUZI

και της ICSI, η συμβατική IVF αποτελούσε τη μόνη ελπιδοφόρα μέθοδο. Τα αποτελέσματα, όμως, σε περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας ήταν απογοητευτικά. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις με βαριά τερατοσπερμία (λιγότερο από 9% φυσιολογικές μορφές) τα ποσοστά εγκυμοσύνης ανά κύκλο ήταν λιγότερα από 12% ενώ ήταν μηδενικά σε ποσοστό φυσιολογικών μορφών κάτω του 5%¹. Τα δεδομένα δείχνουν σαφέστατα ότι, όπως η SUZI παλαιότερα, έτσι και η ICSI σήμερα αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την αντιμετώπιση της σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας^{2,3}. Ενώ σε περιπτώσεις ολιγοασθενοτερατοσπερμίας τα ποσοστά εγκυμοσύνης με SUZI ήταν 16%, με την ICSI τα ποσοστά έφθασαν το 35%³. Επίσης, φαίνεται πως με την ICSI τα ποσοστά εγκυμοσύνης παραμένουν τα ίδια (29%) όταν το ποσοστό μορφολογίας πέσει κάτω του 10%⁴. Ακόμη, είναι σημαντικό το γεγονός πως η απευθείας έγχυση του σπερματοζωαρίου μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, σε αντίθεση με τη συμβατική IVF, βελτιώνει σαφέστατα το συγχρονισμό μεταξύ της εξωσωματικής γονιμοποίησης και του δέκτη αλλά συμβάλλει και στην εξοικονόμηση χρόνου έξι έως οκτώ ωρών⁵. Τα ποσοστά εγκυμοσύνης στη μελέτη μας με τη χρήση της μεθόδου mini swim up για την προετοιμασία του σπέρματος και στη συνέχεια της ICSI φαίνεται πως αντιστοιχούν στα βιβλιογραφικά δεδομένα^{5,6}. Ακόμη, συγκριτικές μελέτες της mini swim up με άλλες τεχνικές προετοιμασίας του σπέρματος, όπως τη mini-Percoll και τη Sephadex G10, καταδεικνύουν την ανωτερότητα της mini swim up όσον αφορά στην ποιότητα του σπέρματος^{7,8}. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως η μέθοδος ICSI έχει υψηλά ποσοστά επιτυχίας ανεξάρτητα από την κακή ποιότητα του σπέρματος. Η προετοιμασία του σπέρματος με τη μέθοδο mini swim up είναι αποτελεσματική χωρίς επιπλοκές και λιγότερο χρονοβόρα^{6,9} και αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας⁹.

Summary

Palapelas V, Daniilidis A, Petropoulos P, Hasani Al S, Karagiannis V.

The use of mini swim up technique for sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection.

Helen Obstet Gynecol 19(1):16-19, 2007

The sperm abnormalities are one of the major causes of infertility. The last few years the use of ICSI with sperm retrieval with FNA and TESE has been the solution for treating infertility of men with non obstructive azoospermia. The aim of our study is to present the clinical results of ICSI after the sperm preparation with the mini swim up technique. We made a retrospective analysis of 152 ICSI cycles from 1999 to 2003. The indication for ICSI was the severe male infertility. The mean age of men was 35.02 ± 6.92 years old. In 26 cases, we used TESE and cryopreservation of testicular tissue. We used the mini swim up technique in order to prepare the spermatocytes. We performed double centrifugation and incubation at 37°C for one to two hours. The ovarian stimulation was achieved with GnRH agonist and HMG using the long protocol. In 152 cycles we collected 1.779 oocytes (11.70 ± 7.57 per cycle). 64.47% of the oocytes were mature and underwent ICSI ($n=1147$). The fertilization percentage was 73.3% (841/1147). The total number of pregnancies was 36.8% (56/152). For the subgroup that we used both TESE-ICSI the pregnancy rate was 7/26 (26.92%). The pregnancy rates with ICSI are quite high even in severe infertility due to male factor. The sperm preparation with the mini swim up technique is fast, safe and with satisfactory results.

Key words: IVF, ICSI, infertility, sperm preparation.

Βιβλιογραφία

1. Kruger TF, Menkveld R, Strander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46:1118-1123.
2. WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion 1993. Third edition. Springer Press, Berlin, Heidelberg, New York.
3. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde M-P, Van Assche E, Devroy P. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993; 8:1055-1060.
4. Ombelet W, Fourie F ler, Vandepuut H, Bosmans E, Cox A, Janssen M, Kruger T. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum Reprod* 1994; 9:1479-1484.
5. Al-Hasani S, Trotnow S, Dadtler C, Hahn J. In vitro fertilization and embryo transfer of pre-ovulatory rabbit oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1986; 21:187-195.
6. Palermo G, Joris H, Devroy P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon in an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-18.
7. Bollendorf A, Check JH, Katsoff D, Lurie D. Comparison of direct swim-up, mini-Percoll and Sephadex G10 procedures. *Arch Androl* 1994 Mar-Apr; 32(2):157-162.
8. Al Hassani S, Kupker W, Baschat AA, Sturm R, Bauer O, Diedrich C, Diedrich K. Mini-swim-up: a new technique of sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 1995 Aug; 12(7):428-433.
9. Zollner U, Zollner KP, Dietl J, Steck T. Semen sample collection in medium enhances the implantation rate following ICSI in patients with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 2001 Nov; 16(11):2475-2476.