

Dr. Szöllősi János és mtsai.

A mélyfagyasztás hatásainak vizsgálata az emberi ivarsejtekre morfológiai és funkcionális paraméterek alapján.

OTKA T08235

Bevezetés:

A pentoxyphyllin metilxantin származék, amely spermiumokra gyakorolt hatását korábban már igazolták. Növeli a sebességet (curvilinear velocity és lateral head displacement), és fokozza az akroszóma reakció készséget. Normozoospermiában ezt a hatást nem figyelték meg, de asthenozoospermiában jellemző a motilitás változása. Annak ellenére, hogy a donor inszeminációk (AID) száma az IVF és ICSI technikák fejlődése következtében az elmúlt években egyre csökken, mégis ez jelenti az egyedüli megoldást non-obstruktív azoospermia esetén és azokban az esetekben, amikor a fentebb említett mesterséges megtermékenyítési technikák nem vezetnek eredményre.

A donor inszemináció elvégzéséig az ondómintákat előzetesen minimum 6 hónapig-a szükséges tesztek elvégzéséig- folyékony nitrogénben fagyasztva kell tárolni. A fagyasztási és felolvasztási procedúra még a legmegfelelőbb protokoll esetén is károsítja a spermiumok életképességét: csökkenti mind a gyors progresszív motilitást, mind az össz-motilitást. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy felolvasztás után a mintákhoz pentoxyphyllint adva, fokozódik a motilitás. Nem ismertek viszont pontos adatot arra vonatkozóan, hogy melyik is a legmegfelelőbb pentoxyphyllin koncentráció: alacsony koncentrációban nem eléggé hatékony, túl magas koncentrációban a toxikus hatása érvényesülhet. Az irodalomban az AIH esetén hozzáadandó pentoxyphyllin koncentráció is vitatott. Továbbá nem ismert intrauterin inszemináció során a donor hímivarsejtek pentoxyphyllin kezelésének terhességi rátára gyakorolt hatása sem.

A petefészek-fagyasztás ötlete rövidebb múltra tekint vissza. A páciensek olyan fertilis korú nők köréből kerülhetnek ki, akiknek valamilyen fennálló rosszindulatú betegség (leukaemia, Hodgkin-kór, Non-Hodgkin lymphoma, melanoblastoma, pajzsmirigy-, vese-, bélrendszeri vagy csontok stb.) miatt kemo- és/vagy radioterápiát javasoltak, és fennáll a petefészek károsodás lehetősége, ugyanakkor az alapbetegségből meggyógyulva nem mondanak le az esetleges későbbi gyermekvállalás szándékáról. A vizsgálataink tervezett célja a szövetminták morfológiai és funkcionális vizsgálata első lépésben ún. explant kultúrákban. Ennek során a felolvasztott szövet kis szeletét tápfolyadékba helyezve és fiziológiás koncentrációban adott in vitro FSH-LH kezelést követően az érési folyamat a termelőző ösztadiol, tesztoszteron és

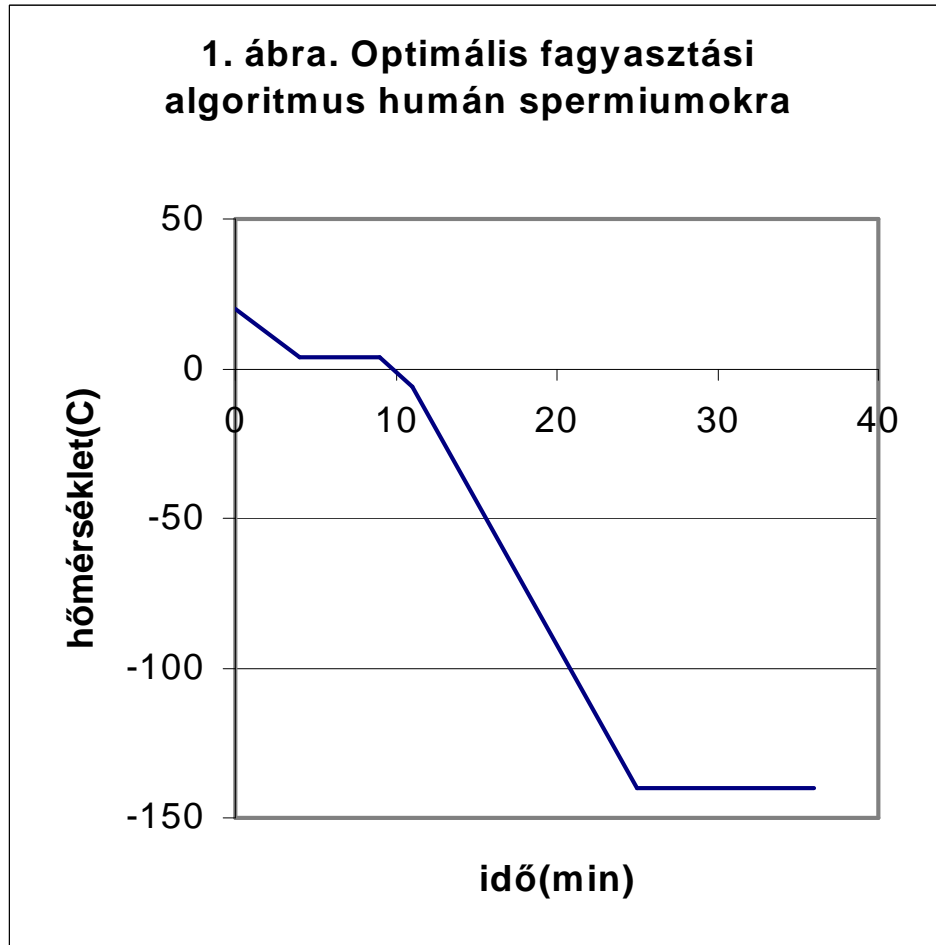
inhibin mérésével nyomonkövethető. A módszer alkalmazásával nem az volt a célunk, hogy in vitro érlelt petesejteket állítsunk elő az in vivo hormonális ciklusfelépítés analógiájára és ezáltal mesterséges megtermékenyítést (pl. ICSI) végezzünk, hanem a fagyasztva tárolt szövet későbbi visszaültetése által lehetőséget biztosítunk esetlegesen akár spontán terhesség bekövetkeztére, illetve kivédjük az ováriumok eltávolításából származó nem kívánt menopausa jellegű mellékhatásokat. A vizsgálatok lényeges eleme a felolvasztott szövet hormontermelésének vizsgálata, mely a hormonpótlás endogén formában történő megvalósításában nyithatna új fejezetet.

Eredmények:

A vizsgált 35 normozoospermiás, 27 oligozoospermiás és 42 asthenozoospermiás férfi ondómintájához pentoxyphyllin-t adtunk, emelkedő koncentrációban. Meghatároztunk azt az ideális pentoxyphyllin koncentrációt, amely legjobban növelte a minta motilitását a kiindulási értékhez képest. A normozoospermiás és oligozoospermiás minták esetében az alkalmazott 0-5 mmol/l hígítási sorban a pentoxyphyllin koncentrációk nem növelték szignifikánsan a motilitást in vitro, asthenozoospermia esetében 1 mmol/l koncentráció esetén találtunk optimális motilitásfokozó hatást a pentoxyphyllin hozzáadását követő 2 óra múlva. Ebben az esetben az átlagos gyors progresszív motilitás 6,6%-kal fokozódott $p < 0,05$ szignifikanzint mellett. A különbség csak a gyors progresszív motilitásban nyilvánult meg, az összmotilitás nem növekedett.

Kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a fagyasztási procedúra károsítja az élő sejteket. A spermiumok fagyasztásának jelentősége szerteágazó, de annak ellenére, hogy az emlősök közül az emberé bírja ki leginkább a fagyasztást, a túlélési arányok még mindig alacsonyak.

A fagyasztás eredményét jelentősen befolyásolja a hűtés, illetve a felolvasztás gyorsasága. Több fagyasztási algoritmus kipróbálása után a legmegfelelőbbnek a következő jellemzőkkel rendelkező fagyasztási görbét találtuk: a fagyasztás össz-időtartama 25 perc, amelyben egy 5 percre tartó $+4^{\circ}\text{C}$ -os inkubálási platófázist követően lassú hűtés következik -6°C -ig $5^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ sebességgel. Végül $9,6^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ sebességgel -140°C -ig tartó hűtés. -140°C -ről a mintákat közvetlenül a -196°C -os folyékony nitrogén tartályba helyezhetjük, ugyanis ekkor a fagyasztás már áthaladt a kritikus -15°C és -60°C közötti szakaszon. A fagyasztási görbét az 1. ábra mutatja.



Megjegyzendő, hogy ezt a fagyasztási görbét műszalmában történő fagyasztáskor találtuk a legjobbnak, ettől eltérő hordozókban történő fagyasztáskor más és más lehet a görbe lefutása. Szintén befolyásolhatja a görbe optimális voltát a cryopreservációs médium összetétele is, amelyeket a különböző gyártók termékei kissé különböző összetételben tartalmaznak. Alapvető összetevőjük a glicerin, a szérumalbumin, illetve valamilyen pufferoldat. Ezek az ondómintához adva penetrálnak a sejtmembránon, és növelik a meg nem fagyott intercelluláris térfogatot oldatban tartva így a fagyasztás során bekoncentrálódó, és ezáltal toxikussá váló sókat. Mi a SpermFreeze (Fertipro, Belgium) védőoldatot használtuk vizsgálatainkban.

A felolvasztásra a nemzetközi irodalomban közöltekkel egybecsengően a nagyon gyors felolvasztást találtuk megfelelőnek, amelyet a műszalmák 1-2 perces 37 °C-os vízfürdőbe helyezésével értünk el.

A komputervezérelt fagyasztóberendezéssel végzett ondófagyasztást követő felolvasztás után pentoxyphyllin hozzáadásával vizsgáltuk a motilitást. Az optimális motilitásnövelő hatást 0,75 mmol/l pentoxphyllin-koncentráció esetén kaptuk.

A vizsgálatban 50 normozoospermias ondómintát fagyaszottunk le, amelyek előzetes vizsgálatok alapján fagyasztás előtti minőségüket tekintve megfeleltek a donor ondóminták kritériumainak. A felolvasztás után a minták 54%-ban csak 1-2 mozgó spermiumot találtunk, így ezek további feldolgozását nem végeztük el. Ezen eredmények is alátámasztják a donorok beválogatásának azon feltételét, ami szerint csak próbafagyasztással kell meggyőződnünk a minta felolvasztást követő használhatóságáról. A 23 feldolgozott mintában az átlagos spermiumkoncentráció $153,7 \pm 55,7$ M/ml volt fagyasztás előtt. Az adatok alapján a gyors progresszív motilitás és az összmotilitás is 0,75 mM pentoxyphyllin koncentrációnál volt a legnagyobb. A különbség a kontrollhoz képest ebben az esetben szignifikáns volt (15% vs. 27% illetve 21% vs. 32%).

Donor hímivarsejtekkel történő intrauterin inszeminációt a következő esetekben kell végezni: irreverzibilis azoospermia (a spermatermelés visszafordíthatatlanul hiányzik), súlyos oligo-terato-asthenozoospermia (OTA syndroma, kombinált spermiumtermelési zavar), nem korrigálható ejakulációzavar, a herék veleszületett vagy szerzett hiánya, súlyos atrophiaja, a hímivarsejtek mutációs elváltozásának lehetősége (pl. kemo- vagy radioterápiát követően), súlyos örökletes megbetegedés átörökítésének lehetősége, a saját hímivarsejtekkel végzett többszöri sikertelen ICSI (MESA, TESA; szervezeten kívüli megtermékenyítési kísérletek) illetve Rh negatív vércsoportú izoimmunizált nőbeteg esetében. Az asszisztált reprodukciós eljárások fejlődésével egyre kevesebb igény mutatkozik a donor hímivarsejtekkel történő megtermékenyítésekre. A mellékhere és hereszövetből akár egyetlen spermium izolálásával (MESA, TESA, SMART-ICSI) azonban megnyílik a lehetőség a szervezeten kívüli megtermékenyítés lehetőségére. Mindezekon túl azonban a donor spema használata a megfelelő indikációkban egyre kevésbé alkalmazott, de továbbra sem nélkülözhető eljárásnak tekintendő.

A donortól származó hímivarsejtekkel történő intrauterin inszeminációk minden esetben a női páciens kontrollált petefészek hyperstimulációját követően zajlottak. Az ovulációindukció a ciklus 3. napjától naponta orális antiösztrógen hatású clomiphen citrát és/vagy a ciklus 3. napjától másnaponta subcutan adagolt gonadotrop hormonok (vizeletből tisztított vagy rekombináns) adagolásával történik. Az adagolt hormonok mennyisége és az alkalmazás időtartama individuális kell hogy legyen, ennek kontrollját az adott ciklusban ismételt

végzett ultrahang-folliculometriával és a vérben mérhető 17β -ösztradiol hormon mennyiségi meghatározásával végeztük. Sikeresnek minősült az adott ciklusban az ovulációindukció, ha a domináns tüsző(k) elérték a 17-20mm-es átmérőt, a méh endometriuma legalább 8mm és három rétegű volt, ill. a szérum 17β -ösztradiol szint tüszőnként elérte az 1500 pmol/l értéket. Ekkor végeztünk luteinizálást humán choriogonadotropin (hCG) adásával, általában 10000 IU mennyiségben. Amennyiben szövődményként ovarium hyperstimulatio szindróma (OHSS) igazolódott a luteinizációtól eltekintettünk, és konzervatív kezelést (ágynyugalom, nem-steroid gyulladáscsökkentő) alkalmaztunk. A hCG adása után 36 és 60 órával végeztük az inszeminációkat, egy ciklus esetében két egymást követő napon mindig ugyanattól a donortól származó spermiumokkal. A folyékony nitrogénben történő mélyfagyasztásból felolvasztott spermamintákhoz kontroll spermanalízist követően a korábbi vizsgálataink alapján 0,75 mmol/l koncentrációban adtunk pentoxyphyllint, majd 60 perc $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás és ismételt sperma analízis után került sor az intrauterin inszeminációra, egy-egy alkalommal 1 ml-nyi a fentiek szerint előkészített inszeminációs anyagot felhasználva. Az esetlegesen bekövetkezett terhességeket minden esetben ultrahang vizsgálat /élő embrió(k) kimutatása/ kellett, hogy megerősítse, a csak biokémiai módszerrel (vizelet béta-hCG kimutatás) igazolt terhességet önmagában nem tekintettük igazolt terhességnek. Általában 3 kezelési ciklus alapján számítottunk kumulatív terhességi arányt, hacsak terhesség korábban nem következett be.

A vizsgált időszakban mindösszesen 197 asszony esetében összesen 280 ciklus során végeztünk donor ivarsejtek felhasználásával inszeminációs kezeléseket. Randomizált módon 71 ciklus alkalmával került sor a felolvasztott minta pentoxyphyllinnel történő kezelésére. Az inszeminációs kezelések kapcsán a pentoxyphyllinnek betudható szövődmény, mellékhatás nem fordult elő. A pentoxyphyllinnel kezelt ciklusokban a maximum három egymást követő ciklusra számított kumulatív terhességi arány 38,2% volt, míg a kontrollcsoportban, ahol pentoxyphyllin hozzáadására nem került sor, ugyanez az arány 38,0%-nak bizonyult. A különbség nem szignifikáns.

Következtetések: A donor intrauterin inszeminációs kezeléseknél a mélyfagyasztásból felengedett spermamintákhoz adott 0,75 mmol/l koncentrációjú pentoxyphyllin korábbi vizsgálatainkban tapasztalható eredményekhez hasonlóan szignifikánsan javította a gyors progresszív motilitású spermiumok százalékos arányát a lassú progresszív mozgású spermiumok arányának rovására. Ebben a koncentrációban alkalmazva a pentoxyphyllin inszeminációs kezeléseknél biztonságosan, mellékhatásoktól mentesen alkalmazható volt. A

vizsgált koncentrációban a pentoxyphyllin nem javította szignifikánsan a bekövetkezett terhességek előfordulási gyakoriságát.

Mivel petefészek fagyasztás igénye a vizsgálati időszakban összesen két alkalommal merült fel, amelyek közül csak egy alkalommal sikerült fagyasztható mintát nyerni a petefészek-szövetből, ezért az ezzel kapcsolatos vizsgálatokat nem tudtuk elvégezni. A pályázatunk benyújtása óta eltelt időben a petefészek fagyasztás hazánkban nem vált általános gyakorlattá a világszerte tapasztalt lelkesedés ellenére. Alternatívaként az egyszerűbb kivitelezésű petesejt-fagyasztás alkalmazható erre szakosodott centrumokban. Meglévő kapcsolatainkat változatlanul fenntartva azokkal az intézményekkel, ahonnan petefészek szövet fagyasztásra igény jelentkezhet (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Gyermekgyógyászati Klinika, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Onkoterápiás Klinika) a tervezett vizsgálatokat a jövőben az OTKA pályázati időszak lezárása ellenére is el kívánjuk végezni.

Eddigi eredményeinket tudományos közlemények és előadások formájában ismertettük hazai és nemzetközi folyóiratokban és fórumokon. Egy PhD disszertáció készült a fenti anyag felhasználásával.

Összefoglalás

- Asthenozoospermia esetében 1 mmol/l koncentráció esetén találtunk optimális motilitásfokozó hatást a pentoxyphyllin hozzáadását követő 2 óra múlva. Ebben az esetben az átlagos gyors progresszív motilitás 6,6%-kal fokozódott $p < 0,05$ szignifikanszint mellett. A különbség csak a gyors progresszív motilitásban nyilvánult meg, az összmotilitás nem növekedett. Normozoospermia és oligozoospermia esetében, amikor a kiindulási motilitásérték normális volt, hasonló javulást nem észleltünk..
- A komputervezérelt fagyasztóberendezés programozásának beállításával meghatároztuk az ideális fagyasztási algoritmust.
- A komputervezérelt fagyasztóberendezéssel végzett ondófagyasztást követő felolvasztás után pentoxyphyllin 0,75 mmol/l koncentrációban történő hozzáadásával értük el az optimális motilitásnövelő hatást.

- Randomizált vizsgálatban pentoxyphyllinnel kezelt illetve nem kezelt fagyasztott donor ondómintákkal végzett intrauterin inszeminációk esetén a kumulatív terhességi arány a három ciklusra vonatkoztatva nem különbözött szignifikánsan (38,2 % illetve 38,0 %).

-A petefészek fagyasztásra nem sikerült elegendő mintát nyernünk, ezért az ezzel kapcsolatos vizsgálatokat nem tudtuk elvégezni.