

SPERMIOGRAM – PRIKAZ NOVIH SMJERNICA WHO I PROMJENE U IZRADI

Katarina Jedrejčić, Patricija Banković Radovanović, Lorena Honović

Opća bolnica Pula, Djelatnost za laboratorijsku dijagnostiku

Summary: Infertility is defined as the inability to conceive or carry a pregnancy to term after 24 months of trying to conceive. One half (50%) of infertility can be attributed to male factors, and about one half (50%) can be attributed to female factors. In some cases infertility can't be explained or is caused by a combination of factors in both partners. Infertility strikes diverse groups, affecting people from all socioeconomic levels and nowadays it has become a great public health problem. The infertility evaluation should initially involve both partners. Here will be explained first approach to the male infertility diagnosis which is the semen analysis. Semen analysis may also be useful in monitoring spermatogenesis during and following male fertility regulation. Semen quality depends on factors that usually cannot be modified, such as sperm production by the testes, accessory organ secretions and recent (particularly febrile) illness, as well as other factors, such as abstention time, that should be recorded and taken into account in interpreting the results. These facts explain great intra-individual variation in semen composition. Consequences of such variability are that it is impossible to characterize a man's semen quality from evaluation of a single semen sample, and is helpful to examine two or three samples to obtain baseline data. This is a method with simple testing performance characteristics and does not require demanding equipment. The process for obtaining specimen is simple and non-invasive, and in short time gives valuable information of the male infertility diagnosis problem.

Key words: semen analysis, male infertility, diagnosis

UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), neplodnost je definirana kao nemogućnost spontanog ostvarenja trudnoće, uz normalne spolne odnose tijekom dvije godine bez upotrebe kontracepcije. Otprilike 15% parova u svijetu je neplodno, a u oko 50% slučajeva uzrok je muška neplodnost. Muška neplodnost rezultat je mnogih različitih poremećaja i stanja, a može biti nasljedna ili stečena. U više od 50% slučajeva uzrok muške neplodnosti je nepoznat (idiopatski). Spermioqram je jedan od prvih postupaka koji se provode kod sumnje na mušku neplodnost i može otkriti brojne poremećaje (azospermija, oligozoospermija, teratozoospermija, astenozoospermija, nekrospermija i piospermija).

STVARANJE SPERME

Spermatogeneza je proces nastanka spermija koji se odvija u sjemenim kanalčićima testisa. Cijelo razdoblje spermatogeneze, od zametnih stanica do spermija traje oko 64 dana. Nakon što su stvoreni u sjemenim kanalčićima, spermiji nekoliko dana putuju kroz 6 m dug kanal epididimisa. Pri ulasku u epididimis, spermiji su nepokretni, no nakon 24 do 48 sati postižu djelomičnu pokretljivost. Potpunu pokretljivost spermiji postižu tek po ejakulaciji.

Ejakulat (sperma) se sastoji od spermija i sjemene tekućine koja predstavlja smjesu izlučevina iz sjemenih mjehurića, prostate i uretralnih žlijezda. Funkcija sjemene tekućine je održavanje konstantnog pH, prenošenje hranjivih tvari za

spermije te supstanci koje olakšavaju oplodnju.

Spermiji u muškom spolnom sustavu mogu živjeti tjednima, a jednom kad su ejakulirani, njihov životni vijek traje od 24 do 48 sati.

PREDANALITIČKI ČIMBENICI

Na proizvodnju i kvalitetu sperme utječe mnogo čimbenika, što dovodi do velikih intraindividualnih varijacija. Uz to je postupak uzimanja nestandardiziran, što dodatno otežava dijagnostiku, pa je potrebno poduzeti korake da se ti čimbenici svedu na najmanju moguću mjeru.

Unutarnji čimbenici koji se ne mogu mijenjati su:

- veličina sjemenika,
- aktivnost spolnih žlijezda,
- zaostatak sperme od zadnje ejakulacije,

ali može se utjecati na slijedeće vanjske čimbenike:

- temperatura,
- dani apstinencije,
- utjecaj lijekova i sredstava ovisnosti i sl.

i tako smanjiti vjerojatnost varijacija rezultata.

Iako je kvaliteta sperme održiva u rasponu od 20 do 37°C, važno je da sperma od trenutka prikupljanja do dostave u laboratorij bude cijelo vrijeme u približno konstantnim uvjetima temperature unutar navedenog raspona. Kako bi se smanjio utjecaj promjene temperature, preporučeno je uzorak prikupiti unutar prostora laboratorija. U posebnim uvjetima može se uzorak prikupiti kod kuće ako se mogu

osigurati konstantni uvjeti temperature i dostava uzorka u roku od 1 sat.

Na temelju jedne analize ne može zaključiti o kvaliteti sperme te je uobičajeno učiniti dvije ili tri analize s razmakom od tri mjeseca. Radi usporedivosti rezultata potrebno je osigurati približno iste uvjete. Kako bi se to postiglo, preporučeno vrijeme od zadnjeg snošaja treba biti od 2 do 7 dana, a vrijeme apstinencije jednako kod svake slijedeće analize. Kod prekratke apstinencije spermiji su nezreli, a kod apstinencije duže od 7 dana, spermiji se nakupljaju u pasjemenicima i prelaze u mokraćnu cijev te se izlučuju mokraćom.

Kod sakupljanja uzorka ne smiju se koristiti prezervativi i lubrikanti jer oni sadrže spermaticidne tvari te utječu na valjanost rezultata.

Na valjanost rezultata utječe i volumen prikupljene sperme. Naime, prvi mlaz sadrži najveći broj spermija, pa gubitak bilo kojeg volumena prilikom prikupljanja može obezvrijediti rezultate pretrage te se mora prijaviti laboratorijskom osoblju i zabilježiti.

Uputno je izbjegavati davanje uzorka nakon bolesti (osobito febrilnih stanja) te upotrebu alkohola i drugih sredstava ovisnosti jer oni utječu na kvalitetu sperme.

MAKROSKOPSKI PREGLED

Odmah po dobivanju uzorka započinje makroskopski pregled. Uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi ili u inkubatoru (37°C) 30 minuta do najviše sat vremena. U tom vremenu zbiva se likvefakcija. To je proces u kojem sperma prelazi u homogenu tekuću smjesu sa ili bez želatinoznih tijela (bez kliničkog značaja). Po završetku vremena likvefakcije, određuje se viskoznost, izgled sperme, volumen i pH ejakulata.

Viskoznost: Viskoznost se određuje ispuštanjem uzorka iz pipete. Očekuju se male definirane kapi ili niti dugačke do dva centimetra. Ukoliko se uzorak razvlači staklenim štapićem ili pipetom duže od dva centimetra, smatra se da je viskoznost abnormalna i u nalazu se naznači izmjerena duljina (u centimetrima).

Izgled: Izgled normalnog uzorka je homogena smjesa sivo opalescentne boje. Jako mutna spermija upućuje na nisku koncentraciju spermija. Boja također može varirati. Crveno smeđa označava prisutnost crvenih krvnih stanica (hemospermija), a žuta je posljedica ikterije ili uzimanja određenih vitamina ili droga.

Volumen: Precizno mjerenje volumena je od velike važnosti, jer direktno utječe na određivanje broja spermija i drugih stanica u ejakulatu. Niski volumen je karakterističan za opstrukcije sjemenovoda i neke upalne bolesti spolnih organa, a visoki volumen upućuje na eksudate kod upala spolnih organa. Prema WHO donja referentna granica za volumen je 1,5 ml.

pH: Mjerenje pH sperme pokazatelj je ravnoteže u lučnju sjemene tekućine iz spolnih žlijezda (alkalne frakcije iz sjemenih vezikula i kisele frakcije iz prostate). Konsekusom je dogovoreno da normalni uzorci imaju pH $\geq 7,2$.

MIKROSKOPSKA ANALIZA

Mikroskopska analiza započinje oko sat vremena po ejakulaciji. Određuje se aglutinacija, motilitet, vitalnost, broj, koncentracija i morfologija spermija.

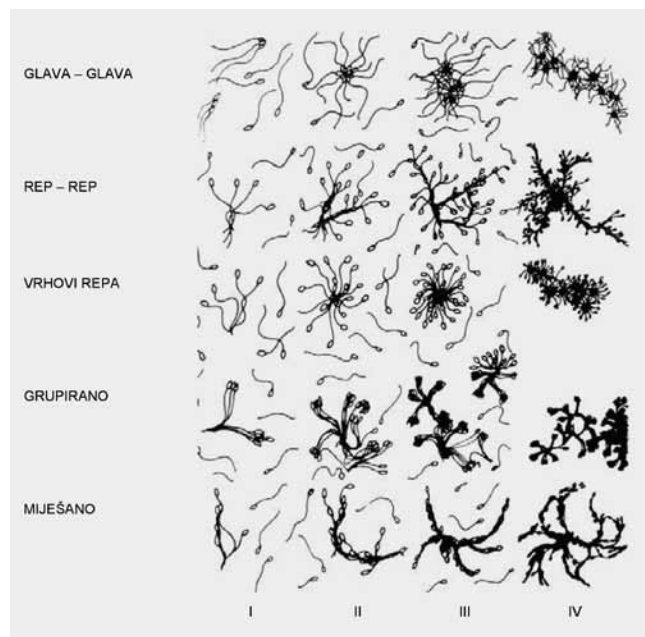
Aglutinacija

Aglutinacija predstavlja međusobno sljepljivanje pokretnih spermija i prikazana je na Slici 1, a obilježavanje stupnjeva aglutinacije prikazano je u Tablici 1.

Tablica 1. Stupnjevi aglutinacije spermija

Stupanj aglutinacije	Način označavanja	Značenje
I (pojedinačni)	+	<10 spermija u aglutinatu uz mnogo pojedinačnih
II (umjereni)	++	10 – 50 spermija u aglutinatu, prisutni pojedinačni spermiji
III (veliki)	+++	>50 spermija u aglutinatu, poneki slobodni spermiji
IV (jako veliki)	++++	svi spermiji u aglutinatima, aglutinati međusobno povezani

Slika 1. Aglutinacija spermija po stupnjevima



Motilitet

Motilitet se određuje najviše sat vremena po ejakulaciji zbog utjecaja pH, dehidracije i promjene temperature. Pregledom se ustanove kategorije pokretljivosti prikazane u Tablici 2.

Tablica 2. Kategorije pokretljivosti spermija

Kategorija pokretljivosti	Opis
Progresivno pokretni (PR)	aktivno kretanje, linearno ili u velikim krugovima
Neprogresivno pokretni (NP)	svi oblici pokretnosti osim aktivnog kretanja (plivanje u malim krugovima, snažne kretnje bičem ili glavom ili oboje)
Nepokretni (IM)	bez ikakvih kretnji

Prema prijašnjim preporukama, progresivno pokretni spermiji razvrstani su u dvije kategorije s obzirom na brzinu, no zbog smanjene pouzdanosti uslijed subjektivne procjene, danas se preporuča odrediti ukupno pokretne spermije (progresivno i neprogresivno pokretne). Prema WHO, donja granica referentnog intervala za ukupno pokretne spermije iznosi 40% (PR +NP), dok je za progresivno pokretne (PR) 32%.

Vitalnost

Vitalnost spermija odnosi se na procjenu integriteta stanične membrane u uzorcima sa < 40% ukupno pokretnih spermija. To je bitno za razlikovanje strukturnih poremećaja biča od patoloških promjena u pasjemenicima. Vitalnost se izražava kao postotak živih spermatozoida, a donja referentna vrijednost je 58%.

Broj i koncentracija spermija

Reproduktivna sposobnost muškaraca ovisi o ukupnom broju spermija i njihovoj koncentraciji. Broj spermija po ejakulatu kod zdravih muškaraca izravno je povezan sa volumenom testisa i pokazatelj je sposobnosti testisa da proizvedu spermije. Donja granica referentnog intervala je 39×10^6 spermija. Na koncentraciju spermija utječe količina izlučene tekućine iz sjemenovoda i prostate i nije mjera funkcije testisa. Donja granica je 15×10^6 spermija po mililitru.

U svrhu grube procjene broja spermija pregledava se nativni preparat na stakalcu na srednjem povećanju mikroskopa (400x). Ukoliko je broj spermija u nativnom preparatu

manji od 4 po vidnom polju, ne određuje se točan broj spermija po ejakulatu već se pregledava sediment.

Koncentracija predstavlja broj spermija po jedinici volumena i određuje se u Maklerovoj komorici. Iz broja spermija izbrojanih u komorici, izračuna se njihova koncentracija, a prema ukupnom volumenu ejakulata izračuna se apsolutni broj spermija.

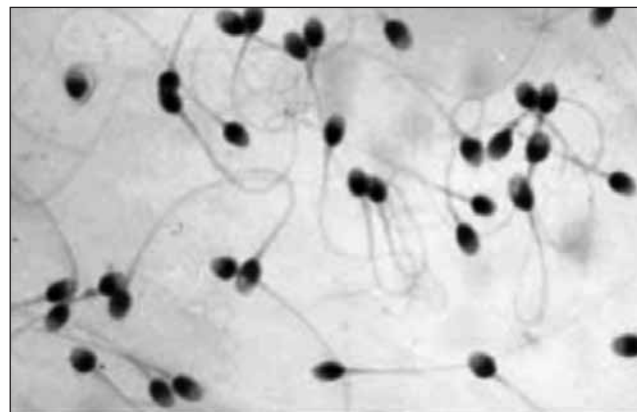
U komorici se također broje i okrugle stanice (leukociti i nezrele spolne stanice) kojih u normalnom uzorku ne bi smjelo biti (prema WHO nema referentnog intervala). Njihova prisutnost se mora zabilježiti na nalazu jer ukazuje na prisutnost patološkog procesa.

Morfologija

Morfologija spermija određuje se iz obojenog preparata. Promatra se spermij u cjelini te oblik i veličina glave, vrata i repa, kao i njihov međusobni odnos. Rezultat se izražava kao postotak normalnih spermija u uzorku (normala > 4%).

Normalni spermij ima ovalnu glavu s konusnim završetkom, u nastavku vrat koji se postepeno sužava i završava repom ravnih kontura (slika 2).

Slika 2. Normalni izgled spermija

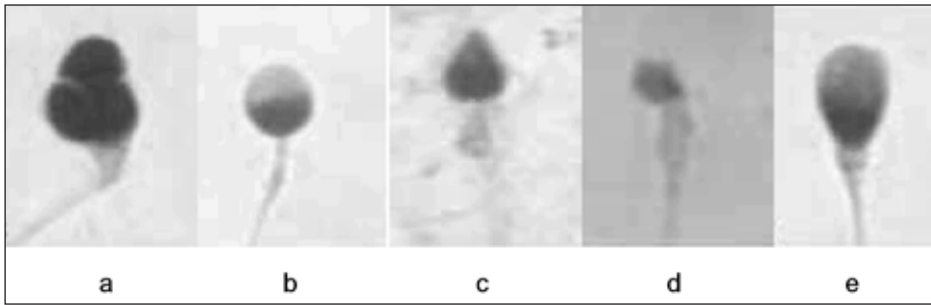


Kod patološke morfologije spermija razlikuju se:

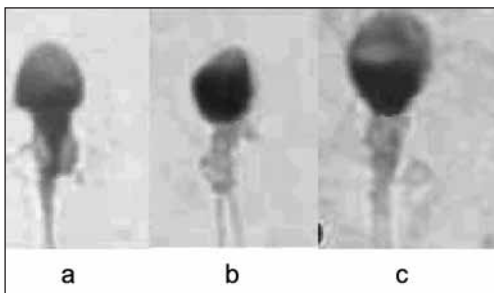
- patološke promjene glave: dvostruke ili trostruke glave (Slika 3a), okrugle glave (Slika 3b), šiljate glave (Slika 3c), premale glave (Slika 3d), prevelike glave (Slika 3e)
- patološke promjene vrata: zadebljani vrat (Slika 4a, b, c)
- patološke promjene repa: savijeni rep (Slika 5a, b, c), dvostruki rep (Slika 5d), slomljeni rep (Slika 3a)

Patološke promjene mogu se manifestirati pojedinačno na glavi, vratu ili repu, a mogu se pojaviti kao kombinacija više abnormalnosti (Slika 3a, 3c, 3d, 4b, 4c, 5a).

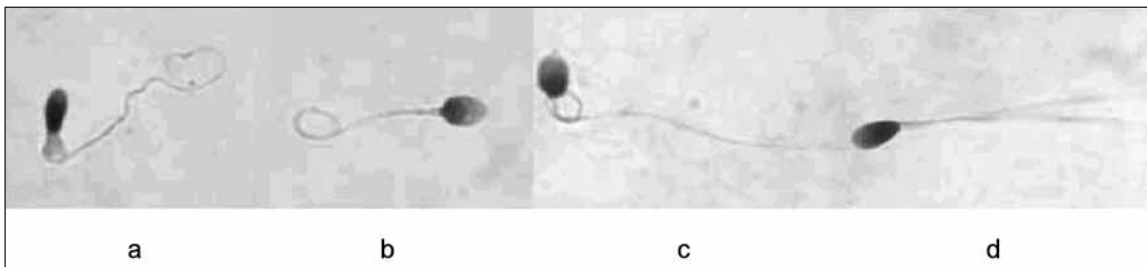
Slika 3. Patološki oblici glave spermija



Slika 4. Patološki oblici vrata spermija



Slika 5. Patološki oblici repa spermija



ZAKLJUČAK

U današnje doba, mladi parovi se sve kasnije odlučuju na roditeljstvo. Uz sjedilački način života, loše životne navike i stresno okruženje, to dovodi do sve većeg postotka parova koji imaju problema sa začećem. Čak i kad se ustanovi problem sa začećem, terapija je u većini slučajeva dugotrajna. Stoga je od vrlo velike važnosti brzi i pouzdani početni skrining radi pravilnog usmjeravanja daljnje dijagnoze i terapije para. Analiza sperme (spermogram) jedna je takva metoda, čije su prednosti jednostavno dobivanje uzorka neinvazivnim postupkom, oprema nije tehnički zahtjevna, izvedba je jednostavna, a informacije nužne za početnu dijagnostiku muške plodnosti se brzo dobivaju.

Daljnji dijagnostički postupci obuhvaćaju diferencijaciju patoloških oblika spermija, razlikovanje leukocita od ostalih okruglih stanica posebnim imunocitokemijskim tehnikama, procjenu funkcije spolnih žlijezda određivanjem cinka, fruktoze i neutralne α -glukozidaze u spermi te genske analize u cilju određivanja uzroka muške neplodnosti.

Literatura

1. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for The Examination And Processing Of Human Seme*. 5th ed. World health organization; 2010.
2. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 10. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2003.
3. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. *Genetics of Human Male Infertility*. Singapore Med J. 2009 Apr;50(4):336-47.

adresa:

Katarina Jedrejčić, mag. med. biokem.
Djelatnost za laboratorijsku dijagnostiku,
Opća bolnica Pula, Zagrebačka 30, 52.100 Pula
e-mail: katarinajedrejccic@gmail.com