

een volle serie wordt verkregen, zoals bij agarosegel-elektroforese. Dit betekent bij duidelijke banden dat ook de immunotypering direct kan worden afgewerkt. Bij de beoordeling van de eiwitpatronen van de capillaire elektroforese wordt de aanwezigheid van monoklonale bandjes minder vaak herkend dan bij agarosegel-elektroforese. Waar bij de agarosegel-elektroforese bij de 433 als negatief beoordeelde eiwitspectra slechts 2 bandjes zijn gemist omdat deze bandjes met een lage concentratie M-proteïne onder een β -band vallen (dit werd in een eerdere studie ook gezien (2)), worden met capillaire elektroforese vaker kleine bandjes (11 à 15 op 450 negatieve beoordelingen) gemist. De verschillen tussen de 4 beoordelaars zijn vermoedelijk te wijten aan de wijze van beoordelen (aan het scherm of op papier) en de mate van ervaring in het beoordelen van eiwitspectra in het algemeen. Voor de beoordeling

hoe ernstig het missen van deze bandjes met geringe concentratie is, is nog nader onderzoek van de patiëntengegevens nodig.

Concluderend heeft bij de eerste screening gericht op het uitsluiten van M-proteïnemie de capillaire elektroforese uit logistiek oogpunt de voorkeur, maar dit gaat ten koste van de sensitiviteit; met name monoklonale bandjes met een geringe concentratie M-proteïne worden met deze methode gemist.

Referenties

1. Kwaliteitsinstituut voor de gezondheidszorg CBO. Monoklonale gammopathie (paraproteïnemie). Utrecht: CBO; 2001.
2. Bakker AJ, Bierma-Ram A, Elderman-van der Werf C, Strijdhartig ML, van Zanden JJ. Screening for M-proteïnemie: Serum protein electrophoresis and free light chains compared. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 1507-1511.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 170-172

Het effect van chymotrypsine op de viscositeit van semen en de motiliteit van zaadcellen

C. BEIJER¹, A.J.van der PLAS¹ en A. WETZELS²

Inleiding

De Werkgroep 'Semen' beschrijft in haar praktijkrichtlijn 'Controle na Vasectomie' (1) het probleem van een niet-homogene verdeling van zaadcellen in semen met een verhoogde viscositeit, met als risico een niet correcte resultaatweergave van de concentratie aan zaadcellen in dergelijke monsters. Het probleem van een niet-correcte resultaatweergave is nog nijpender geworden sinds de Nederlandse Vereniging voor Urologie een grens heeft gesteld van 100.000 niet-motiele zaadcellen per ml semen voor een geslaagde vasectomie (2). De verhoogde viscositeit van semen kan ook in overig semenonderzoek een foutief resultaat geven in de bepaling van de zaadcelconcentratie en de motiliteit van zaadcellen. De mogelijkheid bestaat om proteases, zoals bromeline (advies WHO (3)), chymotrypsine of trypsine aan semen toe te voegen om de viscositeit van het semen te verlagen en aldus een homogene verdeling van de zaadcellen te bevorderen. Het effect van de activiteit van proteases op de viscositeit van semen en op de motiliteit van zaadcellen is echter nauwelijks onderzocht (4). Teneinde zaadcellen tegen een mogelijke proteolyse te beschermen t.g.v. het

toedienen van exogene proteases verdient het aanbeveling de exogene toe te dienen activiteit aan proteases zo te kiezen dat er een voldoende effect is op de viscositeit maar geen nadelig effect op de motiliteit van zaadcellen. Teneinde het effect van de activiteit van proteases op de viscositeit van semen objectief vast te kunnen stellen wordt de viscositeit gemeten voor en na toevoegen van chymotrypsine. De WHO (3) beschrijft voor het bepalen van de viscositeit van semen een 'kwalitatieve' methode. Het doel van het hier beschreven onderzoek is:

1. het bepalen van de viscositeit van semen met een methode welke een 'kwantitatief' resultaat oplevert;
2. het vaststellen m.b.v. deze methode van het effect van het toevoegen van chymotrypsine op de viscositeit van semen;
3. het vaststellen of het toevoegen van chymotrypsine aan semen wel of geen nadelig effect heeft op de motiliteit van zaadcellen.

Methoden

Het gebruikte semen was restmateriaal afkomstig van semenmonsters aangeboden voor een uitgebreide semenanalyse.

Viscositeitsmetingen van semen

De huidige 'kwalitatieve' methode is beschreven door de WHO (3). Bij deze methode wordt semen opgezogen in een 5-ml-pipet en wordt de viscositeit

Rijnland ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiderdorp¹ en UMC St Radboud, Verloskunde en Gynaecologie, Nijmegen²

E-mail: C.Beijer@Rijnland.nl

beoordeeld op de wijze waarop het semen uit de pipet loopt. Een semenmonster met een normale viscositeit verlaat de pipet druppelsgewijs, een monster met een verhoogde viscositeit vormt een draad van minimaal 2 cm. Het resultaat wordt afgegeven als normaal of verhoogd.

De in dit onderzoek gehanteerde 'kwantitatieve' methode maakt gebruik van een viscositeitmeter. De viscositeit van semen werd gemeten met een LDV-II-PRO Cone & Plate rationale viscositeitmeter (Brookfield) met aangesloten waterbad (37 °C). In deze opstelling wordt gebruik gemaakt van een vlakke plaat (de ondergrond) en een CPE-40-spoel (kegel) met een conushoek van 1,565°. De as van de spoel is gemonteerd aan een veer met sensor. De spoel draait met een vaste snelheid rond waardoor de viscositeit van de vloeistof-film de tegenwerking van de veer bepaalt. Deze tegenwerking of weerstand wordt omgerekend naar de viscositeit. Metingen werden verricht bij 20 rpm ('shear rate' 150/sec) voor semenmonsters met een viscositeit <15,3 cP en bij 10 rpm ('shear rate' 75/sec) met semenmonsters met een viscositeit ≥ 15,3 cP.

Activiteit van chymotrypsine

De activiteit van chymotrypsine (C4129) werd spectrofotometrisch bepaald bij 37 °C met als substraat N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide. De bepaling is gebaseerd op een eerder beschreven methode (5). Alle benodigde reagentia werden verkregen bij Sigma (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Chymotrypsine wordt opgelost in een buffer (129 mmol/l Tris-buffer, pH=8,4; 26,6 mmol/l CaCl₂); van deze oplossing wordt 20 µl toegevoegd aan 1 ml semen. Na mengen wordt het monster 30 min bij 37 °C geïncubeerd en vervolgens wordt de viscositeit bepaald. De activiteit aan chymotrypsine genoemd in de tekst betreft de activiteit in het eindvolume.

Concentratie en motiliteit van zaadcellen

De concentratie en motiliteit van zaadcellen in semen werd microscopisch vastgesteld conform de richtlijnen van de WHO (3). Conform deze richtlijnen wordt de motiliteit in vier klassen onderverdeeld, te weten: 1. snelle progressieve motiliteit; 2. langzaam-progressieve motiliteit; 3. niet-progressieve motiliteit en 4. geen motiliteit.

De concentraties van zaadcellen in de semenmonsters werden bepaald in een 'improved' Neubauer-telkamer. De viscositeit van semen en de motiliteit van zaadcellen werden bepaald zowel voor als na het toevoegen van chymotrypsine om het effect van het toedienen ervan op beide parameters vast te stellen. De referentiewaarde voor viscositeit van semen werd bepaald uit de meetresultaten van de achtereenvolgend aangeboden semenmonsters t.b.v. uitgebreide semenanalyse. Aangevraagd onderzoek bij deze monsters (inclusief viscositeitsbepaling) werd uitgevoerd conform de richtlijnen van de WHO (3). Om vast te stellen of de verkregen data volgens Gauss verdeeld waren werden de coëfficiënten van 'skewness' en 'kurtosis' berekend en getest of de absolute waarden groter of kleiner zijn dan 2,6 maal de respectievelijke standaarddeviaties (6).

Resultaten

De distributie van de resultaten van de bepaling van de viscositeit van de semenmonsters (n=70) is een rechts-scheve verdeling, dus niet conform de verdeling volgens Gauss. Na een logaritmische transformatie ontstaat er een verdeling volgens Gauss ('skewness'=0,03, SD=0,29; kurtosis=-0,57, SD=0,59). Het referentie-interval voor de viscositeit voor de getransformeerde dataset (gemiddelde ± 2SD) ligt tussen de 0,34 en 0,86, wat in reële waarden een referentie-interval betekent van 2,18-7,24 cP. Van 50 semenmonsters aangeboden voor een uitgebreide semenanalyse werd de viscositeit met beide beschreven methoden bepaald. Van de 50 monsters hebben 42 monsters verkregen met de huidige (WHO-)methode een normale viscositeit en 8 een verhoogde viscositeit. Van deze 8 monsters hebben er 4 een viscositeit > 7,24 cP bepaald op de viscositeitmeter en 4 een viscositeit < 7,24 cP. Toevoegen van 12,5 x 10³ U/l chymotrypsine aan semenmonsters aangeboden voor een uitgebreide semenanalyse (n=40) resulteert gemiddeld in een daling van 41,5% in de viscositeit van deze semenmonsters. Toevoegen van 12,5 x 10³ U/l chymotrypsine (n=33) heeft geen effect op de motiliteit (motiliteitsklasse A: voor toevoegen 10%, na toevoegen 9%, p=0,37); motiliteitsklasse A + B: voor toevoegen 40%, na toevoegen 39%, p=0,82; n=33) terwijl de viscositeit van de monsters voor het toevoegen van chymotrypsine gemiddeld 4,55 cP is en na het toevoegen gemiddeld 2,69 cP. Aan monsters met een sterk verhoogde viscositeit (>15 cP) werd 37,2 x 10³ U/l chymotrypsine toegevoegd om de viscositeit van deze monsters in het referentie-interval te krijgen. Toevoegen van 37,2 x 10³ U/l chymotrypsine aan semen (n=9) met een viscositeit in het referentie-interval heeft geen effect op de motiliteit van de zaadcellen (motiliteitsklasse A: voor toevoegen 7%, na toevoegen 5%, p=0,14; motiliteitsklasse A + B: voor toevoegen 43%, na toevoegen 43%, p=0,73), terwijl de viscositeit van de semenmonsters voor het toevoegen van chymotrypsine gemiddeld 4,32 cP is en na toevoegen gemiddeld 1,80 cP. In een enkel semenmonster met een sterk verhoogde viscositeit merkten wij een positief effect op de motiliteit na toevoegen van chymotrypsine. Er is geen correlatie tussen viscositeit van semen en de concentratie aan zaadcellen (n=37) of tussen viscositeit van het semen en de motiliteit van zaadcellen aantoonbaar (n=39), figuur 1.

Discussie

Deze publicatie beschrijft een methode om de viscositeit van het semen met chymotrypsine te verlagen zonder dat dit een effect heeft op de motiliteit van de zaadcellen. Het effect van chymotrypsine op de viscositeit van semen hebben wij objectief en kwantitatief vastgesteld met een viscositeitmeter. In de meeste laboratoria wordt de viscositeit van semen vastgesteld conform de aanbevelingen van de WHO, d.w.z. op een kwalitatieve manier. De interpretatie van dit onderzoek is subjectief en de temperatuur en te gebruiken pipet zijn niet gestandaardiseerd. Bij dit onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van een methode om op een gestandaardiseerde wijze de viscositeit van semen kwantitatief te bepalen. De viscositeit van vloeistof-

fen is temperatuurafhankelijk. Wij hebben gekozen voor het vaststellen van de viscositeit van semen bij de lichaamstemperatuur (37 °C). Het bepalen van de viscositeit van semen is ook afhankelijk van het type spoel en de draaisnelheid van de spoel. Vanwege de grote spreiding in de viscositeit van semen buiten het referentie-interval waren wij genoodzaakt bij twee verschillende draaisnelheden te werken. Een draaisnelheid van 20 rpm heeft geen effect op de motiliteit van zaadcellen (zie resultaten).

Uit de resultaten van ons onderzoek blijkt dat de viscositeit van (hoog-)visceus semen d.m.v. toevoeging van chymotrypsine kan worden teruggebracht tot waarden binnen het referentie-interval zonder dat de motiliteit van zaadcellen nadelig wordt beïnvloed. In een eerdere studie (4) werd de viscositeit bepaald bij 25 °C met een vergelijkbare viscositeitmeter. In deze studie werd een range voor de viscositeit vastgesteld van 1,0-7,6 cP (n=67; 'shear rate', 230/sec) en werd na het toevoegen van trypsine ook een significante daling van de viscositeit vastgesteld. Het effect van het toedienen van

trypsine op de motiliteit van de zaadcellen werd echter niet onderzocht.

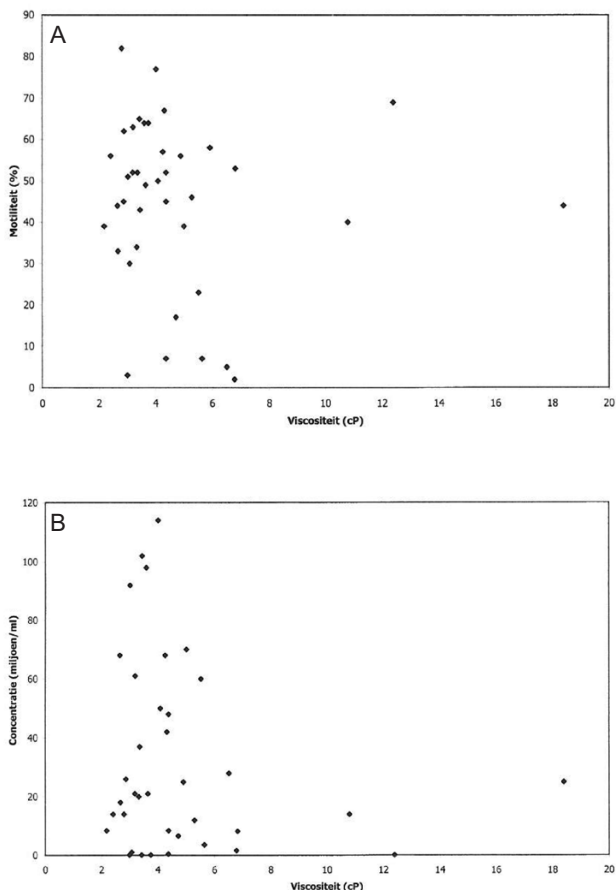
Vervloeiing van semen wordt grotendeels veroorzaakt door het prostaatspecifiek antigeen (PSA). Dit protease knipt in eiwitten (semenogeline I en II) waardoor de zaadcellen vrijkomen die kort na de ejaculatie opgesloten zijn in een aggregaatcomplex van de genoemde eiwitten (7). Wij konden geen correlatie aantonen tussen de viscositeit van de aan ons aangeboden monsters en de concentratie zaadcellen, of tussen de viscositeit en de motiliteit van de zaadcellen, hetgeen eerder werd aangetoond (8). Toevoegen van chymotrypsine aan semenmonsters heeft geen nadelig effect op de motiliteit van zaadcellen, in een klein aantal monsters met een (sterk) verhoogde viscositeit werd er een positief effect op de motiliteit vastgesteld. Voor semenmonsters aangeboden als controle na vasectomie heeft dit geen negatieve consequenties en voor monsters aangeboden voor een uitgebreide analyse geeft dit de arts extra informatie.

Conclusie

Het toevoegen van chymotrypsine aan semen heeft een significant verlagend effect op de viscositeit van semen, waardoor de homogene verdeling van zaadcellen in het monster wordt bevorderd. Chymotrypsine met de door ons gebruikte activiteit van 12,5 of 37,2 x 10³ U/l heeft geen negatief effect op de motiliteit van zaadcellen. Chymotrypsine kan binnen het diagnostisch traject zinvol en veilig worden toegepast om de viscositeit van semen te verlagen zonder dat dit een negatief effect heeft op de motiliteit van zaadcellen.

Referentie

1. Laboratoriumpraktijkrichtlijn 'Controle na vasectomie'. Werkgroep Semen, 2009.
2. Dohle GR, Meuleman EJH, Hoekstra JW, Roijen JH van, Zwiens W. Herziene richtlijn 'vasectomie' van de Nederlandse Vereniging voor Urologie. Ned Tijdschrift Geneesk 2005; 149: 2728-2731.
3. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction; 4th edition Cambridge, UK, Cambridge University Press; 1999.
4. Mendeluk G, Gonzalez Flecha FL, Castello PR, Bregni C. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. J Androl 2000; 21: 262-267.
5. Kasper P, Moller G, Wahlefeld A. New photometric assay for chymotrypsin in stool. Clin Chem 1984; 30: 1753-1757.
6. Reference values in laboratory medicine. Gräsbeck R, Alström T, eds. John Wiley & Sons, New York 1981.
7. Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming multifunctional seminal vesicle protein. Cell Mol Life Sci 1999; 55: 944-960.
8. Hubner HM, Heidl R, Krause W. Investigation of flow behavior (viscosity) from human seminal fluid with a rotational viscosimeter. Andrologia 1986; 17(6): 592-597.



Figuur 1. (A) Verband tussen de viscositeit van semen en de motiliteit van zaadcellen (klasse A + B). (B) Verband tussen de viscositeit van semen en de concentratie zaadcellen.