



Andrology letter

Sperm DNA damage assessment SCSA:
„A test whose time has come“

Untersuchungen zum Zustand der spermatologischen Kernstrukturen erweitern die moderne andrologische Diagnostik in wesentlichen Punkten.

Einleitung

Während der Spermiogenese und Spermiohistogenese finden komplexe Veränderungen der Chromatinstrukturen statt, die unterschiedliche Generationen von Nukleoproteinen und spezifische lamelläre Anordnungen betreffen. Die nukleären Proteine der Spermien sind zunächst sehr einfach und enthalten grosse Mengen von Arginin. Zystein - überbleibsel sind ebenfalls zahlreich vorhanden und werden während der Spermienreifung im Hoden und teilweise auch im Nebenhoden ausgetauscht. So zeigen beispielsweise bei der Ratte 100% der Zysteine im Hoden freie SH Gruppen, im Nebenhoden schliesslich aber alle Disulfidformen. Dieser Wandel der Bindungen und Austausch von Nukleoproteinen äussert sich in zahlreichen, der jeweiligen Entwicklungsstufe entsprechenden charakteristischen histochemischen Färbungen und zunehmender Resistenz der DNA gegenüber thermischen und chemischen Denaturationen und Dekondensationen.

Beim Menschen werden zur Kernkondensation 85% der Histone durch Protamine ersetzt. Die verbleibenden 15% sogenannter Nukleohistonkomplexe initiieren später die Dekondensation. Dieser entscheidende Vorgang nimmt speziesspezifisch unterschiedliche Zeit in Anspruch und dauert beim Menschen nach Mikroinjektion 30-60 Minuten. Schliesslich sind 95% der Nukleone dekondensiert und nun in der Lage, Sauerstoff aufzunehmen und damit auch den ATP Level erheblich anzuheben. Diese Aktivitäten spielen sich bemerkenswerter Weise ohne das Zutun der Akrosomen- oder anderer Membrane, Zellorganellen oder Proteine ab.

Die zunehmende Zahl von Disulfidbindungen innerhalb der Kernprotamine führt zu einer verbesserten Stabilität der Spermienköpfe. Sie zeigen später im reifen Zustand unterschiedliche Resistenz gegenüber Detergenzien, so vor allem Natrium Dodecylsulfate oder NDS in Verbindung mit Disulfid-Bindungsreduzierenden Agentien wie Dithiothreitol DTT. Unreife Spermien dekondensieren schneller und vollständiger als reife Spermien.

Heute bestehen keine Zweifel mehr daran, dass die DNA keineswegs wie bisher angenommen „undurchlässig“ sind, sondern vielmehr aufgrund verschiedenartigster Schädigungen single-strand (ss) als auch double-strand (ds) Brüche aufweisen. Diese DNA Schäden korrelieren mit der männlichen Subfertilität und mehrere Theorien befassen sich mit der Entstehung dieser Brüche:

- abortive Apoptose
- inkompletter Repair von Topoisomerase-induzierter Nicks während des Histon – Ersatzes durch Protamine
- ROS bedingte Brüche an reifen Spermien und
- Einflüsse endogener Nukleasen welche in der Lage sind, Chromatin zu verdauen.

Moderne SCSA Tests

Mit dem **SDS Test** werden nun fluoreszenzoptisch die Dekondensationsstadien eines Ejakulats erfasst und quantifiziert. Auf diese Weise gelingt es, wichtige und für die klassische Therapie verwertbare Hinweise zu erhalten. Zudem erlaubt die Bestimmung der Anzahl im SDS Test normaler Spermien prognostische Aussagen über die Verwertbarkeit eines Ejakulats für die IVF.

Acridin Orange (AO) wird zur Unterscheidung von Spermien mit normalen oder abnormen Chromatinstrukturen verwendet. In zahlreichen Studien wurde diese Substanz bereits zur in situ Untersuchung der Nukleinsäuren eingesetzt. AO bindet an Nukleinsäuren und andere Makromoleküle. Bei geringen Konzentrationen ergibt die monomere AO Form ein grünes Fluoreszenzsignal aber bei höheren Konzentrationen ergeben sich durch Aggregationen und Polymersationen Farbstoffinteraktionen und Verschiebungen der Fluoreszenzfarbe nach gelb bis rot. Ein AO Molekül interferiert grün mit jedem dritten Basenpaar einer DNA Doppelhelix, rot dagegen mit denaturierter oder einsträngiger DNA. Normale Spermien - Chromatinstrukturen ergeben damit ein grünes, denaturierte oder einsträngige Formen ein gelbes oder rotes Signal.

Zusammen mit dem bereits seit langem in die andrologische Routinediagnostik eingeführten **Anilin-Blau Test** ist es damit möglich, sowohl den Kondensationsstatus (ABB), den Dekondensationsstatus (SDS) als auch die Chromatinstrukturen fluoreszenzoptisch zu erfassen. Alle diese Untersuchungsmethoden erlauben Aussagen über Vorgänge innerhalb der Chromatinstrukturen, die mit den klassischen Routinemethoden nicht erfasst werden können und die als unabhängige Vorgänge der Fertilisation enorm wichtige Zusatzinformationen liefern.

Die spermatologische DNA Fragmentation stellt nun den aussagekräftigsten Marker der Apoptose dar und wird durch abnorme Endonukleaseaktivität durch Protein Fas vermittelt. Erhöhte Werte (über 10%) fanden sich bei Paaren mit habituellen Aborten, bei sog unexplained infertility als auch bei Teratozoospermien. Weitere Zusammenhänge wurden mit gestörter Motilität der Spermien, mit verminderter Fertilisierungsrate bei IVF und normaler Embryoentwicklung beobachtet. In zahlreichen Arbeiten zeichnen sich Werte von 30% Spermien mit geschädigter Chromatinstruktur als Grenzwert ab, die eine verminderte Zeugungsfähigkeit oder geringere Chancen bei IVF Therapien bedeuten.

Die **TUNEL Methode** erlaubt die Erfassung der DNA Fragmentation durch die terminale Desoxynukleotidyl-transferase-vermittelte Desoxyuridin-triphosphat-biotin Färbung. Die DNA Fragmentation lässt – unabhängig von der Spermatozoenmorphologie oder Spermiedichte – Aussagen über die Ejakulatqualität zu, insbesondere bei sog. Unexplained infertility, bei Abortgeschehen als auch vor einer IVF Behandlung. Die Methode eignet sich ausgezeichnet, das sog. IVF Pattern zu ergänzen und hat in die moderne andrologische Diagnostik Einzug gehalten.

Übersicht über die aktuellen Untersuchungsmethoden

Untersuchungen zum Zustand des Spermienchromatins und seinem Funktionsstatus sind damit routinemässig möglich geworden:

1. Kondensation (Histon/Protamin-Ersatz) Anilinblau-Test oder Chromomycin A3 oder Toluidin Blau Test
2. Dekondensation (SDS Test)
3. Semiquantitative Bestimmung der Doppelhelixveränderungen (Acridin-Orange-Test)
4. Semiquantitative Bestimmung der DNA-Fragmentation und Apoptose (TUNEL – Methode)

Sperm Chromatin Structure Assays – wann sind sie anzuwenden ?

Die Einführung dieser Methoden in die Andrologischen Abklärungen hat die diagnostische und prognostische Aussagekraft massiv verbessert bzw. in einem biologisch entscheidenden Bereich erweitert. Die Kernstrukturanalysen sind bei folgenden Indikationen durchzuführen:

- sog. *Unexplained infertility (WHO)*
- *isolierte sog. monomorphe Teratozoospermien*
- *schwere idiopathische OAT Syndrome*
- *als zwingend integrierender Bestandteil des andrologischen IVF Patterns*

Der Entscheid, einen neuen Test in die klinische andrologische Praxis einzuführen ist weitestgehend abhängig von der Anzahl der bereits publizierten Arbeiten zum Zusammenhang zwischen dem Ausmass des DNA Schadens und der Fertilisierungsrate, Schwangerschaftsrate und Implantationsrate. Zahlreiche Arbeiten konnten enge Zusammenhänge zwischen dem Ausmass des Chromatin- schadens und

- der Fertilisierungsrate
- der Implantationsrate
- der Schwangerschaftsrate und
- der Lebendgeburtenrate

belegen. Seit einigen Jahren bestehen intensive Bemühungen, diese Untersuchungen in die Routinediagnostik der Fertilitätsabklärungen zu integrieren.

Berücksichtigt man die unterschiedlichen Typen der DNA Defekte und die unterschiedlichen Resultate der bisherigen Untersuchungen, so muss es einleuchten, dass nicht ein einzelner Test dieses Spektrum abdecken kann sondern mehrere Testverfahren in Klinikalltag einzusetzen sind. Das diagnostische Spektrum des sog. IVF-Patterns wird damit erheblich erweitert und das diagnostische Instrumentarium verfeinert.

Heute liegen die Auswertungen von Studien vor, die von einer ganzen Reihe von Kliniken bei unterschiedlichsten Fragestellungen vorgenommen wurden. Diese Resultate zusammenfassend lässt sich eine erhöhte DNA Fragmentation (DFI) verschiedenen pathologischen Zuständen zuordnen wie

- Kryptorchismus
- Varikozele
- Hodenkeimzelltumoren
- Fieber
- Infekte
- Leukozytospermien

Bei infertilen Männern konnten pathologische SCSA Tests bei sonst völlig normalen Spermienparametern nachgewiesen werden: der SCSA wird aus diesem Grunde als unabhängiger prognostischer Faktor für Schwangerschaftsraten sowohl bei der IVF, ICSI als auch bei der IUI angesehen. **Er stellt einen äusserst sensitiven Marker für eine gestörte Spermatogenese dar** – sog. posttestikuläre Ätiologien treten klar in den Hintergrund (erstaunlicherweise korreliert der SCSA auch nicht mit dem Alter der infertilen Männer)

Die Kernstrukturanalysen werden vom Institut für Dermatohistopathologie und Andrologie Zürich gemäss den geltenden Richtlinien der andrologischen Fachgesellschaften und Literatur durchgeführt (*). Die Resultate werden in den Laborberichterstattungen separat ausgewiesen und bezüglich klinischer Relevanz kommentiert. Bei Fragen stehen wir selbstverständlich jederzeit uneingeschränkt zur Verfügung.

(*) empfohlene Literatur: Sperm DNA Fragmentation: a Controversy. Fertil Steril 84;833 (2005)

Und die Zukunft ?

Die Unterscheidung zwischen ds und ss Brüchen der DNA wird aufgrund des Donuts-Loop-Modells der Sperm chromatin structure an Bedeutung gewinnen:

ds und ss Brüche der DNA können durch die TUNEL Methode, Acridin Orange als auch durch die Alkaline COMET Methode nachgewiesen werden (wobei bei letzterer im Gegensatz zur TUNEL und der SCSA Methode Histamine und Protamine entfernt werden. Möglicherweise werden dabei also mehr Brüche identifiziert und die COMET Methode gibt zusätzliche bzw andere Informationen

Nur ds Brüche sind mit der neutralen COMET Methode identifizierbar.

Ausführliche Literaturangaben und –zusammenstellungen auf Wunsch erhältlich