

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Spermienfunktionsdiagnostik im neuen WHO-Labormanual 2021 – eine Aufwertung? // Sperm function tests in the WHO manual 2021 – an upgrade?

Nordhoff V, Kliesch S

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2022; 19 (4), 184-189

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

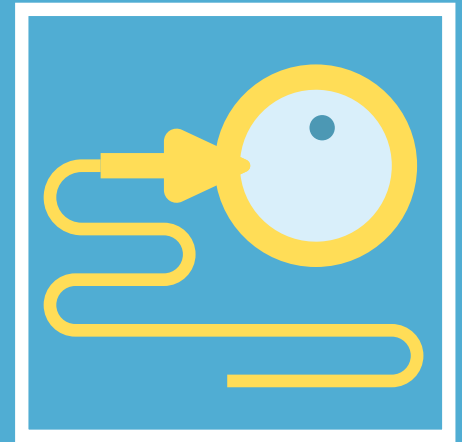
Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Call for Abstracts

10. DVR-KONGRESS

20.09.-22.09.2023



World Conference Center BONN

Prof. Dr. med. Jean-Pierre Allam

PD Dr. rer. nat. Verena Nordhoff

Prof. Dr. med. Nicole Sänger

PROGRAMM JETZT ONLINE!

Download und weitere Informationen unter

www.DVR-KONGRESS.de

BACK TO THE FUTURE

Spermienfunktionsdiagnostik im neuen WHO-Labormanual 2021 – eine Aufwertung?

V. Nordhoff, S. Kliesch

Die klassische Spermienanalyse basiert auf den drei wichtigsten Parametern: der Konzentration oder Spermiengesamtzahl, der Morphologie und der Motilität. Andere physiologische Funktionsstörungen der Spermien, möglicherweise auch ohne eingeschränkte Basisejakulatparameter, sind jedoch nur schwer erkennbar, weil die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht genau erforscht oder die Methoden nicht validiert sind. Die 6. Auflage des WHO-Manuals enthält zusätzlich zu den Kapiteln der Basisuntersuchungen ein weiteres mit sogenannten „erweiterten (extended) Untersuchungen“ und eines zu „weiterführenden (advanced) Untersuchungen“ zur Spermienfunktionsbeschreibung. Einige der beschriebenen Tests stellen eine gute Erweiterung der Basisuntersuchungen dar, andere werden zwar zu den erweiterten Untersuchungen gezählt und empfohlen, jedoch fehlt die Evidenz für deren Anwendung in der Routine.

In dieser Übersichtsarbeit werden die Untersuchungen, die im Handbuch beschrieben sind, und diejenigen Assays, die keine Erwähnung finden, kurz vorgestellt und deren Aussagekraft kritisch bewertet.

Schlüsselwörter: Spermienanalyse, Spermienfunktionstests, Spermien DNA, männliche Infertilität, WHO-Laborhandbuch

Sperm function tests in the WHO manual 2021 – an upgrade? Classical sperm analysis is based on the three most important semen parameters, concentration or total sperm count, morphology and motility. However, other physiological sperm dysfunctions, possibly without restricted semen parameters, are difficult to detect because the underlying mechanisms are still not well understood. The 6th edition of the WHO manual includes additional chapters apart from the basic evaluation methods with so-called “extended examinations” and another one on “advanced examinations” for testing sperm function. Some of the mentioned tests can be considered as a good extension of the basic examinations, other tests are recommended as advanced examinations, but their evidence for use in daily routine is low.

In this review, these tests are shortly presented and their significance is critically evaluated. Moreover, examinations that are not mentioned in the manual, but with potential importance for sperm function analysis are also described. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2022; 19 (4): 184–9.**

Key words: sperm analysis, sperm function tests, sperm DNA, male infertility, WHO manual

■ Einleitung

Ungefähr 70 % aller Fälle männlicher Unfruchtbarkeit können auf eine unzureichende Spermienproduktion, eine abnorme Spermienmorphologie, eine gestörte Spermienmotilität oder eine Kombination dieser drei Parameter zurückgeführt und in der klassischen Ejakulatanalyse identifiziert werden. Eine Funktionsstörung der Spermien ohne eingeschränkte Basisejakulatparameter jedoch ist nur schwer erkennbar, weil die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht genau erforscht sind und entsprechende gezielte Testmethoden fehlen. Im weiblichen Genitaltrakt müssen Spermien eine zeitlich und örtlich festgelegte Abfolge von Funktionen oder Aktivierungen durchlaufen, um ihr Ziel, die Eizelle, zu erreichen [1]. Einige wichtige Funktionen bringen die reifen Spermien nach der Nebenhodenpassage mit, wie z. B. die Fähigkeit zur Akrosomreaktion oder zur Hyperaktivierung, um später die Zona pellucida zu durchdringen und mit der Eizelle zu fusionieren. Andere Funktionen erwerben sie erst im weib-

lichen Genitaltrakt, wie z. B. im Fall der Kapazitation.

Das neue WHO-Manual [2] enthält zusätzlich zu den Kapiteln der klassischen Ejakulatanalyse und den dazu gehörenden Basisuntersuchungen ein Kapitel mit sogenannten „erweiterten (extended) Untersuchungen“ und eines zu „weiterführenden (advanced) Untersuchungen“ zur Spermienfunktionsbeschreibung.

In dieser Zusammenfassung werden die Untersuchungen, die im Handbuch beschrieben sind, und diejenigen, die keine Erwähnung finden, kurz vorgestellt und deren Aussagekraft kritisch bewertet.

■ WHO-Manual – Kapitel „Basisuntersuchungen“

Die Basisuntersuchungen bilden den Grundstock für die Analyse eines Ejakulates. Dazu gehören die Bestimmung des Volumens, die Beurteilung des Aussehens und die erste makroskopische Untersuchung. Dann folgen die Messung des pH-Wertes, die Analyse der Vitalität,

die Bestimmung der Konzentration, die Auszählung der Motilität und weitere Analysen, wie z. B. die Bestimmung der Leukozyten etc. und natürlich die Differenzierung der Morphologie.

Die Vitalität der Spermien im Ejakulat wird klassischerweise meist mit Eosin oder Eosin-Nigrosin bestimmt, so können auch vitale, aber immotile Spermien bei hochgradiger Asthenozoospermie identifiziert werden (Tab. 1). Eine im WHO-Manual beschriebene Alternative für die Bestimmung der Vitalität von zu meist immotilen Spermien ist der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test [2]).

Beide Tests sind für die Diagnostik der Vitalität sicherlich ausreichend; wenn es jedoch zu einer Therapie mittels ICSI kommt, sind diese Untersuchungen ungeeignet, da sie durch die Applikation des Farbstoffs im Falle des Eosintests, oder durch das extreme Aufschwellen des Flagellums beim HOS-Test, unbrauchbar werden. Daher können bei einer ICSI diese beiden Tests nicht zur Anwendung kommen.

Eingelangt und angenommen am 23. August 2022 (verantwortlicher Rubrik-Herausgeber: F.-M. Köhn, München)

Aus dem Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, WHO Kooperationszentrum zur Erforschung der männlichen Fertilität, EAA Ausbildungszentrum, Universitätsklinikum Münster

Korrespondenzadresse: PD Dr. Verena Nordhoff, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster (UKM), Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude D11, D-48149 Münster, Domagkstraße 11; E-Mail: verena.nordhoff@ukmuenster.de

Tabelle 1: Auswahl von Spermienfunktionstests. Adaptiert und modifiziert nach [19].

Spermieeigenschaften/ -funktion	Testverfahren (Beispiele)
Membran-Integrität (Vitalität)	<ul style="list-style-type: none"> – Eosin-Test (Spermien-Vitalität) – Hypoosmotischer Schwell- (HOS-) Test (Membran-Integrität des Flagellums vitaler Spermien) – Spermienflexibilitätstest („sperm tail flexibility test“, STFT) – Laser-gestützte Aktivierung – Hyaluronbindung
Chromatin-Kondensation/ -Integrität	<ul style="list-style-type: none"> – Anilinblau-, Chromomycin-A3-Färbung – Protamin-mRNA-Expression (Ratio Protamin 1/ Protamin 2)
DNA-Integrität	<ul style="list-style-type: none"> – TUNEL¹-Assay; COMET²-Assay – Acridin-Orange-basierte Flowcytometrie (z. B. Sperm chromatin structure assay [SCSATM]) – Sperm-Chromatin-Dispersion-Test (SCD); Halo-Test³ – Raman-Mikrospektroskopie
Produktion reaktiver Sauerstoff-Moleküle (ROS)	<ul style="list-style-type: none"> – Chemilumineszenz – Fluoreszenz-Mikroskopie (intrinsische ROS-Produktion; Oxidation von Dihydroethidin) – Oxidations-Reduktions-Potential (ORP) im Ejakulat
Akrosomreaktion (AR)	<ul style="list-style-type: none"> – Triple-Staining oder FITC-markiertes Pisum sativum-Agglutinin – ARIC-Test (Acrosome Reaction following Ionophore Challenge mittels Ca²⁺-Ionophor A23187) – Polarisationsmikroskopie
Transmembraner Ionenfluss und -transport	<ul style="list-style-type: none"> – Nachweis der Funktionalität von Ionenkanälen, wie z. B. CatSper Ca²⁺-Kanal, Slo3-K⁺-Kanal etc. – Aktivität der CatSper-Ca²⁺-Ionenkanäle im Spermienflagellum (CatSper-Test⁴)

¹Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labelling

²Elektrophoretische Auftrennung von Einzelzellen (Spermien), DNA-Fragmente bilden „Schweif“

³Spermien mit intakter DNA bilden nach Säuredenaturierung und Lyse-„Halo“ in Agarose

⁴C. Schiffer et al., Patent angemeldet (<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=W02020193446>)

Die Alternative zum klassischen HOS-Test ist z. B. der modifizierte HOS-Test (nicht im WHO-Manual beschrieben), dieser setzt nur die Flagellenspitze der hypoosmotischen Lösung aus; so können reagierende Spermien sofort wieder in eine normoosmotische Lösung zur Normalisierung der Schwellung gesetzt und dann für die ICSI weiterverwendet werden.

Alternativ, aber ebenfalls nicht im Handbuch beschrieben, können aktivierende Substanzen, z. B. Xanthinderivate (Theophyllin oder Pentoxiphyllin), zur pharmakologischen Induktion von Bewegungen des Flagellums verwendet werden. Auch kann eine Selektion vitaler, aber immotiler Spermien mittels eines Lasers, der in das ICSI-Mikroskop integriert ist, angewendet werden („laser assisted immotile sperm selection“, LAISS): vitale Spermien zeigen nach kurzem Laser-Schuss auf das Flagellum eine Einrollreaktion und können erfolgreich für die ICSI eingesetzt werden [3].

Auch die Verwendung eines Spermienflexibilitätstests („sperm tail flexibility test“, STFT) ist eine Alternative; jedoch ist hier eine langjährige embryologische Erfahrung unabdingbar, da die Vitalität nur aufgrund der Elastizität des Spermienflagellums erkannt werden kann [4]. Alle Methoden können auch bei morphologischen Defekten, z. B. aufgrund einer genetischen Erkrankung wie beispielsweise beim Karthagener-Syndrom, wo die Zilien durch Mutationen in den Motorproteinen immotil sind, eingesetzt werden [5].

■ WHO-Manual – Kapitel „Erweiterte Untersuchungen“

Das aktuelle WHO-Manual beschreibt in diesem Kapitel Untersuchungen, die für die routinemäßige Samenanalyse nicht erforderlich sind, die aber unter bestimmten Umständen für eine genauere Diagnose oder für Forschungszwecke nützlich sein können. Doch weist die

WHO auch darauf hin, dass, obwohl in vielen Publikationen hohe Korrelationskoeffizienten zur Nützlichkeit der in diesem Kapitel aufgezeigten Assays beschrieben sind, diese nicht unbedingt eine Aussage darüber treffen können, welche Tests im individuellen Fall notwendig oder sinnvoll sind [2].

Erweiterte Untersuchungen listet die WHO zu den folgenden Themen auf: multiple Spermiendefekte, Spermien-DNA-Fragmentation, genetische und genomische Untersuchungen, immunologische Tests, Marker einer Genitaltraktentzündung, unreife Keimzellen im Ejakulat, Antikörper auf Spermatozoen, biochemische Assays zur Bestimmung der akzessorischen Drüsenfunktion und die Analyse der Ejakulatsequenz. Genauer soll hier auf die multiplen Spermiendefekte und die DNA-Fragmentation eingegangen werden.

Multiple morphologische Spermiendefekte

Eine detailliertere Beschreibung von abnormer Spermienmorphologie ist sicherlich sinnvoll, kann jedoch, mit Ausnahmen, keine genauere Prognose für die Fertilität, sei es spontan oder nach assistierter Befruchtung, geben. Eine eingeschränkte Morphologie kann auch auf Stress oder eine Nebenhodenfehlfunktion hindeuten. In einigen Fällen kann die Einschränkung aber auch das Resultat z. B. einer genetisch bedingten Spermien-schwanzstörung sein (multiple morphologische Anomalien der Spermienflagellen, MMAF [6, 7]). MMAF-Phänotypen sind sehr heterogen [8]: Es gibt Spermien mit einer stark eingeschränkten bis vollständig fehlenden Motilität bei normaler Vitalität (z. B. „dynein axonemal heavy chain I“, DNAH1) im Karthagener-Syndrom [6], Membranschäden mit Unterbrechungen der regulären Mittelstück- und Flagellenstruktur, eine Defizienz oder das vollständige Fehlen der im Mittelstück lokalisierten Mitochondrien oder auch pathologische Veränderungen der Länge der Flagellen (aktuelle Liste siehe [9]). Auch gibt es eine besondere Form der Teratozoospermie: die Makrozoospermie, bei der ausschließlich pathomorphe Spermien mit zu großen, amorphen Kopfsegmenten, abnormalen Mittelstücken und multiplen Flagellen im Ejakulat zu finden sind, z. B. durch Mutationen in der Aurora-Kinase C- (AURKC-) Gen [10, 11].

Dies zeigt, dass bei morphologischen Auffälligkeiten der Spermatozoen eine erweiterte Diagnostik sicherlich sinnvoll ist und auch immer empfohlen werden sollte.

Spermien-DNA-Fragmentation

Die Stabilität der Chromatinstruktur der Spermien ist von grundlegender Bedeutung für die spätere Embryonalentwicklung. Ist die Stabilität des Chromatins beeinträchtigt, kann dies zu DNA-Schäden führen und in Folge dessen zu eingeschränkter Entwicklung und Qualität der Embryonen. Zu Schäden an der DNA, hier vor allem zu Doppel- oder Einzelstrangbrüchen, kann es während des Austauschs der Histone durch die kleineren Protamine während der DNA-Kondensation kommen (Tab. 1) [12]. Die Ursachen können mannigfaltig sein, so werden verschiedene intrinsische und auch extrinsische Einflüsse postuliert, wie z. B. Infektionen und Entzündungen im männlichen Genitaltrakt, eine Varikozele oder auch Pharmaka und Lifestyle-bezogene exogene Noxen wie z. B. Tabakrauchen [13–15]. Da die DNA-Fragmentation nicht unbedingt mit einer Einschränkung der Samenqualität einhergeht, können solche Tests eine individuelle Ergänzung zur Abklärung einer männlichen Infertilität sein.

Die WHO beschreibt sehr detailliert die verschiedenen direkten oder indirekten Testverfahren, die eine Schädigung der DNA nachweisen können [2]. So gibt es Verfahren wie den TUNEL-Assay, den „sperm chromatin dispersion“- oder Halo-Test, den COMET-Assay und den „sperm chromatin structure assay“ (SCSA) – einen Acridin-Orange-basierten Flowzytometrie-Assay (Tab. 1).

Problematisch für die Beurteilung und Vergleichbarkeit ist allerdings, dass die diagnostischen Schwellenwerte für jeden Assay unterschiedlich sind. Daher ist es notwendig, dass für jede einzelne Untersuchung geeignete Schwellenwerte vom durchführenden Labor bestimmt und validiert werden – ein Umstand, auf den auch die WHO in diesem Kapitel hinweist.

Die Varianz ist durch die zumeist hohe intraindividuelle und Interassay-Variabilität des aus dem jeweiligen Test resultierenden DNA-Fragmentations-Index (DFI) bedingt. Standardisierte „Normalwerte“ werden nicht vorgegeben und die Gren-

zen zwischen einem physiologischen und pathologischen DFI variieren von Labor zu Labor. Eine Vergleichbarkeit der Tests zwischen verschiedenen Laboren oder Qualitätskontrollen existieren für diese Analysen nicht. Daher wird der Stellenwert des DFI immer noch sehr kontrovers in der Literatur diskutiert, die entsprechenden Assays sind bisher nicht als Screeningverfahren in der andrologischen Routinediagnostik empfohlen [16–20].

Für die *In-vivo*-Selektion von chromosomal normalen Spermien gibt es bisher keine Methoden, die in der Routine zum Einsatz kommen. Es gibt jedoch einen experimentellen Ansatz mittels Raman-spektromikroskopie, bei der die Spermien nach Analyse noch intakt sind [21, 22]. Die weitere Forschung wird zeigen, ob diese Methode zukünftig für die Routine anwendbar sein wird.

■ WHO-Manual – Kapitel „Weiterführende Untersuchungen“

Das WHO-Manual listet unter den weiterführenden Untersuchungen Tests zum oxidativen Stress und ROS, zur Akrosomreaktion, zum Spermienchromatin, zum transmembranen Ionenfluss und -transport auf und beschreibt die Anwendungsmöglichkeiten der Computer-assistierten Spermienanalyse (CASA), sowie möglicher neue Technologien (siehe auch Tab. 1).

Oxidativer Stress und ROS

Es wird vermutet, dass „reactive oxygen species“ (ROS) im männlichen Genitaltrakt dazu führen, dass die Spermienfunktion beeinträchtigt wird. Obwohl Spermien ROS benötigen, um den Fertilisationsprozess zu unterstützen [23], kann eine überschießende Produktion, z. B. durch Zytoplasmareste der Spermien oder durch Leukozyten im Seminalplasma, oxidativen Schaden bewirken [24] und so ein möglicher Grund oder Kofaktor für die männliche Fertilitätsstörung sein [25]. Hier sind es vor allem durch ROS induzierte DNA-Schäden an den Spermien, die in Zusammenhang mit einer eingeschränkten Fertilität stehen.

Es gibt Messmethoden, die das Gleichgewicht des Reduktions-Oxidations-(REDOX-) Potentials und das Gleichgewicht von Antioxidantien und ROS untersuchen können. Jedoch sind diese

Tests bzw. die auf dem Markt befindlichen Geräte [26] aus klinisch-diagnostischer Sicht eher noch zurückhaltend zu bewerten, da noch keine eindeutige Evidenz für ihre diagnostische Relevanz bzw. die Validität der Messmethodik vorliegen. Daher bewertet die WHO diese zusätzlichen Untersuchungen eher als optionale oder Forschungstests [2].

Akrosomreaktion

Das Spermium besitzt eine akrosomale Kappe mit darin eingelagerten Enzymen, die in der Nähe der Eizelle zur Akrosomreaktion ausgeschüttet werden. Dadurch wird es dem Spermium erst möglich, die *Zona pellucida* zu durchdringen und anschließend mit dem Oolemma der Eizelle verschmelzen zu können. Die Akrosomreaktion ist ein wichtiger Bestandteil der Spermien-Eizell-Interaktion und damit des Fertilisationsprozesses [27, 28]. Es scheint so zu sein, dass mehrere Stimuli die Akrosomreaktion auslösen können. Dazu gehören z. B. *Zona-pellucida*-Proteine [29] und Progesteron [30]. Eine Meta-Analyse konnte zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil an Spermien mit durchlaufender Akrosomreaktion und der Befruchtungsrate besteht [31].

Für den Nachweis der Intaktheit des Spermienakrosoms werden histochemische Methoden (z. B. Anfärbung mit *Pisum-sativum*-Agglutinin, Tab. 1) oder auch fluoreszenz- oder polarisationsmikroskopische Techniken angewandt [32–34]. Auch ist es möglich, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch den sogenannten ARIC-Test (Acrosome Reaction following Ionophore Challenge mittels Ca^{2+} -Ionophor A23187) zu untersuchen [35]; die Induzierbarkeit kann als prädiktiver Parameter für das Fertilisationsvermögen von Spermien verwendet werden [36, 37].

Allerdings sind diese Tests durchaus kostspielig und eher keine Routine-Untersuchungen [33]. Auch ist eine weitere Validierung und Bewertung erforderlich, bevor solche Akrosomreaktionstests als klinische Routineuntersuchungen angesehen werden können [2].

Tests, die das Bindungsverhalten von Spermien an eine halbierte *Zona pellucida* (Hemizone-Assay [36, 38]) oder das Eindringen in zonafreie Hamstereizellen (HOP-Test [36]) untersuchen, werden

kaum noch angewendet und sind auch aufgrund von Materialmangel fast nicht mehr möglich. Daher wurden sie aus dem aktuellen WHO-Laborhandbuch gestrichen [2].

Transmembraner Ionenfluss und -transport

Eine funktionelle Analyse des transmembranen Ionenflusses und -transports könnte ein neues diagnostisches Tool zur Erforschung der männlichen Infertilität sein, denn die Navigation der Spermien im weiblichen Genitaltrakt, die Kapazitation, die Hyperaktivierung und auch die Akrosomreaktion werden durch Änderung des intrazellulären pH-Wertes, der Membranspannung und der wechselnden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gesteuert [2].

Dafür verantwortlich sind Ionenkanäle und -transporter, die ausschließlich in Spermien zu finden sind, z. B. der CatSper- Ca^{2+} -Kanal, Slo3- K^{+} -Kanäle und sNHE- $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher [39, 40]. Man vermutet seit Langem, dass ungeklärte Spermienfehlfunktionen durch Defekte in solchen Proteinen verursacht werden können. So wurden Patienten mit diagnostisch völlig unauffälligem Spermioogramm und vermeintlich normalbeweglichen Spermien beschrieben, denen jedoch funktionelle CatSper-Kanäle fehlen [41–44]. Diese Patienten konnten weder auf natürlichem Wege noch mithilfe einer IVF Kinder zeugen. Spermien, denen funktionelle CatSper-Kanäle fehlen, können vermutlich die *Zona pellucida* nicht durchdringen, weshalb eine ICSI-Therapie für die Fertilisierung erforderlich ist [40, 42, 43, 45, 46]. Routinediagnoseverfahren, die solche Ionenkanaldefekte nachweisen können, sind zurzeit noch nicht verfügbar, werden aber, mit entsprechender Forschungsgrundlage, sicherlich zukünftig angeboten werden (Tab. 1).

Nicht im WHO-Manual erwähnt werden neue physiologische Ansätze zur Funktionsanalyse, wie z. B. der Nachweis der Phospholipase C (PLC) zeta. PLC zeta ist zur Aktivierung der Eizelle notwendig und könnte möglicherweise als Biomarker kompetenter Spermien dienen [28]. Nachteil ist jedoch, dass dieser Test nur ein diagnostisches Hilfsmittel ist, um nachzuweisen, dass solche Spermien existieren. Für therapeutische Maßnahmen sind die Spermien nach der Ana-

lyse leider nicht mehr verwendbar. Dies könnte auch der Grund sein, warum die WHO diese Untersuchung nicht mit in das neue Manual aufgenommen hat.

Ebenfalls keine Erwähnung finden epigenetische Untersuchungen, wie z. B. die Analyse der DNA-Methylierung oder der Histonmodifikation, die jeweils die Expression der Gene verändern können. Zum Beispiel geht eine Einschränkung der Ejakulatparameter mit Veränderungen der DNA-Methylierung einher [47] und Spermien von Männern mit OAT-Syndrom zeigen zum Teil ein maternales und somit nicht korrektes Muster epigenetisch geprägter Gene [48].

Computer-assistierte Spermienanalyse (CASA)

CASA-Systeme werden schon länger verwendet, um die klassischen Parameter eines SpermioGRAMMS zu ermitteln. Die korrekte Bestimmung der Morphologie gelingt teilweise, hängt jedoch in hohem Maß von der Standardisierung und Qualität der Färbung ab. Die Ermittlung der korrekten Konzentration ist stark abhängig von der genauen Erkennung intakter Spermien. Unzuverlässiger sind diese Systeme bei der Bestimmung der Motilität, da der prozentuale Anteil der beweglichen von der Anzahl der unbeweglichen Spermien vorgegeben wird; der unbewegliche Anteil kann jedoch durch das falsche Mitzählen von Debris ein ungenaues oder sogar falsches Ergebnis liefern [2].

Optimal sind CASA-Systeme für kinematische Analysen, da sie bewegliche Zellen einzeln verfolgen und ihre Geschwindigkeit ermitteln können. Um genaue Ergebnisse zu erhalten, müssen allerdings mindestens 200, besser 400 Spermien ausgezählt werden. Daher sind diese Systeme nur für leicht oligozoo- bis normozoosperme Proben sinnvoll.

CASA-Systeme können, anders als das menschliche Auge, das Maß der Hyperaktivierung, welche durch Kapazitation und eine Änderung der Wellenform des Flagellums (höhere Amplitude und verringerte Frequenz) erreicht wird [49, 50], bestimmen. Um die Resultate besser darzustellen, wurden entsprechende Algorithmen entwickelt; diese sind in der Lage, die genaue Quantifizierung von Kopfbewegungen zu verfolgen [51, 52].

Der Anteil an Spermien mit einer optimalen Kopfmorphologie („Zona-preferred“) und einer guten geradlinigen Geschwindigkeit („straight line velocity“, VSL [2]) ist signifikant mit der natürlichen Schwangerschaftsrate in einer großen Gruppe von subfertilen Paaren korreliert [53, 54].

Neue Technologien

Fortschritte bei der Bildverarbeitung und die verbesserten Rechnerleistungen werden die Effizienz und die Analysemethoden von Spermien zukünftig deutlich verbessern. So könnten z. B. Kinematikmessungen zur genaueren Klassifizierung von Spermienpopulationen helfen, das Verständnis und die Veränderung der Zellmotilität bei ihrem Weg bis zur Eizelle zu verstehen [52]. Auch Smartphone-basierte Geräte könnten in die Evaluierung einbezogen werden. Allerdings wird eine App niemals den Gang zum Andrologen ersetzen, sie könnte aber zum Erkennen einer Einschränkung der Spermien durchaus Verwendung finden, um so schon frühzeitig einen Beratungstermin beim Spezialisten einzuholen.

Da die Ergebnisgenauigkeit der Apps leider nur einen groben Anhalt bietet, können diese Tests leider auch dazu führen, dass sich die Männer in einer „falschen Sicherheit“ wiegen. Weitere Entwicklungen werden die Anwendung in Zukunft sicherlich verbessern.

Nicht spezifisch erwähnt werden neue Möglichkeiten der Spermien Selektion anhand physiologischer Mechanismen zum Aufspüren der Eizelle: die Rheotaxis, das Schwimmen gegen die Flussrichtung, die Thermotaxis, eine Bewegung entlang eines Temperaturgradienten, und die Chemotaxis, Bewegungen, ausgelöst durch einen biochemischen Gradienten um die Eizelle. Eine Selektion kann auch in Submillimeter großen Kammern mittels Mikrofluidik erfolgen [55]. Hier sind die Daten jedoch noch nicht ausreichend, um diese Methoden in die Routine einzuführen, bzw. zeigen keine Unterschiede in der Aufbereitung im Vergleich zu den klassischen Verfahren.

■ WHO-Manual – Kapitel „Spermienaufbereitung“

Interessanterweise erwähnt das neue WHO-Manual neben den klassischen

Methoden, wie dem einfachen Waschen, dem Swim-Up oder dem Dichtegradienten, auch die Selektion durch MACS („magnetic activating cell sorting“), obwohl eine systematische Cochrane-Analyse [56, 57] zwischen der Aufbereitung mittels MACS, einer Hyaluronsäure-(HA-) Bindungs-Selektion zur sogenannten HA-ICSI oder anderen Verfahren keine Unterschiede in Bezug auf klinische oder Lebendgeburten festgestellt hat.

Weitere Aufbereitungsmethoden, wie z. B. die Zeta-Selektion [58] oder die schon oben genannte HA-Selektion [59] bzw. die Anwendung von Mikrofluidikkammern [60], werden auch nicht erwähnt, vermutlich aus der Überlegung heraus, dass hier die derzeitige Datenlage nicht eindeutig ist und im Moment eher nicht darauf hinweist, dass diese Methoden einen Vorteil bringen, oder den klassischen Verfahren überlegen sein könnten.

Keine Erwähnung mehr finden die diversen Spermien-Mukus-Interaktionstests, da diese nicht mehr in der klinischen Routine verwendet werden [2].

■ Interessenkonflikt

VN und SK geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Literatur:

- Nordhoff V. Spermienqualität und Funktionstests. In: Nieschlag E, et al. (Hrsg). *Andrologie*, 4. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, 2022; im Druck.
- WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen. 6th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2021.
- Nordhoff V, Schüring AN, Krallmann C, et al. Optimizing TESE-ICSI by laser-assisted selection of immotile spermatozoa and polarization microscopy for selection of oocytes. *Andrology* 2013; 1: 67–74.
- Nordhoff V. How to select immotile but viable spermatozoa on the day of intracytoplasmic sperm injection? An embryologist's view. *Andrology* 2015; 3: 156–62.
- Gerber PA, Kruse R, Hirschhain J, et al. Pregnancy after laser-assisted selection of viable spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in a couple with male primary cilia dyskinesia. *Fertil Steril* 2008; 89: 1826.e9–12.
- Coutton C, Escoffier J, Martinez G, et al. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* 2015; 21: 455–85.
- Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new? *Asian J Androl* 2020; 22: 236–45.

■ Relevanz für die Praxis

Eine weitergehende Analyse von Spermien, über ihre Motilität, Morphologie oder Konzentration hinaus, ist ein sinnvoller und auch zusätzlicher Aspekt, der in die Überlegungen vor einer medizinisch assistierten Reproduktion (MAR) mit einbezogen werden muss. Trotzdem muss man auch kritisch abwägen, ob, und vor allem welche Untersuchungen im individuellen Fall sinnvoll oder angemessen ist. Wichtig ist, dass jeder Assay gut validiert sein muss. Dies ist bei den meisten Tests (auch den im WHO-Handbuch aufgeführten) noch nicht der Fall, und somit ist die klinische Relevanz oder Evidenz nicht bei allen Untersuchungen gegeben.

Ein Nachteil aller Spermienfunktionstest ist in jedem Fall, dass sie nicht die Gesamtheit der *In-vivo*-Situation, aber eben auch nicht der *In-vitro*-Situation, abbilden können. Sie erfassen meist nur isolierte Schritte oder sind häufig auch zu kosten- oder zeitintensiv. Daher wird sich zukünftig sicherlich zeigen, welche Methoden für welche Patientengruppe sinnvoll in die Routine übernommen werden können.

- Schuppe HC, Wyrwoll MJ, Fietz D, Tüttelmann F. Störungen der Spermato- und Spermiogenese. In: Nieschlag E, et al. (Hrsg). *Andrologie*, 4. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, 2022; im Druck.
- Houston BJ, Riera-Escamilla A, Wyrwoll MJ, et al. A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Hum Reprod Update* 2021; 28: 15–29.
- Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007; 39: 661–5.
- Ben Khelifa M, Coutton C, Blum MG, et al. Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod* 2012; 27: 3337–46.
- Steger K, Cavalcanti MC, Schuppe HC. Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. *Int J Androl* 2011; 34: 513–27.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril* 2015; 104: 582–90.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA fragmentation: Mechanisms of origin. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1166: 75–85.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010; 93: 1027–36.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015; 103: e18–25.
- Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update* 2017; 23: 660–80.
- Colpi GM, Francavilla S, Haidl G, et al. European Academy of Andrology guideline management of oligo-astheno-teratozoospermia. *Andrology* 2018; 6: 513–24.
- Nordhoff V, Kliesch S. Das eine unter vielen – Spermienqualität und Möglichkeiten der Selektion. *Gyn Endokrinol* 2019; 17: 250–6.
- Panner Selvam MK, Ambar RF, Agarwal A, Henkel R. Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrology* 2020; 19: e13706.
- Mallidis C, Sanchez V, Wistuba J, et al. Raman microspectroscopy: shining a new light on reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 403–14.
- Da Costa R, Redmann K, Schlatt S. Simultaneous detection of sperm membrane integrity and DNA fragmentation by flow cytometry: A novel and rapid tool for sperm analysis. *Andrology* 2021; 9: 1254–63.
- Robert KA, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. An update on the techniques used to measure oxidative stress in seminal plasma. *Andrology* 2020; 19: e13726.
- Cannarella R, Crafa A, Barbagallo F, et al. Seminal plasma proteomic biomarkers of oxidative stress. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 9113.
- Agarwal A, Sengupta P. Oxidative stress and its association with male infertility. In: Parekattil S, Esteves S, Agarwal A (eds). *Male infertility*. Springer Verlag, Cham, Switzerland, 2020; 57–68.
- Agarwal A, Sharma R, Roychoudhury S, et al. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril* 2016; 106: 566–73.
- Barroso G, Valdespin C, Vega E, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 2009; 92: 835–48.
- Tosti E, Ménéz Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Hum Reprod Update* 2016; 22: 420–39.
- Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 156–61.
- Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, et al. Progesterone, spermatozoa and reproduction: An updated review. *Mol Cell Endocrinol* 2020; 516: 110952.
- Xu F, Guo G, Zhu W, Fan L. Human sperm acrosome function assays are predictive of fertilization rate in vitro: a retrospective cohort study and meta analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2018; 16: 8.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2010; 93: 807–13.
- Barbăroșiu C, Agarwal A, Henkel R. Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility. *Andrologia* 2020; 26: e13625.
- Pinto S, Carrageta DF, Alves MG, et al. Sperm selection strategies and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Andrologia* 2020; 28: e13725.
- Zeginiadou T, Papadimas J, Mantalenakis S. Acrosome reaction: Methods for detection and clinical significance. *Andrologia* 2000; 32: 335–43.
- Henkel R, Maaß G, Bödeker RH, et al. Sperm function and assisted reproduction technology. *Reprod Med Biol* 2005; 4: 7–30.
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, et al. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 160–8.
- Liu de Y, Liu ML, Garrett C, Baker HW. Comparison of the frequency of defective sperm-zona pellucida (ZP) binding and the ZP-induced acrosome reaction between subfertile men with normal and abnormal semen. *Hum Reprod* 2007; 22: 1878–84.
- Kaupp UB, Strünker T. Signaling in Sperm: More different than similar. *Trends Cell Biol* 2017; 27: 101–9.

40. Wang H, McGoldrick LL, Chung JJ. Sperm ion channels and transporters in male fertility and infertility. *Nat Rev Urol* 2021; 18: 46–66.
41. Williams HL, Mansell S, Alasmari W, et al. Specific loss of CatSper function is sufficient to compromise fertilizing capacity of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2015; 30: 2737–46.
42. Brown SG, Publicover SJ, Barratt CLR, et al. Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update* 2019; 25: 758–76.
43. Luo T, Chen HY, Zou QX, et al. A novel copy number variation in CATSPER2 causes idiopathic male infertility with normal semen parameters. *Hum Reprod* 2019; 34: 414–23.
44. Schiffer C, Rieger S, Brenker C, et al. Rotational motion and rheotaxis of human sperm do not require functional CatSper channels and transmembrane Ca²⁺ signaling. *EMBO J* 2020; 39: e102363.
45. Ren D, Navarro B, Perez G, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; 413: 603–9.
46. Kelly MC, Brown SG, Costello SM, et al. Single-cell analysis of [Ca²⁺]_i signalling in sub-fertile men: characteristics and relation to fertilization outcome. *Hum Reprod* 2018; 33: 1023–33.
47. Kläver R, Gromoll J. Bringing epigenetics into the diagnostics of the andrology laboratory: challenges and perspectives. *Asian J Androl* 2014; 16: 669–74.
48. Laurentino S, Borgmann J, Gromoll J. On the origin of sperm epigenetic heterogeneity. *Reproduction* 2016; 151: R71–8.
49. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 403–39.
50. Mortimer D, Mortimer ST. Computer-aided sperm analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol* 2013; 927: 77–87.
51. Zhu JJ, Pacey AA, Barratt CL, Cooke ID. Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American versions of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum Reprod* 1994; 9: 456–62.
52. Goodson SG, White S, Stevans AM, et al. CASAnova: a multi-class support vector machine model for the classification of human sperm motility patterns. *Biol Reprod* 2017; 97: 698–708.
53. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, et al. Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod* 2003; 18: 1643–9.
54. Garrett C, Liu DY, Baker HW. Comparison of human sperm morphometry assessment models based on zona pellucida selectivity. *Soc Reprod Fertil* 2004; 65: 357–61.
55. Yan Y, Liu H, Zhang B, Liu R. A PMMA-based microfluidic device for human sperm evaluation and screening on swimming capability and swimming persistence. *Micromachines* 2020; 11: 793.
56. Lepine S, McDowell S, Searle LM, et al. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 7: CD010461.
57. Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M, Borini A. Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better than the traditional one? *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 1045–51.
58. Kızılay F, Altay B. Sperm function tests in clinical practice. *Turk J Urol* 2017; 43: 393–400.
59. Kirkman-Brown J, Pavitt S, Khalaf Y, et al. Sperm selection for assisted reproduction by prior hyaluronan binding: the HABSelect RCT. Southampton (UK): NIHR Journals Library 2019.
60. Quinn MM, Ribeiro S, Juarez-Hernandez F, et al. Microfluidic preparation of spermatozoa for ICSI produces similar embryo quality to density-gradient centrifugation: a pragmatic, randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2022; 30: 1406–13.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)