

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer testikulären Spermienextraktion (TESE)

Steger K, Diemer T, Hauck EW, Weidner W

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (1), 13-17

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

Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer testikulären Spermienextraktion (TESE)

K. Steger, T. Diemer, E. W. Hauck, W. Weidner

Hoden von infertilen Patienten besitzen meist kleine Areale mit zumindest qualitativ intakter Spermatogenese, die die Entnahme von Spermatozoen erlauben. Daher kommt der testikulären Spermienextraktion (TESE) in Kombination mit einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) eine wichtige therapeutische Rolle für die Behandlung männlicher Infertilität zu. Da Protamine ausschließlich in postmeiotischen Keimzellen exprimiert werden, sind sie hervorragend als Marker für die Anwesenheit von Spermatozoen und somit den Erfolg einer TESE geeignet. Die RT-PCR bietet hierfür eine spezifische, sensitive und effiziente Methode für die klinische Routinediagnostik. Der Nachweis der Expression von Protaminen in Spermatozoen einer Hodenbiopsie erlaubt derzeit aber noch keine Prognose für den Erfolg einer ICSI, d. h. der Fertilisierung einer Eizelle bzw. der Geburt eines Kindes.

Schlüsselwörter: Histologie, ICSI, männliche Infertilität, Protamin, Spermatozoen, TESE

Protamine as Prognostic Factor for Successful Testicular Sperm Extraction. Testes from infertile patients are known to contain some small foci with at least qualitative normal spermatogenesis which allow testicular sperm extraction (TESE) to be carried out. TESE, therefore, plays a vital role for the treatment of male infertility in combination with intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Protamines are solely expressed in postmeiotic germ cells and thus represent ideal markers to demonstrate the presence of spermatozoa and the success of TESE. RT-PCR for protamines displays a specific, sensitive and efficient method for clinical routine diagnosis. However, detection of protamines in spermatozoa of a testicular biopsy, to date, is insufficient to predict the success of ICSI, namely the fertilization of an oocyte and the birth of a child, respectively. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2005; 2 (1): 13–7.**

Key words: histology, ICSI, male infertility, protamine, spermatozoa, TESE

Seit Einführung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) [1] können selbst Männer mit Verschlussazoospermie und schwersten Spermatogenesestörungen inklusive Sertoli-Cell-Only- (SCO-) Syndrom ein genetisch eigenes Kind zeugen, da ihre Hoden meist kleine Areale mit zumindest qualitativ intakter Spermatogenese besitzen, die die Entnahme von Spermatozoen erlauben [2]. Der testikulären Spermienextraktion (TESE) kommt somit eine wichtige therapeutische Rolle für die Behandlung männlicher Infertilität zu. Sowohl für den behandelnden Arzt als auch für das betroffene Ehepaar wäre die Existenz eines Prognosefaktors wünschenswert, um den Erfolg einer TESE-ICSI-Therapie realistisch einschätzen zu können. Hierbei muß klar zwischen dem Erfolg einer TESE, d. h. dem Auffinden von Spermatozoen in der Hodenbiopsie, und dem Erfolg einer ICSI, d. h. Fertilisierung, Schwangerschaft und Geburt eines Kindes, unterschieden werden.

Zur Technik der Hodenbiopsie und Mikro-Hodenbiopsie

Bei der Hodenbiopsie werden nach einer skrotalen Längsinzision die Hodenhüllen eröffnet und der Hoden hervorluxiert. Anschließend erfolgen an der lateralen Hodenzirkumferenz die Inzisionen der Tunica albuginea auf einer Länge von ca. 0,5 cm. Um die testikuläre Blutversorgung nicht zu beeinträchtigen, werden die Inzisionen parallel zum Gefäßverlauf gesetzt. Durch leichten Druck quillt das Hodengewebe hervor und kann mit einer Schere abgetragen werden [3]. Die Zahl der Inzisionen ist variabel. In der Gießener Arbeitsgruppe hat sich die 3fach-Inzision am oberen, mittleren und unteren Hodenpol durchgesetzt. Die gewonnenen Proben wer-

den geteilt und der eine Teil wird für eine mögliche spätere Spermatozoenextraktion kryokonserviert, der andere Teil für die histologische Evaluation und den Protaminnachweis (siehe unten) asserviert.

Bei der Mikro-Hodenbiopsie wird die mittlere Inzision über die gesamte laterale Hodenzirkumferenz erweitert und das Gewebe durch Aufklappen der Tunica albuginea exponiert. Unter dem OP-Mikroskop können dann gezielt die dunkler und dicker aussehenden Tubuli seminiferi gewonnen werden [4]. Durch diese Technik soll sich die Ausbeute der Spermatozoen steigern lassen. Gleichzeitig können die akuten und dauerhaften operativen Komplikationen, wie Blutungen und Atrophie, durch die schonende mikroskopische Technik gesenkt werden [5].

Mögliche Prognosefaktoren für den Erfolg einer TESE

Histologie der Hodenbiopsie

Bei nicht obstruktiver Azoospermie ist die TESE bei ca. 52 % der Patienten erfolgreich [6–10]. Die große Variabilität der in der Literatur beschriebenen Erfolgsraten beruht auf der unterschiedlichen Histologie der verwendeten Hodenbiopsie. So berichten Tournaye et al. [6] über eine Spermatozoenausbeute von 100 % bei Hypospermatogenese, von 48 % bei Spermatogenese-arrest und von 19 % bei SCO. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Su et al., Seo & Ko sowie Friedler et al. [8–10] (Tab. 1). Diese Daten zeigen, daß der Erfolg der TESE durch den histologischen Biopsiefund abgeschätzt werden kann

Tabelle 1: Erfolg von TESE bei unterschiedlicher Histologie

Autor	Hypo-spermatogenese	Spermatogenese-arrest	SCO-Syndrom
Tournaye et al. 1996 [6]	100 %	48 %	19 %
Su et al. 1999 [8]	79 %	47 %	24 %
Seo & Ko 2001 [9]	89,2 %	62,5 %	16,3 %
Friedler et al. 2002 [10]	55 %	29 %	16 %
Mittelwert	80,8 %	46,6 %	18,8 %

Eingegangen: 25.01.2005; akzeptiert nach Revision: 07.02.2005

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Korrespondenzadresse: PD Dr. med. Klaus Steger, Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität, D-35385 Gießen, Rudolf-Buchheim-Str. 7; E-Mail: klaus.steger@chiru.med.uni-giessen.de

und auch bei schlechtem histologischem Befund – wie SCO – meist Spermatogeneseinseln vorliegen, die die Entnahme von Spermatozoen erlauben.

Parallel zum histologischen Befund Hypospermatogenese, Spermatogenese-arrest oder SCO-Syndrom wird bei der Evaluation einer Hodenbiopsie die Effektivität der Spermatogenese anhand eines Score-Systems beurteilt, bei dem der prozentuale Anteil der Tubuli seminiferi mit elongierten Spermatischen ermittelt wird [11, 12]. Eine Färbung mit Anilinblau läßt die Zellkerne von Spermatozoen deutlich hervortreten. Diese Tatsache beruht auf dem Austausch DNA-bindender Histone gegen Protamine. Letztere werden ausschließlich in haploiden Spermatischen exprimiert und erfüllen somit eine wichtige Voraussetzung, um als Prognosefaktor für den Erfolg einer TESE zu fungieren (siehe unten).

Da rechter und linker Hoden oftmals unterschiedliche histologische Befunde aufweisen, sollten für eine korrekte Beurteilung der Spermatogenese stets beide Hoden therapiert werden [13]. Hingegen ist bislang nicht endgültig geklärt, ob durch Anwendung spezieller mikrochirurgischer Techniken – wie der Mikro-Hodenbiopsie – höhere Ausbeuten erzielt werden können als mit der konventionellen Hodenbiopsie [5, 14–17]. Okada et al. [16] berichteten eine höhere Spermatozoenextraktionsrate bei Spermatogenese-arrest (75 % versus 37,5 %) und SCO-Syndrom (33,9 % versus 6,3 %).

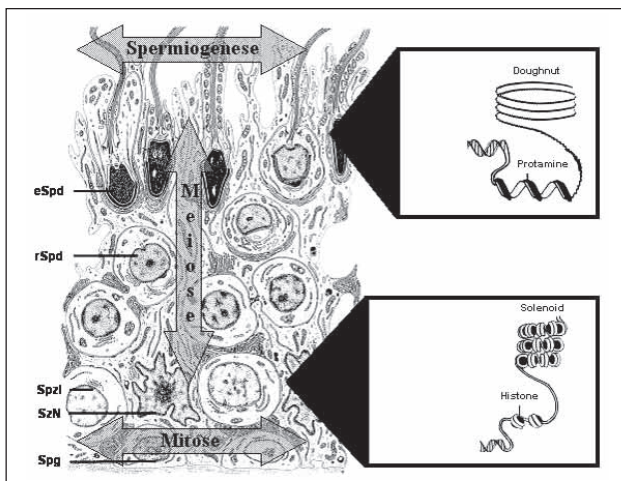


Abbildung 1: Während der Spermatogenese durchlaufen die Keimzellen drei Entwicklungsphasen. Die Spermatogonien (Spg) unterliegen einer mitotischen Vermehrung. Regelmäßig differenzieren Spermatogonien zu primären Spermatozyten (SpzI), die in die Meiose eintreten. Aus einer primären Spermatozyte entstehen zunächst zwei sekundäre Spermatozyten und schließlich vier runde Spermatische (rSpd). Diese teilen sich nicht mehr, sondern differenzieren zu reifen elongierten Spermatischen (eSpd). Während dieser als Spermiogenese bezeichneten Entwicklungsphase werden Histone gegen Protamine ausgetauscht. Die DNA ist zunächst an Nukleosome gebunden, d. h. Histonoktamere aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4. Die Histon-gebundene-DNA wickelt sich auf und formt als dreidimensionale Struktur ein sogenanntes Solenoid. Protamine (Protamin-1 und Protamin-2) binden über ihr zentrales Polyargininsegment an die DNA, während ihre N- und C-terminalen Enden in Disulfid-Brückenbindungen involviert sind. Die Protamin-gebundene DNA formt als dreidimensionale Struktur ein sog. „Doughnut“. Hierbei handelt es sich um konzentrische Kreise von Protamin-DNA-Komplexen, die durch van der Waals-Kräfte zusammen gehalten werden. Diese Protamin-DNA-Wechselwirkungen führen zu einer enormen Kondensation des Kernchromatins in haploiden Spermatischen, die für die weitere Differenzierung zu befruchtungsfähigen Spermien eine zentrale Rolle spielen (Erklärung siehe Text). SzN = Nukleus der Sertolizelle. (Mod. nach: Hees H, Sinowatz F. Histologie – Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 2. Aufl. Deutscher Ärzte Verlag, Köln, 1992)

Hormonstatus des Patienten

Obwohl der Serum-FSH-Wert positiv mit dem Prozentsatz von SCO-Tubuli in einer Hodenbiopsie korreliert [18–20], ist er nicht als Prognosefaktor für die Anwesenheit von Spermatozoen geeignet [9, 21]. Gleiches gilt für LH, Prolaktin und Testosteron [21]. Auch Inhibin-B und Inhibin-B in Kombination mit FSH können die Anwesenheit von Spermatozoen nicht mit Sicherheit vorhersagen [22, 23].

Screening von Yq11.21–23

Auf dem langen Arm des Y-Chromosoms (Yq11.21–23) befindet sich der Multigenlocus für den Azoospermiefaktor (AZF) a–c. Mikrodeletionen führen innerhalb der AZFa-Region zu SCO-Syndrom [24] und innerhalb der AZFb-Region zu einem Arrest der Spermatogenese auf der Stufe von Spermatozyten [25]. Somit enthalten beide Hoden in beiden Fällen keine Spermatozoen. Demgegenüber resultieren die am häufigsten detektierten Mikrodeletionen innerhalb der AZFc-Region lediglich in Hypospermatogenese [26] und erlauben somit keine ausreichend sichere Prognose für den Erfolg einer TESE. Sie treten vornehmlich bei Patienten mit nicht obstruktiver Azoospermie und subfertilen Patienten mit Spermienkonzentrationen $< 1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ auf [27]. Es sei an dieser Stelle auf die Empfehlung der „Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin“ zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren verwiesen [28].

Der Histon-Protamin-Austausch und seine Folgen für die Bildung befruchtungsfähiger Spermatozoen

Die Bildung befruchtungsfähiger Spermatozoen erfolgt im Keimepithel der Tubuli seminiferi. Während der Spermatogenese wandern die Keimzellen entlang der Oberfläche der somatischen Sertolizellen von basal nach apikal und durchlaufen drei charakteristische Entwicklungsphasen: Mitose, Meiose und Spermiogenese (Abb. 1).

Die unreifen runden Spermatischen differenzieren durch morphologische, biochemische und physiologische Veränderungen zu reifen elongierten Spermatischen. Während dieser Entwicklung kommt es in den haploiden Spermatischen zur Kondensation des Zellkerns sowie zur Ausbildung eines Akrosoms und eines Flagellums.

Die Kondensation des Zellkerns ist eine Folge des Austausches DNA-bindender Histone gegen Protamine, der beim Menschen zu ca. 85 % erfolgt [29]. Die Protamin-DNA-Interaktionen haben zwei Konsequenzen, die für die weitere Entwicklung der haploiden Spermatischen von zentraler Bedeutung sind:

- Die Kondensation des Kernchromatins bewirkt, daß die Genexpression in elongierenden Spermatischen zum Erliegen kommt.
- In haploiden Spermatischen sind Transkription und Translation zeitlich entkoppelt (Abb. 2).

Eine vergleichende Genexpressionsanalyse mittels Microarray zwischen Spermatischen aus Hoden und Spermien aus Ejakulat zeigte keine Unterschiede in der Genexpression dieser beiden Zelltypen [31]. Spermien können somit als nicht-invasive Hodenbiopsie verwendet werden, um mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden mögliche Ursachen für eine Hoden-spezifische Infer-

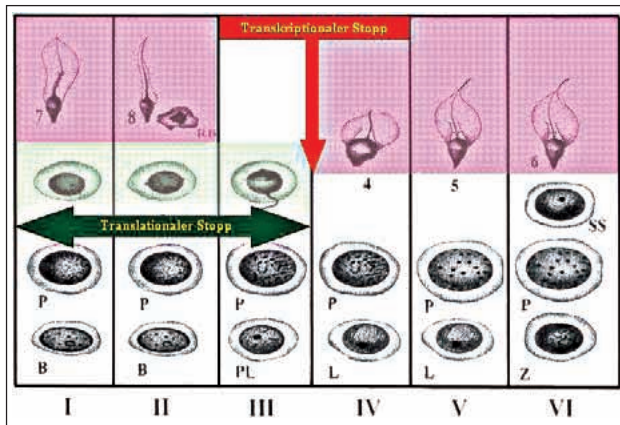


Abbildung 2: Die Entwicklung von Spermatogonien zu reifen Spermatozoen wird als Zyklus des Keimepithels bezeichnet. Durch die räumliche Koordination verschiedener Keimzellklone entstehen im Keimepithel ständig wiederkehrende Muster der Anordnung von Keimzellen, die Stadien des Keimepithelzyklus. Beim Menschen wird der Keimepithelzyklus in 6 Stadien eingeteilt, die Differenzierung runder Spermatozoen in elongierte Spermatozoen wird nochmals in 8 Entwicklungsstufen unterteilt [30]. Durch die Chromatinkondensation kommt es in haploiden Spermatozoen zu einer zeitlichen Entkopplung von Transkription und Translation, d. h. die Transkription der Protamin-mRNA erfolgt im Kern von Step-1–4-Spermatozoen (grün), die Translation der Protamin-Proteine mit zeitlicher Verzögerung im Zytoplasma von Step-4–8-Spermatozoen (rot).

tilität zu untersuchen. Demgegenüber kann bei Azospermie die Analyse des Transkriptes von Spermatozoen aus der Hodenbiopsie dazu dienen, das Proteom und somit das Fertilisierungspotential von Spermien zu prognostizieren.

Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer TESE

Eine TESE ist erfolgreich, sobald Spermatozoen für eine ICSI gewonnen werden können. Als Marker für die Anwesenheit von Spermatozoen eignen sich prinzipiell alle Genprodukte, die spezifisch und ausschließlich in Spermatozoen exprimiert werden [32–34]. Den Protaminen kommt hierbei jedoch eine besondere Bedeutung zu, da die Protamin-DNA-Interaktionen die Ursache für die Chromatinkondensation und die damit verbundene Entkopplung von Transkription und Translation in haploiden Spermatozoen bilden. Durch den Stopp der Transkription in elongierenden Spermatozoen gibt das Transkript in runden Spermatozoen Auskunft über das Proteom in elongierten Spermatozoen und reifen Spermatozoen. Den runden Spermatozoen kommt somit eine Schlüsselfunktion für die Produktion befruchtungsfähiger Spermien zu.

Der immunhistochemische Nachweis von Protamin-Protein in Spermatozoen ist schwierig, da die Epitope durch die Chromatinkondensation für Antikörper nur schwer zugänglich sind. Demgegenüber ist der Nachweis von Protamin-mRNA in runden Spermatozoen mit mehreren Vorteilen verbunden: So sind beide Protamingene relativ klein (Protamin-1: 156 Bp, Protamin-2: 309 Bp) und besitzen je ein Intron (Protamin-1: 91 Bp, Protamin-2: 163 Bp). Bei einer RT-PCR kann bei Verwendung Intron-überspannender Primerpaare somit eine Amplifikation genomischer DNA sicher ausgeschlossen werden. Durch den Stopp der Translation enthalten runde Spermatozoen zudem relativ viel mRNA, was deren Detektion einfach und sicher gestaltet. So reicht in einer TESE-Probe bereits die

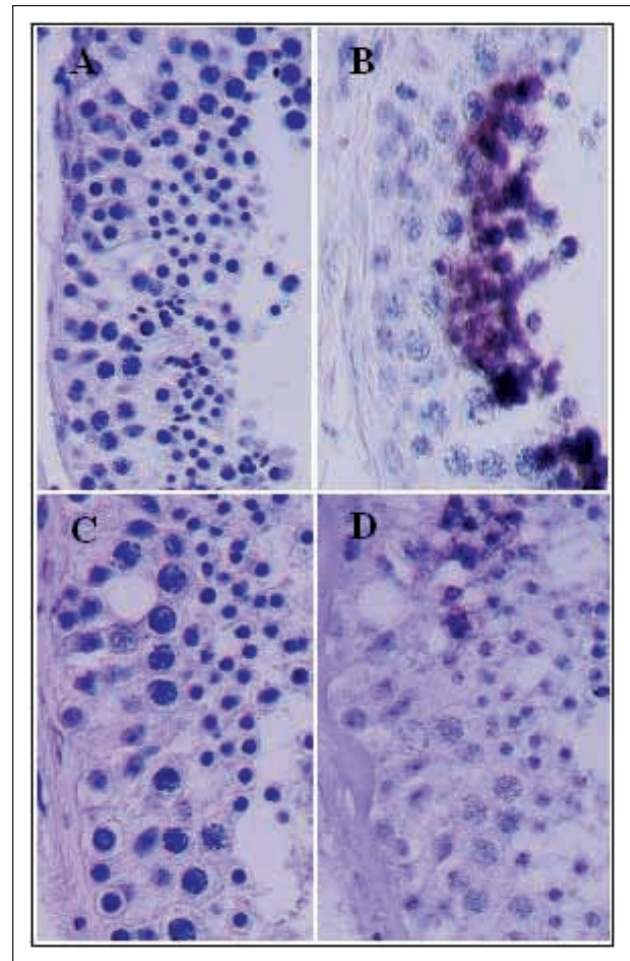


Abbildung 3: Paraffinschnitt eines Mannes mit normaler Spermatogenese (A: HE-Färbung, B: *In-situ*-Hybridisierung für Protamin-1) und eines Patienten mit gestörter Spermatogenese (C: HE-Färbung, D: *In-situ*-Hybridisierung für Protamin-1). Der Tubulus in D enthält nicht nur weniger runde Spermatozoen als in B, sondern darüber hinaus auch runde Spermatozoen, die negativ für Protamin-1 sind. Primärvergrößerung $\times 40$.

Anwesenheit weniger runder Spermatozoen, um ein Amplifikationsprodukt für Protamin zu erzeugen, das im Anschluß durch eine Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann [35]. Die hohe Effizienz und Spezifität des Protaminnachweises führte kürzlich zu dem Vorschlag, die Detektion von Protaminen für den Nachweis von Sexualdelikten in der Gerichtsmedizin zu verwenden [36].

In der Andrologie erfolgt der Nachweis von Protaminen bislang meist indirekt durch Färbung mit Anilinblau [37, 38] oder Chromomycin A3 [39, 40]. Während Anilinblau die Arginin-reichen Protamine stärker färbt als die Lysin-reichen Histone, lagert sich das Fluorochrom Chromomycin A3 bevorzugt in GC-reiche Sequenzen der DNA ein. Durch beide Methoden konnte nachgewiesen werden, daß bei infertilen Patienten auch Spermatozoen mit normaler Morphologie eine unvollständige Chromatinkondensation, verursacht durch einen unvollständigen Histon-Protamin-Austausch, aufweisen können. Der direkte Nachweis von Protaminen durch *In-situ*-Hybridisierung bestätigt diese Daten (Abb. 3).

Sowohl der Nachweis der Chromatinkondensation durch Färbung mit Anilinblau bzw. Chromomycin A3, als auch die *In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis der Protamine

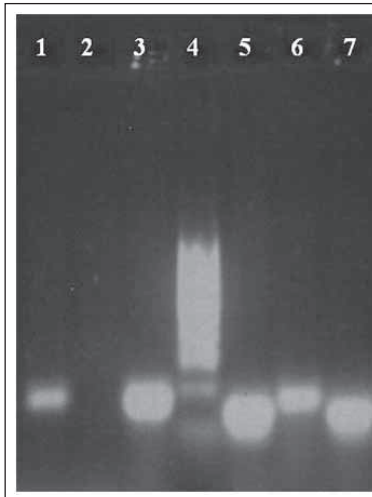


Abbildung 4: RT-PCR für Protamin-1 aus Kryo-TESE von drei Patienten (Patient 1: Spur 1 und 2; Patient 2: Spur 3 und 5; Patient 3: Spur 6 und 7). Als Positivkontrolle für die Qualität der mRNA der Kryo-TESE diente GAPDH (Spur 1, 3 und 6), die in allen drei Patienten ein Amplifikationsprodukt aufweist. Während bei Patient 1 kein Protamin-1 nachgewiesen werden konnte (Spur 2), zeigten Patient 2 und 3 deutliche Amplifikationsprodukte für Protamin-1 (Spur 5 und 7). Spur 4 enthält einen 100 Bp DNA-Marker.

werden an Paraffinschnitten durchgeführt, deren Herstellung einen enormen Zeit- und damit Kostenaufwand erfordert. Eine Alternative für die klinische Routinediagnostik bietet der Nachweis von Protaminen in der Kryo-Hodenbiopsie durch RT-PCR (Abb. 4).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der RT-PCR-Nachweis der Expression von Protaminen in Kryo-Hodenbiopsieproben einen sicheren Prognosefaktor für den Erfolg einer TESE darstellt, der künftig auch in die Routinediagnostik mit einbezogen werden sollte. Die Methode ist

- spezifisch, da Protamine ausschließlich in postmeiotischen Keimzellen exprimiert werden [32–36],
- sensitiv, da bereits die Anwesenheit weniger Spermatozoen/Spermatozoen für einen positiven Nachweis ausreicht [35, 36],
- effizient, da mehrere Proben parallel getestet, Zeit- und Kostenaufwand somit relativ gering gehalten werden können, und
- repräsentativer als die histologische Evaluation eines Paraffinschnittes, da ein größeres Areal untersucht wird. Zudem wurde bereits darauf hingewiesen, daß Spermatozoen/Spermatozoen mit normaler Morphologie durchaus eine gestörte Chromatinkondensation aufweisen können, die bei der histologischen Beurteilung nicht erkannt wird (Abb. 3).

Protamin als möglicher Prognosefaktor für den Erfolg einer ICSI?

Speziell für den Erfolg einer ICSI, bei der die natürlichen Selektionsmechanismen der Spermienauswahl umgangen werden, könnte die Integrität des Spermienchromatins eine zentrale Rolle spielen. So ist das Massenverhältnis von Protamin zu DNA zwischen verschiedenen Spezies nahezu konstant [41]. Das Verhältnis von Protamin-1 zu Protamin-2 ist zwischen verschiedenen Spezies zwar variabel, innerhalb einer Art aber ebenfalls konstant [42]. Ein Ungleichgewicht des Spezies-spezifischen Verhältnisses von Protamin-1 zu Protamin-2 führt zu Infertilität. So sind sowohl transgene Mäuse, bei denen Protamin-1 zu früh exprimiert wird [43], als auch Knockout-Mäuse, bei denen entweder Protamin-1 oder Protamin-2 nicht exprimiert wird [44], steril.

Hammadah et al. [45] berichteten, daß die Chromatinkondensation nicht als Prognosefaktor für den Erfolg

einer ICSI geeignet ist. Die in dieser Studie verwendete Anilinblau-Färbung gibt jedoch keine Auskunft über das Verhältnis von Protamin-1 zu Protamin-2. Balhorn et al. [46] und Belokopytova et al. [47] zeigten, daß dieses Verhältnis in ejakulierten Spermien von infertilen Männern deutlich verändert ist. De Yebra et al. [48] berichteten sogar von einer kompletten Abwesenheit von Protamin-2. Auch Carrell und Liu [49] konnten bei 13 von 75 Patienten, die sich einer *In-vitro*-Fertilisation (IVF) unterzogen, kein Protamin-2 nachweisen. Während sich die Spermienkonzentration zwischen diesen Patienten und 50 freiwilligen Spendern nicht signifikant unterschied, waren die Spermienmorphologie, die progressive Spermienmotilität und die Spermienpenetrationsraten der Protamin-2-defizienten Patienten signifikant erniedrigt. Im Falle einer Fertilisierung lagen die Implantations-, Schwangerschafts- und Geburtenraten jedoch im Normbereich. Kürzlich unterstrichen Mengual et al. [50], Razavi et al. [51] und Nasr-Esfahani et al. [52] den prognostischen Wert des Protamin-1- zu Protamin-2-Verhältnisses für den Erfolg einer ICSI.

Die Ergebnisse, die bei ejakulierten Spermien auf Proteinebene gewonnen wurden, konnten auf mRNA-Ebene an runden Spermatozoen in Hodenbiopsien bestätigt werden [53]. So zeigten Spermatozoen aus Hoden, in denen das Verhältnis der für Protamin-1- zu Protamin-2-mRNA-positiven runden Spermatozoen verändert war, ein signifikant vermindertes Fertilisierungspotential gegenüber Eizellen. Spermatozoen aus Hoden, in denen weniger als 30 % der runden Spermatozoen Transkripte für Protamin-1 bzw. Protamin-2 enthielten, führten in keinem der untersuchten Fälle zu einer Schwangerschaft. Real-time quantitative (RT-) PCR zeigte bei infertilen Männern eine verminderte Genexpression für Protamin-1 [54]. Das Protamin-1- zu Protamin-2-Verhältnis könnte somit als möglicher Prognosefaktor für den Erfolg einer ICSI dienen. Für eine statistisch gesicherte Aussage sind jedoch noch weitere Untersuchungen an einer größeren Patientenzahl nötig.

Literatur:

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an ovocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–8.
2. Silber S, van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995; 10: 148–52.
3. Schroeder-Printzen I, Köhn FM, Ludwig M, Weidner W. Mikroschirurgische epididymale Spermatozoenextraktion (MESA) und testikuläre Spermatozoenextraktion (TESE) – Eine Übersicht. *Aktuel Urol* 1997; 28: 251–9.
4. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14: 131–5.
5. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod* 2000; 15: 653–6.
6. Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goosens A, Silber S, van Steirteghem AC, Devroey P. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 127–32.
7. Amer M, Haggag SE, Moustafa T, El-Naser A, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact to testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optional time for repetition. *Hum Reprod* 1999; 14: 3030–4.
8. Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for non obstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol* 1999; 161: 112–6.

9. Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 2001; 24: 306–10.
10. Friedler S, Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Bern O, Ron-El R. Outcome of first and repeated testicular sperm extraction and ICSI in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 2356–61.
11. Bergmann M, Kliesch S. Hodenbiopsie. In: Krause W, Weidner W (Hrg). *Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998; 6–71.
12. Holstein AF, Schirren C. Histological evaluation of testicular biopsies. In: Schirren C, Holstein AF (Hrg). *Fortschritte der Andrologie*. Bd 8. Grosse, Berlin, 1983; 108–17.
13. Plas E, Riedl CR, Engelhardt PF, Muhlbauer H, Pfluger H. Unilateral or bilateral testicular biopsy in the era of intracytoplasmic sperm injection. *J Urol* 1999; 162: 2010–3.
14. Schlegel PN, Li PS. Microdissection TESE: testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. In: *Proc 94th Ann Meet AUA*, 1999; V-16.
15. Colpi GM, Piediferro G, Nerva F, Scropo FI. TESE microchirurgica nelle azoospermie non ostruttive. In: *Proc XVIII. Cong Soc Ital Androl Giorn Ital Androl* 2001; 8: 133.
16. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Hara I, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for non obstructive azoospermia. *J Urol* 2002; 168: 1063–7.
17. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, Tohda A, Miura H, Nishimura K, Koga M, Takeyama M, Fujioka H, Okuyama A. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* 2002; 17: 2924–9.
18. Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 133–6.
19. Martin-du-Pan RC, Bischof P. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod* 1995; 10: 1940–50.
20. Yaman O, Ozdiler E, Seckiner I, Gogus O. Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males. *Int Urol Nephrol* 1999; 31: 519–23.
21. Hauser R, Botchan A, Yogev L, Gamzu R, Ben Yosef D, Lessing JB, Amit A, Yavetz H. Probability of sperm detection in nonobstructive azoospermic men undergoing testicular sperm extraction procedures unrelated to clinical parameters. *Arch Androl* 2002; 48: 301–5.
22. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2496–501.
23. Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, van Steirteghem A, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 971–6.
24. Grimaldi P, Scarponi C, Rossi P, March MR, Fabbri A, Isidori A, Spera G, Krausz C, Geremia R. Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1116–21.
25. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PTK, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3848–53.
26. Ferlin A, Moro E, Onisto M, Toscano E, Bettella A, Foresta C. Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies. *Hum Reprod* 1999; 14: 2286–92.
27. Krausz C, Rajpert-De Meyts S, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2638–42.
28. Ludwig M, Gromoll J, Hehr U, Wieacker P. Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin: Empfehlung zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2004; 1: 190–3.
29. Tanphaichitr N, Sohbon P, Taluppeth N, Chalermisrachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978; 117: 347–50.
30. Clermont, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112: 35–51.
31. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002; 360: 772–7.
32. Patrizio P, Ricci SM, Tomaszewski JE, Hecht NB. Identification of meiotic and postmeiotic gene expression in testicular tissue of patients histologically classified as Sertoli cell only. *Fertil Steril* 2002; 74: 785–90.
33. Song GJ, Lee H, Park Y, Lee HJ, Lee YS, Seo JT, Kang IS. Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with non-obstructive azoospermia: usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. *Fertil Steril* 2000; 73: 1104–8.
34. Friel A, Houghton JA, Glennon M, Lavery R, Smith T, Nolan A, Maher M. A preliminary report on the implication of RT-PCR detection of DAZ, RBMY1, USP9Y and protamine-2 mRNA in testicular biopsy samples from azoospermic men. *Int J Androl* 2002; 25: 59–64.
35. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 219–25.
36. Bauer M, Patzelt D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *Int J Legal Med* 2003; 117: 175–9.
37. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6: 979–82.
38. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330–7.
39. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 139–44.
40. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 1999; 31: 361–6.
41. Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996; 23: 263–71.
42. Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. Protamine 1:Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 519–27.
43. Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12451–5.
44. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001; 28: 82–6.
45. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996; 11: 2468–71.
46. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988; 44: 52–5.
47. Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorobév VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 53–7.
48. De Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 1993; 268: 10553–7.
49. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22: 604–10.
50. Mengual L, Balleca JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 2003; 24: 438–47.
51. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 2003; 35: 238–43.
52. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia* 2004; 36: 95–100.
53. Steger K, Failing K, Klonisch T, Behre HM, Manning M, Weidner W, Hertle L, Bergmann M, Kliesch S. Round spermatids from infertile men exhibit decreased levels of protamine-1 and 2 mRNA. *Hum Reprod* 2001; 16: 709–16.
54. Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M. Decreased protamine-1 transcript levels in infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 331–6.

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](#)