

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

WINKLE T, GAGSTEIGER F, DITZEL N
*Reduktion von apoptotischen Spermien im Ejakulat mittels
MACS-System*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2007; 17 (1) (Ausgabe
für Österreich), 19-21*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate,
Kräuter und auch Ihr Gemüse
ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller
Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz
ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



Reduktion von apoptotischen Spermien im Ejakulat mittels MACS-System

Th. Winkle, F. Gagsteiger, N. Ditzel

Im Verlauf einer ART und insbesondere einer ICSI werden die eingesetzten Spermatozoen sorgfältig untersucht und ausgewählt. Bisher bezieht sich die Auswahl der Spermien nur auf WHO-Kriterien wie Konzentration, Morphologie und Motilität, wobei eine Fragmentierung oder sonstige Schädigungen der DNA nicht detektiert werden. Ziel unserer Studie war es daher, den Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung und Apoptose im Ejakulat mit Hilfe des MACS-Systems (Magnetic Activated Cell Sorting) zu ermitteln und gegebenenfalls zu reduzieren. Bisher wurden Ejakulatproben von 55 Patienten mittels MACS-System aufgereinigt und anschließend sowohl der native wie auch der aufgereinigte Teil der Probe in einem Durchflußzytometer gemessen, nachdem sie mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt worden waren. Die Isolierung durch das MACS-System erfolgte mit Hilfe von magnetisch markiertem Annexin V und einer entsprechenden Säule. Pro Probe wurden 20.000 Zellen gemessen und der Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA ermittelt. Im Vergleich dazu wurden Proben von 37 Patienten einmal nativ und einmal nach Dichtegradientenzentrifugation analysiert. Der durchschnittliche Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung betrug im nativen Ejakulat 17,6 %, wohingegen nach Aufreinigung mittels des MACS-Systems dieser Anteil auf 11,29 % reduziert werden konnte. Bei einer Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde ein Anteil von 11,83 % ermittelt. Anhand unserer Ergebnisse konnte festgestellt werden, daß mit Hilfe des MACS-Systems der Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung deutlich gesenkt werden kann (17,6 % vs. 11,29 %). Außerdem zeigt der vergleichsweise hohe Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung in den über Dichtegradienten aufgereinigten Proben, daß die DNA-Fragmentierung mit dieser bisher üblichen Methode nicht zu reduzieren ist (15,96 % vs. 11,83 %).

*In the course of an ART and especially an ICSI the used spermatozoa is meticulously examined. So far the samples were only evaluated as to WHO criteria, like concentration, motility and morphology during such an examination. In this way a fragmentation or any other deterioration of the DNA cannot be detected. So the aim of our study is to determine and, if required, reduce the amount of spermatozoa with DNA-fragmentation or apoptosis within the ejaculate by means of the MACS system (Magnetic Activated Cell Sorting). Ejaculate samples of 55 patients were purified using the MACS system so far. The native and the purified part of the sample were then measured in a cytometer, after being stained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The isolation via the MACS system was carried out with the help of magnetic marked Annexin V and an appropriate column. In each sample 20,000 cells were measured and the percentage of cells with DNA-fragmentation was determined. In comparison, samples of 40 additional patients were analyzed as described above, both natively and according to density gradient centrifugation. The average amount of spermatozoa with DNA fragmentation was 17.6 % in native ejaculate, while, after purification with the MACS system, this percentage was reduced to 11.29 %. By purification via density gradient centrifugation a percentage of 11.83 % was obtained. On the basis of our results it has been found that by means of the MACS system the percentage of spermatozoa with DNA fragmentation can be reduced distinctly (17.6 % vs. 11.29 %). Furthermore, the relatively high amount of spermatozoa with DNA fragmentation in the samples purified by density gradient shows that DNA fragmentation cannot be reduced by this common method (15.96 % vs. 11.83 %). **J Fertil Reprod 2007; 17 (1): 19–21.***

Männliche Infertilität ist zu ca. 70 % primär und zu 30 % sekundär [1]. Die Ursachen sind vielseitig: Es kommen exogene Ursachen (Medikamente, Bestrahlung, Umweltgifte, Drogenmißbrauch, Rauchen), entzündliche und immunologische Ursachen (Prostatitis, Hoden- und Nebenhodenentzündungen, Autoantikörper), anatomische Ursachen (z. B. Leistenhoden mehr als 2 Jahre), psychische Ursachen und genetische Ursachen in Betracht [2, 3]. Ungefähr 90 % der infertilen Männer weisen eine beeinträchtigte Samenqualität, wie eine reduzierte Spermienanzahl (Azoo-, Oligospermie), eingeschränkte Beweglichkeit (Asthenozoospermie) und abnorme Morphologien (Teratozoospermie), auf. Sie sind oftmals anderweitig klinisch unauffällig und weisen nur eine Störung der Spermatogenese auf [3, 4]. Die Aufgabe eines Spermiums besteht darin, die DNA physikalisch und chemisch sicher verpackt in die Eizelle zu transportieren [5, 6]. Dafür benötigt es eine gute Vitalität und Vorwärtsmotilität [7]. Wenn die Spermien jedoch direkt in die Oozyte injiziert werden, könnten abnorme Spermien oder Spermien mit einer defekten DNA direkt zur Oozyte gelangen. Somit steigt natürlich das Risiko, ein DNA-geschädigtes Spermium in die Eizelle zu injizieren, vor allem bei Spermien mit schlechten Spermioqrammparametern [8–11]. Die gesteigerte Sensitivität für DNA-Schäden von Spermien mit schlechten Spermioqrammparametern hängt mit einer fehlerhaften Chromatinkondensation zusammen [9, 12, 13]. Eine Hypothese besagt, daß Spermien mit instabiler oder abnormer Chromatinstruktur keine oder nur eine geringe Befruchtungsfähigkeit aufweisen

[6]. Das beinhaltet auch die Frage, ob es im Falle einer Befruchtung durch chromatininstabile Spermien zu embryonalen Entwicklungsstörungen bis hin zum frühembryonalen Fruchttod kommen kann. Aus diesem Grund war es notwendig, neue und genauere Methoden zur Charakterisierung von Spermienproben zu entwickeln, denn Spermien mit einer intakten DNA sind essentiell für eine akkurate Transmission von genetischem Material an die nächste Generation [14]. Eines der ersten Zeichen für Apoptose ist die Fragmentierung der DNA. Diese kann verschiedene Ursachen haben, wie z. B. Streß, was zu einer erhöhten Anzahl von freien Sauerstoffradikalen (ROS) führt und somit auch zu einer erhöhten Rate an Spermien mit fragmentierter DNA. Daher war es das Ziel dieser Studie, zu untersuchen, ob sich der Anteil an DNA-fragmentierten Spermien im Ejakulat mit Hilfe des MACS-Systems ebenso reduzieren läßt wie mit den herkömmlichen Spermienpräparationstechniken.

Patienten und Methoden

Für diese Studie wurden Patienten aus der Kinderwunschprechstunde des IVF-Zentrums Ulm herangezogen. Insgesamt wurden Ejakulatproben von 55 Patienten mit Hilfe des MACS-Systems aufgereinigt und der Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung bestimmt. Die Ejakulatproben wurden vor der Behandlung mit dem MACS-System aufgereinigt, um das Seminalplasma und etwaige Verunreinigungen von den Spermien abzutrennen. Das MACS-System beruht auf der Tatsache, daß bei apoptotischen Zellen Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zellmembran externalisiert wird. PS entwickelt in Gegenwart von physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen eine hohe Affinität zu Annexin V. Diese Tatsache nutzt das MACS-System, indem

Aus dem Institut ReproGen-Ulm und IVF-Zentrum Ulm

Korrespondenzadresse: Thomas Winkle, ReproGen-Ulm, D-89077 Ulm, Einsteinstraße 59, E-Mail: winkle@ivf-zentrum.de

durch magnetisch markierte Annexin V-„Micro Beads“, die mit den Spermien inkubiert werden, die apoptotischen Zellen markiert werden (Annexin-V-positive Fraktion). Über eine magnetische Säule kann nun die Annexin-V-positive Fraktion von der negativen isoliert werden, wobei die positive Fraktion auf der Säule verbleibt. Nach der Isolation kann auch diese wieder eluiert werden, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit Puffer nachgewaschen wird. Die Rate an Spermien mit DNA-Fragmentierung wurde durch eine FACS- (Fluorescence Activated Cell Sorter) Analyse ermittelt. Dazu wurden die Spermien mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und mittels eines Durchflußzytometers und der dazugehörigen Software die Rate an Spermien mit DNA-Fragmentierung ermittelt. Es wurden von jedem Patienten 4 Proben analysiert: die Annexin-V-negative Fraktion, die Annexin-V-positive Fraktion, die native Ejakulatprobe und eine Probe nach Aufarbeitung durch Dichtegradientenzentrifugation (80%/40%).

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Studie wurde die Rate an Spermien mit DNA-Fragmentierung in nativen Ejakulatproben zum einen mit jener nach Aufarbeitung durch das MACS-System verglichen und zum anderen mit jener nach Aufarbeitung durch Dichtegradientenzentrifugation. In der Gruppe nativ vs. Dichtegradientenzentrifugation, die in Abbildung 1 dargestellt ist, konnten von ursprünglich 55 Patientenproben lediglich 37 Proben ausgewertet werden, da die Ejakulatmenge nicht ausreichend war, um sowohl die Probe nach Dichtegradientenzentrifugation als auch die nach MACS zu analysieren. Bei diesen 37 Ejakulatproben ergab sich im Mittel eine Rate an Spermien mit DNA-Fragmentierung in der Nativprobe von 15,96% und von 11,83% nach Aufarbeitung durch Dichtegradientenzentrifugation. Somit ließ sich nach statistischer Berechnung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fraktionen mit $p < 0,05$ feststellen. Der Vergleich nativ vs. MACS-System ist in Abbildung 2 dargestellt, er wurde bei 55 Patienten durchgeführt. In diesem Patientenkollektiv konnte ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ ermittelt werden. Im nativen Ejakulat wurde ein durchschnittlicher Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung von 17,6% gemessen, welcher durch das MACS-System auf 11,29% reduziert werden konnte.

Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, den Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung im menschlichen Ejakulat zu be-

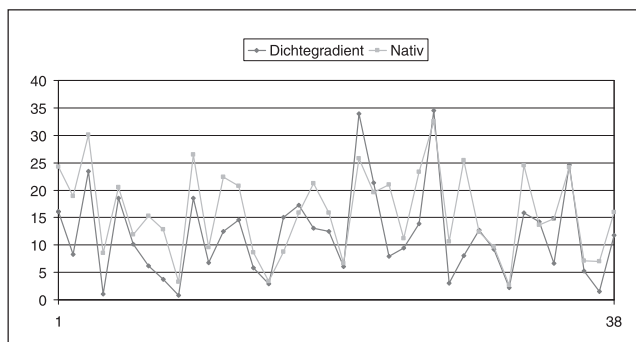


Abbildung 1: Vergleich des Anteils an Spermien mit DNA-Fragmentierung nativ (nativ) und nach Aufarbeitung durch Dichtegradientenzentrifugation (Dichtegradient). Der letzte Wert ist jeweils der Durchschnitt des gesamten Kollektives.

stimmen und zwei verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten im Hinblick darauf zu untersuchen, ob sie diesen Anteil reduzieren können. Ermittelt wurde der Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung durch DAPI-Färbung und FACS-Analyse. Die beiden Aufarbeitungsmethoden waren zum einen die mittlerweile zur Spermienaufbereitung routinemäßig eingesetzte Dichtegradientenzentrifugation und zum anderen das MACS-System, das apoptotische Zellen durch Bindung von magnetisch markiertem Annexin V an PS isoliert. Dabei wurde festgestellt, daß die herkömmliche Dichtegradientenzentrifugation den Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung im Schnitt um 25,88% reduzieren kann, wohingegen nach einer Aufarbeitung durch das MACS-System der Anteil um 35,85% geringer war. Wie in dieser Arbeit präsentiert, wurde auch in anderen Studien gezeigt, daß das MACS-System apoptotische Spermien erfolgreich isolieren kann [15–18]. Somit stellt das MACS-System einen Zusatz zu herkömmlichen Spermienpräparationstechniken dar, die zwar visuelle Merkmale der Spermien nach den WHO-Kriterien wie die Spermienmotilität, Spermienkonzentration und Spermienmorphologie beurteilen lassen, allerdings eine Analyse der DNA-Integrität nicht ermöglichen. Wie bereits bekannt, können durch das MACS-System die Spermigrammparameter verbessert werden, was auf die bereits bekannte Korrelation zur Integrität der Plasmamembran zurückzuführen ist [19].

Literatur:

1. Seshagiri PB. Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 2001; 4: 429–35.
2. Dohle GR, Hally DJ, Van Hemel JO, Van den Ouwel AM, Pieters NH, Weber RF, Govaerts LC. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 1: 13–6.
3. Foresta C, Bettella A, Moro E, Roverato A, Merico M, Ferlin A. Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermia factors on the y chromosome long arm. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 6: 2414–9.
4. Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 183–98.
5. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 4: 569–74.
6. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi FG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31–7.
7. Ohsumi K, Katagiri C, Yanagimachi R. Human sperm nuclei can transform into condensed chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Gamete Res* 1988; 1: 1–9.
8. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 3: 703–8.
9. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 7: 1864–71.

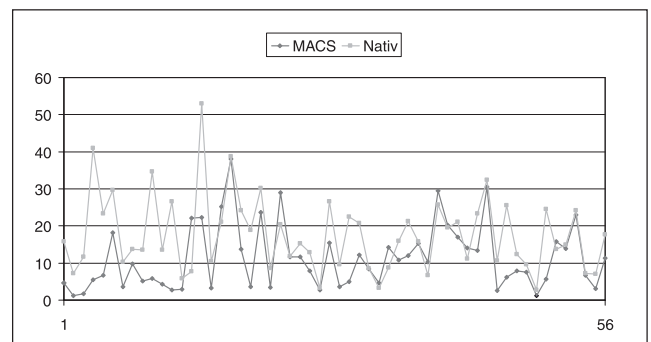


Abbildung 2: Vergleich des Anteils an Spermien mit DNA-Fragmentierung nativ (nativ) und nach Aufarbeitung durch das MACS-System (Annexin-V-negativ). Der letzte Wert ist jeweils der Durchschnitt des gesamten Kollektives.

10. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damage spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 9: 2279–85.
11. Irvine S, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken J. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33–43.
12. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protmaination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 5: 1083–8.
13. Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998; 1: 33–9.
14. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 7: 1552–61.
15. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after kryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001; 2: 127–33.
16. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glander HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004; 81 (Suppl 1): 802–9.
17. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1828–37.
18. Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander HJ. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl* 2005; 7: 61–.
19. Glander HJ, Schaller J. Binding of Annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 109–15.

Dipl. Biol. Thomas Winkle

Geboren 1978 in Illertissen (D), Studium der Diplom-Biologie an der Universität Ulm von 1999 bis 2006. Seitdem Doktorand am Institut für Reproduktionsmedizin und -genetik (Repro-Gen-Ulm).



Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

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](#)