

Dansk resume' af Erik Høsts afhandling

”Perspectives of DNA strand breaks in human ART”

Mandlig infertilitet udgør ca. 50 % af alle henvisningsårsager til fertilitetsbehandling. Ifølge WHO er en sædprøve normal, når der i råsæden er mere end 20 millioner sædceller pr. milliliter og god bevægelighed. Generelt ser det ud til, at sædkvaliteten er dalende. Årsagen til dette er ukendt, men visse faktorer i miljøet kan spille en rolle. Alder og livsstilsfaktorer som rygning og overvægt, lægemidler og sygdomme som diabetes, varicocele og cancer kan også være årsag til mange ufrivilligt barnløse mænd. Siden det første barn efter reagensglasbefrugtning blev født i 1978, er der ikke udviklet nye og betydningsfulde sædparametre til en bedre forståelse og tolkning af sædkvaliteten. Morfologisk beskrivelse af sædceller har været forsøgt af mange, dog uden overbevisende effekt. I 1997 begyndte vi på Fertilitetsklinikken Ciconia at interessere os for DNA-skader i sædceller, specielt skader, der er forårsaget af apoptose.

Der er to måder, hvorpå en sædcelle kan gå til grunde: nekrose eller apoptose. Nekrose er en almindelig form for uprogrammeret celledød, der ofte opstår som følge af toksisk skade, iltmangel eller stress. Nekrose medfører opsvulmning af cellen, ændring af cellemembranen, opsvulmning af mitokondrierne og evt. frigivelse af celled materiale til omgivelserne.

Apoptose er programmeret celledød og opstår fx, når der er sket for mange mutationer i cellen, således at den ikke længe kan fungere normalt, fx ved cancer. Apoptose er en følge af et internt, genetisk kontrolleret selvdestruktionsprogram og fungerer samtidig som en vedligeholdelsesmekanisme, hvor udslidte eller unødvendige dele udskiftes med nye. Apoptose kan udløses via et oxidativt stress, som fremkalder dannelse af stoffer /reactive oxygen species (ROS)) og frie radikaler, som i

sig selv er skadelige. En anden måde, hvorpå apoptose kan finde sted, er ved aktivering af enzymgruppen caspaser (især caspase-3) via cytokrom-c, som findes i mitokondrier. TNF (tumor necrosis factor), som primært produceres af aktiverede makrofager, er det vigtigste ekstrinsiske mellemlid i den apoptotiske proces. Bindningen af TNF til receptor R1 medfører, at der åbnes op til cellen, og caspaseaktivering kan finde sted.

Der findes adskillige kommercielt tilgængelige metoder til påvisning af DNA-skader i sædceller. De hyppigst anvendte er TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) og SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). TUNEL er en metode til påvisning af brud på DNA-kæden af en bestemt længde (180 basepar) som et resultat af apoptose. Analysen er afhængig af brud i DNA-kæden, der kan identificeres ved terminal deoxynucleotidyltransferase, som koblet med et nukleotid til de frie 3-OH-ender på DNA'et kan analyseres i et lysfeltmikroskop, flourescencemikroskop eller i et flowcytometer. Princippet i SCSA-metoden er baseret på en denaturation af DNA'et via et lavt pH efterfulgt af farvning med acridine orange. Sædceller analyseres ved denne metode i et flowcytometer. Vi valgte TUNEL-metoden, da den var veldokumenteret og en forbedret metode, der er anvendt af mange andre. Desuden kunne den let implementeres på Ciconia med anvendelse af det basisudstyr, der typisk er til stede i fertilitetsklinikker, som for eksempel lysfeltmikroskop, stinkskab osv.

Følgende grupper af mænd, der var involveret i fertilitetsbehandlingen, blev inkluderet: a) sæddonorer, b) mænd, hvis partner havde aflukkede æggeledere, c) uforklarligt barnløse, d) mænd med oligozoospermi (dvs. <20 millioner sædceller i råsæden pr. milliliter). De blev behandlet med IVF. Endvidere blev e) mænd med oligozoospermi inkluderet og behandlet med ICSI. Endelig undersøgte f) en gruppe mænd fra Madagaskar med Schistosoma haematobium (Bilharzia ikke).

Ud over måling af sædceller for DNA-skader vurderede vi også deres morfologi efter strikte kriterier, Krüger, WHO og TZI (Teratozoospermia-indeks). Mænd fra gruppe b) og c) havde normale sædparametre, volumen, antal og bevægelighed (WHO). Alligevel præsenterede de signifikant flere sædceller med DNA-brud end sæddonorerne. Denne forskel var specielt iøjnefaldende for gruppe b), da deres barnløshed jo formodes at være forårsaget af den kvindelige partner. Dette tyder på, at der i gruppen med tubafaktorer også kan forekomme mandlige faktorer.

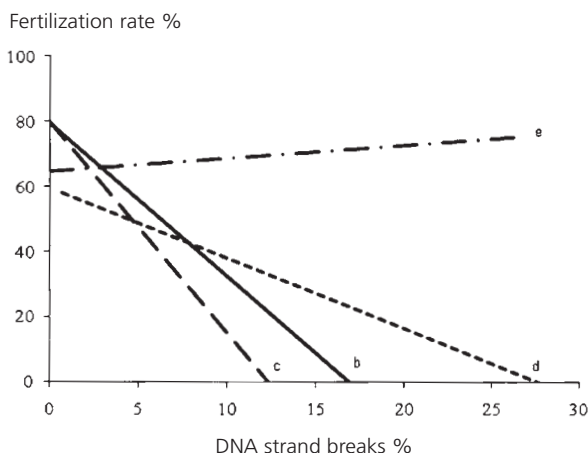
Fotos: Jens Berg



**Af bioanalytiker // Msc, dr. med.
Erik Høst
Klinisk Biokemisk Afdeling
Bornholms Hospital**

FIGUR 6 FRA AFHANDLINGEN

Erik Høst har som den første i verden påvist, at hvis man fertiliserer spontant (IVF) (b,c,d), er der en negativ korrelation mellem fertilitetsraten og antallet af sædceller med DNA skader. Men, hvis man mekanisk indfører en sædcelle i ægget (ICSI) (e) er der ingen sammenhæng mellem fertilitetsraten og DNA skader.



Hvis det ikke er muligt at påvise årsager til barnløshed, blev parret kategoriseret som uforklarligt barnløst. I gruppen af uforklarligt barnløse må man derfor antage, at en anelig del af barnløsheden skyldes en mandlig faktor, som imidlertid ikke kan påvises med de gængse metoder. Disse barnløse par behandles enten med insemination (IUIH) eller IVF.

Gruppen af mænd med oligozoospermi viste ikke kun flere sædceller med DNA-skader end sæddonorerne, men også flere DNA-skader end mændene fra grupperne b) tubafaktor og c) uforklarligt barnløse. For grupperne b) tubafaktor, c) uforklarligt infertilitet og d) oligozoospermi har vi kunnet vise, at hvis mere end 4 % af sædcellerne har DNA-skader, vil det påvirke fertilitetsraten negativt. Udførte vi ICSI-behandling ved oligozoospermi, var hverken fertilitetsraten eller graviditetschancen påvirket negativt. Denne interessante observation gjorde vi i 2000, og den er senere blevet bekræftet af andre.

I gruppen med uforklarligt barnløse, hvor der blev foretaget IVF (gruppe c), fandt vi også, at der var færre sædceller med DNA-skader hos par, der blev gravide, end hos par, der ikke blev gravide.

Vi fandt ingen korrelation mellem morfologisk klassifikation (Krüger, WHO og TZI) og fertilitetsraten, deling og graviditet, selv om IVF-gruppen (d) præsenterede en bedre morfologisk score end ICSI-gruppen (e). Samme resultater gælder for mænd med en partner, der har lukkede æggeledere (b), og de uforklarligt barnløse par (c). I vores undersøgelser havde morfologisk vurdering af sædceller ingen indvirkning på resultatet efter hverken IVF eller ICSI.

Næsten 20 % af de mænd i vores undersøgelse, der ellers havde normale sædparametre, havde mere end 4 % sædceller med DNA-skader. Samme forhold har andre vist med SCSA-metoden, dog med et DNA-fragmentationsindeks (DFI) på mere end 30 %. Mange af disse barnløse par kunne formentlig have undgået et langt behandlingsforløb med 3-6 inseminationsbehandlinger efterfulgt af IVF. I stedet kunne de have fået ICSI-behandling fra starten. Dette kunne reducere de økonomiske, sociale, psykologiske og følelsesmæssige problemer, der ofte er forbundet med infertilitetsbehandling. Alder og livsstilsfaktorer som rygning og overvægt er faktorer, der påvirker sædcellens DNA negativt. Hertil kommer en række sygdomme, som også kan have negativ effekt på sædcellernes DNA; diabetes, varicocele, cancer samt sygdomsbehandling i sig selv, her-

under kemoterapi. Derfor er det vigtigt i en fertilitetsudredningsfase **også** at have fokus på manden mht. livsstilsfaktorer og anamnese.

Som følge af både vores og andres fund vedrørende DNA-skader i sædceller bør de kliniske retningslinjer for sædundersøgelse og -vurdering ud over antallet og bevægeligheden inkludere en vurdering af DNA-skader i sædcellerne for at optimere behandlingen for det ufrivilligt barnløse par.

Desuden vil vi opfordre til nedsættelse af en arbejdsgruppe, som skal vurdere, hvilke farvemethoder der skal være "guldstandard" for måling af DNA-skader i sædceller. De hyppigst anvendte metoder er TUNEL og SCSA. En lettere og billigere test, som er nemmere at integrere i laboratoriet, bør kunne udvikles.

For tiden gennemføres ICSI i ca. 40-50 % af IVF-behandlingerne. Da vores resultater vedrørende DNA-skader i sædceller indebærer, at der burde udføres endnu flere ICSI-behandlinger, foreslår vi, at der fokuseres på followupstudier eller etableres databaser med børn, der er født efter fertilisering med sædprøver, i hvilke der var et højt antal af sædceller med DNA-skader.

Der bør fokuseres på metoder til separation af sædceller med DNA-skader fra sædceller med intakt DNA for kun at anvende sædceller, der er fri for DNA-skader i fertilitetsbehandling. ▣

Den 10. juni 2011 erhvervede Erik Høst doktorgraden for sin forskning i mænds sædkvalitet.

DU KAN REKVIERERE Erik Høsts afhandling for 200 kroner ved at sende en mail til erikhoest@gmail.com eller til fakultetssekretariatet, henielsen@sund.ku.dk.

ERIK HØST HOLDER FOREDRAG om sine forskningsresultater på NML-kongressen den 13. til den 15. september 2011.

