

Lovande metod för utredning och behandling av infertilitet

Spermiekromatinanalys – bra markör för manlig infertilitet



ALEKSANDER GIWERCMAN, docent, verksamhetschef
 aleksander.giwercman@med.lu.se

LEIF BUNGUM, överläkare, sek-

tionschef
 MONA BUNGUM, med dr, laboratoriechef; samtliga Reproduktionsmedicinskt centrum, Skånes universitetssjukhus, Malmö

Ofrivillig barnlöshet, infertilitet, definieras oftast som ett pors oförmåga att åstadkomma en graviditet efter tolv månader av oskyddat samlag. Det brukar anges att ca 15 procent av alla par i västvärlden någon gång under sitt reproduktiva liv drabbas av infertilitet, som därmed kan betraktas som en folksjukdom.

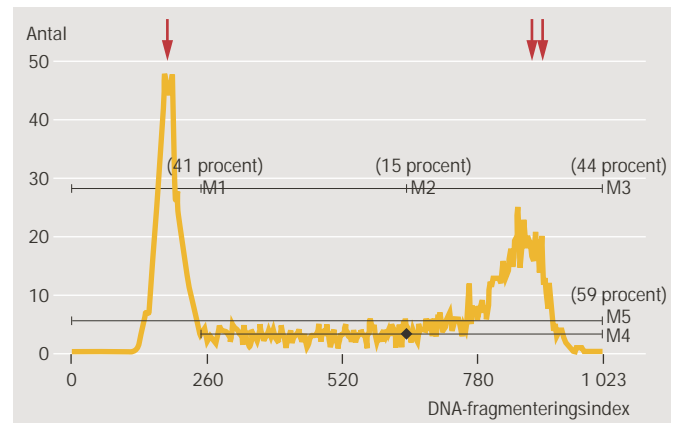
Infertilitet och behandlingsmetoder

För assisterad befruktning har man i dag flera olika behandlingsalternativ: intrauterin insemination (IUI), in vitro-fertilisering (IVF) och mikroinjektionsbehandling (ICSI). Introduktionen av dessa metoder har medfört betydligt bättre möjligheter för infertila par att få barn. Behandlingen kan dock betraktas som symtomatisk, och endast ca 30 procent av alla IVF- eller ICSI-behandlingar resulterar i en födsel.

På grund av brist på pålitliga markörer för fekunditet hos det individuella paret har det varit svårt att ange en individuell prognos för par som kommer till assisterad befruktning eller att bestämma om försök till spontan graviditet bör fortsätta [1]. Det saknas också metoder som med en rimligt god specificitet och sensitivitet kan vara till hjälp vid val av assisterad befruktning. Därför representerar nya markörer som leder till en relevant diagnos och behandling av infertilitet en medicinsk utmaning och har dessutom samhällsekonomiska implikationer.

I södra sjukvårdsregionen, med ett befolkningsunderlag på knappt 2 miljoner invånare, utförs årligen 1 100 offentligt finansierade och ett motsvarande antal privatfinansierade IVF-/ICSI-behandlingar. Det innebär en årlig kostnad på ca 50 miljoner kronor för den offentliga sjukvården. Därtill kommer ett okänt belopp för subventionering av hormonell ovulationsstimulering som inte är kopplad till IVF-/ICSI-behandlingarna.

Förutom att behandling med assisterad befruktning representerar en allvarlig psykologisk påfrestning exponeras dessutom kvinnorna i de aktuella paren för kraftiga hormonbehandlingar, som kan ge oönskade biverkningar. Därför bör man försöka öka antalet positiva utfall i samband med assiste-



Figur 1. Exempel på analys av ett spermprov med högt DNA-fragmenteringsindex (DFI). Den normala cellpopulationen (enkel pil) motsvarar 41 procent av alla spermier. 59 procent av spermerna har abnormt DNA (dubbla pilar), varför DFI är 59 procent.

rad befruktning och försäkra sig om att endast de par som inte har möjlighet att uppnå spontan graviditet remitteras till sådan behandling.

Störningar i mannens fortplantningsfunktion

Störningar i det manliga reproduktionssystemet anses vara den viktigaste orsaken eller en medverkande orsak till att minst 50 procent av alla par har infertilitetsproblem [2]. Spermakvalitet är därför en väsentlig faktor att ta hänsyn till när någon ska remitteras till assisterad befruktning och i valet av metod. Det också viktigt att komma ihåg att i 15 procent av alla infertilitetsfall finner man – med de standardmetoder som oftast används – ingen avvikelse hos vare sig den manliga eller den kvinnliga partnern. Tillståndet diagnostiseras som sk oförklarad infertilitet [3].

Även om man på senare år har lyckats förbättra standardiseringen av spermaundersökningsmetoderna bygger undersökningen fortfarande på traditionell ljusmikroskopisk bedömning av spermernas antal, rörlighet och morfologi [4]. Undersökningen är behäftad med en betydande interlaboratorievariation, vilket gör det svårt att överföra resultat från ett laboratorium till ett annat. Dessutom har dessa standardparametrar lågt prediktivt värde i relation till fertilitet både in vivo och in vitro. Det betyder att möjligheten till spontan graviditet fortfarande är relativt hög, även om en eller flera av dessa spermieparametrar ligger betydligt under WHO:s referensvärden och endast har begränsat värde vid val av metod för assisterad befruktning [5].

Man har därför sökt efter nya och ur prediktiv synvinkel mer pålitliga tekniker för bedömning av spermakvalitet. Man

■ sammanfattat

DNA-fragmenteringsindex (DFI), bestämt med spermiekromatinanalys (SCSA), kan vara en bra markör för manlig infertilitet.

Metoden kan användas för att bedöma vilka par som bör remitteras direkt till in vitro-fertilisering (IVF) eller mikroinjektionsbehandling (ICSI)

på grund av låg chans till graviditet genom intrauterin insemination. Om DFI är högt – över 30 procent – kan ICSI snarare än IVF rekommenderas.

Abnormt DFI kan helt eller delvis förklara en del av de fall som diagnostiserats som oförklarad infertilitet.

har gjort analyser av fria radikaler i sädesvätska, mätt kreatinkinaskoncentrationen i sädesvätska, utfört analyser av spermernas penetrationsförmåga i zona pellucida-fria hamsterägg etc, utan att någon av metoderna visat sig vara kliniskt användbar.

Spermiokromatinanalys (SCSA)

Det har inom reproduktionsmedicinen funnits ett ökande intresse för metoder som bygger på evaluering av spermiokromatinintegriteten. En av dem är spermiokromatinanalys (sperm chromatin structure assay, SCSA) [6].

SCSA utvecklades i början av 1980-talet av amerikanen Donald P Evenson [7] och bygger på det faktum att defekt spermie-DNA denaturerar i sur miljö (pH 1,5), vilket intakt DNA inte gör. Vid tillsättning av det fluorescerande färgämnet akridinorange färgas spermier gröna om DNA är intakt och röda om det är denaturerat. Med hjälp av en flödescytometer kan man på några få sekunder analysera 5 000–10 000 spermier och få fram ett mönster som visar fördelningen av gröna och röda spermier (Figur 1). Andelen spermier som färgats röda kallas för DNA-fragmenteringsindex (DFI), medan den gröna fraktionen anges som hög DNA-färgbarhet (high DNA stainability, HDS). Det är fortfarande oklart vilka kromatinförändringar som skett vid DFI respektive HDS, men man menar att DFI detekterar andelen spermier med brott på kromatinsträngen eller defekter i de specifika spermiokromatinproteinerna, protaminerna, medan HDS kan vara ett uttryck för andelen omogna spermier [8].

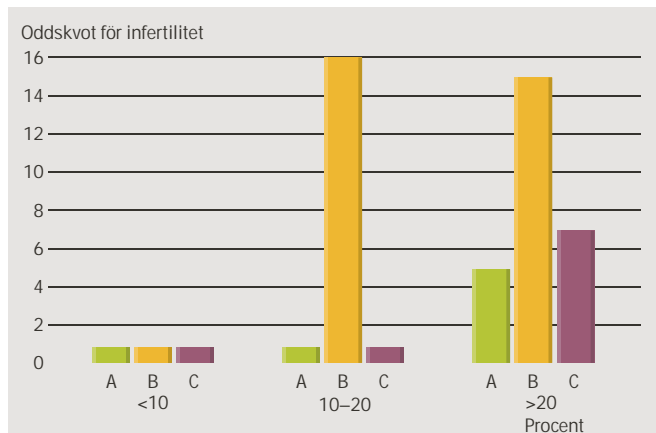
SCSA är en av flera metoder som används för att bedöma spermie-DNA-integritet. Bland andra tekniker kan man nämna tex Comet eller terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling (TUNEL). Generellt finns endast en moderat korrelation (korrelationskoefficient 0,4–0,7) mellan DFI-värdet vid SCSA och resultaten av Comet respektive TUNEL [9]. Detta indikerar att dessa mätmetoder inte påvisar helt identiska störningar i spermiokromatinintegriteten. Den förvirring som finns i litteraturen rörande spermiokromatinintegritet och fertilitet relaterar utan tvivel till att man inte tar hänsyn till denna skillnad utan betraktar resultat av olika mätmetoder som likvärdiga.

Även om den biologiska bakgrunden till lågt eller högt DFI/HDS inte är känd har de senaste årens forskning demonstrerat att i synnerhet DFI ger information som ur klinisk synvinkel är värdefull vid infertilitetsutredningar. Vi har därför i denna genomgång valt att fokusera på endast SCSA.

SCSA och chansen till spontan graviditet

Två befolkningsbaserade undersökningar, en amerikansk inkluderande 165 par [6] och en dansk inkluderande 215 par [6], har visat att DFI är en värdefull fekunditetsmarkör i normalbefolkningen. Sannolikheten för spontan graviditet var lika stor vid DFI i intervallet 0–20 procent, för att därefter minska vid stigande DFI till att bli i det närmaste obefintlig vid DFI överstigande 30–40 procent. Man bör dock ha i åtanke att även vid DFI under 20 procent resulterade endast 13 procent av alla menstruationscykler i en graviditet.

Således är SCSA i en population som inte är selekterad på grund av fertilitetsproblem ett bra verktyg för att identifiera den delen av den manliga populationen som har en näst intill obefintlig chans att göra sin partner gravid. Motsvarande information kan inte fås med standard spermieparametrar eftersom även män med mycket låga spermiekoncentrationer och dålig spermierörlighet eller -morfologi har en viss fertilitetspotential [5, 10]. Däremot kan ingen av dessa metoder an-



Figur 2. Oddsquot för infertilitet in vivo i relation till olika nivåer för DNA-fragmenteringsindex: under 10 procent, 10–20 procent, över 20 procent. A = spontan graviditet samt normal spermiekoncentration, -motilitet och -morfologi. B = spontan graviditet, en av standard spermieparametrarna avviker. C = intrauterin insemination.

vändas för att välja ut par med hög chans att uppnå graviditet.

Liknande resultat som i de befolkningsbaserade studierna noterades vid jämförelse av spontana graviditeter bland 137 fertila par och 127 infertila par utan känd orsak till barnlösheten, varken hos mannen eller hos kvinnan. Bland män med normala standard spermieparametrar var oddsquoten (OR) för infertilitet identisk (1,0) vid DFI under 10 procent respektive DFI mellan 10 och 20 procent. Vid DFI över 20 procent ökade OR för infertilitet till 5,1 (95 procentens konfidensintervall, KI, 1,2–23). 40 procent av männen från dessa »oförklarade infertila« par hade DFI över 20 procent (Figur 2) [11].

Man kunde med hjälp av DFI predicera infertilitet oberoende av standardparametrar, men om en av standard spermieparametrarna – koncentration, rörlighet eller morfologi – var abnorm var risken för infertilitet signifikant högre redan vid DFI överstigande 10 procent.

SCSA och chansen till graviditet vid assisterad befruktning

Begreppet assisterad befruktning omfattar, som nämnts, metoder som bygger på fertilisering både in vivo (IUI) och in vitro (IVF och ICSI). Vid IVF utnyttjar man spermernas egen förmåga att ta sig in i ägget och befrukta det, medan den manliga gameten injiceras i ägget vid ICSI. Dessa skillnader gör att man inte omedelbart kan använda graviditet som utfallsparameter, vilket har skett i huvudparten av de arbeten som publicerats beträffande SCSA och assisterad befruktning [12]. Vid de tillfällen där man bedömt dessa tre behandlingsformer separat har antalet inkluderade patienter varit relativt lågt och därmed minskat den statistiska styrkan [13].

Vår egen studie, som inkluderar 387 IUI-cykler, är den enda som är tillräckligt stor för att besvara frågan beträffande det prediktiva värdet av SCSA för män som ingår i par som är aktuella för IUI. I överensstämmelse med övriga studier som haft fertilitet in vivo som utfallsparameter fann vi även för IUI-patienter att möjligheten att bli gravid minskade om DFI var över 20 procent hos männen, för att närma sig obefintligt vid DFI över 30 procent (OR för att få ett barn i förhållande till DFI <30 procent 0,07; 95 procentens KI 0,01–0,48).

I samma studie inkluderades 388 IVF- och 223 ICSI-cykler, men inget tröskelvärde för DFI som kunde användas till att förutsäga behandlingsresultat kunde påvisas. Om DFI var över 30 procent var dock ICSI signifikant bättre än IVF (OR för att få ett barn 2,17; 95 procentens KI 1,04–4,51) [14, 15]. Den-

na tendens till något bättre resultat med ICSI än med IVF vid högt DFI har senare bekräftats i andra studier [15]. Den andra SCSA-parametern, HDS, hade inget prediktivt värde avseende möjligheten att uppnå graviditet, varken in vivo eller in vitro.

Problem med individ- och laboratorievariationer

Ett av de genomgående problemen vid användning av spermakvalitet som diagnostiskt verktyg är den stora intraindividuell variationen för såväl koncentration som motilitet och morfologi [16]. De första rapporterna om motsvarande variation för SCSA antydde att den är i det närmaste obefintlig [17]. I vårt laboratorium har även DFI en ganska betydlig dag-till-dag-variation hos de enskilda patienterna, med en genomsnittlig variationskoefficient om knappt 30 procent [18].

Trots denna intraindividuell variation visar våra studier att högt DFI är en robust parameter vid prediktion av in vivo-infertilitet [11]. Dessutom är undersökningen, i motsats till undersökning av andra spermiekaraktäristika, förenad med låg intra- och interlaboratorievariation (<5 procent) [19]. En av anledningarna kan vara att man vid användning av en flödescytometer analyserar 5 000–10 000 spermier, medan en standardspermieanalys oftast baseras på bedömning av endast 200 celler.

SCSA som kliniskt verktyg

Eftersom intra- och interlaboratorievariationen för SCSA-analysen är låg är metoden lämplig som kliniskt verktyg. En nackdel är att den kräver tillgång till en flödescytometer, vilket kan vara en begränsande faktor för många spermialaboratorier. Provmaterialet kan dock, om det förvarats i -80°C , skickas till ett annat laboratorium för analys, och analysverksamheten kan därmed centraliseras. Det är vår uppfattning att med rätt indikation är SCSA ett värdefullt verktyg i utredningen och behandlingen av infertila par. Metodens användbarhet relaterar först och främst till fertiliteten in vivo, men på grund av den intraindividuell variationen rekommenderar vi att analysen upprepas om DFI är över 20 procent.

Som tidigare nämnts har 20 procent av de män som för övrigt har spermieparametrar som uppfyller kriterierna för IUI

ett DFI över 30 procent och därmed mycket begränsad möjlighet att göra sin partner gravid. Det finns ingen anledning att avvakta med att påbörja IVF- eller ICSI-behandling, utan paren bör omgående remitteras till IVF/ICSI. Därmed kan man undvika att utsätta en femtedel av alla par som annars skulle ha remitterats till IUI för den onödiga fysiska och psykiska påfrestning som en behandling med assisterad befruktning – som på förhand är dömd att misslyckas – representerar.

Vid ett DFI på 20–30 procent kan det ta något längre tid för paret att åstadkomma en spontan graviditet, men chansen finns, vilket kan användas i samband med rådgivning och ställningstagande till assisterad befruktning. Däremot kan ett yngre par, där mannens spermakvalitet visar en avvikelser i endast en av standardparametrarna, DFI är under 10 procent och om det för övrigt inte finns manliga eller kvinnliga faktorer som talar emot detta, rekommenderas att fortsätta att försöka uppnå spontan graviditet.

SCSA-metodens roll i samband med IVF och ICSI är mer diskutabel. Några studier, inklusive en av våra egna, indikerar större chans till graviditet med ICSI vid DFI över 30 procent. Man måste dock komma ihåg att all befintlig information härstammar från retrospektiva studier, varför det finns behov av prospektiva, randomiserade undersökningar. Däremot finns inga bevis för att SCSA kan förutsäga fertilisering, implantation eller missfallsrisk. Därmed är testet inte användbart vid utebliven fertilisering, misslyckade ICSI-behandlingar eller upprepade tidiga missfall.

En stor del av de störningar i spermiekromatinintegriteten som visar sig som högt DFI anses relatera till hög nivå av fria radikaler i sädesvätskan. Enstaka försök att behandla högt DFI och infertilitet med antioxidanter har rapporterats. Resultaten har inte varit övertygande, men det kan inte uteslutas att SCSA-analysen i framtiden kan användas inte bara till att värdera chansen till fertilitet in vivo eller in vitro utan också för att selektera patienter hos vilka det finns möjlighet till kausal behandling av störningar i fertiliteten.

■ Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

REFERENSER

1. Ferrell RJ, O'Connor KA, Holman DJ, Brindle E, Miller RC, Rodriguez G, et al. Monitoring reproductive aging in a 5-year prospective study: aggregate and individual changes in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone with age. *Menopause*. 2007;14(1):29-37.
2. Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer Verlag; 2001. p. 1-8.
3. Gleicher N, Barad D. Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod*. 2006;21(8):1951-5.
4. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
5. Bonde JPE, Ernst E, Jensen TK, Hjøllund NHI, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. 1998;352:1172-7.
6. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14:1039-49.
7. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980;210(4474):1131-3.
8. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23:25-43.
9. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreiss J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*. 2006;8(1):11-29.
10. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1388-93.
11. Giwercman A, Lindstedt L, Larson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl*. 2010;33(1):e221-7.
12. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 2005;84(2):356-64.
13. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*. 2004;19(6):1409-17.
14. Bungum M, Humaïdan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007;22(1):174-9.
15. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1576-82.
16. Jørgensen N, Auger J, Giwercman A, Irvine DS, Jensen TK, Jouannet P, et al. Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl*. 1997;20(4):201-8.
17. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol*. 1991;5(2):115-25.
18. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod*. 2006;21(8):2061-4.
19. Giwercman A, Richthoff J, Hjøllund H, Bonde JP, Jepsen K, Frohm B, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1404-12.