

Indikationen, Möglichkeiten, Grenzen und Perspektiven zytogenetischer Untersuchungen für die Reproduktionsmedizin

Dieter Meschede, Jürgen Horst

Institut für Humangenetik
der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Zusammenfassung

Die Karyotypisierung stellt seit jeher ein wichtiges Diagnostikum bei reproduktionsmedizinischen Fragestellungen dar. Klassische Indikationen sind der hypergonadotrope Hypogonadismus der Frau sowie beim Mann die ätiologisch ungeklärte Azoospermie und hochgradige Oligozoospermie. In jüngerer Zeit hat sich, unabhängig von den endokrinologischen und spermatologischen Detailbefunden, die geplante Behandlung mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) als Indikation zur Karyotypisierung beider Partner des infertilen Paares herauskristallisiert. Der klinische Stellenwert der zytogenetischen Analyse von Spermatozoen, die heute bevorzugt mit der FISH-Technik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) durchgeführt wird, bedarf noch einer präziseren Definition. Untersuchungen solcher Art sind derzeit als eher wissenschaftlicher Natur und nicht als Teil der Routinediagnostik anzusehen. Dies gilt in noch ausgeprägterer Weise für die zytogenetische Präimplantationsdiagnostik. Auch diese stützt sich im wesentlichen auf die FISH-Technik. Neben einer Risikominderung für fetale Aneuploidien verspricht man sich von diesem Verfahren eine Effektivitätssteigerung der IVF-Therapie.

Schlüsselwörter

FISH, ICSI, Infertilität, Karyotypisierung, Präimplantationsdiagnostik, Spermienchromosomen

Summary

Karyotyping is an important tool for the diagnosis of human reproductive system disorders. Among the undisputed indications for ordering a chromosome analysis are hypergonadotropic hypogonadism in females and unexplained azoospermia or severe oligozoospermia in males. More recently, the planned treatment through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become a more and more accepted indication for karyotyping both partners of the infertile couple. In this setting a chromosome analysis is recommended even regardless of the endocrine and spermatological case details. The analysis of sperm chromosomes is now preferentially performed by means of fluorescence in situ hybridization (FISH). What needs more precise definition is the practical value of this diagnostic procedure. Thus, sperm chromosome analysis should currently be considered more an experimental technique than a test for routine clinical purposes. This is even more true for cytogenetic preimplantation diagnosis. This elaborate procedure is also based on FISH technology. Advocates of cytogenetic preimplantation diagnosis cite a risk reduction for fetal aneuploidy as well as improved efficacy of the IVF procedure as possible assets of the technique.

Keywords

FISH, ICSI, infertility, karyotyping, preimplantation genetic diagnosis, sperm chromosomes

Die Reproduktionsmedizin hat sich, wenn auch weiterhin verankert in ihren Mutterfächern Gynäkologie und Andrologie, vielerorts als eigenständiger klinischer und wissenschaftlicher Arbeitsbereich etabliert. Bei einschlägigen Fragestellungen nahmen zytogenetische Untersuchungsverfahren von Beginn an einen festen Platz ein. Allerdings haben sich, bedingt sowohl durch Fortschritte in der Zytogenetik als auch in der Reproduktionsmedizin, seit Anfang der neunziger Jahre wesentliche Akzentverschiebungen und Neuentwicklungen ergeben. Deren Darstellung soll hier, nach einer einleitenden Beschreibung der klassischen Indikationsbereiche für zytogenetische Untersuchungen bei reproduktionsemedizinischen Fragestellungen, im Vordergrund stehen.

Traditionelle Indikationen zur zytogenetischen Diagnostik

Hypergonadotroper Hypogonadismus

Die Karyotypisierung spielt eine zentrale Rolle in der differentialdiagnostischen Abklärung des hypergonadotropen Hypogonadismus der Frau. Dieser ist gekennzeichnet durch subnormale Östrogenspiegel bei gleichzeitig erhöhten Serumwerten für die Gonadotropine LH und FSH. Diese hormonelle Konstellation weist auf eine primär gonadale Störung hin, im Gegensatz zum hypogonadotropen Hypogonadismus, dessen pathophysiologische Grundlage meist auf der Ebene von Hypophyse und/oder Hypothalamus zu suchen ist. Die breite Differentialdiagnose der primären endokrinen Gonadeninsuffizienz umfaßt eine

Tab 1
Ergebnisse der seriellen Karyotypisierung von infertilen Paaren vor geplanter ICSI-Therapie

Autoren	Anzahl karyotypisierter Männer	Anzahl karyotypisierter Frauen	Männer: auffälliger Chromosomenbefund	Frauen: auffälliger Chromosomenbefund
Testart et al. 1996	261	261	11 (4,2%)	3 (1,1%)
Mau et al. 1997	150	150	18 (12,0%)	9 (6,0%)
Pauer et al. 1997	128	122	9 (7,0%)	1 (0,8%)
Meschede et al. 1998	432	436	9 (2,1%)	24 (5,5%)
Scholtes et al. 1998	1116	1164	50 (4,5%)	114 (9,8%)
van der Ven et al. 1998	305	305	10 (3,3%)	10 (3,3%)

Reihe verschiedener numerischer oder struktureller Chromosomenaberrationen, so den 45,X-Karyotyp und die von ihm abgeleiteten Mosaiken sowie eine Vielzahl gonosomaler und autosomaler Strukturanomalien. Auf der klinischen Ebene werden Patienten meist unter den Verdachts- oder Arbeitsdiagnosen Turner-Syndrom, Gonadendysgenese, primäre Amenorrhoe oder prämatüre Menopause geführt. Beim Mann stellt das Klinefelter-Syndrom eine der wichtigsten Differentialdiagnosen des hypergonadotropen Hypogonadismus dar, so daß bei entsprechendem klinischem Gesamtbild auch bei männlichen Patienten die Indikation zur Karyotypisierung gegeben ist.

Azoospermie

Eine eindeutige Indikation zur Chromosomenanalyse stellt die (nicht-obstruktive) Azoospermie dar. Etwa bei 14% der Patienten mit diesem Befund findet sich eine chromosomale Aberration (Van Assche et al. 1996). Zahlenmäßig im Vordergrund steht der 47,XXY-Karyotyp, aber auch verschiedene strukturelle Aberrationen sowie der 46,XX-Karyotyp („XX-Mann“) werden beobachtet.

Oligozoospermie

Weniger übersichtlich ist der Zusammenhang zwischen graduellen Einschränkungen der Spermatogenese (Oligozoospermie) und zytogenetischen Aberrationen. Als Grundregel gilt, daß je ausgeprägter eine Spermatogenesestörung sich präsentiert bzw. je geringer die Spermienkonzentration ist, umso wahrscheinlicher eine chro-

mosomale Aberration vorliegt. Im Gegensatz zur Azoospermie stehen bei der Oligozoospermie strukturelle Chromosomenaberrationen im Vordergrund, und unter diesen insbesondere balancierte Robertson'sche und reziproke Translokationen sowie Inversionen (De Braekeleer & Dao 1991; Van Assche et al. 1996). Die Prävalenz chromosomaler Aberrationen wird bei oligozoospermen Männern auf etwa 5 % eingeschätzt (Van Assche et al. 1996).

Es ist zu betonen, daß männliche Träger struktureller Chromosomenumbauten normal fertil oder nur leicht subfertil sein können. Daher erlaubt kein spermatologischer Befund das Vorliegen einer chromosomalen Aberration als Ursache einer gegebenen andrologischen Problematik auszuschließen. Die nur sehr begrenzte Korrelation zwischen Fertilitäts-„Phänotyp“ und zytogenetischem Befund wirft die Frage nach geeigneten Indikationsrichtlinien zur Karyotypisierung von infertilen Männern auf, die nicht den Extrembefund einer Azoospermie aufweisen. Ausreichend validierte empirische Daten stehen bislang nicht zur Verfügung. Als provisorische Leitlinie für die Praxis mag gelten, daß bei einer Spermienkonzentration von 5 Millionen/ml oder weniger eine Karyotypisierung auf jeden Fall erfolgen sollte, sofern es sich um eine scheinbar „idiotypische“ Fertilitätsstörung handelt.

„Neue“ Indikationsbereiche zur zytogenetischen Diagnostik

Karyotypisierung vor geplanter intrazytoplasmatischer Spermieninjektion

Die therapeutischen Möglichkeiten der Reproduktionsmedizin haben sich mit der Einführung von Verfahren der sogenannten mikroassistierten Fertilisation enorm erweitert. Unter deren zahlreichen technischen Varianten spielt die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mit Verwendung entweder ejakulierter oder operativ gewonnener Spermatozoen die weitestgehend größte Rolle. Die Einführung des ICSI-Verfahrens in die Humanmedizin hat eine Reihe spezieller genetischer Fragestellungen aufgeworfen, darunter auch die nach einer adäquaten genetischen Diagnostik und Beratung vor Einleitung der Therapie (Meschede et al. 1995; Engel et al. 1998, Themenschwerpunkt „Reproduktionsmedizin“ (medgen (1998) 3–26).

Was die wünschenswerte zytogenetische Vordiagnostik anbetrifft, so zeichnet sich mittlerweile ein breiter Konsens ab, daß auf jeden Fall für den männlichen Partner eine Karyotypisierung erfolgen sollte. Mehrere Studien an großen ICSI-Kollektiven haben übereinstimmend eine mit 2,1 bis 12,0 Prozent gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlich erhöhte Prävalenz chromosomaler Aberrationen bei den männlichen Partnern gezeigt (Tab 1; Meschede et al. 1998). Angesichts des bekannten Zusammenhanges zwischen Azoospermie / schwerer Oligozoospermie und Chromosomenstö-

rungen (s.o.) sowie der Tatsache, daß ICSI vorwiegend zur Behandlung der männlichen Infertilität eingesetzt wird, war dies kein unerwarteter Befund. Ein Teil der bei den prätherapeutischen Reihenuntersuchungen aufgedeckten chromosomalen Aberrationen ist für die Nachkommen der Patienten genetisch risikoträchtig (Meschede et al. 1998). Demnach ist auch unter diesem Gesichtspunkt eine praktische Relevanz der konsequenten Karyotypisierung von mit ICSI behandelten Männern gegeben.

Die Untersuchungen zur Zytogenetik ICSI-behandelter Paare haben auch unter den Frauen eine deutlich erhöhte Prävalenz (0,8–9,8%) sowohl balancierter autosomaler Strukturanomalien als auch niedriggradiger gonosomaler Mosaik gezeit (Tab 1; Meschede et al. 1998). Dieser Befund ist insofern doppelt überraschend, als zum einen bei der überwiegenden Mehrzahl der „ICSI-Paare“ die Infertilität andrologisch bedingt ist, und zum anderen auch ein Zusammenhang zwischen weiblicher Subfertilität und balancierten autosomalen Strukturaberrationen nicht bekannt ist. Unklar ist die biologische und klinische Signifikanz der in diesem Kollektiv häufig anzutreffenden niedriggradigen Mosaikzustände für numerische Gonosomenaberrationen (45,X/46,XX, 45,X/46, XX/47,XXX etc.). Da etwa ein Viertel der mittels ICSI behandelten Patientinnen 35 Jahre oder älter sind, könnte es sich um ein altersassoziiertes und damit quasi physiologisches Phänomen handeln. Andererseits ist aber auch nicht auszuschließen, daß diese niedriggradigen Mosaik das zytogenetische Korrelat einer latenten gonadalen Dysfunktion darstellen.

Die Autoren vertreten die Auffassung, daß nach augenblicklicher Datenlage vor geplanter ICSI-Therapie nicht nur der männliche Partner, sondern auch die Frau karyotypisiert werden sollte. In dieser Frage zeichnet sich aber noch kein allgemeiner Konsens ab. Allerdings hat die Bundesärztekammer kürzlich in ihre „Richtlinien zur Durchführung der assistierten Reproduktion“ die Empfehlung einer Karyotypisierung beider Partner vor geplanter ICSI-Therapie aufgenommen (Bunde-

särztekammer 1998).

Eine für den reproduktionsmedizinischen Therapeuten interessante, derzeit aber noch nicht abschließend beurteilbare Frage ist, inwieweit eine nachgewiesene Chromosomenstörung einen Indikator für die Erfolgsaussichten der ICSI-Behandlung darstellt. Erste hierzu veröffentlichte Daten deuten darauf hin, daß die Erfolgschancen der Therapie bei vorliegender zytogenetischer Aberration bei einem der Partner gegenüber chromosomal normalen Paaren reduziert sein könnten (Montag et al. 1997).

Zytogenetische Diagnostik an Keimzellen

Die zytogenetische Charakterisierung menschlicher Eizellen spielt, obwohl technisch möglich und von wissenschaftlichem und möglicherweise auch klinischem Interesse, in der gegenwärtigen Praxis der Reproduktionsmedizin kaum eine Rolle. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß geeignetes Material für eine solche Analytik aus offensichtlichen Gründen nur schwer zu gewinnen ist. Auf die Eizellkaryotypisierung soll daher an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Es sei auf die Übersichtsarbeit von Zenzes & Casper (1992) verwiesen.

Auch die zytogenetische Untersuchung menschlicher Spermien war bis vor kurzem wenigen Speziallabors vorbehalten, da sich Informationen über ihren Chromosomensatz nur nach Dekondensation in Hamsterooocyten gewinnen ließen. Dieses extrem aufwendige Verfahren kann inzwischen aber für die meisten Zwecke durch die FISH-Analyse von Spermienausstrichpräparaten ersetzt werden. Ein Nachteil gegenüber der Hamster-Ovum-Technik ist allerdings, daß die FISH-Diagnostik naturgemäß nur punktuelle Informationen und keinen kompletten Überblick über das Keimzellgenom liefert. Einige Labors setzen anstelle der FISH-Technik oder auch ergänzend zu ihr die PRINS-Technik (primed in situ labelling) zur Chromosomendiagnostik an menschlichen Spermatozoen ein.

Die zytogenetische Analyse von Spermien hat zwei Hauptanwendungsgebiete (Martin 1995; Guttenbach et al. 1997): (1) Bei Patienten mit bekannten konstitutionellen Chromosomenanomalien kann mit Hilfe geeigneter ausgewählter Sonden das Segregationsverhalten der jeweiligen Aberrationen untersucht werden. So hat sich gezeigt, daß der Anteil genetisch unbalancierter Spermien je nach Art einer vorliegenden Translokation innerhalb einer Spanne von 19 bis 77 Prozent variieren kann. (2) Bei infertilen Männern mit normalem somatischen Karyotyp kann untersucht werden, ob die Rate an Spermien mit numerischen Chromosomenaberrationen gegenüber den Vergleichswerten fertiler Kontrollen erhöht ist. Zur Einschätzung der Gesamt-Aberrationsrate wird meist mit einigen wenigen FISH-Sonden, die jeweils für ein Chromosom spezifisch sind, analysiert, und das Resultat dann auf den kompletten Chromosomensatz hochgerechnet. Die bislang vorliegenden Daten deuten nicht darauf hin, daß infertile Männer generell vermehrt Samenzellen mit numerischen Chromosomenaberrationen produzieren.

Allerdings wurde mehrfach über einzelne Patienten berichtet, die in ihren Keimzellen eine gegenüber dem Gruppendurchschnitt deutlich erhöhte Aberrationsrate aufwiesen. Eine besonders eindrucksvolle Kasuistik wurde von In't Veld et al. (1997) mitgeteilt, die bei einem Patienten mit schwerwiegenden morphologischen Spermienanomalien 40 Prozent diploide, 24 Prozent triploide und 22 Prozent gonosomal aneuploide Samenzellen feststellten.

So unzweifelhaft die zytogenetische Untersuchung menschlicher Spermatozoen von grundlegendem biologischem Interesse ist, so unklar ist bislang, welchen praktisch-prognostischen Wert die erhobenen Untersuchungsdaten haben. Eine wesentliche Zielrichtung weiterer Forschung muß daher sein, die klinische Signifikanz der Befunde klar herauszuarbeiten und ggfs. spezifische Indikationen für die zytogenetische Untersuchung von Samenzellen festzulegen.

Zytogenetische Präimplantationsdiagnostik

Die Präimplantationsdiagnostik (pre-implantation genetic diagnosis, PGD) ist nach derzeitiger Gesetzeslage in Deutschland nicht anwendbar, wird aber weltweit bereits von mehr als 40 Zentren betrieben (Verlinsky & Kuliev 1999). Während das Verfahren ursprünglich zur molekulargenetischen Diagnostik monogener Erkrankungen entwickelt wurde, sind zytogenetische Fragestellungen inzwischen zum häufigsten Gegenstand der PGD geworden. Hier sind im wesentlichen zwei Indikationsgruppen zu unterscheiden: (1) zytogenetische PGD bei elterlicher balancierter Translokation, sowie (2) zytogenetische PGD bei einem mütterlichen Alter ≥ 35 Jahren. Außerdem ist die zytogenetische PGD bei gegebenem Risiko für X-gekoppelt-rezessiv vererbte Erkrankungen zur Geschlechtsbestimmung eingesetzt worden. Für alle genannten Indikationen stellt die Präimplantationsdiagnostik eine noch im experimentellen Stadium befindliche Technik dar.

Je nach Fragestellung wird für die zytogenetische PGD entweder auf eines oder beide Polkörperchen der Oocyte oder auf Blastomeren des frühen Embryos zurückgegriffen. Die Analyse erfolgt mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), wobei je nach Indikation Zentromer-, Telomer- oder gesamtchromosom-spezifische Sonden zum Einsatz kommen. Nach einer kürzlich erschienenen Übersicht von Verlinsky & Kuliev (1999) wurde nach weltweit ca. 700 Behandlungszyklen mit zytogenetischer PGD bislang über etwa 100 Lebendgeburten berichtet. Negative Auswirkungen auf die diesem Verfahren unterworfenen Oozyten bzw. Embryonen haben sich bisher nicht gezeigt.

Ein wesentlicher limitierender Faktor für die Präimplantationsdiagnostik ist, daß das Verfahren grundsätzlich nur im Gefolge einer in vitro Fertilisation (IVF) anwendbar ist. Während in einigen Fällen die PGD auch von normal fertilen Patienten als Alternative zur konventionellen Pränataldiagnostik gewählt wurde, erfolgten die meisten PDG-Behandlungszyklen für Paare, die sich aufgrund einer Fertilitätspro-

blematik ohnehin einer IVF-Behandlung unterzogen. Zielrichtung der zytogenetischen PGD in diesem Patientenkollektiv ist nicht nur die Risikominderung für Aneuploidien, sondern auch die Effektivitätssteigerung der IVF-Therapie. Hier wird an die Überlegung angeknüpft, daß die Erfolgsrate der in vitro Fertilisation, insbesondere bei Patientinnen im Alter von ≥ 35 Jahren, wahrscheinlich durch den Transfer chromosomal aberranter Embryonen merklich eingeschränkt wird. Würde man einen Teil dieser Aneuploidien bereits in vitro erkennen und die entsprechenden Embryonen nicht transferieren, sollte die Chance für eine entwicklungsfähige Schwangerschaft steigen. Ob diese Hypothese zutreffend und damit die zytogenetische PGD zur Effektivitätssteigerung der IVF geeignet ist, bedarf noch der empirischen Überprüfung. Derzeit ist auch in dieser Hinsicht der experimentelle Charakter der Präimplantationsdiagnostik zu betonen.

Literatur

Bundesärztekammer (1998) Richtlinien zur Durchführung der assistierten Reproduktion. Dt Ärztebl 95:A-3166-3171

De Braekeleer M, Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. Hum Reprod 6:245-250

Engel W, Schmid M, Pauer H-U (1998) Genetik und mikroassistierte Reproduktion durch intracytoplasmatische Spermieninjektion. Dt Ärztebl 95:A-1902-1908

Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997) Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. Hum Genet 100:1-21

In't Veld PA, Broekmans FJM, de France HF, Pearson PL, Pieters MHEC, van Kooij RJ (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. Hum Reprod 12:752-754

Martin RH (1995) The sperm cell – genetic aspects. In: Grudzinskas JG, Yovich JL (Hg.) Gametes – The Spermatozoon. Cambridge University Press, Cambridge. 104-121

Mau UA, Bäckert IT, Kaiser P, Kiesel L (1997) Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12:930-937

Meschede D, De Geyter C, Nieschlag E, Horst J (1995) Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. Hum Reprod 10:2880-2886

Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J (1998) Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing ICSI treatment - prevalence, types, sex distribution, and reproductive relevance. Hum Reprod 13:576-582

Montag M, van der Ven K, Ved S, Schmutzler A, Prietl G, Krebs D, Peschka B, Schwanitz G, Albers P, Häidl G, van der Ven H (1997) Success of intracytoplasmic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations. Hum Reprod 12:2635-2640

Pauer HU, Hinney B, Michelmann HW, Krasmann EW, Zoll B, Engel W (1997) Relevance of genetic counselling in couples prior to intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12:1909-1912

Scholtes MCW, Behrend C, Dietzel-Dahmen J, van Hoogstraten DG, Marx K, Wohlers S, Verhoeven H, Zeilmaker GH (1998) Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. Fertil Steril 70:933-937

Testart J, Gautier E, Bami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A (1996) Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. Hum Reprod 11:2609-2612

Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, van Steirteghem A, Liebaers I (1996) Cytogenetics of infertile men. Hum Reprod 11 (Suppl 4):1-26

van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven HH (1998) Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 13:48-54

Verlinsky Y, Kuliev A (1999) Preimplantation genetic diagnosis. Reprod Med Rev 7:1-10

Zenzes MT, Casper RF (1992) Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. Hum Genet 88:367-375

Korrespondenzadresse

Dr. Dieter Meschede, Prof. Dr. Jürgen Horst
Institut für Humangenetik der Universität
Vesaliusweg 12-14
48149 Münster
Tel 0251-8355401
Fax 0251-8356995
dmesche@uni-muenster.de
horstj@uni-muenster.de