

# **1. ZUSAMMENFASSUNG**

## **1.1. DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG**

In der vorliegenden Studie werden insbesondere die Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen (Vitamin E, Selen, Zink) im menschlichen Seminalplasma sowie die Parameter zur DNA-Integrität (Chromatinkondensationsstatus und Apoptoserate) untersucht und in Vergleich zu den Parametern der klassischen Samenanalyse und den Ergebnissen des IVF- und ICSI-Fertilisationsprogrammes gesetzt.

Im wesentlichen bezieht sich diese Arbeit bei der immer komplexer werdenden Materie der Reproduktionsmedizin auf die andrologischen Ursachen einer Sub- oder Infertilität.

In unserer Studie wurden insgesamt 48 männliche subfertile Samenproben untersucht und auf die zwei Fertilisationsprogramme verteilt (IVF: n=26, ICSI: n=22). Alle klassischen SpermioGrammparameter wurden makroskopisch (Volumen, Viskosität, Verflüssigungszeit, pH-Wert, Cytur-Test) und mikroskopisch (Dichte, Global- und Progressivmotilität) untersucht sowie weitere Testungen durchgeführt (Vitalitätsprüfung mit Eosin- und HOS-Test sowie Spermienfunktionsprüfung mit dem MAR-Test). Zur Beurteilung der Kernchromatinkondensation im Spermienkopf wurde die Acridinorangefärbung sowie die Färbung mit Chromomycin A<sub>3</sub> durchgeführt. Um stattgefundenene Apoptose in der Spermien-DNA zu detektieren, wurde zudem die TUNEL-Färbung genutzt. Nach Aufbereitung der Samenprobe mit unterschiedlichen Methoden (Percoll, Swim-Up, Mini-Swim-Up, Pure-Sperm, Isolate) wurden auch Parameter des seminalen Plasmas beurteilt. Hier wurde im Bereich der Oxidantien die reactive oxygen species (ROS) mittels eines kalorimetrischen Assays bestimmt. Auf der anderen Seite wurden im antioxidativen Spektrum der totale Antioxidantien-Status (TAS) mit einer photometrischen Methode, Vitamin E mit Chromatographie, sowie Selen und Zink mittels einer Neutronen-Aktivierungsanalyse gemessen. Die Behandlung der Patientinnen erfolgte mit gebräuchlichen Therapieprotokollen. Anschließend wurden die Patientinnen mittels IVF oder ICSI einer reproduktionsmedizinischen Fertilisationstechnik zugeführt. Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten wurden dokumentiert.

Bei den Parametern der klassischen Samenanalyse konnten wir insbesondere reduzierte Normalwerte bezüglich der Motilität, Vitalität und normalen Morphologieformen feststellen. Signifikante Unterschiede in beiden Patientenkollektiven fanden sich nur in Bezug auf die Spermiedichte, -motilität und Vitalität. Sowohl für den Chromatinkondensationsstatus als auch für die Apoptoserate konnten keine pathologischen Werte gefunden werden. Weder bei der Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma noch bei den Fertilisationsparametern fanden sich signifikante Unterschiede zwischen der IVF- und ICSI-Patientengruppe. Die Befruchtungsraten lagen in beiden Gruppen in etwa gleich hoch (im Mittel 67.26% zu 67.87%), wobei die Schwangerschaftsrate in der IVF-Gruppe (Mittelwert 42.3%) deutlich höher als in der ICSI-Gruppe (Mittelwert 18.2%) lag.

Korrelationen fanden sich in unserer Studie zwischen dem kondensierten Kernchromatin und der Spermienmotilität, -morphologie und -vitalität. Negativkorrelationen zeigten sich zwischen der Apoptoserate und der Motilität und Vitalität, allerdings nicht zu Dichte und Morphologie. Zusammenhänge zwischen den Werten der DNA-Integrität und der Oxidantien- oder Antioxidantienkonzentration konnten nicht gezeigt werden. Eine Assoziation zwischen dem Chromatinkondensationsstatus und der Schwangerschaftsrate liegt vor. Bezüglich der Apoptoserate ist zu erwähnen, dass apoptotische Spermien wohl weiter eine Befruchtung der Oozyte vollziehen können, der nachfolgende Schwangerschaftsablauf dann aber gestört sein kann. Das erklärt die zum Großteil positive Korrelationen der Apoptoserate mit den Befruchtungsraten und eher negative mit den Schwangerschaftszahlen.

Wie in einigen früheren Studien ebenfalls festgestellt, konnte man auch negative Assoziationen zwischen ROS und der Spermiedichte, -morphologie und Membranstabilität detektieren. Interessanterweise konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhten ROS-Werten und der Spermienmotilität festgestellt werden.

Im antioxidativen Spektrum konnten bezüglich TAS im Vergleich mit den anderen Parametern keine eindeutigen Resultate erzielt werden. Im Gegensatz zu vielen früheren Studien fand man Negativkorrelationen zwischen Vitamin E zur Spermienmotilität, Morphologie und zur Schwangerschaftszahl. Als Erklärung vorstellbar wäre, dass die Vitamin E-Werte im seminalen Plasma zu hoch waren, so dass sie einen Negativeffekt auf die Samenqualität ausübten. Selen hatte in dieser

vorliegenden Studie keinen Zusammenhang zu den übrigen Parametern. Lediglich zeigte sich eine positive Verbindung zu den Fertilitätsparametern. Bei der Betrachtung von Zink gab es insgesamt recht inkonsistente Resultate, was auch die Tendenz einiger Vorgänger-Studien bestätigte. Erwähnenswert ist sicherlich die Negativkorrelation zur Global- und Progressivmotilität.

Insgesamt muss man auch nach der vorliegenden Studie resümieren, dass kein einzelner Parameter eine klare Vorhersage über den möglichen Ausgang einer Fertilisationsbehandlung liefern kann. Die Untersuchungen der einzelnen Parameter sind in der reproduktionsmedizinischen Forschung immer noch unzureichend. Weitere Studien werden folgen müssen, die unterschiedliche Gegebenheiten zu berücksichtigen haben. So werden die Forschungen der kommenden Jahre darauf ausgerichtet sein müssen, noch genauer die Beeinflussungen der Parameter untereinander zu untersuchen, Referenzbereiche für die Parameter zu finden und die unterschiedlichen Gegebenheiten der einzelnen Kompartimente (intrazellulär versus Seminalplasma) zu berücksichtigen. Erst dann kann man eventuell klare Aussagen anhand solcher Resultate treffen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung oder Schwangerschaft in einem Fertilisationsprogramm sein wird.

## **1.2. ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)**

Examinations of oxidants and antioxidants concentrations (vitamin E, selenium, zinc) in human seminal plasma as well as DNA integrity and their influences on the results of IVF- and ICSI-program.

In the present study especially the concentrations of oxidants and antioxidants (vitamin E, selenium, zinc) in human seminal plasma as well as the parameters of DNA-integrity (status of condensed chromatin and apoptosis rate) were examined and were compared to the parameters of classical semen analysis and the results of IVF- and ICSI-fertilization program.

In the always more complex growing subject of reproductive medicine this work is essentially referred to the male factor causes of sub- or infertility.

In our study a total of 48 male subfertile semen samples were examined and distributed to the two fertilization programs (IVF: n=26, ICSI: n=22). All classical parameters of a spermiogram were macroscopically (volume, viscosity, time to liquefaction, pH-value, cytur-test) and microscopically (density, global and progressive motility) examined as well as further more tests were carried out (vitality test with eosin- and HOS-test as well as sperm function test with the MAR-test). For the opinion on nucleus chromatin condensation in the sperm head the acridine orange staining as well as the staining with chromomycin A<sub>3</sub> were carried out. To detect apoptosis which had taken place in the sperm-DNA moreover the TUNEL staining was used. After processing of the semen sample with different methods (Percoll, Swim-Up, Mini-Swim-Up, Pure-Sperm, Isolate) also the parameters of the seminal plasma were viewed. Here in the range of oxidants the reactive oxygen species (ROS) were determined with a calorimetric assay. On the other side in the antioxidant spectrum the total antioxidant status (TAS) with a photometric method, vitamin E with chromatography as well as selenium and zinc with a neutron activation analysis were measured. The treatment of the female patients followed current therapy protocols. Subsequently the female patients were lead to a reproductive medicine fertilization technique with IVF or ICSI. Fertilization and pregnancy rates were documented.

For the parameters of classical semen analysis we could especially determine reduced normal values for motility, vitality and normal morphological forms. Significant differences were only found in both patient collectives for sperm density,

motility and vitality. Both for chromatin condensation status and for the apoptosis rate no pathological values could be found. Neither for the oxidant and antioxidant concentration in seminal plasma nor for the fertilization parameters significant differences between the IVF and ICSI patient group were found. The fertilization rates in both groups were almost the same (in the middle 67.26% to 67.87%), at which the pregnancy rate in the IVF group (middle value 42.3%) was obvious higher than in the ICSI group (middle value 18.2%).

In our study correlations were found between the condensed nucleus chromatin and the sperm motility, morphology and vitality. Negative correlations were shown between the apoptosis rate and the motility and vitality, though not to density and morphology. Connections between the values of DNA integrity and oxidants or antioxidants concentration we could not see. An association between the chromatin condensation status and the pregnancy rate exists. Referring the apoptosis rate, it should be mentioned, that apoptotic sperms doubtless can fulfil the fertilization of the oocyte, but then the following pregnancy process could be disturbed. This explains the in the major part positive correlations of the apoptosis rate with the fertilization rates and the rather negative with the numbers of pregnancies.

Like in several earlier studies also determined, we could also detect negative associations between ROS and the sperm density, morphology and membrane stability. Interestingly, there could not be any relationship between higher values of ROS and the sperm motility determined.

In the antioxidant spectrum definitive results for TAS in comparison to other parameters could not be achieved. In contrast to many earlier studies there were found negative correlations between vitamin E and sperm motility, morphology and number of pregnancies. As an explanation we could imagine, that the values for vitamin E in the seminal plasma were too high so that they exert a negative effect on the semen quality. In our results selenium had no connections to the other parameters. Only a positive relationship to the fertilization parameters was shown. At the view on zinc, in the mean there were relative inconsistent results, which also confirms the tendency of several earlier studies. Worth mentioning is surely the negative correlation to the global and progressive motility.

Altogether also after the present study we have to say that no parameter on its own can supply a clear predictive value about the possible outcome of a fertilization therapy. The examinations of the single parameters are still insufficient in the

reproductive medicine research. Further studies have to follow, which have to consider the different circumstances. So the research of the following years have to be orientated more exactly on the examination of the influences of the parameters one beneath the other, on the findings of reference areas for the parameters and on the consideration of the different circumstances of the single compartments (intracellular versus seminal plasma). Only then we can eventually express clear statements by such results, how the probability of a fertilization or pregnancy in a fertilization program would be.

## **2. EINLEITUNG UND EIGENE FRAGESTELLUNG**

### **2.1. ALLGEMEINE EINLEITUNG**

„This thing, so simple to many women, is proving very difficult for me.“ So schreibt Lucy, die Protagonistin in Ben ELTON's Bestseller „Inconceivable“, an ihre imaginäre Freundin Penny in ihr Tagebuch. Lucy und ihr Mann Sam, so schildert der britische Theaterschriftsteller ELTON (1999) in seinem augenzwinkernden Roman, sind ein Paar in den Dreißigern, die mit ihrer ungewollten Kinderlosigkeit umgehen müssen und dafür einige, zunächst erfolglose IVF-Zyklen über sich ergehen lassen. Das Buch schildert eindrücklich, wie beide versuchen damit fertig zu werden, indem sie sich ihren Tagebüchern anvertrauen, sich in Arbeit oder andere Affären stürzen. Lucy selbst wird dabei zusehends deprimierter, wohingegen Sam eher Gründe für seine „fehlende Männlichkeit“ sucht: „Sperm counts, it seems, are generally down in the Western world.“ Zum Schluss geht diese Beziehungskomödie, die mittlerweile unter dem Titel „Maybe Baby“ verfilmt wurde, natürlich gut aus: Lucy wird schwanger, und ihr Mann macht aus der ganzen Lebensgeschichte noch ein erfolgreiches Theaterstück. Das ganze ist eine nette erdachte Komödie eines britischen Schriftstellers, aber wohl nicht allzu weit von der Realität entfernt. Insbesondere das Rollenverhalten der beiden Partner, hier das Schuldigfühlen der Frau, dort die Erklärungsversuche des Mannes seine „fehlende Männlichkeit“ zu rechtfertigen, sind wohl gute Beispiele für den durchlebten Leidensdruck ungewollt kinderloser Paare.

Der Präsident der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, DIEDRICH (2004) meint zum Thema „Innovationsoffensive“ einer lokalen Tageszeitung, dass Deutschland mehr Kinder bräuchte, das müsse jedem nach der Verschärfung der Rentendebatte klar sein. Er macht für den Geburtenrückgang die anderen Lebensgewohnheiten der Menschen verantwortlich, die aufgrund ihres individuellen Lebensplans immer später den Kinderwunsch hegen und dadurch die Chancen auf eine erfolgreiche Schwangerschaft senken. Nach DIEDRICH'S Schätzung sind momentan rund fünfzehn Prozent aller deutschen Paare, also ca. zwei Millionen ungewollt kinderlos. In Deutschland werde mittels künstlicher Befruchtung und Embryotransfer mittlerweile jedes 100. Kind gezeugt. Jährlich werden laut DIEDRICH (2004) 90.000 Behandlungszyklen mit in-vitro-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) vorgenommen. Ein

Hauptproblem der reproduktionsmedizinischen Maßnahmen ist mittlerweile der Kostenfaktor geworden, da seit Januar 2004 die gesetzliche Krankenversicherung eine 50%-ige Selbstbeteiligung der Patienten fordert. Die Gesamtbehandlungskosten liegen pro Zyklus zwischen 3.000 und 4.000 Euro. Weiterhin postuliert DIEDRICH, dass zum Beispiel in Belgien bessere Ergebnisse in der Reproduktionsmedizin erzielt werden, weil sie die Embryonen vor dem Transfer gezielt durch Präimplantationsdiagnostik (PID), die bei uns verboten ist, untersuchen können.

Ferner steht in der Diskussion um zunehmende Kinderlosigkeit in der Bevölkerung auch noch die Annahme gegenüber, dass Umwelteinflüsse wie hohe Schadstoffbelastungen eine wichtige Rolle bei der Fertilitätsbeeinträchtigung spielen, die sich dann noch weiter potenzieren, indem die Einwirkzeit solcher Noxen immer länger wird, da die Paare ihren Kinderwunsch, wie oben bereits ausgeführt, in immer höhere Altersstufen verschieben (FEICHTINGER, 1991).

Die Zahl der ungewollt kinderlosen Paare ist nur eine der vielfältigen Erklärungsmöglichkeiten, warum die sogenannte Reproduktionsmedizin, nicht nur in Deutschland, eine immer wichtigere Rolle einnimmt und sich ständig weiterentwickelt. Dieses Gebiet hat in den letzten Jahrzehnten rasante medizinische Fortschritte gemacht, und ein Ende ist hier nicht abzusehen.

In den letzten Jahren sind die Techniken der Reproduktionsmedizin wissenschaftlich anerkannt worden (FELDERBAUM et al., 1998). Weiterhin hat mit der Einführung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) ein Verfahren in die Sterilitätstherapie Einzug gehalten, das die männlich bedingte Subfertilität gut therapieren kann (VAN STEIRTEGHEM et al., 1993). Allerdings darf dies nicht dazuführen, dass komplexe Krankheitsbilder nur symptomatisch therapiert werden (FORNARA et al., 1998). Die kausale Abklärung einer Subfertilität ist weiterhin von entscheidender Bedeutung, die vor allem die andrologische Anamnese und die klinische Untersuchung umfassen sollte. Hierzu sollten Fachärzte der Allgemeinmedizin, Inneren Medizin, Gynäkologie, Urologie und Dermatologie angehalten sein (FORNARA et al., 1998; WISARD et al., 2002).

In den Jahren von 1978 bis 1993 sind weltweit 136.408 Kinder nach IVF-Therapie geboren worden, in Deutschland davon allein 9.871 im Zeitraum 1982 bis 1993

(FELDERBAUM et al., 1998 nach dem ART World Report, 1995). Bei jeder geplanten assistierten Reproduktion ist jedoch weiterhin eine genaue Anamnese bezüglich früherer (fehlgeschlagener) künstlicher Befruchtungen, früherer Schwangerschaften, Aborten oder Lebendgeburten sowie das Alter der Patientin entscheidend. Diese Angaben können hilfreich bei der Planung eines weiteren Behandlungszyklus sein und die Chancen für einen Erfolg durchaus abschätzen (KUPKA et al., 2003).

Die andrologisch bedingte In- oder Subfertilität, die Gegenstand dieser vorliegenden Studie ist, nimmt einen immer höher werdenden Anteil an. Nach BALS-PRATSCH et al. (1998) liegen circa 50% der Sterilitätsfaktoren beim Mann und sogar in circa 20% der Fälle wird eine alleinige männliche Sterilitätsursache angenommen.

Aber bei allen Vorteilen, die diese Medizin ungewollt kinderlosen Paaren bietet, darf man nicht wesentliche andere Aspekte dieser Materie vernachlässigen, wie juristische, aber auch ethisch-theologische Aspekte. Außerdem muss man bei allen denkbaren Sterilitätsursachen, die sich medizinisch erklären und diagnostizieren lassen, auch an eine idiopathische Sterilität denken, die ätiologisch nicht erklärbar ist, aber die eventuell auch auf psychosomatische Ursachen schließen lässt. Immerhin macht diese Form der andrologisch bedingten Subfertilität über 30% aller andrologisch bedingten In- oder Subfertilitätsursachen aus (NIESCHLAG, 1996).

Letztlich bezieht sich die vorliegende Studie im wesentlichen auf mögliche andrologisch bedingte Ursachen einer Subfertilität.

### **2.1.1. JURISTISCHE ASPEKTE DER REPRODUKTIONSMEDIZIN**

Juristische Aspekte in der Reproduktionsmedizin sind im ärztlichen Berufsrecht und im Embryonenschutzgesetz geregelt (RATZEL, 1998). Die zentrale Regel hierzu in der ärztlichen Berufsordnung ist in § 9 geregelt, der besagt, dass „die künstliche Befruchtung einer Eizelle außerhalb des Mutterleibs [...] Maßnahmen zur Behandlung der Sterilität ärztliche Tätigkeiten“ sind. Weiter ist in diesem Paragraphen festgehalten, dass die Eizellenspende verboten ist und kein Arzt verpflichtet werden kann, an einer in-vitro-Fertilisation oder einem Embryotransfer

mitzuwirken. Einige Regeln zur Insemination oder hormonellen Stimulation sind darin allerdings nicht festgehalten.

Weitere Richtlinien enthält das sogenannte Embryonenschutzgesetz, das unter anderem besagt, dass nicht mehr als drei Embryonen pro Transfer übertragen werden dürfen. Allerdings ist zu beachten, dass hier nicht alle Regeln Rechtsnormqualität unterliegen (RATZEL, 1998). Zum Beispiel beziehen sich streng genommen diese Regelungen nur auf Ehepaare, also sogenannte homologe Inseminationen. In allen anderen Fällen ist eine Ausnahmegenehmigung bei der Ethikkommission einzuholen, das bedeutet bei heterologen Inseminationen (also Gebrauch von Fremd-Spendersamen), aber auch bei sogenannten „quasi-homologen“ Inseminationen, dies bedeutet bei nicht-ehelichen Lebensgemeinschaften. Dafür gibt es gute Argumente dagegen, da bei nicht-ehelichen Paaren schließlich auch soziale und genetische Vaterschaft gleich wären, aber auch dafür, dass die Nicht-Eheleute schließlich die gesetzlichen Nachteile einer Ehe ausschließen wollen, also auch nicht die Vorteile einer solchen beanspruchen dürfen. Allerdings ist dies lediglich eine Regelung, aber kein Gesetz. Per Gesetz eindeutige Verbotsfälle sind die Insemination einer alleinstehenden Frau oder eine Post-mortem-Insemination.

Ein weiteres juristisches Problem ist die Mehrlingsreduktion durch Fetozid, die die Zentrale Kommission der Bundesärztekammer zur Wahrung ethischer Grundsätze in der Reproduktionsmedizin versuchte zu regeln. Nach dieser ist die Mehrlingsreduktion durch Fetozid, der nicht selektiert ist, zwar unerwünscht, aber zur „Prävention zur Verhinderung höhergradiger Mehrlingsschwangerschaften“ erlaubt.

### **2.1.2. ETHISCH-THEOLOGISCHE ASPEKTE DER REPRODUKTIONSMEDIZIN**

Das Gebiet der Reproduktionsmedizin wirft allerdings immer auch Fragen der Ethik auf. Zwei Artikel des deutschen Grundgesetzes stehen sich nach KÜPKER et al. (1998) hier gegenüber: Artikel 1, der die Würde des Menschen garantiert und Artikel 5, Absatz 3, der die Freiheit von Wissenschaft und Forschung garantiert. Die Gesetzgebung in der Bundesrepublik Deutschland hat auf diese Unklarheit mit dem Deutschen Embryonenschutzgesetz, das 1991 unter anderem nach den Vorschlägen der 1984 eingerichteten Benda-Kommission in Kraft trat, reagiert. Dieses Gesetz gilt

weltweit, gemeinsam mit vergleichbaren Gesetzen in Irland und der Schweiz, als restriktivstes Gesetz gegen die Reproduktionsmedizin (KÜPKER et al., 1998). Andere europäische Staaten, aber auch die USA haben liberalere Richtlinien auf diesem Gebiet. Es wurde sogar erwogen ein Verbot der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) zu erlassen, da aufgrund des Selektionsverfahrens nur ein Spermium mit der Eizelle in Kontakt gebracht wird, dies wurde aber aufgrund überzeugender Argumente, wie dem Weiterbestehen der zufälligen Auswahl eines Spermiums, nicht in den Gesetzestext aufgenommen.

Kurz angesprochen werden müssen in diesem Zusammenhang der ethischen Betrachtung der Reproduktionsmedizin auch die theologischen Positionen: Die protestantische Kirche, hier insbesondere als Vorreiter in der Schweiz und in Frankreich, begann schon in den 1950er Jahren mit der Diskussion um die Insemination. Grundsätzlich sieht der Protestantismus in der künstlichen Befruchtung keine ethischen Probleme. Hingegen äußert sich die katholische Kirche ablehnend gegenüber jeglicher Form von Reproduktionsmedizin. Sie sieht nur eine „menschenwürdige Fortpflanzung“ gegeben, die an die Ehe und die „durch die Liebe geknüpfte Vereinigung des Ehepaares“ gebunden ist. Das Judentum befürwortet die Reproduktionsmedizin, untersagt aber Maßnahmen im heterologen System. Der Islam geht noch weiter und sagt, es sei eine „Pflicht“ für den Mediziner, alles nur Mögliche für eine erfolgreiche Konzeption zu unternehmen. Ausgenommen sind hier allerdings auch, wie beim Judentum, die heterologen Maßnahmen. Der Buddhismus erlaubt alle, auch heterologe, Behandlungen und hat klare Richtlinien hierzu (SCHENKER, 1990).

### **2.1.3. PSYCHOSOMATISCHE ASPEKTE IN DER INFERTILITÄTSFORSCHUNG**

Psychosoziale und psychosomatische Faktoren müssen bei der Erforschung der Ätiologie männlicher Fertilitätsstörungen mitbeachtet werden und sollen auch hier kurz umrissen werden. SCHILL et al. (1998) schreiben folgenden Faktoren fertilitätsmindernde Eigenschaften zu: Todes- und Existenzangst, Furcht, Berufsstress, Störung der Persönlichkeitsentwicklung, gestörte Partnerbeziehung, sexueller Leistungsdruck, ambivalentes Verhalten gegenüber Kinderwunsch und Frustrationen aufgrund unerfülltem Kinderwunsch. Dieser letzte Punkt bedeutet einen

nachfolgenden hohen Leidensdruck der Partner. Auch bei andrologisch bedingter Fertilitätsstörung wird eher den Frauen die Patientenrolle zugeschrieben (KOWALCEK et al., 1998).

Nach der Sub- oder Infertilitätsdiagnose ist es auch häufiger zum sexuellen Versagen der Männer bezüglich Erektion und Ejakulation gekommen, sowohl beim Sexualkontakt mit ihrer Partnerin als auch bei der Masturbation. Dies spricht wiederum für eine psychische Ursache dieser sexuellen Dysfunktion, da diese vor der Diagnosemitteilung noch nicht bestand (SALEH et al., 2003).

Diese psychosomatischen Aspekte einer ungewollten Kinderlosigkeit finden nach KOWALCEK et al. (1998) schwierigen Zugang in die Reproduktionsmedizin, da psychosomatische Ursachen eben nicht naturwissenschaftlich messbar sind. In vielen Fällen der sogenannten idiopathischen Sterilität ist aber sicherlich eine psychische Ursache zu vermuten. Daher wird es nach STAUBER (1993) immer wichtiger, dass das behandelnde Team auch bei der Bewältigung des frustrierten Kinderwunsches eine unterstützende Rolle übernimmt.

POOK et al. (1999) beschreiben sogar direkte Zusammenhänge zwischen Stressfaktoren und der Samenqualität. So sind in ihrer Untersuchung die Stressfaktoren bei denjenigen Patienten höher, die eine verschlechterte Spermienqualität bezüglich Konzentration und Motilität aufweisen, jedoch zeigt sich kein Zusammenhang zwischen abnormer Spermienmorphologie und Stressfaktoren. Eine klassische Studie beschreibt in diesem Zusammenhang deutlich verschlechterte Spermienparameter bei Männern, die auf die Vollstreckung der Todesstrafe warteten (CALDAMONE et al., 1981).

## **2.2. HISTORISCHER ÜBERBLICK**

Die Geschichte der Reproduktionsmedizin beginnt sicherlich früher, als von den meisten vermutet wird. Es gab eine Reihe von Versuchen und Experimenten, Entdeckungen und Fehlschlägen, bevor 1978 das erste „Retortenbaby“ zur Welt kam, das von vielen als der eigentliche Beginn der Reproduktionsmedizin gesehen wird.

Die Inseminationsbehandlung wurde erstmals 1770 von John HUNTER an einer Frau durchgeführt. 1838 erzielte der Franzose GIRAULT 80%ige Schwangerschaftsraten

nach homologen Inseminationen. SIMS wiederholte dies in den USA 1866 mit homologen Inseminationen während der Menstruation. 1884 wurde die erste erfolgreiche heterologe Insemination durch William PANCOAST an einer Frau vorgenommen, deren Ehemann unter Azoospermie nach einer Gonokokkeninfektion litt (MONTZKA et al., 1998).

Bereits 1880 versuchte der deutsche Biologe SCHENK (1880) Eizellen von Hasen und Schweinen in-vitro zu befruchten. Allerdings scheiterte er mit diesem Experiment. HEAPE (1891) konnte dann in England den ersten Meilenstein zur heutigen IVF-Therapie setzen, indem er einem Hasen eine befruchtete Eizelle entnahm und sie erfolgreich einem anderen Tier einsetzte. PINCUS, ROCK und MENKEN folgten dann in den 1930er Jahren mit Versuchen an von Frauen entnommenen Eizellen, von denen sie über 100 mit Spermien in-vitro zusammenbrachten. Drei davon wurden wohl erfolgreich fertilisiert, aber keine transferiert. CHANG (1959) gelang es eine IVF mit anschließendem Embryotransfer bei Hasen durchzuführen, die zu einer erfolgreichen Geburt führte (Literaturübersicht nach DIEDRICH et al., 1998).

In den 1960er Jahren begann der britische Physiologe Robert EDWARDS mit Experimenten an menschlichen Eizellen. Bereits 1970 schrieb EDWARDS über seine fortgeschrittenen Studien (EDWARDS et al., 1970), in denen er schon jetzt Vorteile zur Erklärung der Infertilität oder fetaler Abnormalitäten sah. Er sah damals schon „exzellente Chancen“ einen erfolgreichen Embryotransfer mit vollkommen normaler Entwicklung des Kindes durchzuführen, auch Frauen mit okkludierten Tuben wäre so der Kinderwunsch zu erfüllen. EDWARDS war in der Erforschung der in-vitro-Fertilisation schon recht weit, er beschrieb, dass die Eizellen zur Befruchtung in der Metaphase II sein müssten und der Samen vor der Befruchtung erst gewaschen und aufbereitet werden muss. Allerdings wurde schon früh auf EDWARDS' Versuche reagiert und postuliert, dass Infertilität schließlich ein individuelles und kein gesellschaftliches Problem sei. Außerdem bestanden schon 1971 Befürchtungen, dass das Klonen von Menschen zwar „Fantasie“ sei, aber irgendwie die Angst davor doch bestand. Es gab auch andere Forschungsgruppen, beispielsweise in den USA, die die vorher publizierten Daten in ihren Versuchen nicht reproduzieren konnten (JACOBSON et al., 1970). 1972 versuchten EDWARDS und der Gynäkologe Patrick

STEPTOE (SEITEL, 2003) einer Frau einen Embryo einzupflanzen, aber der Versuch scheiterte. Andere Gynäkologen, wie beispielsweise der deutsche Frauenarzt CARSTENSEN, beschrieben 1977 in-vitro-Versuche mit menschlichen Eizellen zum Studium immunologischer Fragen ohne die Absicht einer späteren Implantation einer befruchteten Eizelle (CARSTENSEN et al., 1977).

1977 führte ein erneuter Versuch von STEPTOE und EDWARDS zu einer Eileiterschwangerschaft, aber 1978 glückte der Transfer und endete mit der Geburt von Louise Brown am 25. Juli 1978 im nordenglischen Oldham bei Manchester (STEPTOE und EDWARDS, 1978). Die anfangs von beiden Medizinern geäußerte Hoffnung, dass hiermit eine Erfolgsgeschichte begonnen habe, konnte selbst EDWARDS 2002 auf einer Wiener Tagung nicht bestätigen, wo er sagte, dass „die künstliche Befruchtung nach wie vor ein biotechnisches Verfahren voller Unwägbarkeiten und Mängel“ sei (SEITEL, 2003). Allerdings stellten er und STEPTOE im Laufe der Zeit (EDWARDS et al., 1983) eine kontinuierliche Verbesserung der Schwangerschaftsrate nach künstlicher Befruchtung fest. Weiterhin unterzogen sie das IVF-Verfahren sorgfältigen Beobachtungen (STEPTOE et al., 1986), wie dem Alter der Patienten, vorhergehenden Erkrankungen, aber hauptsächlich Aspekten wie der Schwangerschaftsrate, der Abortanzahl, der Mehrlingsgeburtenanzahl und einigem mehr.

Relativ rasch nach der Geburt von Louise Brown begann auch die Diskussion um heterologe Inseminationen, Eizellspende und Leihmütter (CRAFT et al., 1979). Ebenso brach die ethische Diskussion und der Ruf nach gesetzlichen Regelungen auf (ANNAS, 1985; GILL, 1985). Direkt nach dem ersten „Retortenbaby“ wurde in wissenschaftlichen Zeitschriften die Vorgehensweise von STEPTOE und EDWARDS kritisiert, ihnen Kommerzialisierung vorgeworfen. Ehemalige Schüler von EDWARDS berichteten von 15 bis 20 fehlgeschlagen früheren Versuchen. Dies warf die Frage auf, ob diese erste erfolgreiche IVF-Schwangerschaft ein Zufall oder ob dies ein neues, sicheres, wiederholbares Verfahren zur Behandlung einer Infertilität war (KOLATA, 1978).

In Deutschland wurde erst 1982 das erste Baby nach einer künstlichen Befruchtung in Erlangen geboren.

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) setzte sich schließlich gegenüber vorher ähnlich versuchten Verfahren, wie zum Beispiel die partielle Zonadisektion,

durch (KÜPKER et al., 1998). LANZENDORF et al. (1988) konnten erste Erfolge nach Injektion eines Spermatozoons in die Eizelle vorweisen. Letztlich erzielten PALERMO et al. 1992 eine erfolgreich ausgetragene Behandlung nach ICSI-Therapie. Die ICSI-Methode hat sich seither als Alternativmethode bewährt für Patientinnen, die nach mehrmaligen IVF-Zyklen keine erfolgreiche Befruchtung erzielt hatten. Das ICSI-Verfahren wird darüber hinaus bei schwerer männlicher Subfertilität eingesetzt (HAMMADEH, 1997).

Nicht zu vergessen ist bei den historisch bedeutsamen Entwicklungen der Reproduktionsmedizin, dass Therapieoptionen wie IVF und ICSI nur deshalb erfolgreich sein können, da sich zeitgleich neue Entwicklungen ergeben haben, wie beispielsweise die Laparoskopie, die verbesserte Ultraschalluntersuchung, Spermien- und Eizell-Aufbereitungstechniken, Hormontherapien und die Mikrochirurgie. Eine detaillierte Übersicht über fünfzig Jahre reproduktionsmedizinische Forschung liefern CHEN und WALLACH (1994).

### **2.3. URSACHEN VON FERTILITÄTSSTÖRUNGEN**

Im folgenden werden kurz und schematisch die Ursachen von Fertilitätsstörungen, insbesondere die der männlichen, skizziert.

#### **2.3.1. URSACHEN MÄNNLICHER FERTILITÄTSSTÖRUNGEN**

Sowohl SCHILL et al. (1998) als auch HOFMANN (1998) differenzieren bei den Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen zwischen primären und sekundären Hodenschäden, extratestikulären genitalen Störungen, Arzneimittelnebenwirkungen, immunologischen und psychosozialen Ursachen sowie der Impotentia coeundi und der idiopathischen Infertilität.

LUDWIG et al. (1997) sehen als Hauptursache männlicher Fertilitätsstörungen den Malescensus testis, den idiopathischen hypogonadotropen Hypogonadismus, das Klinefelter-Syndrom, die große Gruppe der erektilen Dysfunktion, die verschiedenste ätiologische Möglichkeiten und Risikofaktoren aufweist, und schließlich

Penisverkrümmungen während der Erektion, insbesondere im Rahmen einer Induratio penis plastica.

Bei etwa 30% der kinderlosen Ehen liegt nach TAUBERT (1998) die alleinige Sterilitätsursache beim Mann, in weiteren 20% der Fälle kommt eine männliche Fertilitätsstörung als einer von mehreren Faktoren in Betracht. TAUBERT sieht Störungen der männlichen Fertilität vor allem in einer fehlerhaften Spermio-genese oder in einer gestörten Androgensekretion begründet.

CALDAMONE et al. (1981) verweisen auf die sehr gründliche andrologische Anamnese, die körperliche Untersuchung sowie die Samenanalyse als Grundlage für die männliche Fertilitätsdiagnostik. Als Hauptursachen für männliche Fertilitätsstörungen sehen sie die Varikozele, Samenveränderungen, sexuelle Dysfunktion, Genitaltraktinfektionen, Diabetes mellitus, Kryptorchismus, endokrinologische und chromosomale Aberrationen sowie als multifaktorielle Ursachen das Alter, die Ernährung, Stress und emotionales Befinden, Hitze- und Bestrahlungsschäden.

Als wichtige Krankheitsbilder im Zusammenhang mit männlicher Infertilität gelten nach BALS-PRATSCH et al. (1998) Erkrankungen im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse, Lageanomalien der Testes, Varikozele, Hydrozele, Entzündungen oder Traumata im Bereich des Hodens oder Nebenhodens, Hodentumoren, exogen bedingte Spermatogenesestörungen, Störungen oder Erkrankungen im Bereich der Samenwege und des Penis.

Um sich einen Überblick über die Häufigkeit der einzelnen Ursachen der andrologisch bedingten Sub- oder Infertilität zu machen, eignet sich gut die von NIESCHLAG (1996) aufgestellte Reihung nach absteigender Häufigkeit: Idiopathische Infertilität, Varikozele, endokriner Hypogonadismus, Kryptorchismus oder Gleithoden, Störungen der Samenwege, systemische Erkrankungen, Hodentumoren, Obstruktion der Samenwege.

FORNARA et al. (1998) betonen, dass die Lebensweise des Patienten und Umwelteinflüsse wohl eine Rolle bei der Infertilität spielen, aber dass Nachweise hierzu leider noch fehlen.

Als wichtige Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen seien hier, orientierend an den Einteilungen von SCHILL et al. (1998) und HOFMANN (1998), beispielhaft erwähnt:

a) *primäre Hodenschäden:*

- angeboren:

- chromosomale Anomalien: z.B. Klinefelter-Syndrom
- Spermatozoendefekte: z.B. Globozoospermie (autosomal-rezessive Störung mit Akrosomverlust), Immotile-Cilia-Syndrom (immotile Spermatozoen bei erhaltener Vitalität)
- Missbildungssyndrome: z.B. Mukoviszidose
- Anorchie: Fehlen des Hodens
- Hodenatrophie / -hypoplasie: z.B. als Endstadium einer chronischen Orchitis
- Hodendystopie: alle Formen eines Maldescensus testis
- Germinale Aplasie: Fehlen des Keimepithels bei vorhandenen Sertoli-Zellen
- Störungen der Testosteron-Biosynthese
- Enzymmangel (z.B.  $\alpha$ -Reductase-Mangel) oder Androgen-Rezeptordefekte

- erworben:

- Tubulusinsuffizienz: aufgrund Infektionen, Intoxikationen, Traumen, Wärmeschäden, ionisierenden Strahlen, Hypoxämie, Durchblutungs- oder Ernährungsstörungen, Medikamente
- Hodentumoren: Seminom, Teratokarzinom, Chorionepitheliom
- Leydigzell-Insuffizienz (erniedrigte Fructosewerte im Seminalplasma)
- Kombinierte Tubulus- und Leydigzellinsuffizienz: z.B. durch chemische Kastration

b) *sekundäre Hodenschäden:* (Beispiele)

- idiopathischer hypogonadotroper Hypogonadismus

- Pubertas tarda
- Hypophysenadenome
- ZNS-Infektionen
- Schädeltrauma
- Sarkoidose

c) *extratestikuläre genitale Störungen:*

- Verschlüsse der ableitenden Samenwege („Verschlussazoospermie“): Verschlüsse in Ductuli efferentes, im Nebenhoden, im Samenleiter oder im Ductus ejaculatorii
- Störungen der Funktionen von Nebenhoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen: meist durch postinflammatorische Prozesse bedingt
- Transport- und Entleerungsstörungen: Aspermie (angeborene und erworbene Ursachen)
- Pathologisch-anatomische Veränderungen der Genitalorgane:
  - Induratio penis plastica (IPP): Schwellkörperfibrosierung
  - Kongenitale Penisdeviationen
  - Varikozele: pathologische Erweiterung des Plexus pampiniformis bei insuffizienten Klappen der Vena spermatica interna (bei 20% der Männer; linksseitig) > durch erhöhten Blutfluss kommt es zur Störung der Spermiogenese.

d) *Arzneimittelnebenwirkungen:*

- Beeinflussung des männlichen Sexualverhaltens durch Arzneimittel: z.B. Hormone, Neuroleptika, Antihypertensiva, Beta-Blocker
- Arzneimittelnebenwirkungen auf die männliche Fertilität: Hormone, Hormonantagonisten, Motilitätshemmende Medikamente, antispermatogene Substanzen, Spermatozoentransport-hemmende Substanzen

e) *immunologische Ursachen:*

- Autoantikörper gegen Spermatozoenantigene: behindern Eindringen der Spermatozoen in den Zervikalmukus

f) *psychosoziale Ursachen:*  
siehe unter 2.1.3.

g) *Impotentia coeundi:* (erektile Dysfunktion)

- organische Ursachen: vaskulär, neurogen, lokal
- psychogene Ursachen
- endokrinologische Ursachen
- Medikamente

h) *Infertilität ohne nachweisbare Ursache:*

Fällt unter den Begriff „idiopathische Sterilität“.

### **2.3.2. URSACHEN WEIBLICHER FERTILITÄTSSTÖRUNGEN**

Nach TAUBERT (1998) sind Sterilitätsursachen zu 50% bei der Frau, zu 30% beim Mann und in 20% bei beiden Partnern zu suchen. Da sich die vorliegende Studie in erster Linie mit andrologischen Aspekten beschäftigt, wird hier nur kurz auf Ursachen weiblicher Fertilitätsursachen eingegangen.

Zu den Hauptursachen der weiblichen Sterilität gehören Zyklusstörungen wie Anovulation und Corpus-luteum-Insuffizienz, Hormonstörungen (z.B. adrenogenitales Syndrom, Hypothyreose, Hyperprolaktinämie), zervikale Sterilität, Uterushypoplasien, Endometriose, Eileitersterilität, Tumore, Lageanomalien, polyzystische Ovarien (TAUBERT, 1998). Hierzu sind, analog der Abklärung der männlichen Fertilität, sorgfältige Anamnese, Untersuchung und spezielle Testverfahren unabdingbar.

Bei 10 bis 15% der ungewollt kinderlosen Paare spielt laut MALLMANN (1998) immunologische Aspekte eine Rolle. Diese umfassen Autoantikörper gegen das Ovar und die Oozyten, Antikörper gegen Spermatozoen (im Zervikalmukus um im Serum), Antikörper gegen fetale Antigene. Vermutlich spielen in erster Linie Antiphospholipid-

Antikörper eine Rolle, die bei bis zu 20% bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und bei bis zu 5% bei Frauen mit ungeklärter idiopathischer Sterilität zu finden sind. Insofern könnte man auch Zusammenhänge zwischen Autoimmunerkrankungen und ungeklärter Sterilität vermuten, jedoch ist dies noch unklar.

Neben psychogenen Ursachen der Infertilität (KOWALCEK et al. 1998) werden auch Umweltfaktoren beschuldigt an der reduzierten Fertilität von Frauen beteiligt zu sein (HANF, 1998). Neben einigen aus der Arbeitsmedizin bekannten Chemikalien mit fruchtbarkeitsschädigender Wirkung (z.B. Bleiverbindungen, Nitrobenzol) werden auch folgenden Umweltfaktoren fertilitätsminderndes Potential zugeschrieben: radioaktive Strahlung, Nikotinabusus, „Freizeitdrogen“ (vor allem Cannabiskonsum), Äthylalkoholabusus, koffeinhaltige Getränke. Unklar beziehungsweise schwer bewertbar hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Fertilität sind Substanzgruppen wie Bleiverbindungen, Amalgamquecksilber, Kadmium, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und viele weitere (HANF, 1998).

## **2.4. PHYSIOLOGIE DER SPERMATOGENESE UND DER BEFRUCHTUNG**

Dieses Kapitel beschreibt zum Verständnis der später dargestellten pathophysiologischen Zusammenhänge die Physiologie der Spermatogenese und des Befruchtungsvorgangs. Aufgrund der Ausrichtung dieser Studie auf andrologische Aspekte wird auf die Schilderung der Oogenese verzichtet.

### **2.4.1. PHYSIOLOGIE DER SPERMATOGENESE**

Um die Spermatogenese (KÜPKER et al., 1998; SCHILL et al., 1998) zu erklären, muss man sich zunächst den Aufbau des Hodens verdeutlichen. Er besteht aus zwei Kompartimenten, dem Tubuluskompartiment mit den keimepitheltragenden Tubuli seminiferi und dem Leydig-Zell-Kompartiment.

Die Tubuli laufen auf das Rete testis zu und sind mit den Ductuli efferentes und somit dem Nebenhoden verbunden. Das Leydig-Zell-Kompartiment, das mit dem

Tubuluskompartiment eng verknüpft ist, übernimmt die Aufgabe der Testosteronbiosynthese.

Die Tubuli sind von kontraktile peritubulären Zellen umgeben, die Sekrete und die Spermatozoen in den Nebenhoden transportieren. Im Tubuluslumen befinden sich die Sertoli-Zellen, die eine wesentliche Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung der Spermatogenese (Aufrechterhaltung der Blut-Testis-Schranke, Phagozytoseeigenschaften, Synthese verschiedener Stoffwechselprodukte) spielen.

Das Keimepithel enthält die verschiedenen Stadien der Spermatogenese (A- und B-Spermatogonien, Spermatozyten I. und II. Ordnung, frühe und späte Spermatisden). Es erfolgen zwei Reifungsteilungen zur Reduktion des diploiden auf einen haploiden Chromosomensatz. Während der Spermatogenese vollzieht sich eine Kerndekondensation und Differenzierung des Akrosoms und des Geißelapparates. Am Ende dieses Prozesses steht die Spermatisde, die dann das Keimepithel verlässt (Spermiation).

Die Dauer des Prozesses bis zur Spermiation beträgt 74 Tage, danach folgt die Nebenhodenpassage. Insgesamt dauert es circa 90 Tage von der Entwicklung bis zur Ejakulation des ausgereiften Spermatozoons.

Nach der Spermiation gelangen die Spermatozoen in den Nebenhoden, der als Reifungs- und Speicherorgan dient. Der Reifungsprozess im Nebenhoden ist komplex und bewirkt eine Reihe von Veränderungen an den Spermatozoen, die dazu führen, dass sie ihre Progressivmotilität und Befruchtungsfähigkeit erlangen. Solche Veränderungen sind beispielsweise Veränderung von Membranstrukturen, zunehmende Kernkondensation, Rezeptorenausbildung und vieles mehr. Im Nebenhodenschwanz werden die Spermatozoen bis zur Emission gespeichert.

Die Steuerung der Spermatogenese erfolgt über hormonelle Mechanismen wie die intratestikuläre Hormonproduktion und die Achse Hypothalamus- Hypophyse- Gonadensystem. Die Regulation erfolgt über einen negativen Feedback-Mechanismus. An der Regulation wirken folgende Hormone in der Hauptsache mit: Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH, Hypothalamus), follikelstimulierendes Hormon für die Spermatogenese (FSH, Hypophysenvorderlappen), luteinisierendes Hormon zur Steroidogenese (LH, Hypophysenvorderlappen), Testosteron, Dihydrotestosteron, Östradiol (Gonadensystem).

Bei der Zusammensetzung des Ejakulates spielen die sogenannten akzessorischen Geschlechtsdrüsen eine weitere wichtige Rolle: Die Bläschendrüsen sezernieren

circa 60% des Ejakulatvolumens. Ihr Anteil ist alkalisch und enthält bestimmte Sekretionsprodukte wie Fructose und Prostaglandine. Das Prostatasekret ist sauer und hat einen Anteil von circa 30% am Seminalplasma. Es enthält Enzyme, Zink, Magnesium, Zitrat und Lysozym. Ihm wird eine große Rolle bei der normalen Spermienmotilität zugeschrieben.

Der Aufbau des Spermatozoons besteht aus einem längs-ovalen Kopf (Breite: 3-5  $\mu\text{m}$ ) und einem axial verlaufendem Schwanz (Länge: circa 50  $\mu\text{m}$ ). Der Kopf wird von zu zwei Dritteln von einer bläschenförmigen Kuppe bedeckt, die zwischen der Plasmamembran und der äußeren und inneren akrosomalen Membran verschiedene Enzyme enthält. Am Flagellum unterscheidet man Halsstück (1  $\mu\text{m}$ ), Mittelstück (3,5 bis 5,0  $\mu\text{m}$ ), Hauptstück (44 bis 50  $\mu\text{m}$ ) und Endstück (6 bis 10  $\mu\text{m}$ ). Im Mittelstück befinden sich die Mitochondrien, die die „Motilitätsenergie“ liefern. An der äußeren Membran der Mitochondrien befinden sich Selen und Zink, die einen wesentlichen Beitrag zum Schutz vor oxidativer Zerstörung haben.

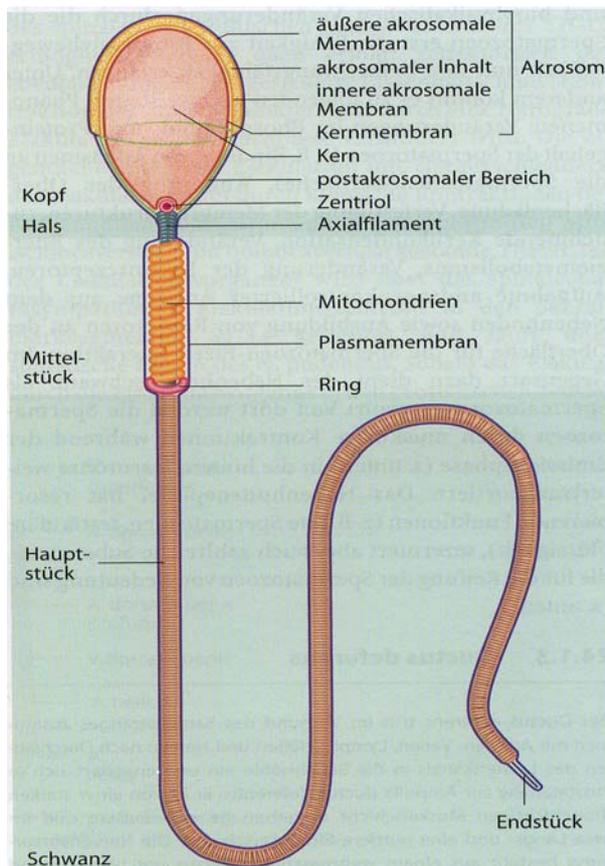


Abbildung 1: Aufbau eines Spermatozoons

## 2.4.2. PHYSIOLOGIE DER BEFRUCHTUNG

Der Befruchtungsvorgang läuft physiologischerweise wie folgt ab (KÜPKER et al., 1998; SCHILL et al., 1998; SCHMIDT-MATTHIESEN, 1998): Nach Ejakulation des Spermas in den weiblichen Genitaltrakt kommt es nach bis zu 30 Minuten zur Verflüssigung. Durch Interaktion der Spermatozoen mit dem seminalen Plasma wird den Spermien zunächst ihre Befruchtungsfähigkeit genommen (durch den Dekapazitationsfaktor), sie erhalten sie durch Ablösung des Faktors bei der weiteren Durchwanderung des weiblichen Genitaltraktes wieder zurück.

Im weiblichen Genitaltrakt gibt es gleich zwei Barrieren für die Spermatozoen: Zum einen die Zervixbarriere (alkalischer Mukus, lässt nur periovulatorisch Spermatozoen passieren), zum anderen die intrauterine leukozytäre Phagozytose. Daraus folgt, dass nur etwa jede 100.000ste Spermatozoe überhaupt die Tube erreicht. Dort sind jedoch 100 bis 200 Spermatozoen für eine erfolgreiche Befruchtung nötig. Der Zervixmucus dient als Spermatozoenreservoir und ist gleichzeitig Filterorgan für Fehlformen.

Nach der Kapazitation der Spermatozoen während der intrauterinen Migration, also der Lösung des Dekapazitationsfaktors, durch diese die Spermatozoen eine hyperaktivierte Motilität erlangen, kommt es zu komplexen Reaktionen im Bereich der akrosomalen Membranen des Spermienkopfes („akrosomale Reaktion“): Zunächst kommt es zu einer Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran (Vesikulation). Dadurch dringen akrosomale Enzyme aus, die wiederum die Penetration der Zona pellucida der Eizelle ermöglichen.

Die Enzyme des Akrosoms, die erforderlich sind, um die drei Eihüllen (Zona pellucida, Corona radiata, Cumulus oophorus) zu durchdringen, sind im wesentlichen das Akrosin, das Schlüsselenzym zur Penetration der Zona pellucida, und die Hyaluronidase, die die Interzellularbrücken des Cumulus oophorus dispersiert. Die Regulation dieser Reaktionen unterliegt Inhibitoren des Akrosoms und des Seminalplasmas. Während des Reaktionsvorganges werden mehr als vierzehn Proteine phosphoryliert (KÜPKER et al., 1998).

Die Kapazitation und Akrosomreaktion dauern circa zwei Stunden, der Penetrationsvorgang durch die Zona pellucida etwa eine weitere Stunde.

Nach geradliniger Penetration der Zona pellucida kommt es zur Verschmelzung der postakrosomalen Membran der Spermatozoe mit der Zellmembran der Eizelle (Imprägnation). Durch Exozytose kortikaler Granula, die in der Region der Fusion beginnt, werden keine weiteren Spermatozoen in die Oozyte hineingelassen

(„Polyspermieblock“). Anschließend kommt es, wahrscheinlich ausgelöst durch einen Proteinstimulus, zur Aktivierung der Oozyte (SWANN, 1993). Hiernach wird nach der Fusion mit dem Spermatozoon der zweite Polarkörper ausgeschleust. Im Spermatozoonkopf beginnt circa eine Stunde nach Penetration der Zona pellucida die Dekondensation durch Reduktion von Disulphidbrücken zwischen den Protaminen, die durch Histone ersetzt werden. Gleichzeitig zur Ausbildung des männlichen Pronukleus dekondensiert auch das maternale Chromatin unter Ausbildung des weiblichen Pronukleus. Nach Verschmelzung der Kerne (Konjugation), unter Kondensation der männlichen und weiblichen Chromosomen, zu einer Zygote ist der Befruchtungsvorgang abgeschlossen.

## **2.5.-2.9. ÜBERBLICK ZU DEN UNTERSUCHTEN ANDROLOGISCHEN PARAMETERN**

Die nachfolgenden Kapitel beschäftigen sich kurz mit den gemessenen Parametern und ihrer Bedeutung in der andrologischen Fertilitätsdiagnostik. Weiterhin wird auf die Wirkungen der einzelnen Parameter kurz eingegangen.

Weitere Bedeutung der Parameter und ihrer Wirkung wird hauptsächlich in der Diskussion abgehandelt (siehe 5.).

### **2.5. KLASSISCHE SAMENANALYSE**

Zur klassischen Samenanalyse gehört die Erstellung eines Spermioграмms mit Bestimmung von Probenvolumen, pH-Wert, Leukozytenzahl, Viskosität, Spermiedichte, Motilität, weiterhin der Eosin- und HOS-Test, der MAR-Test sowie die Ermittlung der Spermienmorphologie.

Zur Beurteilung des Spermioграмms gibt es eine festgelegte Nomenklatur (KÖHN et al., 2002):

Nomenklatur	Begriffserklärung
Normozoospermie	Normale Ejakulatparameter
Oligozoospermie	Reduzierte Spermienkonzentration
Asthenozoospermie	Reduzierte Motilität

Teratozoospermie	Reduzierter Anteil von Spermien mit normaler Morphologie
Oligoasthenoteratospermie (OAT-Syndrom)	Kombination aus Oligozoospermie, Asthenozoospermie und Teratozoospermie
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Ejakulat nach Zentrifugation
Aspermie	Kein Ejakulat

Als Normalwerte in einem Spermogramm gelten nach WHO (1999):

Parameter	Normalbefund
Volumen	≥ 2 ml
pH-Wert	≥ 7,2
Leukozytenzahl	≤ 1x10 <sup>6</sup> /ml
Spermatozonenkonzentration (Dichte)	≥ 20x10 <sup>6</sup> /ml
Gesamtzahl an Spermatozoen	≥ 40x10 <sup>6</sup>
Motilität	≥ 50% (WHO-Kategorien a und b) oder ≥ 25% (WHO-Kategorie a)
Anzahl vitaler Spermatozoen (Eosin- / HOS-Test)	≥ 50%

OHL et al. (1996) sehen eine normale Spermienfunktion als Grundvoraussetzung, um die „Hindernisse“ des weiblichen Genitaltrakts zu überstehen. Daher ist und bleibt die klassische Samenanalyse der Eckpunkt jeder Samenfunktionsbestimmung. Dies ist im Rahmen von Fertilitätsuntersuchungen unabdingbar, da die Spermogrammwerte schon recht gut Aufschluss darüber geben können, welche weiteren Untersuchungen von Nöten sind oder welche künstliche Befruchtungsmethode am besten anzuwenden ist. Des weiteren dient die klassische Samenanalyse neben der Beurteilung des männlichen Fertilitätsstatus auch zur Bewertung der funktionellen Situation der Drüsenorgane des Reproduktionstraktes (BANDHAUER et al., 1970). Allerdings bedeuten die angegebenen Normwerte eines Spermogramms zwar eine prognostische Einschätzung, aber keine definitive Beurteilung der Zeugungsfähigkeit des Mannes (mit Ausnahme der Azoospermie und

Aspermie), denn auch bei Männern mit schlechteren Spermioigrammparametern bestehen dennoch noch eventuell gute Konzeptionschancen (THIEL et al., 1983).

Es wird beschrieben, dass die männliche Samenqualität immer schlechter geworden ist und werden wird. AITKEN et al. (2003) beschreiben selbst bei Ejakulaten von normalen fertilen Männern 85% abnormale Spermienformen. Es gab immer wieder Streitpunkte, ob es wirklich in den letzten Jahrzehnten zu einem Verlust von Samenqualität, insbesondere der Spermienanzahl und –dichte, gekommen ist. So stellten CARLSEN et al. (1992) einen 50%igen Abfall der Spermiedichte zwischen 1938 und 1990 fest. Diese Studie löste Diskussionen aus, ob es nicht vielleicht an den moderneren Untersuchungsmethoden liegen könnte, dass die Spermioigrammparameterwerte schlechter geworden sind, jedoch bestätigten auch folgende Studien den Trend der schlechter werdenden Samenqualität (SWAN et al., 1999). Untersuchungen über mehrere Jahrzehnte zeigten vor allem eine verminderte Anzahl an morphologisch normalen Spermatozoen, aber auch einen leichten Rückgang des Samenvolumens (ANDOLZ et al., 1998). Hingegen stellte DEICHMANN (1976) eine Konstanz der Samenqualität über mehrere Jahre fest und sogar eine steigende Spermiedichte mit zunehmendem Alter der Patienten, was nicht erklärt werden konnte.

## **2.6. CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS**

Wie bereits unter 2.4. zum Teil schon beschrieben, durchläuft der Kern im Spermatozoonkopf verschiedene Kondensationsstufen des Chromatins: Auf dem Weg vom Hoden zum Nebenhoden kommt es zu einer zunehmenden Kernkondensation. Nach Penetration der Zona pellucida der weiblichen Eizelle kommt es zur Dekondensation, bevor es dann nach Verschmelzung der männlichen und weiblichen Kerne zu einer Zygote zu einer erneuten Kondensation kommt.

DADOUNE (1995) beschreibt genau den Aufbau und die Veränderungen im Spermienkopf während der Spermatogenese und der Fertilisation: Ungefähr in der Mitte der Spermatogenese finden entscheidende Schritte im Spermienkern statt. Der Kern durchläuft dabei Stufen von fein granuliertem Karyoplasma bis hin zum dicht kondensierten Chromatin. Dabei wird der das Chromatin zunehmend kondensiert

und heterogener. Zunächst ist das Chromatin hauptsächlich an Histone, basische Proteine, gebunden. Im weiteren Verlauf der Spermatogenese werden diese zum Großteil zunächst durch Spermatiden-spezifische Transitionsproteine, eine Art Zwischenstufe, dann schließlich durch Protamine, die eigentlich hauptsächlich basischen Proteine der reifen Spermatozoen, ersetzt. Allerdings verbleibt ein kleiner Anteil, der nicht durch Protamine ersetzt wird; circa 15 % der DNA bleibt an Histone gebunden (WYKES et al., 2003). Wahrscheinlich spielt dieses Arrangement nicht nur eine Rolle bei der dreidimensionalen Kernstruktur, sondern auch für die korrekte Weitergabe der genetischen Informationen und die ordnungsgemäße Spermienfunktion.

Bei den Protaminen gibt es im wesentlichen zwei Hauptgruppen, P1 und P2, wobei P2-Protamine nur noch in wenigen anderen Säugetier-Spermien zu finden sind. Während des Bindungsvorganges der Protamine werden diese zunächst phosphoryliert, was wohl zu einer korrekten Bindung der Protamine beiträgt, und anschließend wieder dephosphoryliert, was wiederum zu einem Anstieg der Chromatinkondensation führt. Die Protamine binden sich hierbei nicht nur an die DNA, sondern auch untereinander über Disulphidbrücken. Auf der Passage der Spermatozoen vom Hoden zum Nebenhoden (siehe hierzu auch 2.4.) stabilisiert sich die Chromatinkondensation weiter, was wiederum abhängig von der Zahl der Disulphidbrücken zu sein scheint. Diese Stabilisierung des Chromatins trägt entscheidend zum erfolgreichen Transport des männlichen Genoms im weiblichen Genitaltrakt bei.

Eine weitere entscheidende Rolle zur Stabilität des Chromatins scheint in diesem Prozess auch Zink zu spielen (siehe auch 2.9.), das sich an die Protamine bindet und eine frühzeitige Dekondensation verhindert. Eine frühzeitige Dekondensation beziehungsweise eine fehlende Kondensation des Chromatins, also eine Störung der DNA-Integrität, scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Fertilität des Mannes zu haben (AGARWAL et al., 2003). Eine fehlerhafte DNA-Verpackung könnte durch fehlerhafte Protamination oder DNA-Brüche erklärt werden (SPANO et al., 2000). Außerdem könnte es sein, dass Fehler bei der Chromatinkondensation schlechtere Fertilisationsraten bei morphologisch normalen Spermatozoen erklären können (HAMMADEH et al., 1998). Allerdings werden fehlerhafte Chromatinkondensationen in erster Linie in Spermien mit defektem Akrosom oder in hyperelongierten Formen, nur in 20% bei normalen Spermatozoen gefunden (HAIDL, 1994). Weiterhin ist mit

unzureichend kondensiertem Chromatin eine Befruchtung möglich, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es hierdurch zu einer Verschlechterung der Entwicklung in der frühen Phase der Zygotenentwicklung kommen kann (DADOUNE, 1995).

## **2.7. APOPTOSE BEI SPERMATOZOEN**

Apoptose, also spontaner programmierter Zelltod, hat auch bei der Beurteilung der Ursachen von Sub- oder Infertilität an Bedeutung gewonnen. So scheint es sicher, dass selektiver Spermatozoen-Zelltod auch eine Komponente der normalen Spermatogenese ist (KIM et al., 2002). Allerdings scheint Apoptose nicht nur ein normaler Prozess innerhalb der regulären Spermatogenese zu sein, sondern ist wohl auch klar assoziiert mit der männlichen Sub- oder Infertilität (SHEN et al., 2002). So ist der Anteil an apoptotischen Zellen bei Männern mit Azoospermie oder schwerer Oligozoospermie erhöht gegenüber normalen Populationen. Außerdem gelten eine erhöhte Anzahl an nachgewiesenen DNA-Strangbrüchen, beispielsweise durch die TUNEL-Färbemethode (siehe 3.4.1.), als ein Hauptbeweis für stattgefundene Apoptose. SHEN et al. (2002) identifizierten zwei Phasen von Apoptose, zum einen die frühe, zum anderen die späte Phase, wobei die DNA-Fragmentation wohl eher in der späten Apoptosephase abläuft. Sie postulieren, dass die Apoptose als Hauptgrund für DNA-Schäden bei subfertilen Männern verantwortlich ist, neben zwei anderen möglichen Gründen, nämlich dem oxidativen Stress (siehe hierzu auch 2.8.) und der inkorrekten Verpackung der DNA durch das Chromatin (siehe 2.6.). SHEN et al. erklären die erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen bei Subfertilen damit, dass anscheinend bei diesen Patienten mehr Spermatozoen als normalerweise markiert werden, um einen programmierten Zelltod zu vollziehen (Prinzip der vorzeitigen Apoptose).

Die DNA-Fragmentation, wie oben schon erwähnt, scheint also in einer späten Phase des Reifungsprozesses zu geschehen, also kurz vor oder nach der Ejakulation. Eine hohe Rate von Schäden an der DNA steht also wahrscheinlich auch direkt im Zusammenhang mit verminderten Spermienkonzentrationen (OOSTERHUIS et al., 2000).

Der irreguläre Chromatinstatus und die Anzahl an DNA-Strangbrüchen stehen auch in einem direkten Zusammenhang (SAKKAS et al., 2002). Die Strangbrüche umfassen sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche. SAKKAS et al. gehen von zwei Theorien zu den DNA-Schäden aus: Zum einen gibt es endogene Marker, die „eingreifen“ können, wenn die Chromatinkondensation unvollständig abläuft, die aber auch während der Protamination des Chromatins helfen können, dass dieses korrekt rearrangiert wird. Zum anderen erklären sie sich die vorhandenen DNA-Schäden in den Spermien mit Apoptoseinduktion in den Spermatozoen. Es wird vermutet, dass es eine Population von Spermien mit DNA-Schäden gibt, die dem programmierten Zelltod entgehen konnten, die aber weiterhin apoptotische Marker aufweisen, und die höchstwahrscheinlich auch mit Fehlern in der Chromatinentwicklung assoziiert sind.

Auch HOST et al. (1999) zeigten, dass bei Männern mit idiopathischer Infertilität eine höhere Anzahl an DNA-Strangbrüchen vorlag als bei normal fertilen Männern. Sie machten hierfür auch zum einen eine Steigerung der Apoptoserate verantwortlich, zum anderen aber auch das Einwirken von Sauerstoffradikalen. Außerdem könnten DNA-Schäden auch noch später ausgelöst werden, beispielsweise wenn die Spermatozoen-DNA nur partiell apoptotisch ist, aber weiterhin zur Befruchtung fähig ist. Dann könnten die Strangbrüche erst nach Verschmelzung mit der Oozyte wirksam werden.

Interessanterweise stellten SINGH et al. (2003) einen Zusammenhang zwischen Apoptoseraten und dem Alter der Männer her. Die Studie zeigte eine klare Zunahme der DNA-Strangbrüche mit dem Alter, allerdings einen Rückgang der Apoptoseraten. Daraus ist zu folgern, dass mit zunehmendem Alter des Mannes die physiologischen Selektionsprozesse – wie hier durch Apoptose – weniger werden.

## **2.8. WIRKUNG VON OXIDANTIEN IM MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSTRAKT**

In der Betrachtung der Ursachen für eine männliche In- oder Subfertilität spielt die Konzentration von Oxidantien im Seminalplasma eine entscheidende Rolle. Diese Stoffe fasst man in der Andrologie unter dem Begriff „reactive oxygen species“,

abgekürzt ROS, zusammen, deren Einfluss auf die menschliche Spermienfunktion hier kurz erläutert werden soll.

Zu ROS zählt man freie Radikale, welche eine oder mehrere unpaarige Elektronen enthalten. Als wichtige Beispiele sind anzuführen (SANOCKA et al., 2004): Hydroxylradikale ( $\text{OH}\cdot$ ), Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) - die wohl die Hauptgruppe von ROS im menschlichen Sperma sind (ZALATA et al., 1995) - , Peroxide ( $\text{ROOH}$ ), Peroxidradikale ( $\text{ROO}\cdot$ ), Stickstoffoxid ( $\text{NO}\cdot$ ) oder Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2\cdot$ ). Solche Radikale entstehen im menschlichen Organismus durch vielfältige Mechanismen wie Ionisation, Induktion durch Entzündungszellen, Aktivierung von Oxidasen / Oxigenasen oder durch Verlust der antioxidativen Kapazität (siehe hierzu 2.9.). Zellen, die eine ROS-Produktion induzieren und ROS produzieren können, sind Endothelzellen, mesangiale Zellen, Fibroblasten, Schilddrüsenzellen, Leydig-Zellen, EBV-transformierte B-Lymphozyten, Adipozyten, Tumorzellen und Oozyten (AITKEN et al., 1994). Schon 1946 wurde festgestellt, dass menschliche Spermatozoen ROS produzieren und weitergeben können. Lange wurde auch vermutet, dass ROS nur Produkt eines Entzündungsprozesses sei und nicht auch „de novo“ synthetisiert werde (HAIDL, 1994). Es ist aber in der Tat so, dass die Hauptquellen von ROS Leukozyten (ZALATA et al., 1995), auch bei normalen Konzentrationen, und unreife Spermatozoen sind (GARRIDO et al., 2004). Also gilt es weiterhin, dass ROS besonders bei Genitaltraktinfektionen vermehrt produziert wird, aber dies ist eben nicht der alleinige Grund für erhöhte ROS-Werte im Sperma. Ebenso sind Fälle von immunologisch bedingter Infertilität auch an erhöhte ROS-Konzentrationen gekoppelt (ZALATA et al., 1995).

ROS greift, in Bezug auf Spermatozoen, in erster Linie die Membran dieser an. Die Plasmadoppelmembran von Spermatozoen besteht hauptsächlich aus Lipiden, wie Phospholipide, Sterole, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren. Diese Lipide in der Membran sind hauptverantwortlich für den flüssigen Zustand der Membran. Des Weiteren übernehmen diese Lipide wichtige Aufgaben während der Spermatogenese, der Akrosomreaktion und dem Befruchtungsvorgang. Daraus folgt, dass Störungen in dieser Membran auch Störungen dieser Vorgänge nach sich ziehen (GARRIDO et al., 2004; SANOCKA et al., 2004).

Durch ROS kommt es zur sogenannten Lipidperoxidation, eine Reaktion an der Spermatozoenmembran, die hierdurch ihre Integrität und ihre Funktion verliert. Diese Peroxidation verläuft in zwei Schritten, erstens der Initiation, bei der ein Wasserstoffatom einer ungesättigten Fettsäure, die besonders „verwundbar“ für einen solchen Angriff ist, von ROS weggenommen wird („Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion“; AITKEN et al., 1994), und zweitens der Vermehrung, die zunächst aus der Formation eines Lipidalkylradikals besteht und dann in einer schnellen Reaktion mit Sauerstoff in einem Lipidperoxidradikal endet.

Die Lipidperoxidation verschlechtert die Membranfunktionen, inaktiviert Enzyme und Rezeptoren und vieles mehr. Hohe ROS-Konzentration, oder auch normale ROS-Konzentrationen bei Verlust von antioxidativen Schutzmechanismen (GARRIDO et al., 2004), können diese Lipidperoxidation induzieren und so letztendlich zum Zelltod führen. Ebenso kommt es durch ROS zu Störungen der Spermatogenese, die durch ROS-induzierte Schäden an der DNA zu verminderter Spermienmotilität und verminderter Fertilisationsfähigkeit führen können. Diese durch ROS verursachten DNA-Schäden können wohl auch den Prozess der Apoptose (siehe 2.7.) beschleunigen (AGARWAL et al., 2003). So ist es auch erklärbar, dass hohe Konzentrationen von Radikalen vor allem bei Männern mit Asthenozoospermie gefunden wurden (DANDEKAR et al., 2002). Es wird auch angenommen, dass die Höhe der ROS-Konzentration von Umweltfaktoren abhängig ist. Dies herauszufinden hat bei der Beurteilung der ROS-Konzentration entscheidende Bedeutung, da ROS nicht nur an der Induktion von DNA-Schäden beteiligt ist, sondern wohl auch eine wichtige Rolle bei genetischen Erkrankungen und Krebsleiden zu spielen scheint (AITKEN et al., 2003).

Allerdings nimmt ROS auch physiologische Funktionen im Spermienzellmetabolismus wahr. In erster Linie spielen hier die Radikale eine Rolle bei der Signaltransduktion, bei der Regulierung von Genen und zellulärem Wachstum, bei der Regulierung des Vasotonus und bei der antimikrobiellen Immunabwehr. Bei normal fertilen Männern wird davon ausgegangen, dass geringe Mengen an ROS physiologischerweise produziert werden (AITKEN et al., 1994). Hierfür wurden auch schon Referenzwerte gefunden (SHEKARRIZ et al., 1995).

## **2.9. WIRKUNG VON ANTIOXIDANTIEN IM MÄNNLICHEN REPRODUKTIONSTRAKT**

Den Oxidantien (siehe 2.8.) gegenüber gestellt werden müssen die Antioxidantien im Seminalplasma, von denen es viele verschiedene Stoffe gibt. So sind dies wichtige Enzyme, wie beispielsweise Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reductase und Katalase, aber auch nicht-enzymatische Stoffe wie Taurin, Hypotaurin, Pyruvat, Laktat, Ferritin und einige mehr (GARRIDO et al., 2004). Hier wird auf die im Rahmen dieser Studie betrachteten Parameter mit antioxidativer Wirkung eingegangen, nämlich den totalen Antioxidantienstatus, Vitamin E, Selen und Zink.

### **2.9.1. TOTALER ANTIOXIDANTIEN-STATUS**

Der totale Antioxidantien-Status (total antioxidant status, TAS) umfasst alle nicht-enzymatischen Antioxidantien im menschlichen Seminalplasma (SMITH et al., 1996). Die Antioxidantien wirken den durch ROS (siehe 2.8.) verursachten Schäden entgegen. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit und Wirkung von im seminalen Plasma befindlichen Antioxidantien die Höhe der ROS-Konzentration senkt. Vor allen Dingen hat dies Bedeutung in der Beurteilung von andrologisch bedingter Sub- oder Infertilität, da eine hohe Antioxidantienkonzentration eher bei fertilen Männern zu finden ist, und analog eine niedrige TAS-Konzentration bei infertilen Männern, besonders bei jenen mit herabgesetzten Motilitätswerten (SMITH et al., 1996) und / oder schlechteren Morphologiewerten (KOCA et al., 2003).

Ebenso erscheint es sinnvoller diesen Gesamt-Antioxidantien-Status zu erfassen als jedes Antioxidanz für sich, denn diese Messung berücksichtigt hiermit schließlich auch das Zusammenspiel der einzelnen Antioxidantien (SMITH et al., 1996). Auch wird postuliert, dass die Bestimmung des TAS und der ROS zusammen einen berechneten Wert ergeben (ROS-TAS-Score), der zur Beurteilung von fertilen versus

sub- oder infertilen Männern besser geeignet ist als ROS und TAS für sich alleine (SHARMA et al., 1999).

### **2.9.2. VITAMIN E**

Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) hat ebenfalls eine antioxidative Wirkung im Seminalplasma. Physiologisch kommt es in zahlreichen Nahrungsmitteln (Getreide, Gemüse, Milchprodukte) vor und reichert sich hauptsächlich in Plazenta, Hypophysenvorderlappen, Muskulatur, Leber, Milz und Hoden, dort in einer Menge von 2,8 mg / 100 g Hodengewebe, an (ENGEL et al., 1985).

Vitamin E wirkt antioxidativ, in dem es ungesättigte Fettsäuren der Spermienmembran vor Lipidperoxidation schützt (THÉROND et al., 1996). Hierbei wird  $\alpha$ -Tocopherol über  $\alpha$ -Tocopherylchinon in Di- $\alpha$ -Tocopheron umgewandelt. Die antioxidative Wirkung des  $\alpha$ -Tocopherols an Membranen wird begründet durch eine direkte Neutralisation von Superoxidanionen, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikalen durch Vitamin E (AGARWAL et al., 2004).

In Tierversuchen stellten ENGEL et al. (1985) fest, dass bei Hypovitaminosen vom Typ des Vitamin E vermehrt pathologische Spermatozoen auftreten und eine verminderte Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen besteht. Insbesondere hat Vitamin E wohl einen positiven Effekt auf die Spermienmotilität (ENGEL et al., 1985) und konzentrationsabhängig auch auf die Morphologie (AGARWAL et al., 2004). Bei sehr hohen Vitamin E-Werten ( $>1.000 \mu\text{mol/l}$ ) wurde allerdings sogar aus dem Antioxidanz ein Oxidationsstimulator (CAO et al., 1993), was bei Therapieoptionen mit Vitamin E-Supplementation sicher zu beachten ist. Allerdings ist bei allen gegen ROS gerichteten antioxidativen Therapien zu bedenken, dass man durch eine komplette ROS-Ausschaltung auch die Spermienfunktion weiter verschlechtern kann, da, wie unter 2.8. bereits ausgeführt, eine bestimmte Menge an ROS physiologisch für bestimmte Stoffwechselprozesse nötig zu sein scheint. Auch scheint Vitamin E in Kombination mit anderen Antioxidantien wie Selen (siehe 2.9.3.) einen positiven Effekt auf Spermienmotilität, -lebensfähigkeit und -morphologie zu haben (AGARWAL et al., 2004).

Interessant ist, dass THÉROND et al. (1996) feststellten, dass die Vitamin E-Konzentration in den Spermatozoen selbst nicht mit der Konzentration von Vitamin E im seminalen Plasma, die im Rahmen dieser Studie auch gemessen wurde, nicht korreliert, woraus sie folgern, dass es vielleicht nützlicher sei, die Vitamin E-Konzentration in den Spermatozoen selbst zu messen. Vermutlich wird Vitamin E vor der Ejakulation des Samens in die Spermienmembran eingebaut.

### **2.9.3. SELEN**

Im antioxidativen Spektrum spielt Selen eine entscheidende Rolle, so vor allem als wichtiger Bestandteil des Enzyms Glutathion-Peroxidase (VÉZINA et al., 1988). In der Nahrung ist das Spurenelement Selen in Meeresfrüchten, Leber, Getreide und fettarmem roten Fleisch zu finden (STRAUSS, 1999). Bei den im Menschen festgestellten Selenkonzentrationen gibt es auch deutliche geographische Unterschiede, so ist in Finnland und Teilen Chinas ein Selenmangel vorherrschend, wohingegen in Venezuela sogar toxische Werte für Selen im menschlichen Körper gemessen wurden (BEDWAL et al., 1994). Außerdem hat Selenmangel nicht nur in der Reproduktionsmedizin Bedeutung, sondern spielt auch eine Rolle bei Herz- und Krebserkrankungen. Im männlichen Reproduktionstrakt hat Selen im Hoden die höchsten Konzentrationen, das bedeutet das zweitgrößte Selenreservoir im menschlichen Körper überhaupt nach der Niere (OLDEREID et al., 1998).

Selen im männlichen Reproduktionstrakt ist hauptsächlich im seminalen Plasma zu finden, zu ca. 85% der Gesamtmenge (BLEAU et al., 1984). Es gibt wohl einen „optimalen Wertebereich“ für Selen im Seminalplasma, denn es zeigten sich deutliche Assoziationen zwischen der Selenkonzentration und der Spermienmotilität, aber eben auch negative Effekte des Selens unterhalb und oberhalb bestimmter Konzentrationen (BLEAU et al., 1984). Zu niedere Selenwerte können die Spermatozoen durch Verminderung des antioxidativen Effektes anfälliger für Angriffe von ROS machen (OLDEREID et al., 1998). Des weiteren gibt es eindeutige Zusammenhänge zwischen Selenkonzentrationen und Spermogrammparametern wie Spermindichte oder totaler Spermienanzahl. Die Selenkonzentrationen haben auch einen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate, so stellten BLEAU et al. (1984)

fest, dass niedrige Selenwerte die Schwangerschaftsrate verschlechtern, wohingegen hohe Werte eher zu Fehlgeburten und Störungen im weiblichen Reproduktionstrakt führen.

Im Spermatozoon selbst ist Selen hauptsächlich im Mittelstück lokalisiert (STRAUSS, 1999). Dort ist es in der äußeren Membran der Mitochondrien als Selenoprotein, dem sogenannten mitochondrialen Kapselprotein (mitochondrial capsule protein, MCP) gebunden (BEDWAL et al., 1994). Ungenügende Selenkonzentrationen, so postulieren BEDWAL et al. (1994), könnten also auch zu Störungen der Testosteronbiosynthese führen, ebenso bewirke ein niedriger Selengehalt eine Veränderung der Anzahl von LH-Rezeptoren (luteinisierendes Hormon) in den Leydig-Zellen, was wiederum die Testosteronsekretion beeinflusst.

Selen als Bestandteil von Glutathion-Peroxidase spielt eine wichtige Cofaktor-Rolle als Selenoprotein (Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase [PHGPx]), um die sich entwickelnde Samenzelle vor Schäden durch Sauerstoffradikale zu schützen, indem diese in harmlose Alkohole umgewandelt werden. Dieses Selenoprotein wirkt auch bei der Bewahrung der strukturellen Integrität des Mittelstückes des Spermatozoons mit (STRAUSS, 1999).

Selen interagiert auch mit Schwermetallen wie Kadmium oder Quecksilber, deren toxische Wirkkraft durch eine Metallkomplexbildung mit Selen verhindert wird.

Insgesamt gesehen bedeutet eine Minderung von Selen im menschlichen Sperma insbesondere eine Verminderung der Spermienmotilität, Brüche des Spermatozoons auf Höhe des Mittelstücks und eine erhöhte Inzidenz für abnormale Spermienformen (OLDEREID et al., 1998).

#### **2.9.4. ZINK**

Zink wurde erstmals schon 1921 als Bestandteil des menschlichen Samens beschrieben. Hauptsächlich befindet sich Zink im seminalen Plasma und hat seinen Hauptursprung aus der Prostata, aber auch aus der Samenblase und den Cowper-Drüsen (ABOU-SHAKRA et al., 1989). Es ist ein Element, das eine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung der Spermienmotilität spielt und dem Seminalplasma wichtige

Mediumeigenschaften gibt, die für die Spermatozoenaktivität wichtig sind (SKANDHAN, 1981).

Auch bei Zink ist es so, dass es größere regionale Unterschiede gibt, was die Konzentrationen angeht, so hat in Australien der Boden einen so niederen Zinkgehalt, dass das Pflanzenwachstum stellenweise unterdrückt ist. Zinkdefizienzen im menschlichen Körper können auch durch bestimmte Erkrankungen wie die Sichelzellanämie oder dem chronischen Alkoholabusus zu finden sein. Bei Männern steigen die Zinkkonzentrationen im Laufe der Pubertät an und erreichen ein Maximum im Alter zwischen 34 und 40 Jahren (BEDWAL et al., 1994).

Zink hat außerdem einen Einfluss auf die Hoden- und Spermienentwicklung, so auch auf die Funktion des Angiotensin-converting-Enzyms (ACE) und weiterer wichtiger Zink-Metalloenzyme. Zinkmangel bedeutet eine Unterdrückung der Steroidogenese, Zink beeinflusst die LH- (luteinisierendes Hormon), FSH- (follikelstimulierendes Hormon) und Prolaktinproduktion und hat somit eine Wirkung auf die Testosteronbiosynthese (BEDWAL et al., 1994).

LINDHOLMER et al. (1972) und HIDIROGLOU et al. (1984) stellten erhöhte Zinkwerte bei einer vorliegenden hohen Anzahl von toten oder immotilen Spermatozoen fest. Zink im seminalen Plasma selbst beeinflusst die Motilität weniger als das in Spermatozoen selbst vorhandene Zink, je höher der Zinkgehalt ist, desto schlechter ist die Motilität, insbesondere die Progressivmotilität (HENKEL et al., 1999).

Außerdem ist Zink wichtig zur Erhaltung der Membran- und Chromatinstabilität. Im Spermatozoon selbst ist Zink vor allem im Mittelstück und im Schwanz zu finden. Zink inhibiert Oxidation – deshalb auch hier die Zuordnung zum antioxidativen Spektrum - und Alkylation von Sulphydrylgruppen in Spermatozoen und verhindert damit die Ausbildung von Disulphidbrücken (HIDIROGLOU et al., 1984). Erhöhte Zinkwerte im Schwanzteil des Spermatozoons könnten der Grund für Asthenozoospermie sein, da bei geringeren Zinkwerten im Schwanz stabilisiertere Strukturen resultieren, die die Progressivmotilität des Spermiums generieren. Normalerweise wird während des Transits der Spermatozoen durch den

Nebenhoden ein Großteil des Zinks im Flagellum eliminiert, so dass eine Nebenhodendysfunktion eine Asthenozoospermie bewirken könnte. Durch diese Elimination des Zinks sowie die dann folgende Ausbildung von Disulphidbrücken ist eine Stabilität der Flagellumstrukturen gewährleistet und damit ein wichtiger Beitrag zur Aufrechterhaltung der Progressivmotilität (HENKEL et al., 1999).

Zink liefert durch seine Interaktion mit den Disulphidbrücken außerdem einen wichtigen Beitrag zum Dekondensationsprozess des Chromatins beim Durchdringen der Zona pellucida der Oozyte, es hilft mit die funktionelle Lebensspanne der Spermien zu verlängern (BEDWAL et al., 1994).

## **2.10. FERTILISATION MITTELS IN-VITRO-FERTILISATION (IVF) UND INTRACYTOPLASMATISCHER SPERMIENINJEKTION (ICSI)**

Im folgenden werden kurz die beiden in dieser Studie vorkommenden Fertilisationsverfahren beschrieben, zum einen die in-vitro-Fertilisation (IVF), zum anderen die intracytoplasmatische Spermieninjektion, wobei der methodische Ablauf dieser Prozeduren unter 3.9. beschrieben wird. Bedacht werden sollte, dass diese extrakorporalen Befruchtungsverfahren niemals die Primärtherapie eines ungewollt kinderlosen Paares sind, sondern erst nach Ausschöpfung der sonstigen therapeutischen Möglichkeiten zum Einsatz kommen. Insbesondere sollen in der Beschreibung die in dieser Dissertation hauptsächlich behandelten andrologisch bedingten Subfertilitätsbehandlungsoptionen erklärt werden. HAMMADEH (1997) empfiehlt eine klar festgelegte Prozedur bei andrologischer Subfertilität, die sich an den Spermioigrammparametern orientiert. Hierbei wird die Subfertilität in drei Gruppen unterteilt:

Grad der andrologischen Subfertilität	Spermiogrammparameter	Empfohlene Therapiereihenfolge
I. Leichtstörung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration: 10-20 Mio./ ml</li> <li>• Motilität: 30-40%</li> <li>• Morphologie: 16-20% normal</li> </ul>	<p>6x IUI (intrauterine Insemination)</p> <p>↓</p> <p>dann IVF</p> <p>↓</p> <p>falls 2x kein erfolgreicher ET (Embryotransfer)</p> <p>↓</p> <p>ICSI</p>
II. Mittelstörung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration: 5-10 Mio./ml</li> <li>• Motilität: 20-30%</li> <li>• Morphologie: 10-16% normal</li> </ul>	<p>3x IUI</p> <p>↓</p> <p>dann IVF</p> <p>↓</p> <p>falls kein erfolgreicher ET</p> <p>↓</p> <p>ICSI</p>
III. Schwerstörung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration: 0-5 Mio./ml</li> <li>• Motilität: 0-20%</li> <li>• Morphologie: 0-10% normal</li> </ul>	<p>ICSI;</p> <p>eventuell:</p> <p>*MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration)</p> <p>*TESE (testicular sperm extraction)</p>

### 2.10.1. FERTILISATION MITTELS IN-VITRO-FERTILISATION (IVF)

Die in-vitro-Fertilisation (IVF), also die extrakorporale Befruchtung einer Eizelle, die mit mehreren tausend Spermien zusammengebracht wird, mit anschließendem Embryotransfer in den Uterus, ist ein gebräuchliches reproduktionsmedizinisches

Verfahren geworden, das in Deutschland in fast siebzig Zentren durchgeführt wird. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche IVF-Therapie sollten ein normaler Uterus und funktionsfähige Ovarien gegeben sein. Wie oben bereits erwähnt, sollten alle anderen Behandlungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die intrauterine Insemination (IUI), vorher ausgeschöpft worden sein. Außerdem sollte das Paar darauf hingewiesen werden, dass die Erfolgchancen jenseits des 40. Lebensjahres der Frau deutlich verschlechtert sind (DIEDRICH et al., 1998).

Indikationen für eine IVF-Behandlung sind nach absteigender Häufigkeit laut DIEDRICH et al. (1998): andrologisch bedingte Subfertilität, tubare Sterilität (z.B. durch Entzündungen, Tumore, vorausgegangene Operationen), andere Infertilitätsursachen, idiopathisch bedingte Sterilität, Endometriose. Noch vor Jahren war die tubare Sterilität als Hauptindikation führend. Je nach Ursache der Sterilität, sind die Erfolgsaussichten einer möglichen Schwangerschaft (SCHILL et al., 1998).

Als wichtige mögliche Probleme einer IVF-Schwangerschaft sind erhöhte Raten an Mehrlingsschwangerschaften, Aborten, Extrauteringraviditäten, erhöhte Sectio caesarea-Rate, jedoch keine erhöhte Fehlbildungsrate zu nennen.

## **2.10.2. FERTILISATION MITTELS INTRACYTOPLASMATISCHER SPERMIENINJEKTION (ICSI)**

Die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) als Verfahren der assistierten Reproduktion, bei der ein einzelnes Spermatozoon in das Zytoplasma der Oocyte injiziert wird, ist insbesondere bei schwerer männlicher Subfertilität mit extremer funktioneller und / oder morphologischer Störung der Spermatozoen Therapiemethode der Wahl. ICSI und assoziierte Verfahren ermöglichen es dem Spermatozoon die Barriere der Zona pellucida zu durchbrechen, was vor allem bei Oligoasthenoatozoospermie (OAT-Syndrom) nicht möglich zu sein scheint (KÜPKER et al., 1998). Selbst bei Fällen von Azoospermie können ICSI-verwandte Verfahren wie MESA oder TESE angewandt werden (HOPPE, 1997). Ferner bedeutet das ICSI-Verfahren eine Chance für Paare, die unter IVF-Therapie keinen Erfolg erzielen konnten, jedoch unter den Vorteilen einer ICSI-Behandlung

(künstliches Passieren der Zona pellucida und des Oolemmas) durchaus gute Erfolgsaussichten haben (PALERMO et al., 1996; LI et al., 2003).

Indikationen zur ICSI sind nach KÜPKER et al. (1998):

- schweres OAT-Syndrom
- extreme Asthenozoospermie
- Akrosomdefekte, die ein Durchdringen der Zona pellucida unmöglich machen
- Chromatinstörungen
- Krypto- / Nekrozoospermie
- Immunologische Sterilität
- Geringe Fertilisierung bei klassischer IVF (< 10%)
- Retrograde Ejakulation / Anejakulation
- Geringe Eizellzahl (zur sicheren Gewährleistung einer Fertilisierung)

Die Probleme einer ICSI-Schwangerschaft, bei der eher bessere Schwangerschaftsraten als bei IVF-Behandlung erzielt werden, entsprechen im wesentlichen denen einer IVF-Therapie (siehe 2.10.1), insbesondere konnten keine erhöhten Fehlbildungsraten unter ICSI-Therapie festgestellt werden. Lediglich die Zahl chromosomaler Anomalien scheint minimal erhöht, was aber in der wohl eher erhöhten Rate an Chromosomenanomalien bei subfertilen Männern begründet liegt (KÜPKER et al., 1998). Dennoch sind gerade bei einer ICSI-Behandlung eine humangenetische Betreuung, vor allem bei Fällen von kongenitalem beidseitigen Verschluss der Ductuli deferentes mit erhöhtem Risiko für eine Mutation im Gen für cystische Fibrose (Mukoviszidose), und intensive Schwangerschaftsüberwachung mit Amniozentese und Ultraschalldiagnostik angezeigt. Insbesondere sollte eine Stammbaumanalyse beider Partner hinsichtlich Fehlbildungen über drei Generationen erfolgen (HAMMADEH, 1997; HOPPE, 1997; KÜPKER et al., 1998).

## **2.11. EIGENE FRAGESTELLUNG**

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es zu untersuchen, welche Parameter der klassischen Samenanalyse, des Seminalplasmas beziehungsweise welche Störungen der DNA-Integrität entscheidende Einflüsse auf andrologisch bedingte Sub- oder Infertilität und die Ergebnisse der Therapie mit in-vitro-Fertilisation (IVF) oder intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) haben.

Hierzu wurden Messungen zur klassischen Samenanalyse (Volumen, pH-Wert, Cytur-Test, Viskosität, Dichte, Motilität, Eosin-Test, HOS-Test, MAR-Test, Morphologie), zum Chromatinkondensationsstatus (Acridinorange- und Chromomycinfärbung), zur Apoptosebeurteilung (TUNEL-Färbung), zur Oxidantien- (ROS) und Antioxidantienkonzentration (TAS, Vitamin E, Selen, Zink) im seminalen Plasma durchgeführt.

Insgesamt kann man die Fragestellungen dieser Studie in folgenden Punkten zusammenfassen:

- a) Welchen Einfluss haben Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im menschlichen Seminalplasma auf die Parameter der klassischen Samenanalyse ?
- b) Welche Auswirkungen haben die Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen auf die Parameter der DNA-Integritätsmessung (Acridinorange-, Chromomycin- und TUNEL-Färbung) ?
- c) Welche Konsequenzen ergeben sich für die Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate der Patientinnen durch die gemessenen Parameter der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe sowie durch die Ergebnisse der Färbungen zur DNA-Integrität ? Beeinflussen sich diese Parameter gegenseitig ?
- d) Gibt es Unterschiede in diesen unter a) bis c) formulierten Erkenntnissen aufgeteilt nach den beiden Patientenkollektiven, zum einen der Gruppe mit IVF-Therapie, zum anderen der Gruppe mit ICSI-Therapie ?

### **3. MATERIAL UND METHODIK**

#### **3.1. PATIENTEN**

Für diese Dissertation wurden insgesamt 48 männliche Samenspender untersucht, die gemeinsam mit ihren Ehe- oder Lebenspartnerinnen die Fertilitätssprechstunde der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsklinik des Saarlandes (Homburg / Saar) aufsuchten. Die Spenden wurden im Laufe eines Jahres (November 2000 bis November 2001) gewonnen.

Die Spender wurden gleich in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Zuteilung erfolgte nach dem geplanten Fertilisationsprogramm. In der IVF-Gruppe wurden 26 Samenproben untersucht, in der ICSI-Gruppe waren es 22.

Die Spermaproben werden nach mindestens dreitägiger sexueller Karenz gewonnen. Dies erfolgt in einem dafür vorgesehenen Raum der Klinik durch Masturbation in einen sterilen beschrifteten Einmal-Kunststoffbecher. Die Patienten werden vorher über die korrekte Abgabe der Probe aufgeklärt, insbesondere sollte darauf geachtet werden, dass die Probe vollständig abgegeben wird (WHO, 1999).

Das Gefäß sollte nach der Probengewinnung warm gehalten werden, um eine Reduktion der Motilität zu vermeiden. Dies geschieht durch das Abstellen des Bechers auf eine Heizplatte, die auf Temperaturen zwischen 20°C und 40°C eingestellt wird.

Innerhalb der ersten Stunde nach Probengewinnung erfolgt die Untersuchung des Samens im andrologischen Labor der Gynäkologie nach makroskopischen (Volumen, Viskosität, Verflüssigungszeit, pH-Wert, Cytur-Test) und mikroskopischen Gesichtspunkten (Dichte, Global- und Progressivmotilität). Des Weiteren werden die Vitalitätsprüfungen (Eosin- und HOS-Test) sowie ein Spermienfunktionstest (MAR-Test) durchgeführt. Alle Ergebnisse werden in dafür vorgesehene standardisierte Spermogrammprotokolle der WHO eingetragen.

Nach Aufbereitung der Probe mit diversen Methoden (Percoll, Swim-Up, mini-Swim-Up, pure sperm, mini-pure-sperm, Isolate) werden erneut Dichte und Motilität bestimmt und festgehalten.

Nach Liquefizierung der Samenprobe werden von jedem Patienten Ausstrichpräparate auf Objektträgern angefertigt für die weiteren untersuchten Färbungen.

Vor weiterer Aufbereitung der abgegebenen Samenprobe wird der Überstand der Probe (Seminalplasma) abpipettiert und in Konustuben gegeben und eingefroren, bis die weiteren Untersuchungen erfolgen.

Die aufbereiteten Samenproben werden weiter zur in-vitro-Fertilisation (IVF) beziehungsweise zur intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) verwendet. Daher können auch alle erzielten Ergebnisse direkt mit der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate in Bezug gesetzt werden.

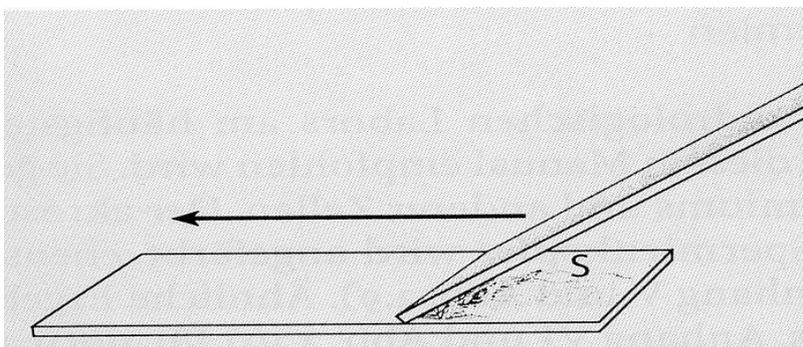
## **3.2. KLASSISCHE SAMENANALYSE**

### **3.2.1. SPERMIENAUSSTRICHE UND FIXIERUNG DER OBJEKTTRÄGER**

*Prinzip, Material und Methode:*

Die Ausstriche werden für weitere Untersuchungen von der frischen liquefizierten Ejakulatprobe vor der weiteren Aufbereitung angefertigt.

Ein Ejakulattropfen wird auf einen gesäuberten Objektträger (MENZEL-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gegeben. Anschließend wird die Probe durch eine „ziehende Bewegung“ mit der Kante eines zweiten Objektträgers gleichmäßig verteilt (WHO, 1999).



*Abbildung 2: Anfertigung eines Spermienausstriches – „Feathering-Methode“ für unverdünnte Proben. Der Ejakulattropfen (S) breitet sich am hinteren Rand des Objektträgers aus und wird über das flache Glas vorgezogen, um den Ausstrich zu erstellen.*

Es muss beachtet werden, dass der Ausstrich für die weitere Beurteilung mit diversen Färbungen nicht zu dick ausfällt. Bei sehr viskösen Ejakulaten kann der Ejakulattropfen durch Auflage eines zweiten Objektträgers besser verteilt werden (KÖHN et al., 2002).

Anschließend werden die Objektträger circa zehn Minuten luftgetrocknet und mit Fixierspray (Merckofix-Fixationsspray für Zytodiagnostik, MERCK, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### **3.2.2. SPERMAVOLUMEN**

*Prinzip, Material, Methode und Auswertung:*

Die abgegebene Spermaprobe wird vollständig in einen graduierten Zylinder gegeben und das Volumen abgelesen (KÖHN et al., 2002). Bei Reduktion des Volumens ist neben einer fehlerhaften Samenabgabe auch an Erkrankungen wie retrograde Ejakulation, zentrale Verschlüsse oder verminderter Bläschendrüsensekretion zu denken.

### **3.2.3. PH-WERT**

*Prinzip:*

Der pH-Wert kann wertvolle diagnostische Hinweise auf das Vorliegen von Erkrankungen im Urogenitaltrakt des Mannes liefern. Der Normwert liegt zwischen 7,2 und 8,0 (BALS-PRATSCH et al., 1998). Werte unter 7 deuten auf chronische Entzündungen hin, Werte über 8 auf akute Entzündungen von Prostata, Samenblase oder Nebenhoden. Ein gleichzeitiges Auftreten eines sauren pH-Wertes sowie reduziertem Ejakulatvolumen und Azoospermie lässt auf ein Sekret der Prostata schließen, was wiederum einen diagnostischen Ausschluss einer Obstruktion der Samenwege oder einer Fehlanlage im Rahmen eines kongenitalen bilateralen Fehlen der Vasa deferentia erfordert (KÖHN et al., 2002).

*Material, Methode und Auswertung:*

Frisches Ejakulat (innerhalb der ersten Stunde nach Gewinnung) wird gleichmäßig auf Indikatorpapier getropft (pH-Indikatorstäbchen / Spezialindikator pH 6,5-10,0; MERCK, Darmstadt, Deutschland). Nach 30 Sekunden zeigt sich eine gleichmäßige Färbung, die mit dem Kalibrationsstreifen verglichen wird, und so wird der pH-Wert bestimmt.

### **3.2.4. CYTUR-TEST**

#### *Prinzip:*

Der Cytur-Test dient der Feststellung einer Leukozytospemie im Ejakulat. Eine Konzentrationsbestimmung der Leukozyten erfolgt beim Cytur-Test durch Nachweis der Esteraseaktivität. Leukozytospemie ist ein mögliches Symptom für eine Infektion der ableitenden Samenwege (BALS-PRATSCH et al., 1998), bei hohen Leukozytenzahlen sollte daher eine weitere mikrobiologische Untersuchung des Ejakulats erfolgen, insbesondere auf Chlamydien und Mykoplasmen.

#### *Material, Methode und Auswertung:*

Ein Teststreifen (Combur<sup>2</sup>-Test-LN; ROCHE, Schweiz) wird in frisches Ejakulat eingetaucht. Nach ein bis zwei Minuten kann man anhand des Farbumschlages bestimmen, ob eine pathologische Leukozytenzahl im Sperma vorliegt. Bei Leukozytospemie kommt es zu einer klaren Blaufärbung des Teststreifens (RIEDEL, 1980).

### **3.2.5. VISKOSITÄT**

#### *Prinzip:*

Die Viskosität der Spermaprobe, auch als Konsistenz bezeichnet, ist ein routinemäßig erhobener Parameter zur Beurteilung der Probe. Eine abnormale Konsistenz kann die Analyse anderer Parameter, insbesondere die Bestimmung der Spermienmotilität beeinträchtigen (BALS-PRATSCH et al., 1998).

#### *Material, Methode und Auswertung:*

In die verflüssigte Probe wird ein Glasstab eingeführt und wieder langsam herausgezogen. Wenn das Ejakulat hierbei eine Fadenlänge > 2 cm zieht, so gilt die Viskosität als abnormal. Alle Werte darunter deuten auf normale Konsistenz der Probe hin (WHO, 1999).

### **3.2.6. SPERMIENDICHTE**

#### *Prinzip, Material, Methode und Auswertung:*

Zur Bestimmung der Spermienkonzentration (Dichte) werden – analog der Motilitätsmessung – 10 µl Ejakulat in die Vertiefung einer Zählkammer nach

MAKLER (1980) pipettiert. Dann wird bei 20facher Vergrößerung drei mal zehn Quadranten der insgesamt 100 Quadranten ausgezählt. Schließlich wird aus den Auszählungsergebnissen der Mittelwert berechnet, der die Spermienanzahl in Millionen pro Mikroliter angibt. Der Normwert beträgt nach WHO (1999) mindestens  $20 \times 10^6$  Spermien /  $\mu\text{l}$ . Eine zweite Auszählung erfolgt dann nach Aufbereitung der Spermaprobe.

### **3.2.7. SPERMIENMOTILITÄT**

*Prinzip:*

Die Spermienmotilität wird unmittelbar nach der Verflüssigung bestimmt, da sie sich am schnellsten verändert (BALS-PRATSCH et al., 1998). Die WHO hat die Motilität in vier Kategorien eingeteilt (WHO, 1999):

- a) schnelle progressive Beweglichkeit (d.h.  $\geq 25 \mu\text{m/s}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $\geq 20 \mu\text{m/s}$  bei  $20^\circ\text{C}$ );
- b) langsame oder träge progressive Beweglichkeit;
- c) nichtprogressive Beweglichkeit ( $< 5 \mu\text{m/s}$ );
- d) Immotilität.

Bei den untersuchten Proben wird zwischen globaler Motilität, also WHO-Kategorien a) und b), und progressiver Motilität, also WHO-Kategorie a), unterschieden (BALS-PRATSCH et al., 1998).

*Material, Methode und Auswertung:*

In eine Vertiefung einer Zählkammer werden  $10 \mu\text{l}$  verflüssigtes Ejakulat gegeben. Bei 20facher Vergrößerung werden nun 100 Spermien in möglichst vielen Quadranten hinsichtlich ihrer Motilität ausgezählt und den oben genannten Kategorien zugeordnet. Eine Doppelbestimmung ist notwendig. Sollte die Abweichung über 10 % betragen, muss mit einem neuen Ejakultropfen neu ausgezählt werden.

Normale Werte sind für die Globalmotilität  $> 40 \%$  der Spermien mit Motilität der Kategorie a) oder b), für die Progressivmotilität  $> 25\%$  (nach standardisiertem Spermogramm der WHO).

Eine erneute Auszählung erfolgt nach Aufbereitung der Probe.

### **3.2.8. SUPRAVITALFÄRBUNGEN: EOSIN- UND HOS-TEST**

#### *Prinzipien:*

Der Eosintest (Farbausschlußverfahren) oder der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test) dienen dem Nachweis der Lebensfähigkeit der Spermien.

Beim Eosintest werden tote Spermatozoen selektiv angefärbt, da sie aufgrund von defekten Plasmamembranen bestimmte Farbstoffe aufnehmen.

Beim HOS-Test kommt es aufgrund der Semipermeabilität der intakten Spermienzellmembran bei hypoosmotischen Verhältnissen durch Wassereinstrom zu einer Anschwellung des Spermiums (DREVIUS, ERIKSSON, 1966).

#### a) Eosintest

##### *Material:*

Eosin Y + 0,9% wässrige NaCl = 0,5%(5g/l) Eosin Y-Lösung

##### *Methode:*

10 bis 15 µl frisches Ejakulat und ein Tropfen der 0,5%igen Eosin Y-Lösung werden auf einem Objektträger gemischt und mit einem Deckglas bedeckt. Bei 400facher Vergrößerung werden 200 Spermatozoen nach 30 Sekunden unter dem Lichtmikroskop mit Hellfeld- oder Phasenkontrastbeleuchtung ausgezählt (sofortige Beurteilung der Präparate).

##### *Auswertung:*

Lebende Spermien erscheinen weiß (ungefärbt), tote rot (gefärbt). Der Eosintest lässt die Diagnose „normal“ zu, wenn sich > 50% der Spermien ungefärbt (also vital) darstellen.

#### b) HOS-Test

##### *Material:*

Schwelllösung : 0,735 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Natriumzitat) und 1,351 g Fructose werden in 100 ml destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

##### *Methode:*

1 ml Schwelllösung wird bei 37°C in einem Eppendorf-Hütchen für ca. 5 Minuten erwärmt. Danach wird 0,1 ml liquefiziertes Ejakulat hinzugegeben und mit einer Pipette durchmischt. Anschließend wird für mindestens 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. 200 Spermatozoen werden unter dem Phasenkontrasmikroskop

ausgezählt. Dabei wird der Anteil geschwollener Spermischwänze ermittelt (WHO, 1999).

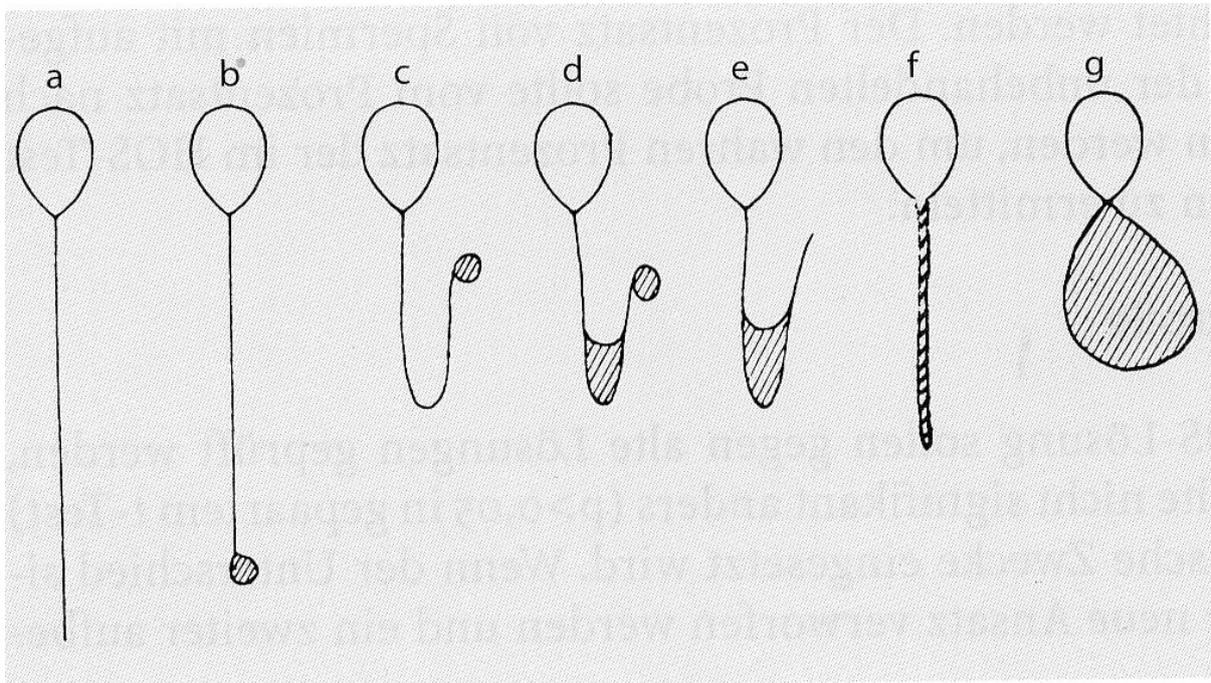


Abbildung 3: Schematische Darstellung typischer morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen nach Kontakt mit hypoosmotischer Lösung. a: keine Änderungen. b-g: unterschiedliche Schwanzveränderungen. Die ein Schwellen anzeigenden Schwanzregionen sind durch die schraffierten Flächen gekennzeichnet.

*Auswertung:*

Vitale Spermien schwellen, tote nicht. Der HOS-Test gilt als normal, wenn > 60% der Spermischwänze anschwellen. Bei Werten < 50% ist die Probe als „abnorm“ einzustufen.

Zu beachten ist, dass manche Spermien schon vor dem Test aufgerollte Schwänze hatten. Deshalb muss man diese vor dem Test ermitteln und von der Anzahl nach dem Test subtrahieren (WHO, 1999 nach ELIASSON, TRESCHL, 1971; ELIASSON, 1981; JEYENDRAN et al., 1984).

### **3.2.9. MAR-TEST**

*Prinzip:*

Der gemischte Antiglobulin-Test (**mixed antiglobulin reaction test**) dient der Detektion von Immunglobulin G-Antikörpern auf den Spermien . Der MAR-Test trägt zur

Diagnose einer immunologischen Infertilität bei (bei  $\geq 50$  gebundenen Spermatozoen ist diese Diagnose wahrscheinlich; BARRATT et al., 1992). Der Test sollte direkt nach der Motilitätsbeurteilung durchgeführt werden, weil für ein aussagekräftiges Testergebnis motile Spermien nötig sind (BALS-PRATSCH et al., 1998).

*Methode:*

10  $\mu$ l frisches Ejakulat, 10  $\mu$ l IgG-beschichtete Latexpartikel und 10  $\mu$ l Antiserum gegen menschliches IgG werden zusammen auf einen Objektträger gegeben.

Zunächst wird das Sperma und die Latexpartikel vermischt und dann ein Deckgläschen mit Antiserum daraufgegeben. Dieses Prinzip wurde mit einem Fertigtest-Präparat durchgeführt (SpermMarTest IgG, FertiPro N.V., Beemem, Belgien).

Danach wird der Objektträger unter dem Mikroskop (OLYMPUS BH2-RFCA) bei 400- bis 600-facher nach 2-3 Minuten und nach weiteren 10 Minuten im Hellfeld oder Phasenkontrast betrachtet (WHO, 1999).

*Auswertung:*

Antikörperfreie Spermatozoen bewegen sich frei zwischen den zusammengelagerten Latexpartikeln. Antikörperbehaftete Spermatozoen werden an die Latexpartikel gehaftet. Zunächst schwimmen die Spermatozoen mit den angehefteten Partikeln noch herum; werden die Agglutinationen zu groß, können sich die gebundenen Spermatozoen nur noch auf der Stelle bewegen.

Von 200 ausgezählten Spermatozoen wird die Prozentzahl der gebundenen Spermatozoen ermittelt. Der MAR-Test gilt als normal (negativ), wenn  $< 10$  % der Spermatozoen an die Latexpartikel angeheftet sind (Spermiogramm nach WHO-Richtlinien), (WHO, 1999).

### **3.2.10. SPERMIENMORPHOLOGIE**

*Prinzip:*

Die Ausstrichpräparate werden zur Beurteilung der Spermienmorphologie mit einer modifizierten Färbung nach Papanicolaou (WHO, 1999) gefärbt. Die Auswertung erfolgt anhand der WHO-Kriterien (WHO, 1999).

*Material:*

- Äthanol 99,5; 95, 90, 80, 70, 50 %

- Hämatoxylin nach Harris (bestehend aus Hämatoxylin 8 g, Äthanol 95 % 80 ml, Aluminium-Ammonium-Sulfat  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  160 g, destilliertes Wasser 1600 ml, Quecksilberoxid  $\text{HgO}$  6 g)
- Destilliertes Wasser
- Fließendes Wasser
- Saurer Alkohol (bestehend aus Äthanol 99,5 % 300 ml, konzentrierte  $\text{HCl}$  2 ml, destilliertes Wasser 100 ml)
- Scotts-Lösung (bestehend aus  $\text{NaHCO}_3$  3,5 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  20 g, destilliertes Wasser 1000 ml)
- Orange G6 (bestehend aus Orange G-Kristallen 10 g, destilliertes Wasser 100 ml, Äthanol 95 % 1000 ml, Phosphorwolframsäure 0,15 g)
- EA-50 (bestehend aus Eosin Y 10g, Bismarckbraun Y 10 g, Lichtgrün SF 10 g, destilliertes Wasser 300 ml, Äthanol 95 % 2000 ml, Phosphorwolframsäure 4 g, gesättigte Lithiumkarbonatlösung 0,5 ml)
- Xylol

*Methode:*

Die fixierten Ausstriche werden mit einer maschinellen Methode (SHANDON, Cheshire, Großbritannien) gefärbt (*Anmerkung:* 1mal eintauchen entspricht ca. 1 sec):

Substanz	Färbevorgang
Äthanol 80 %	10 mal eintauchen
Äthanol 70 %	10 mal eintauchen
Äthanol 50 %	10 mal eintauchen
Destilliertes Wasser	10 mal eintauchen
Hämatoxylin nach Harris	Exakt 3 Minuten eintauchen
Fließendes Wasser	3 bis 5 Minuten eintauchen
Saurer Alkohol	2 mal eintauchen
Fließendes Wasser	3 bis 5 Minuten eintauchen
Scotts Lösung	4 Minuten eintauchen
Destilliertes Wasser	1 mal eintauchen
Äthanol 50 %	10 mal eintauchen
Äthanol 70 %	10 mal eintauchen
Äthanol 80 %	10 mal eintauchen

Äthanol 90 %	10 mal eintauchen
Orange G 6	2 Minuten eintauchen
Äthanol 95 %	10 mal eintauchen
Äthanol 95 %	10 mal eintauchen
EA-50	5 Minuten eintauchen
Äthanol 95 %	5 mal eintauchen
Äthanol 95 %	5 mal eintauchen
Äthanol 95 %	5 mal eintauchen
Äthanol 99,5 %	2 Minuten eintauchen
Xylol	Ca. 1 Minute eintauchen

Anschließend wird der Objektträger mit Entellan (MERCK, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt, mit einem Deckglas abgedeckt und kann jetzt unter 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl unter dem Mikroskop beurteilt werden.

*Auswertung:*

Es werden jeweils 100 Spermien pro Objektträger ausgezählt und in „vollständig normal“ geformte Spermien und anormale Spermien klassifiziert. Als normal geformtes Spermium gilt nach WHO (1999 nach MENKVELD et al., 1990):

- Länge des Spermienkopfes: 4,0-5,5 µm
- Breite des Spermienkopfes: 2,5-3,5 µm
- Quotient Länge / Breite: 1,5 bis 1,75
- Akrosom: sollte gut abgrenzbar sein, nimmt 40 bis 70% der Spermienkopfoberfläche ein

Als defekte Spermien werden registriert:

a) Spermienkopffdefekte:

- abnorme Form und / oder Größe
- deformierte Köpfe (groß, klein, elongiert, amorph)
- Doppelköpfe

b) Hals- und Mittelstückdefekte:

- geknickter Hals, abnorm dickes oder dünnes oder unregelmäßiges Mittelstück

c) Schwanzdefekte

d) Zytoplasmaabnormalitäten:

- Zytoplasmotropfen, die größer als ein Drittel des normalen Spermienkopfes

sind  
e) Spermienkopfverluste

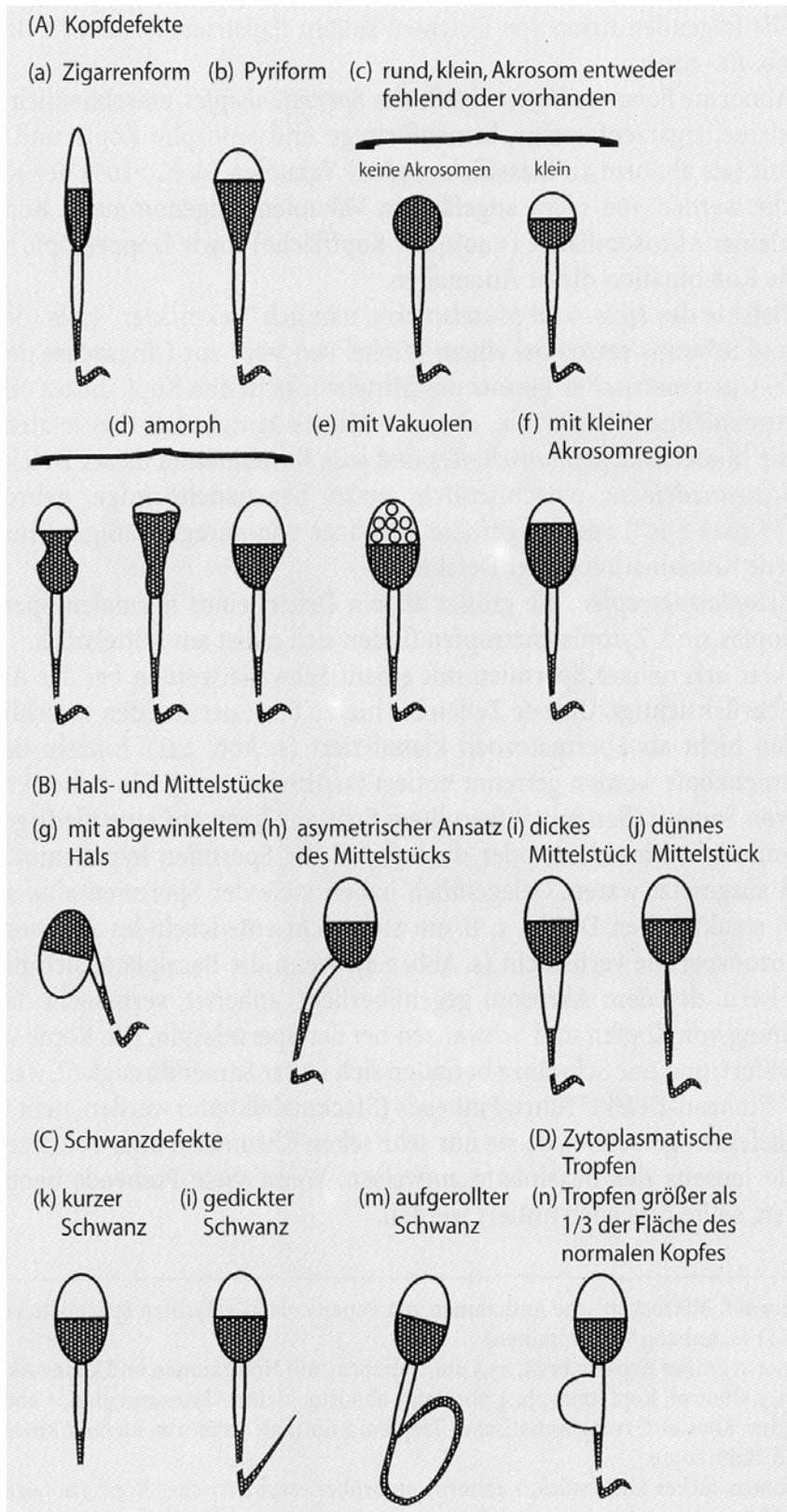


Abbildung 4: Schematische Zeichnung von abnormalen Formen von menschlichen Spermien.

### **3.3. CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS**

#### **3.3.1. ACRIDINORANGEFÄRBUNG**

*Prinzip:*

Zur Beurteilung der Normalität der Kerne der Spermienköpfe (Kondensationszustand) wurde die Acridinorangefärbung angewandt.

*Material:*

- a) Carnoys solution (frischer Ansatz):

3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessigsäure

- b) Stock solution (Lagerung im Dunkeln bei 4°C):

1 g Acridinorange (SIGMA, Deutschland) in 50 ml destilliertem Wasser lösen und anschließend filtrieren

- c) Färbelösung (Herstellung bei Raumtemperatur):

Die Färbelösung muss stets frisch angesetzt werden und sollte nach Ende der Herstellung einen pH-Wert von 2,5 besitzen.

Es werden folgende Lösungen zusammengegeben:

Menge	Lösung	Herstellung
3 x 10 ml	Stock solution	Siehe b)
3 x 40 ml	0,1 M Zitronensäure	4,8 g in 250 ml destilliertem Wasser
3 x 2,5 ml	0,3 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10,6 g in 250 ml destilliertem Wasser

*Methode:*

1. Die Spermienpräparate (Ausstriche) werden zunächst mindestens 2 Stunden lang, besser jedoch über Nacht, in Carnoys solution fixiert.
2. Danach werden die Objektträger wenige Minuten trocknen gelassen.
3. Anschließend werden die Objektträger jeweils mit ca. 2 bis 3 ml Färbelösung beschichtet. Die Färbelösung wird 5 Minuten einwirken gelassen.
4. Nach vorsichtigem Spülen der Objektträger in destilliertem Wasser wird ein Deckgläschen auf die Präparate gelegt.
5. Bei 100facher Vergrößerung in Ölimmersion werden die Präparate noch am gleichen Tag im Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen, Deutschland) mit einem 490 nm-Exzitationsfilter beurteilt.

*Auswertung:*

Es werden 200 Spermien pro Objektträger ausgezählt. Zeigen sie im Spermienkopf eine grüne bis gelbe Fluoreszenz, so ist von einem normalen Kernzustand auszugehen. Bei Kernanomalien zeigt sich eine orangene bis rote Fluoreszenz über dem Spermienkopf.

### **3.3.2. CHROMOMYCINFÄRBUNG**

*Prinzip:*

Die Färbung der Spermienpräparate mit Chromomycin A<sub>3</sub> lässt eine Aussage über den Kondensationsstatus der DNA im Spermienkopf zu.

*Material:*

a) Carnoys solution (frischer Ansatz):

3 Teile Methanol und 1 Teil Eisessigsäure

b) Phosphat-buffered-saline (PBS)-Lösung (10fach konzentriert):

b1) Lösung 1: 1,32 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

b2) Lösung 2:

Stoff	Menge
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,21 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Glucose	10 g

Die Chemikalien werden in 500 ml destilliertem Wasser in einem Erlenmeyerkolben gelöst. Nach vollständiger Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 900 ml aufgefüllt.

b3) Es wird 1 l PBS-Gebrauchslösung hergestellt, indem 10 ml der Lösung 1 mit 90 ml der Lösung 2 vermischt werden und anschließend 900 ml destilliertes Wasser hinzugefügt wird.

c) Färbelösung:

0,25 mg CMA<sub>3</sub> (SIGMA, St.Louis, USA) wird in 1 ml PBS-Lösung (siehe b) gelöst.

*Methode:*

1. Die Spermienpräparate (Ausstriche) werden zunächst mindestens 2 Stunden lang, besser über Nacht, in Carnoys solution fixiert.
2. Danach werden die Objektträger wenige Minuten trocknen gelassen.
3. Die fixierten Objektträger werden dann für einen Zeitraum von 20 Minuten mit jeweils 100 µl CMA<sub>3</sub>- Färbelösung beschichtet.
4. Anschließend werden die Präparate mit PBS-Lösung gespült und mit Glycerin eingedeckt.
5. Bei 100facher Vergrößerung werden die Präparate noch am gleichen Tag in Ölimmersion unter einem Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen, Deutschland) mit einem 490 nm-Exzitationsfilter betrachtet.

*Auswertung:*

Es werden 200 Spermien pro Präparat ausgezählt. Die Färbung testet die Spermien auf An- bzw. Abwesenheit von Protaminen, die an der Chromatinkondensation beteiligt sind. Bei angezeigter Fluoreszenz (helles Aufleuchten der Spermienköpfe) fehlen Protamine, so dass das Chromomycin Guanin-Cytosin-reiche Sequenzen der DNA anfärbt. Abwesenheit von Protaminen bedeutet eine unvollständige Kondensation des Chromatins.

### **3.4. APOPTOSEBEURTEILUNG**

#### **3.4.1. TUNELFÄRBUNG**

*Prinzip:*

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT] mediated dUTP nick end labeling) wird genutzt, um Apoptose in der Spermien-DNA zu detektieren. Die Färbung reagiert mit den 3'OH-Enden der DNA durch die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT). DNA-Fragmente, die durch Apoptose entstanden sind, werden durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an TdT gebunden. Diese mit TdT gebundenen Fragmente können sich dann an Anti-Digoxigenin-Antikörper binden, die wiederum an Fluorescein gebunden sind. Nach der Gegenfärbung (z.B. mit Propidiumiodid) werden die Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet.

*Material:*

- a) ApopTag<sup>®</sup> Plus Fluorescein in situ Apoptosis Detection Kit für indirekte Immunfluoreszenzfärbung (INTERGEN, Oxford, Großbritannien):

Komponente	Lagerungsart in °C
Equilibrationspuffer	-15 bis -25
Reaktionspuffer	-15 bis -25
TdT-Enzym	-15 bis -25
Stop/Waschpuffer	-15 bis -25
Blocking-Lösung	-15 bis -25
Anti-Digoxigenin-Fluorescein	2 bis 8

- b) PBS-Lösung (Herstellung analog derer bei Chromomycinfärbung)  
c) 0,5 bis 1,0 µg/ml Propidiumiodid in Antifade für die Gegenfärbung

*Vorbereitung des Versuchs:*

- a) Herstellung des sog. Working-Strength-TdT-Enzyms:

In einer Mikrozentrifugentube werden 77 µl Reaktionspuffer und 33 µl TdT-Enzym zusammengegeben (Mengenangaben für 2 Objektträger). Das Gemisch wird gut gevortext.

- b) Herstellung des sog. Working-Strength-Stop/Waschpuffers:

Es werden 1 ml Stop/Waschpuffer mit 34 ml destilliertem Wasser gemischt (Mengenangaben für 5 Objektträger).

- c) Herstellung der sog. Working-Strength-Fluorescein-Antikörper-Lösung:

68 µl Blocking-Lösung und 62 µl Anti-Digoxigenin-Konjugat werden in einer Mikrozentrifugentube zusammengegeben und anschließend gevortext (Mengenangaben für 2 Objektträger). Diese Lösung wird auf Eis gelegt und im Dunkeln aufbewahrt.

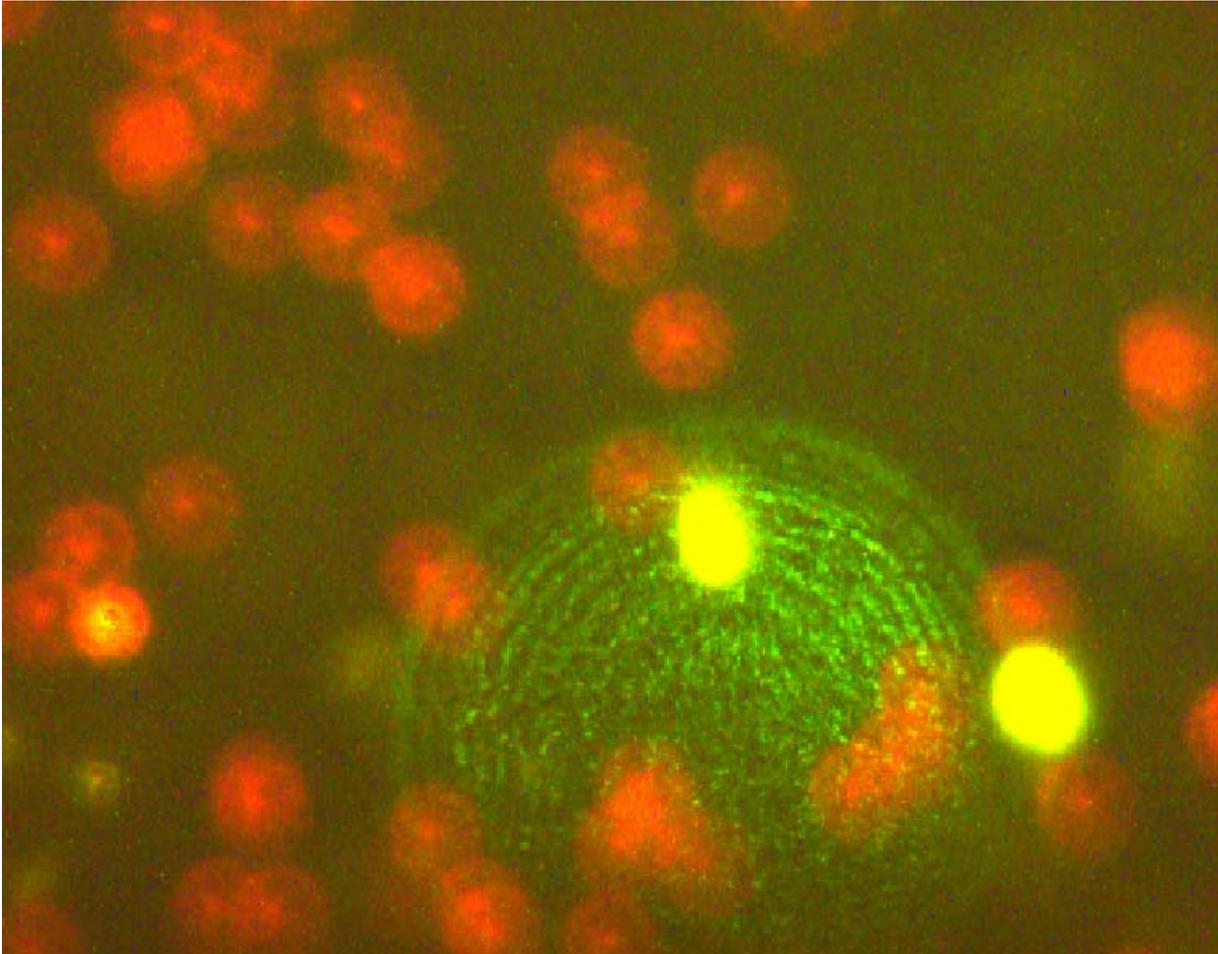
*Methode:(indirekte Immunfluoreszenzfärbung)*

1. Auf die Objektträger-Ausstriche wird 75 µl Equilibrationspuffer gegeben. Es wird für mindestens 10 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Dann wird sofort 55 µl des Working-Strength-TdT-Enzyms auf den Ausstrich pipettiert. Die Objektträger werden dann für 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Inkubator HERAEUS).

3. Die Proben werden dann in einem coplin jar, das den Working-Strength-Stop/Waschpuffer enthält, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wird das vorbereitete Working-Strength-Anti-Digoxigenin-Konjugat auf Raumtemperatur erwärmt, wobei weiterhin Lichtexposition vermieden werden muss.
4. Die Ausstriche werden dann je drei Mal für 1 Minute in PBS-Lösung gewaschen. Dann wird das auf Raumtemperatur erwärmte Anti-Digoxigenin-Konjugat auf den Objektträger gegeben (65  $\mu$ l pro Ausstrich). Im Dunkeln werden dann die Proben zunächst 15 Minuten bei 37°C inkubiert, dann für wiederum 15 Minuten bei 4°C.
5. Bei Raumtemperatur werden die Ausstriche in einem coplin jar 4 mal für je 2 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.
6. Zur Gegenfärbung wird 15  $\mu$ l Propidiumiodid (0,5-1  $\mu$ g/ml) auf die Objektträger gegeben, die abschließend mit einem Deckgläschen bedeckt werden.
7. Sofern die Objektträger nicht gleich beurteilt werden, werden sie bei – 20°C im Dunkeln gelagert.
8. Bei 100facher Vergrößerung in Ölimmersion werden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen, Deutschland) mit einem 490 nm-Exzitationsfilter betrachtet.

*Auswertung:*

Es werden 200 Spermien pro Präparat ausgezählt. Grüne Färbung des Spermienkopfes bedeutet stattgefundenene Apoptose, wobei nicht-apoptotische Spermien eine rote Färbung aufweisen.



*Abbildung 5: Foto einer fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme von TUNEL-gefärbten Spermatozoen. Es sind zahlreiche rot angefärbte, also nicht-apoptotische Spermatozoen und andere Zellen zu sehen neben zwei grün gefärbten apoptotischen Spermien.*

### **3.5. SEMINALPLASMAGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG**

*Prinzip, Material und Methode:*

Da zur Bestimmung der weiteren Parameter Selen, Zink, Vitamin E, ROS und TAS lediglich das seminale Plasma, also der Bestandteil des Ejakulats (weitgehend) ohne die Spermatozoen, erforderlich ist, wird dieses vor der weiteren Aufbereitung der Probe von der Nativprobe nach deren Liquefizierung mit einer sterilen Pipette als Überstand gewonnen und in eine sterile Konustube gegeben. Anschließend werden die beschrifteten Behälter mit den Seminalplasmaproben in einer Gefriertruhe (Bio 36, MESSER, Griesheim, Deutschland) mit flüssigem Stickstoff bei  $-40^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und erst direkt vor den weiteren Messungen der oben genannten Parameter wieder auf Raumtemperatur aufgetaut.

Zur weiteren Untersuchung der Gesamtprobe sowie zur anschließenden Zuführung zur in-vitro-Fertilisation beziehungsweise zur intracytoplasmatischen Spermieninjektion wird die Nativprobe weitgehend randomisiert diversen Aufbereitungstechniken unterzogen. Diese Methoden dienen dem Ziel einen relativ hohen Prozentsatz morphologisch normaler und motiler Spermien zu bekommen, die frei von toten Spermien oder anderen Zellen sind (WHO, 1999). Die Verfahren bedienen sich der Fähigkeit der Spermien in Medien zu schwimmen oder Dichtegradienten. Beim untersuchten Patientengut wurden die Techniken Percoll, Swim-Up, mini-Swim-Up, pure sperm, mini-pure-sperm und Isolate verwendet. Im folgenden werden kurz die Prinzipien dieser Aufbereitungsmethoden erläutert:

#### *Aufbereitung mit Percoll-Gradienten:*

Dieses Verfahren wurde lediglich noch zu Beginn der Erfassung des Patientengutes verwandt, da mittlerweile eine mögliche Toxizität des Verfahrens postuliert wird (MONTZKA et al., 1998). Verschiedene Percoll-Lösungen (Percoll TM-Sterile Grundlösung, AMERSHAM Pharmacia, BIOTECH AB, Uppsala, Schweden) werden mit abnehmender Dichte (90% > 70% > 40%) in einem Reagenzglas übereinandergeschichtet. Dann wird circa 1 ml Sperma hinzugegeben und die Säulen für 20 Minuten bei 1.800 bis 2.000 U/min zentrifugiert (HAMMADEH, 1997). Am Boden reichert sich ein Pellet an, in dem sich gut motile Spermien aufgrund ihrer höheren Dichte befinden. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet mit Medium überschichtet und erneut zentrifugiert. Dann wird erneut der Überstand abgehoben und die Spermien einer nochmaligen mikroskopischen Begutachtung unterzogen.

#### *Aufbereitung mit der Swim-Up-Methode:*

Die Swim-Up-Technik liefert eine hohe Anzahl an motilen Spermien, ist jedoch mit hohen Spermaverlusten behaftet (AL-HASANI et al., 1995). Das Ejakulat wird in einem Verhältnis 1:1 bis 1:4 mit Kulturmedium vermischt. Das so verdünnte Ejakulat wird bei 500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei sehr viskösem Ejakulat werden diese beiden Schritte nochmals wiederholt. Das Pellet wird mit 1 ml Medium überschichtet und zwei bis drei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die motilen und morphologisch normalen Spermien „befreien“ sich aus dem Sediment und schwimmen nach oben („swim-up“). Diese Spermien werden abpipettiert und resuspendiert (HAMMADEH, 1997).

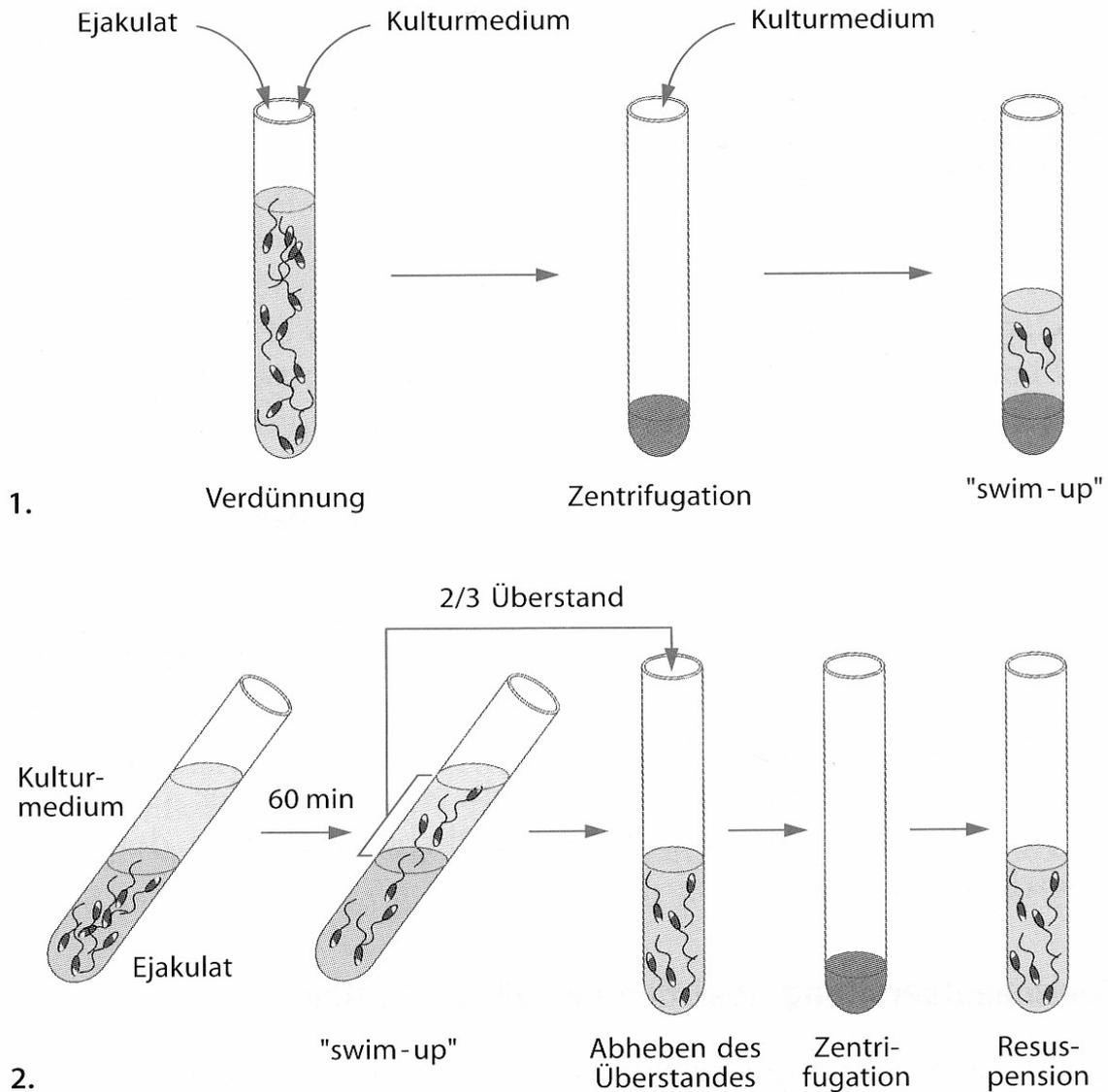


Abbildung 6: Selektion motiler Spermien durch die Swim-Up-Technik.

*Aufbereitung mit der mini-Swim-Up-Methode:*

Das Ejakulat wird in ein 5 ml-Falcon-Röhrchen gegeben und bei 500 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Dann wird die Probe in 0,5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wird in einem Eppendorf-Röhrchen der Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt. Das Pellet wird dann mit einer Menge von 10 bis 20 µl Medium überschichtet und bei 37°C für ein bis zwei Stunden inkubiert (KÜPKER et al., 1998).

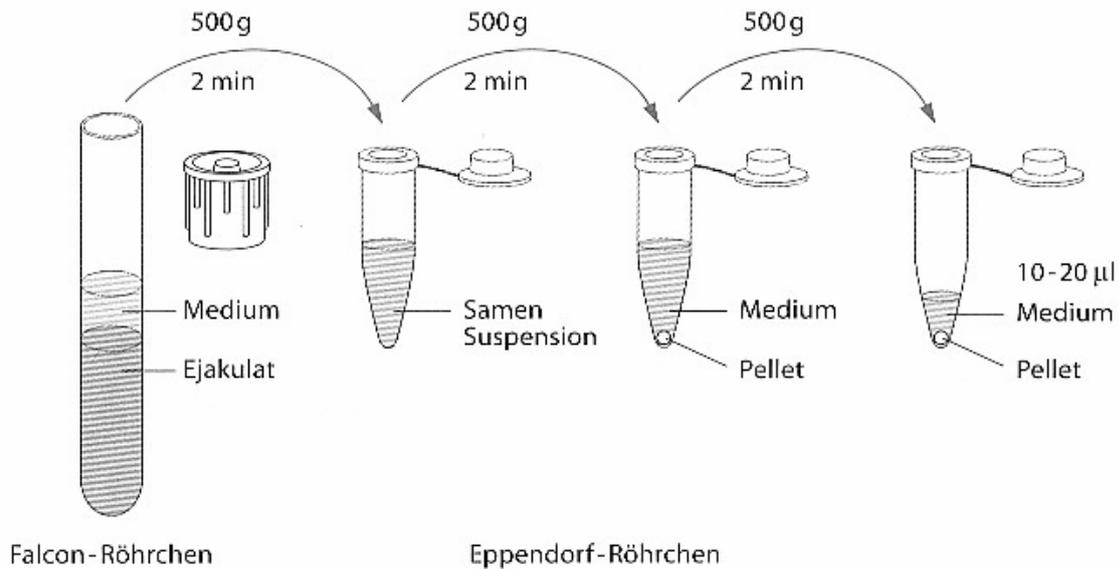


Abbildung 7: Mini-Swim-Up-Technik nach Al-Hasani.

#### Aufbereitung mit der (mini-)pure-sperm-Methode:

Die (mini-) pure-sperm-Methode bedient sich eines Dichtegradienten zur Aufbereitung der Spermien. Verschiedene Pure-Sperm-Lösungen (PureSperm 100<sup>®</sup>, NIDACON International AB, Gothenburg, Schweden) werden mit abnehmender Dichte (80% > 40%) übereinandergeschichtet (diesen Vorgang in zwei Reagenzgläsern gleichzeitig durchführen). Dann wird eine Schicht verflüssigter Samen darüberschichtet und bei 300 U/min für zwanzig Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, das Pellet aus beiden Gläsern aspiriert und zusammengegeben. Anschließend wird das Pellet mit 10 ml Medium resuspendiert und bei 500 U/min für zehn Minuten erneut zentrifugiert. Der dann verbleibende Überstand wird wiederum verworfen, und das Pellet nochmals mit 1 ml Medium resuspendiert. Danach werden die Spermien erneut bezüglich Konzentration und Motilität beurteilt.

#### Aufbereitung mit der Isolate-Methode:

Auch die Isolate-Methode (Isolate<sup>®</sup>, IRVINE SCIENTIFIC, Santa Ana, USA) nutzt einen Dichtegradienten zur Spermienaufbereitung. Nach Vorbereitung zweier Lösungen, der „unteren Schicht“ (50%) und der „oberen Schicht“ (90%), werden beide bei 37°C übereinandergeschichtet (90% > 50%). Dann wird 1,5 bis 2 ml liquefizierter Samen daraufgegeben. Anschließend wird die Probe bei 200 bis 300

U/min für 10 bis 20 Minuten zentrifugiert. Die Überstände werden abpipettiert und das Pellet in eine neue Zentrifugationstube gegeben. Das Pellet wird mit 2 bis 3 ml Waschmedium resuspendiert. Anschließend wird die Probe erneut bei 200 U/min für 8 bis zehn Minuten zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Dieser Schritt wird nochmals wiederholt (zweite Waschung). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets mit Medium kann die Probe wieder neu beurteilt werden.

### **3.6. OXIDANTIENKONZENTRATION IM SEMINALPLASMA**

#### **3.6.1. ROS-MESSUNG**

##### *Prinzip:*

Reactive oxygen species (ROS) ist ein Sammelbegriff für die im seminalen Plasma befindlichen freien Radikale, wie Peroxide oder Hydroperoxide. Freie Radikale wirken hierbei schädigend auf die Spermien ein, in dem sie kurz- und langfristige Störungen verursachen. Bei dieser Messung wird die gesamte Peroxidkonzentration der Probe bestimmt, deren Ergebnis direkt korreliert mit den Konzentrationen an freien Radikalen. Somit kann man den oxidativen Status der untersuchten Probe relativ genau bestimmen. Das Prinzip der Messung ist ein kolorimetrischer Assay für die quantitative Bestimmung von Peroxiden (Oxystat<sup>®</sup>-Kit für 96 Bestimmungen, BIOMEDICA Gesellschaft mbH, Wien, Österreich). Die Peroxidkonzentration wird ermittelt durch eine Reaktion der Peroxide mit Peroxidase mit anschließender Farbreaktion mit TMB als Substrat. Nach Zugabe des Stoppuffers wird das Substrat mit einem ELISA-Reader photometrisch bei 450 nm bestimmt. Mit Hilfe eines Kalibrators kann dann die Konzentration der Peroxide in der Seminalplasmaprobe berechnet werden (Detektionsgrenze: 7 µmol/l).

##### *Material:*

- a) Mikrotiterplatte
- b) Lösung A: Probenpuffer
- c) Lösung B: Reaktionspuffer
- d) Lösung C: Auflösungs-puffer
- e) Lösung D: Enzymlösung
- f) Lösung E: Wiederherstellungslösung
- g) Kalibrator-Gefäße
- h) Stoppuffer

- i) Inkubator für 37°C
- j) ELISA-Reader mit 450 nm-Filter

Alle Reagenzien müssen bei 4°C gelagert werden und dürfen nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden.

*Vorbereitung des Versuchs:*

- a) Trübe Proben werden zunächst bei 5000xg mindestens fünf Minuten zentrifugiert.
- b) Des Weiteren werden alle Proben vor der Messung erneut gut gemischt.
- c) Die Mikrotiterplatte und das beigefügte Protokollblatt müssen zunächst sorgfältig markiert und beschriftet werden für den Kalibrator, die Kontrollprobe und die Seminalplasmaproben.

*Methode:*

1. Lösung B wird in 600 µl Lösung C gelöst. Diese Puffer sind lichtempfindlich und müssen deshalb vor direkter Lichteinstrahlung bewahrt werden.
2. Ein Kalibrator wird in 250 µl Lösung E gelöst und bei Raumtemperatur für fünf Minuten stehen gelassen, und dann wird die Probe gevortext.
3. Dann wird das sogenannte ABD-Reaktionsgemisch hergestellt (Angaben für 40 Proben), das allerdings *direkt* vor dem Assay erst gemischt werden sollte:  
5 ml Lösung A + 100 µl Lösung B + 5 µl Lösung D.
4. Anschließend werden sowohl von dem Kalibrator als auch von den Proben je 10 µl in die dafür markierten wells gegeben.
5. In alle wells wird dann je 100 µl Lösung A zugefügt.
6. Es erfolgt dann die erste photometrische Messung bei 450 nm mit dem ELISA-Reader. Die Messung sollte unter 20 bis 37°C erfolgen und 15 Minuten andauern.
7. Nach der Messung wird je 100 µl ABD-Reaktionsgemisch in alle wells hinzugegeben.
8. Bei 37 °C werden dann die Proben für 15 Minuten inkubiert.
9. Danach wird je 50 µl Stoppuffer in alle wells gegeben.
10. Schließlich erfolgt die zweite photometrische Messung unter den gleichen Bedingungen, wie bereits unter 6. erläutert.

*Auswertung:*

Die Unterschiede zwischen Messung 1 und 2 (siehe Schritte 6. und 10.) sind proportional der Peroxidkonzentration der Proben. Die ROS-Konzentrationen müssen wie folgt berechnet werden:

1. Sowohl für den Kalibrator als auch für die Proben müssen die Messergebnisse der beiden Messungen voneinander subtrahiert werden ( $\Delta OD = OD_2 - OD_1$ ).
2. Der  $\Delta OD$ -Wert des Kalibrators ist proportional der  $H_2O_2$ -Konzentration ( $\mu mol/l$ ).
3. Die Konzentrationen der Kontrollproben und Seminalplasmaproben werden mit folgender Formel berechnet:

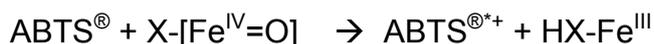
$$\text{Probenkonzentration } (\mu mol/l) = \Delta OD \text{ der Proben} \times 403 \mu mol/l \text{ (Kalibrator)} / \Delta OD \text{ des Kalibrators}$$

### **3.7. ANTIOXIDANTIENKONZENTRATION IM SEMINALPLASMA**

#### **3.7.1. TAS-MESSUNG**

*Prinzip:*

Die Bestimmung des Gesamt-Antioxidantien-Status (total antioxidant status, TAS) im seminalen Plasma erfolgt mit einer photometrischen Methode. 2,2'-Azino-di-[3-Äthylbenzthiazolin-Sulfonat] (ABTS<sup>®</sup>, BOEHRINGER, Mannheim, Deutschland) wird mit einer Peroxidase (Metmyoglobin) und  $H_2O_2$  inkubiert, um das radikale Kation ABTS<sup>®\*+</sup> herzustellen, das eine relativ stabile blau-grüne Farbe besitzt, die bei 600 nm gemessen wird. Antioxidantien in der Messprobe unterdrücken diese Farbbildung, d.h. die unterdrückte Farbbildung ist proportional zur Antioxidantienkonzentration. Reaktionsgleichungen zu diesem Versuch:



[Legende:  $HX-Fe^{III}$  = Metmyoglobin;  $X-[Fe^{IV}=O]$  = Ferrylmyoglobin]

*Material:*

- a) Reagenzien des TAS-Kits Nr. NX 2332 (RANDOX, Crumlin, Großbritannien):

Komponente	Konzentrationen im Versuch
Puffer: phosphatgepufferte Saline	80 mmol/l ; pH 7,4
Chromogen :	

- Metmyoglobin - ABTS®	- 6,1 µmol/l - 610 µmol/l
Substrat: stabilisiertes Wasserstoff-Superoxyd	250 µmol/l
Eichmass: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroma-2-Karbonsäure	Chargenspezifisch

b) Herstellung der Versuchslösungen:

Komponente	Behandlung / Lagerungsart
Puffer	Gebrauchsfertig; bei 2-8°C haltbar bis Verfallsdatum.
Chromogen	Eine Flasche Chromogen 2 mit 10 ml Puffer 1 vermischen; bei 2-8°C 2 Tage, bei 15-25°C 8 Stunden haltbar.
Substrat	1 ml Substrat 3 mit 1,5 ml Puffer 1 vermischen; bei 2-8°C haltbar bis Verfallsdatum.
Eichmass	Eine Flasche Eichmass mit 1 ml doppelt entionisiertem Wasser aufbereiten; bei 2-8°C 2 Tage, bei -20°C 1 Monat haltbar.

c) Versuchsbedingungen im Photometer:

Versuchsaufbau	Bedingung
Wellenlänge	600 nm
Küvette	1 cm Lichtpfad
Temperatur	37°C
Messung	gegen Luft

*Methode:*

1. Die Küvette wird nach folgendem Pipettierschema befüllt:

	Blindreagenz	Eichmass	Seminalplasmaprobe
Destilliertes Wasser	20 µl	---	---

Eichmass	---	20 µl	---
Seminalplasmaprobe	---	---	20 µl
Chromogen	1 ml	1 ml	1 ml

- Die Küvetten werden gut gemischt und dann das Anfangsabsorptionsvermögen ( $A_1$ ) gemessen.
- Danach wird jeweils zugefügt:

	Blindreagenz	Eichmass	Seminalplasmaprobe
Substrat	200 µl	200 µl	200 µl

- Die Küvetten werden gut gemischt und gleichzeitig eine Stoppuhr gestartet.
- Das Absorptionsvermögen ( $A_2$ ) wird nach *genau* drei Minuten gemessen.

*Auswertung:*

- Zunächst wird das Absorptionsvermögen bestimmt:  

$$\Delta A_{\text{Seminalplasmaprobe/Eichmass/Blindreagenz}} = A_2 - A_1.$$
- Anschließend erfolgt die Berechnung des Gesamt-Antioxidantien-Status (TAS) in zwei Schritten:
  - Faktor = Konzentration des Eichmasses (1,73 mmol/l) / ( $\Delta A_{\text{Blindreagenz}} - \Delta A_{\text{Eichmass}}$ )
  - TAS-Konzentration (mmol/l) = Faktor x ( $\Delta A_{\text{Blindreagenz}} - \Delta A_{\text{Seminalplasmaprobe}}$ )

### 3.7.2. VITAMIN E

*Prinzip:*

Vitamin E (Alpha-Tocopherol) hat einen pharmakologischen Effekt auf die Keimdrüsenfunktion. Die Bestimmung des Alpha-Tocopherols wird mittels einer HPLC-Methode (high performance liquid chromatography) durchgeführt. Die Methode basiert auf einer UV-Detektion als Messverfahren. Bei einer Wellenlänge von 325 nm bzw. 295 nm wird Licht ausgesandt, das von der Substanz ganz oder teilweise absorbiert wird; diese Absorption wird in dem Ergebnisdiagramm als Peak dargestellt. Die Peakfläche verhält sich proportional zur Analytenkonzentration. Bei dieser Methode wird die Patientenprobe, die in ein Gefäß mit einer trockenen Salzlösung verbracht wird, mit einem organischen Lösungsmittel (enthält internen Standard) gefällt. Die wässrige und die organische Phase werden durch

Zentrifugation voneinander getrennt, wobei dann von der oberen Phase 50 µl in das HPLC-System injiziert werden. Die Patientenproben werden mittels UV-Detektion mit Hilfe der Internen-Standard-Methode ausgewertet.

*Material:*

ClinRep® Komplettkit für Vitamine A und E im Plasma; Inhalt:

Einzelkomponente	Menge in ml
Mobile Phase	1000
Standardlösung	3
P-Präzipitationsreagenz mit internem Standard	10
Serum-Kalibrator, lyophilisiert	5

*Methode:*

Zur Inbetriebnahme des HPLC-Systems müssen folgende Bedingungen hergestellt werden:

Gegenstand	Bedingung
Pumpe	1,5 ml/min Flussrate
Autosampler	Injektionsvolumen: 50 µl Injektionsintervall: 8 min
Säule	Bei 30°C Gegendruck der Säule ≤ 200 bar
Detektor	325 nm; Umschaltung nach 3,5 min auf 295 nm
Auswerteeinheit	Ende der Integration und Peakauswertung nach 8 min
Retentionszeiten	a) interner Standard: ca. 4,7 min b) Vitamin E: ca. 7,0 min

Die Seminalplasmaproben werden in ein Probenvorbereitungsgefäß gegeben:

1. Zunächst gibt man 100 µl der Patientenprobe in das Gefäß, das bereits mit Reagenz gefüllt ist.
2. Hierzu pipettiert man 100 µl Präzipitationsreagenz P (dieses enthält 2 µg internen Standard).
3. Dann wird der Ansatz auf einem Vortexmixer für 30 Sekunden gemischt.
4. Dann wird die Patientenprobe bei 8800 x g für 5 Minuten zentrifugiert.
5. Schließlich werden 50 µl der oberen Phase in die HPLC-Anlage injiziert.

Nach einem Testlauf zur Überprüfung des HPLC-Systems, der mit der Standardlösung durchgeführt wird, und einem Kalibrierlauf, der mit dem lyophilisierten Serumkalibrator durchgeführt wird, der zuvor wie eine Patientenprobe vorbereitet werden muss (siehe oben), werden die Proben mittels HPLC gemessen. Für Alpha-Tocopherol wird ein Chromatogramm und ein Analysenausdruck erstellt, wobei die Peaks anhand der Retentionszeiten zugeordnet werden. Auch unbekannte Peaks werden integriert, um falsche Zuordnungen aufgrund von Verschiebungen der Retentionszeiten infolge Temperaturschwankungen zu vermeiden. Diese unbekannt Peaks werden dann mit Hilfe der Internen-Standard-Methode ermittelt. Die Auswerteeinheit des HPLC-Systems ermittelt automatisch die Konzentration der Substanzen unter Verwendung der Internen-Standard-Methode. Die tatsächliche Konzentration des Analyten, also hier Vitamin E im Seminalplasma, wird in mg/l angegeben (hier:  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ); der Verdünnungsfaktor wird mit 1,00 angegeben.

### **3.7.3. SELEN- UND ZINKMESSUNG**

#### *Prinzip:*

Die Analyse der Spurenelemente Selen und Zink im menschlichen Seminalplasma, beides Bestandteile, die zum antioxidativen Spektrum gerechnet werden, erfolgt mit dem Verfahren der sogenannten Neutronen-Aktivierungsanalyse, die die Messung von Substanzen mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen erlaubt (BEHNE und GAWLIK, 1989, Hahn-Meitner-Institut, Berlin, Deutschland). Grundsätzlich folgt das Verfahren drei Schritten:

1. der Aktivierung der Probe,
2. der Zwischenbehandlung und
3. der Messung.

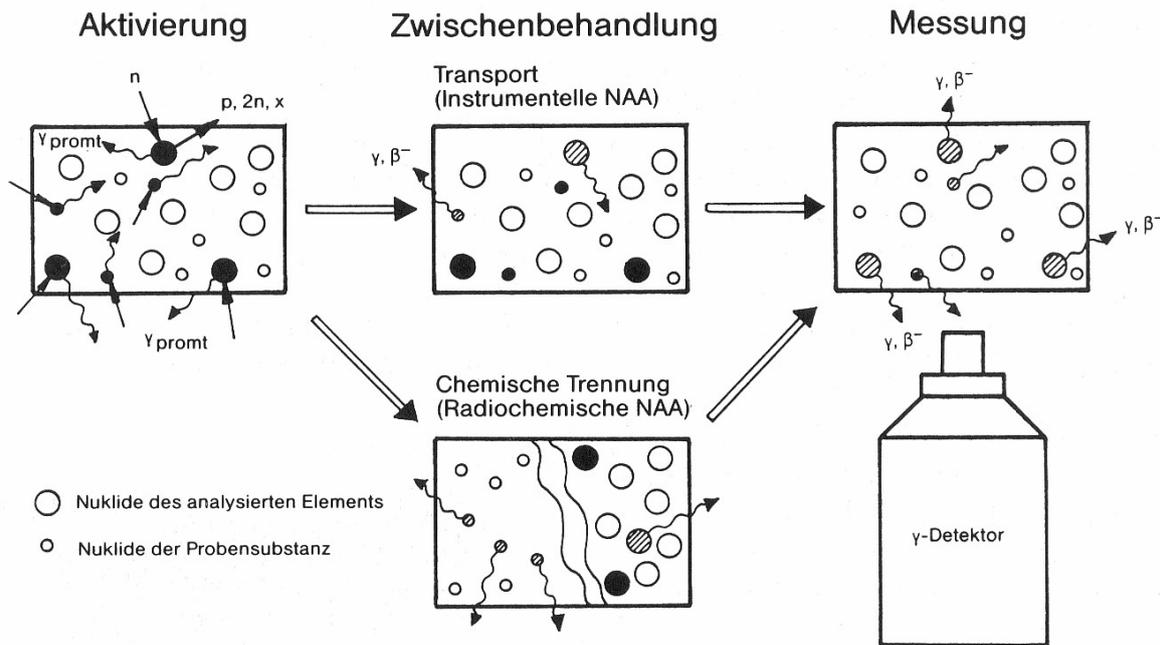


Abbildung 8: Prinzip der Neutronen-Aktivierungsanalyse.

#### Vorbereitung des Versuchs:

Das Probenmaterial (hier: Seminalplasma) wird durch eine abgeschmolzene Ampulle aus Quarzglas umschlossen, das aus bestimmten voruntersuchten Chargen stammt, die sicherstellen, dass die Ampulle nur geringste Mengen von Selen und Zink enthält. Da diese Proben einen hohen Wasseranteil besitzen, der bei Erwärmung und Radiolyse starken Druck erzeugen würde, werden sie vorher gefriergetrocknet, wobei die Probentemperatur unter  $-10^\circ\text{C}$  gehalten wird. Das Innere der Quarzampulle, also das Probenvolumen, muss aufgrund der Ortsabhängigkeit der Neutronenflüsse und der Detektoreigenschaften möglichst klein sein. Des weiteren muss die Probe weit genug vom Schmelzfluss der Ampulle entfernt sein. Dies wird durch eine Aluminiumfolie gewährleistet, die als Schild zur Abschirmung der thermischen Strahlung beim Abschmelzen der Ampulle dient.

#### Methode:

Der Versuchsablauf gliedert sich, wie oben bereits ausgeführt, in drei Schritte:

##### 1. Aktivierung:

Die Probe wird einem Neutronenfeld ausgesetzt, und damit wird eine kernchemische Reaktion induziert. Durch die Umwandlung einiger stabiler Nuklide in Radionuklide (durch Wechselwirkung der stabilen Nuklide mit den Neutronen) wird die Probe aktiviert. Auf die genaue Schilderung des

Reaktoraufbau wird aufgrund der Komplexität im Rahmen dieser Dissertation verzichtet. Zur Messung wird die Gammastrahlung  $E_\gamma$  des Produktkernes C ausgenutzt, der beim Zerfall des radioaktiven Zwischenprodukts B entsteht (siehe Abbildung oben), hier am Beispiel der Aktivierung eines Selenisotops dargelegt:

Aktivierung des Nuklides Se-74 des Spurenelementes Selen bei der Bestrahlung mit Reaktor-Neutronen: (Se-74 hat eine Isotopenhäufigkeit von  $0,9 \cdot 10^{-2}$ )

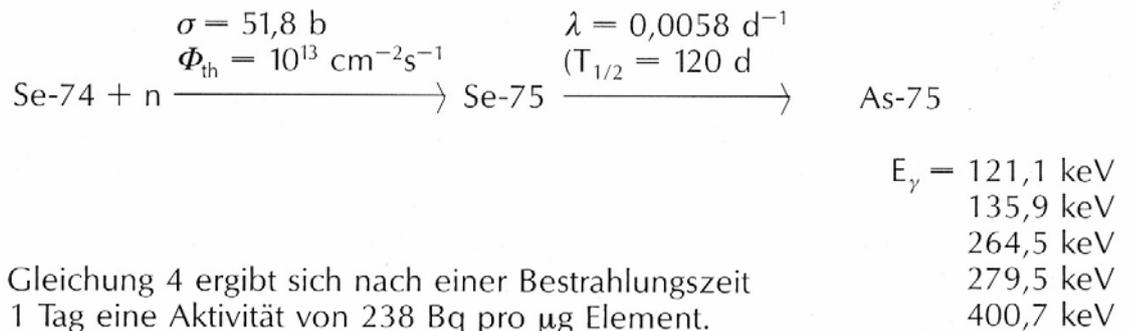


Abbildung 9: Aktivierung eines Selenisotops.

Zu beachten ist jedoch, dass neben den gewünschten zu analysierenden Elementen Selen und Zink auch noch weitere Bestandteile in der Probe vorhanden sind, die das Messergebnis verfälschen und die Nachweisgrenzen anheben können, insbesondere sind hier die Elektrolyte zu erwähnen. Dies weitgehend zu eliminieren, ist Aufgabe der sogenannten Zwischenbehandlung.

## 2. Zwischenbehandlung:

Zur Reduzierung des sogenannten spektralen Untergrunds, also der nicht erwünschten Elemente beim Messergebnis, gibt es unterschiedliche Techniken: Die Proben können von den ebenfalls aktivierten Transportbehältern getrennt werden (sogenannte „instrumentelle Neutronen-Aktivierungsanalyse“), dies geschieht hier innerhalb fünfzig Millisekunden im Berliner Forschungsreaktor BER II. Als zweites Verfahren dient die sogenannte „radiochemische Neutronen-Aktivierungsanalyse“. Hier werden störende Radionuklide (z.B. die störenden Elektrolytelemente) durch Ionentauscher gebunden und so der Probe entzogen. Schließlich gibt es noch als weitere wichtige Technik die Möglichkeit der Optimierung der Bestrahlungs- und Wartezeit. Beim Nachweis von Selen und Zink,

beides Elemente mit langlebigen Nukliden, liegt also der Fall vor, dass das langlebige Nuklid neben einem störenden kurzlebigen Nuklid aktiviert wird. Dies umgeht man, indem man nach Bestrahlungsende mit dem Beginn der Messung solange wartet, bis die kurzlebige Aktivität (hier P-32 als aus Phosphor entstehendes Nuklid mit einer Halbwertszeit von 14,2 Tagen) weitgehend abgeklungen ist.

### 3. Messung:

In der Regel emittieren die Radionuklide der analysierten biologischen Proben Gamma-Quanten mit Energien zwischen 100 Kiloelektronenvolt und 1,5 Megaelektronenvolt, das bedeutet die dominierenden Absorptionsmechanismen sind der sogenannte Photo- und Compton-Effekt. Als Detektoren der Energie dienen große Halbleiterdioden als Eigenleiter aus Germanium. Der Photoeffekt bewirkt die Erzeugung von freien Ladungsträgern in den Halbleitern, deren summierte Ladung proportional der gesamten Gammaenergie des Quants ist. Hierdurch entsteht in der Abbildung des Energiespektrums der sogenannte Photopeak, aus dessen energetischer Lage und dessen Fläche sich Radionuklide qualitativ und quantitativ bestimmen lassen. Die Selbstabsorption der Probe ist zu vernachlässigen. Durch weitere Analyse der Daten erfolgt dann die Berechnung des Selen- und Zinkgehaltes der Probe, angegeben in mg/kg.

## **3.8. PATIENTINNEN**

Die Patientinnen suchten gemeinsam mit ihren Ehe- oder Lebenspartnern (siehe auch 3.1.) die Fertilitätssprechstunde der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsklinik des Saarlandes (Homburg / Saar) auf. Die Daten der Patientinnen wurden retrospektiv aus den Krankenakten erhoben.

Die Behandlung der Patientinnen erfolgte mit der sogenannten kontrollierten ovariellen Stimulation nach gebräuchlichen Therapieprotokollen. In der Regel erfolgte die Behandlung mit GnRH-Agonisten (Gonadotropin-releasing-hormone) nach dem sogenannten „langen Protokoll“. In wenigen Fällen wurde eine Behandlung nach dem sogenannten „kurzen Protokoll“ oder mit GnRH-Antagonisten durchgeführt.

*Behandlung mit GnRH-Agonisten nach dem „langen Protokoll“:*

Das „lange Protokoll“ ist die momentan gebräuchlichste Stimulationsmethode (DIEDRICH et al., 1998). Die Patientin wird ab dem 20. Tag des Vorzyklus (späte Luteal- oder frühe Follikelphase) mit GnRH-Analoga (hier mit rekombinantem FSH [follikelstimulierendes Hormon]) down-reguliert, um einen vorzeitigen LH-Anstieg (luteinisierendes Hormon) zu vermeiden. Im Punktionszyklus selbst werden dann die Patientinnen nach einem festgelegten Dosisschema, das durch tägliche Ultraschall- und Hormonkontrollen bestimmt wird, stimuliert. In den vorliegenden Fällen erfolgte die Stimulation zumeist mit Decapeptyl® (per subkutaner Injektion), seltener mit Synarela® oder Suprefact® (nasale Verabreichung).

*Behandlung mit GnRH-Agonisten nach dem „kurzen Protokoll“:*

Beim „kurzen Protokoll“ wird der GnRH-Agonist nicht schon im Vorzyklus, sondern erst im Stimulationszyklus eingesetzt, beginnend am ersten Zyklustag bis zur Ovulationsinduktion. Es erfolgt eine gemeinsame Gabe mit HCG (humanes Chorion-Gonadotropin). In den vorliegenden Fällen wurde als GnRH-Agonist Decapeptyl® genutzt.

*Behandlung mit GnRH-Antagonisten:*

Wie beim „kurzen Protokoll“ werden hier die Antagonisten erst im Punktionszyklus eingesetzt. Erst wird mit rekombinantem FSH stimuliert, dann ab dem siebtem Zyklustag wird der GnRH-Antagonist bis zur Ovulationsauslösung gegeben (FELDERBAUM et al., 1995). In den vorliegenden Fällen wurde Cefrotide® (per subkutaner Injektion) verabreicht.

*Ovulationsinduktion:*

Nach erfolgter Stimulation mittels diverser Therapieprotokolle wird der Eisprung ausgelöst durch Gabe von 10.000 Injektionseinheiten (IU) HCG, das den mittzyklischen LH-Anstieg, der ovulationsauslösend ist, imitiert (DIEDRICH et al., 1998). Die Ovulation wird induziert bei ausreichender Follikelanzahl und einer Mindestgröße des Leitfollikels von 18 nm oder mehr.

*Eizellgewinnung:*

Die Follikelpunktion erfolgt 36 Stunden nach Verabreichung des HCG zur Ovulationsinduktion durch einen transvaginalen Zugang. Dieser Zugang ermöglicht die besten Bedingungen, da er risikoärmer und kostengünstiger ist und eine höhere Ausbeute an gewonnenen Eizellen bietet (DIEDRICH et al., 1998).

### **3.9. FERTILISATION**

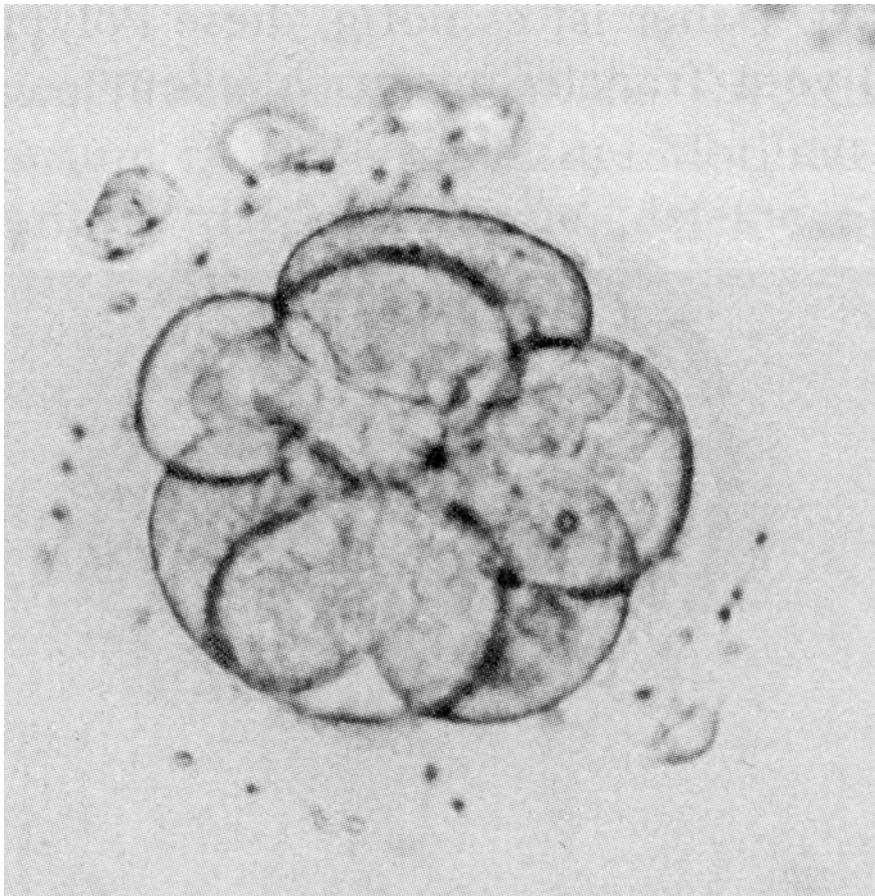
#### **3.9.1. FERTILISATION MITTELS IN-VITRO-FERTILISATION (IVF)**

Die Eizellen werden nach der Punktion zunächst im Kulturmedium gewaschen und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Das Milieu im Reagenzglas sollte den Bedingungen in den Tuben bezüglich Druck, Temperatur, Feuchtigkeit, Begasung und pH nahe kommen (DIEDRICH et al., 1998).

Die Spermien werden mit den bereits vorab beschriebenen Methoden aufbereitet, und dann wird durch Zentrifugation das Seminalplasma von den Spermatozoen getrennt.

Die Eizellen werden dann mit mindestens 50.000 beweglichen Spermatozoen zusammengebracht. Die beginnende Befruchtung wird mittels Mikroskop nach 15 bis 20 Stunden überprüft (Pronukleusstadium wird sichtbar), und dann werden die Eizellen erneut für 24 Stunden inkubiert.

Den anschließenden Embryotransfer sollte man spätestens im Achtzellstadium durchführen.



*Abbildung 10: Embryo im Achtzellstadium.*

Der Embryo wird circa 48 Stunden nach Insemination in den Uterus der Mutter transferiert. In Deutschland ist es nur erlaubt, drei oder weniger Embryonen zu transferieren. Diese Regelung wurde aufgrund des deutlich erhöhten Risikos an Mehrlingsschwangerschaften eingeführt (EDWARDS, 1981).

### **3.9.2. FERTILISATION MITTELS INTRACYTOPLASMATISCHER SPERMIENINJEKTION (ICSI)**

Nach der Punktion werden die Eizellen in ein Hyaluronidasemedium überführt, bis die Cumuluszellen vollständig entfernt sind. Anschließend werden die Eizellen in Kulturmedium gewaschen, und der Reifegrad beurteilt (Metaphase II-, Metaphase I-, Germinalstadium). Zur Injektion werden nur Metaphase II-Oozyten verwendet (KÜPKER et al., 1998).

Die Ejakulataufbereitung und weitere Vorbereitung erfolgt, wie bereits unter 3.9.1. beschrieben.

Zur Vorbereitung der ICSI werden spezielle Instrumente benötigt (HAMMADEH, 1997).

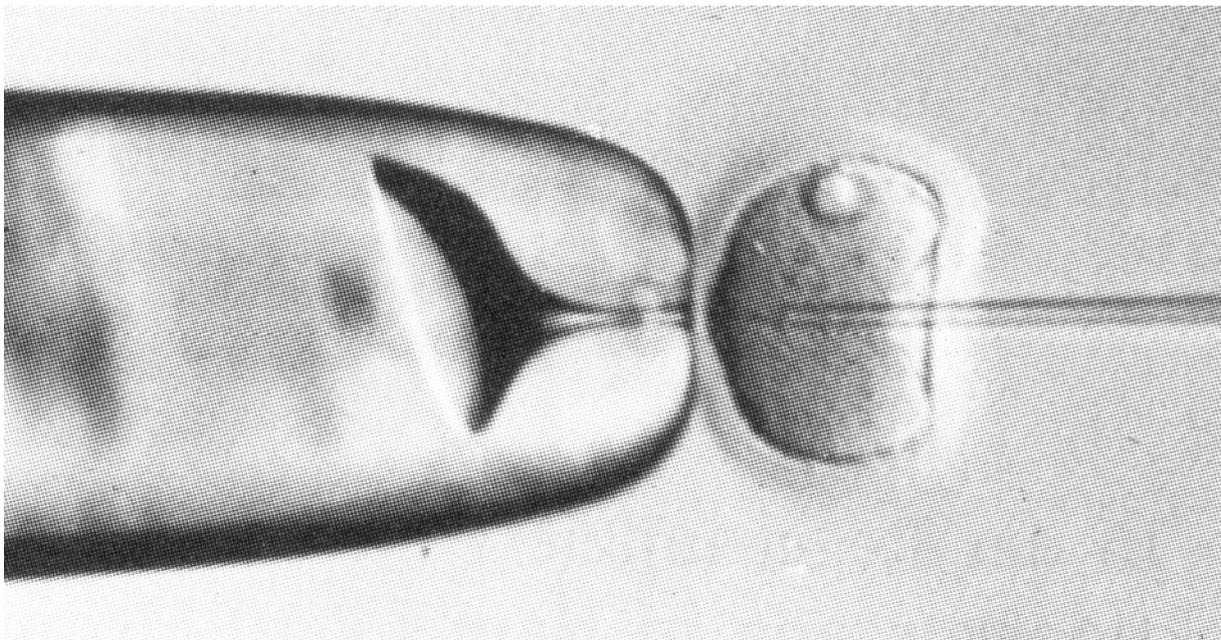
*Instrumentarium zur ICSI-Therapie:*

Instrumentarium	Besonderheiten
Interphase-Differentialmikroskop (NIKON/NARISHIGE, Model IM-69, Japan)	---
2 Manipulations-Sets (NIKON/NARISHIGE, Model MM-188, Japan)	Jedes ausgestattet mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ elektrischem Manipulator</li> <li>➤ hydraulischem Manipulator</li> <li>➤ Injektor</li> </ul>
Wärmeplatte	---
Haltepipette (10 MPH-120, 35°, Micro-Pipets, HUMAGEN, Charlottesville, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ äußerer Durchmesser: 120 µm</li> <li>➤ innerer Durchmesser: 15 µm</li> </ul>
Injektionspipette (10 MIC, 35°, Micro-Pipets, HUMAGEN, Charlottesville, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ äußerer Durchmesser der Pipettenspitze: 6-8 µm</li> <li>➤ innerer Durchmesser der Pipettenspitze: 4-5 µm</li> </ul>

Die Oozyten werden einzeln in Kulturmedium in eine Kulturschale gesetzt. In das Zentrum der Schale werden ein Mikroliter Spermiasuspension und fünf Mikroliter Polyvinylpyrrolidon aufgebracht.

Im nächsten Schritt wird das Spermium mittels Injektionspipette immobilisiert und aspiriert, wobei das Spermium nahe der Öffnung der Pipette positioniert werden sollte (HAMMADEH, 1997).

Unter dem Interphase-Differentialmikroskop bei einer Temperatur von 37°C erfolgt die Mikroinjektion. Die Oozyte wird durch den Sog der Haltepipette festgehalten, wobei das Polkörperchen bei 12 oder 6 Uhr sein sollte, um keine Traumatisierung des Spindelapparates zu bewirken (KÜPKER et al., 1998). Die Samenzelle wird über die Injektionspipette bei 3 Uhr in die Oozyte und das Zytoplasma eingestochen durch eine atraumatische Oolemmembranläsionierung. Dann wird die Injektionspipette wieder zurückgezogen.



*Abbildung 11: ICSI-Injektionsvorgang. Die Zytoplasmamembran ist bei 3 Uhr durch die Pipette durchbrochen, das Spermatozoon wird injiziert.*

Die injizierten Eizellen werden dann mehrmals in Kulturmedium gewaschen und für 18 bis 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die beginnende Befruchtung wird nach 16 bis 18 Stunden anhand des Vorhandenseins eines Vorkernstadiums kontrolliert. Anschließend werden die Eizellen erneut für 24 Stunden inkubiert.

Der darauffolgende Embryotransfer erfolgt, analog den vorgegebenen Richtlinien, wie bei der in-vitro-Fertilisation (siehe 3.9.1.).

### **3.10. BEFRUCHTUNGSRATE UND SCHWANGERSCHAFTSNACHWEIS**

*Befruchtungsrate:*

Die Befruchtungsrate errechnet sich aus den befruchteten Eizellen, geteilt durch die Anzahl der gewonnenen Eizellen und schließlich multipliziert mit 100:

Befruchtungsrate = (befruchtete Eizellen / gewonnene Eizellen) x 100

*Schwangerschaftsnachweis:*

Zur Feststellung einer Schwangerschaft der Patientinnen wird am 12. und am 14. Tag nach dem Embryotransfer eine quantitative HCG-Bestimmung vorgenommen. Zudem wird der Schwangerschaftsverlauf sonographisch kontrolliert.

Zur Berechnung der Schwangerschaftsrate teilt man alle Schwangeren durch alle Patientinnen und multipliziert wiederum mit 100:

Schwangerschaftsrate = (alle Schwangere / alle Patientinnen) x 100

### **3.11. STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Sämtliche Berechnungen, statistische Auswertung und Graphiken wurden mit Hilfe des SPSS-Programms, Version 10.0 für Windows, vorgenommen.

Für alle gemessenen, bestimmten oder errechneten Parameter wurde eine Analyse der Häufigkeitsverteilungen mit Minima, Maxima, Medianen, Mittelwerten und Standardabweichungen vorgenommen (sogenannte deskriptive Statistik).

Zur weiteren Bestimmung von Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern kamen unterschiedliche Testmethoden zum Einsatz:

Bei rein stetigen Merkmalen wurden die Werte per linearer Regression bestimmt und in Streudiagrammen dargestellt.

Bei rein kategorialen Merkmalen wurden die Korrelationen mittels Chi-Quadrat-Test oder exaktem Fisher-Test bestimmt. Dargestellt wurde dies mit Kreuztabellen.

Kam es zum Vergleich von kategorialen und stetigen Variablen, wobei die kategoriale Variable die Einflussvariable darstellte, wurde mit dem T-Test für unabhängige Stichproben beziehungsweise dem Mann-Whitney-U-Test gerechnet; bei Merkmalen, bei denen über zwei Ausprägungen möglich waren, wurde die

Varianzanalyse und der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Die Darstellung erfolgte hier in Boxplots.

Im umgekehrten Fall im Vergleich kategorialer mit stetiger Parameter, wobei jetzt die stetige Variable die Einflussvariable bildete, wurde mit der logistischen Regression gearbeitet. Auch hier erfolgte die Darstellung in Boxplots.

Zur Testung der Varianzgleichheit wurde der Levene-Test verwandt.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt festgelegt: Ein p-Wert  $< 0.05$  gilt als signifikant,  $p < 0.01$  als stark signifikant und ein p-Wert  $\leq 0.001$  als hoch signifikant.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. ERGEBNISSE DER EINZELNEN PARAMETER IM VERGLEICH IVF- UND ICSI-KOLLEKTIV

#### 4.1.1. PARAMETER DER KLASSISCHEN SAMENANALYSE

Es folgt zunächst ein Überblick über die Ergebnisse der Parameter der klassischen Samenanalyse, wie die Übersicht in Tabelle 1 zeigt.

*Tabelle 1: Parameter der klassischen Samenanalyse; Unterteilung in IVF- und ICSI-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)*

Parameter	IVF-Gruppe (n=26)		ICSI-Gruppe (n=22)		P-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
Volumen (ml)	3.63±1.43	3.5	3.36±1.63	3.0	0.542
PH-Wert	8.55±0.34	8.5	8.58±0.33	8.6	0.747
Spermiendichte (Mio./ml)	73.85±34.92	75.0	45.47±41.44	30.0	0.013
Globalmotilität (%)	42.88±18.56	40.0	19.55±11.54	15.0	0.000
Progressivmotilität (%)	5.38±8.71	0.0	0.91±2.51	0.0	0.018
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	48.85±23.85	50.0	30.27±25.09	20.0	0.012
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	61.73±18.65	65.0	60.68±15.53	60.0	0.835
Morphologie mit Normalformen (%)	9.58±5.67	10.5	7.55±6.38	6.5	0.249
Spermiendichte nach Aufbereitung (Mio./ml)	29.68±25.06	19.0	18.59±24.00	12.5	0.126
Motilität nach Aufbereitung (%)	78.08±13.57	80.0	39.32±30.87	27.5	0.000

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven, denen eine in-vitro-Fertilisation (n=26) beziehungsweise eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (n=22) als letztlisches Fertilisationsverfahren zuteil wurde, bezüglich des Volumens (p=0.542), des pH-Wertes (p=0.747), der Membranstabilität / HOS-Test (p=0.835) sowie der Morphologie-Normalformen (p=0.249).

Signifikante Differenzen zwischen beiden Gruppen finden sich bei der Spermiedichte, der Motilität (sowohl vor als auch nach der Aufbereitung, sowie auch aufgeteilt in Global- und Progressivmotilität) und auch bei der Vitalitätsmessung mittels Eosin-Test. So zeigen sich bezüglich der Spermiedichte (p=0.013), der Progressivmotilität (p=0.018) und der Vitalität (p=0.012) signifikante Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven beider Gruppen, bei der Globalmotilität (p=0.000) und der Gesamtmotilität nach der Aufbereitung (p=0.000) gar hoch signifikante Unterschiede.

Zur Gesamtbeurteilung der Ergebnisse der Parameter der klassischen Samenanalyse zeigt Tabelle 2 die Ergebnisse des Gesamtkollektives:

*Tabelle 2: Parameter der klassischen Samenanalyse (Gesamtkollektiv)*

Parameter	IVF- und ICSI-Gruppe (n=48)	
	M±SD	Median
Volumen (ml)	3.51±1.51	3.5
PH-Wert	8.57±0.34	8.5
Spermiedichte (Mio./ml)	60.84±40.25	57.5
Globalmotilität (%)	32.19±19.51	30
Progressivmotilität (%)	3.33±6.95	0
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	40.33±25.91	37.5
Membranstabilität	61.25±17.12	60

(HOS-Test) (%)			
Morphologie	mit	8.65±6.03	7.5
Normalformen (%)			
Spermiendichte	nach	24.59±24.95	16.5
Aufbereitung (Mio./ml)			
Motilität	nach	60.31±30.08	75
Aufbereitung (%)			

Sowohl in der Unterteilung nach zwei Patientengruppen als auch in der Betrachtung der Gesamtzahl zeigen sich in Bezug auf das Volumen der abgegebenen Spermaprobe und auf den pH-Wert normwertige Ergebnisse. Bei der Spermiendichte gibt es im Gesamtkollektiv als auch in der IVF-Gruppe ebenso normale Konzentrationen. Dies ist zwar in der ICSI-Gruppe auch der Fall, nur stellen sich hier signifikant geringere Dichtezahlen dar.

In Betrachtung der Motilitätszahlen zeigen sich insgesamt sowohl in der Darstellung nach Global- und Progressivmotilität als auch in der Gesamtmotilität nach Aufbereitung deutlich erniedrigte Ergebnisse gegenüber den als normwertig eingestuften WHO-Spermiogramm-Werten.

In den Supravitalfärbungen erreichen die Ergebnisse für die Membranstabilität mittels HOS-Test normale Ergebnisse in allen Gruppen, bei der Vitalitätsbestimmungen mittels Eosin-Testung insgesamt erniedrigte Ergebnisse.

Auch die normalen Morphologieformen (bedeutet in dieser Studie der prozentuale Anteil von Patienten, die < 15% abnormale Spermienformen vorweisen) sind insgesamt in allen Fraktionen deutlich verringert.

#### **4.1.2. CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS UND APOPTOSERATE**

In Tabelle 3 werden die Ergebnisse gemäß der Färbungen mit Acridinorange und Chromomycin zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus des Spermienkopfes sowie die Resultate der Apoptoseratebestimmung mittels TUNEL-Färbung aufgezeigt.

Tabelle 3: Parameter zum Chromatinkondensationsstatus und zur Apoptoserate; Unterteilung in IVF- und ICSI-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)

Parameter	IVF-Gruppe (n=26)		ICSI-Gruppe (n=22)		P-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	98.04±2.74	99.50	94.41±7.51	98.0	0.041
Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	79.88±11.62	84.00	60.55±21.64	66.5	0.000
Tunelfärbung mit grünem Ergebnis	4.38±3.82	3.50	5.77±4.95	5.0	0.279

Bei den Färbemethoden zur Beurteilung des Kondensationsstatus zeigt sich ein leicht signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen ( $p=0.041$ ) in Bezug auf die Acridinorangefärbung sowie ein hoch signifikanter Unterschied ( $p=0.000$ ) in der Chromomycinfärbung. Keine signifikanten Differenzen gibt es zwischen den beiden Gruppen bei der Apoptoserate (TUNEL-Färbemethode).

Im Gesamtkollektiv stellen sich, wie in Tabelle 4 veranschaulicht, folgende Ergebnisse ein:

Tabelle 4: Parameter zum Chromatinkondensationsstatus und zur Apoptoserate (Gesamtkollektiv)

Parameter	IVF- und ICSI-Gruppe (n=48)	
	M±SD	Median
Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	96.38±5.70	98.50
Chromomycinfärbung	71.02±19.39	75.00

ohne Fluoreszenz Tunelfärbung grünem Ergebnis	mit	5.02±4.38	4.00
---	-----	-----------	------

Insgesamt gesehen zeigen sich in allen Fraktionen (IVF-, ICSI-, Gesamtkollektiv) vergleichsweise normwertige Ergebnisse. In der Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus des Spermienkopfes zeigen sich in der Acridinorangefärbung äußerst wenig Kernanomalien (Mittelwert 96.38 % normale Kerne im Gesamtkollektiv), wobei in der ICSI-Gruppe etwas mehr Anomalien (Mittelwert 94.41 % normale Kerne) festgestellt wurden. In der Chromomycinfärbung zeigen sich ebenso im Mittel zum Großteil vollständig kondensierte Kerne (Mittelwert 71.02 % im Gesamtkollektiv), wobei sich auch hier in der ICSI-Gruppe hoch signifikant (siehe oben) schlechtere Ergebnisse (Mittelwert 60.55 %) zeigen im Vergleich zur IVF-Fraktion (Mittelwert 79.88%). Die Apoptoserate ist in allen Kollektiven sehr gering mit einem Mittelwert von 5.02 % im Gesamtkollektiv.

#### **4.1.3. OXIDANTIEN- UND ANTIOXIDANTIENKONZENTRATIONEN IM SEMINALPLASMA**

Im folgenden Abschnitt werden in Tabelle 5 die Ergebnisse der Parameter der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe dargelegt.

*Tabelle 5: Parameter der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe; Unterteilung in IVF- und ICSI-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)*

Parameter	IVF-Gruppe (n=26)		ICSI-Gruppe (n=22)		P-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
ROS (µmol/l)	94.73±102.84	62.15	54.78±39.83	44.85	0,093
TAS (mmol/l)	1.43±0.28	1.45	1.53±0.22	1.45	0,153
Vitamin E (µg/dl)	38.94±16.90	37.03	41.34±13.43	39.39	0,610
Selen (mg/kg)	3.412E-02 ±1.681E-02	3.500E-02	3.614E-02 ±8.481E-03	3.500E-02	0,580

Zink (mg/kg)	131.0±77.47	124.5	127.32±60.16	116.5	0,857
--------------	-------------	-------	--------------	-------	-------

In keiner der untersuchten oxidativen (ROS mit  $p=0.093$ ) oder antioxidativen Parameter (TAS mit  $p=0.153$ , Vitamin E mit  $p=0.610$ , Selen mit  $p=0.580$ , Zink mit  $p=0.857$ ) zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen IVF- und ICSI-Gruppe.

In der gesamten Patientengruppe zeigen sich die in Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse für Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma.

*Tabelle 6: Parameter der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe (Gesamtkollektiv)*

Parameter	IVF- und ICSI-Gruppe (n=48)	
	M±SD	Median
ROS ( $\mu\text{mol/l}$ )	76.42±82.09	51.94
TAS (mmol/l)	1.48±0.26	1.45
Vitamin E ( $\mu\text{g/dl}$ )	39.99±15.29	38.21
Selen (mg/kg)	3.504E-02 ±1.355E-02	3.500E-02
Zink (mg/kg)	129.32±69.38	117.5

In der Zusammenschau der Ergebnisse der oxidativen und antioxidativen Parameter zeigt sich für die reactive oxygen species deutlich erhöhte Werte in der IVF-Gruppe (Mittelwert 94,73  $\mu\text{mol/l}$ ) gegenüber der ICSI-Gruppe (Mittelwert 54,78  $\mu\text{mol/l}$ ). Umgekehrt verhält es sich bei den Ergebnissen bezüglich TAS, Vitamin E und Selen. Hier resultieren jeweils höhere Werte der antioxidativen Parameter in der ICSI-Gruppe (Mittelwert für TAS 1.53 mmol/l, für Vitamin E 41.34  $\mu\text{g/dl}$  und für Selen  $3,614 \times 10^{-2}$  mg/kg) gegenüber der IVF-Fraktion (Mittelwert für TAS 1.43 mmol/l, für Vitamin E 38.94  $\mu\text{g/dl}$ , für Selen  $3,412 \times 10^{-2}$  mg/kg). Lediglich bei Zink zeigt sich ein höherer Wert in der IVF-Gruppe ein höherer Wert (Mittelwert 131,0 mg/kg) als im ICSI-Kollektiv (Mittelwert 127,32 mg/kg).

Da es für diese Parameter in der Literatur sehr unterschiedliche Referenzbereiche für die Normalwerte gibt, wird die Beurteilung der Gesamtergebnisse (Tabelle 6) in der Diskussion eingebracht werden.

#### **4.1.4. BEFRUCHTUNGS- UND SCHWANGERSCHAFTSRESULTATE**

In der Betrachtung der Endresultate bezüglich des Erfolges der unterschiedlichen Fertilisationsmethoden zeigt Tabelle 7 die Ergebnisse bezüglich entnommenen, fertilisierten und transferierten Eizellen sowie die Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnisse.

*Tabelle 7: Parameter zu Ergebnissen des Transfers, der Befruchtung und der Schwangerschaft; Unterteilung in IVF- und ICSI-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)*

Parameter	IVF-Gruppe (n=26)		ICSI-Gruppe (n=22)		P-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
Entnommene Eizellen	10.69±7.24	9.00	9.09±4.14	9.00	0.364
Befruchtete Eizellen	5.46±6.59	3.00	5.36±3.62	5.00	0.951
Befruchtungsrate (%)	67.26	---	67.87	---	0.172
Transferierte Eizellen	1.73±1.00	2.00	2.18±0.79	2.00	0.095
Schwangerschaften (absolut)	11	---	4	---	---
Schwangerschaftsrate (%)	42.3	---	18.20	---	---

In keinem der beobachteten Parameter zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der IVF- und der ICSI-Gruppe ( $p \geq 0,05$ ).

Im Gesamtkollektiv zeigen sich die in Tabelle 8 veranschaulichten Resultate.

Tabelle 8: Parameter zu Ergebnissen des Transfers, der Befruchtung und der Schwangerschaft (Gesamtkollektiv)

Parameter	IVF/ICSI (n=48)	
	M±SD	Median
Entnommene Eizellen	9.96±6.02	9.00
Befruchtete Eizellen	5.42±5.39	4.00
Befruchtungsrate (%)	67.65	---
Transferierte Eizellen	1.94±0.93	2.00
Schwangerschaften (absolut)	15	---
Schwangerschaftsrate (%)	31.3	---

Insgesamt gesehen, zeigen sich in den meisten Parametern zur Fertilisation bessere Ergebnisse in der IVF-Gruppe als in der ICSI-Gruppe. Die Zahl der gewonnenen Eizellen, der befruchteten Eizellen sowie die Schwangerschaftsrate und absolute Zahl an Schwangerschaften ist in der IVF-Gruppe zum Teil deutlich höher als in der ICSI-Gruppe. Die Befruchtungsraten sind in beiden Fraktionen jedoch nahezu identisch (Mittelwert IVF 67,26% versus ICSI 67,87%). Die Zahl der letztlich transferierten Eizellen liegt in der ICSI-Gruppe im Mittelwert etwas höher als die der IVF-Patienten.

In Betrachtung des Gesamtkollektives werden von im Mittelwert 9,96 gewonnenen Eizellen 5,42 befruchtet und hiervon 1,94 transferiert. Die Befruchtungsrate in der Gesamtgruppe liegt bei circa 2/3 (Mittelwert 67,65%), wohingegen die Schwangerschaftsrate insgesamt nur bei 31,3% im Mittelwert liegt (15 Schwangerschaften bei insgesamt 48 Patienten).

## **4.2. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS / APOPTOSERATE UND DEN PARAMETERN DER KLASSISCHEN SAMENANALYSE**

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich wird, gibt es insbesondere zwischen den Ergebnissen der Chromomycinfärbung und den Resultaten der klassischen Samenanalyse signifikante Korrelationen.

So zeigen sich bezüglich Globalmotilität ( $p=0.001$ ;  $r=0.457$ ) hoch signifikante Zusammenhänge zur vollständigen Chromatinkondensation. Ebenso gibt es eine hoch signifikante Korrelation bei der Motilität nach der Aufbereitung ( $p=0.000$ ,  $r=0.567$ ) sowie einen signifikanten Zusammenhang zur Progressivmotilität ( $p=0.039$ ,  $r=0.299$ ). Weiterhin gibt es auch signifikante Zusammenhänge zwischen der Spermiovitalität ( $p=0.019$ ,  $r=0.336$ ) beziehungsweise der morphologischen Normalformen ( $p=0.027$ ,  $r=0.319$ ) und der vollständigen Chromatinkondensation (mittels Chromomycinfärbung detektiert). Außerdem zeigt sich des Weiteren ein stark signifikanter Zusammenhang ( $p=0.002$ ;  $r=0.437$ ) zwischen der Spermienkonzentration und der vollständig kondensierten Chromatinfraction (nach Chromomycinfärbung).

Kein signifikanter Zusammenhang zeigt sich zwischen den klassischen Spermioqrammparametern und der Acridinorangefärbung, wohl aber positive Korrelationen (mit Ausnahme des HOS-Testes).

Insgesamt zeigt sich also, dass es positive korrelierende Zusammenhänge zwischen normalen Werten im Spermioqramm und vollständig kondensiertem Chromatin im Spermienkopf gibt.

Zwischen der Apoptoserate (mittels TUNEL-Färbung) und den Spermioqrammparametern ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge aufzeigen. Auffällig zeigen sich, wenn auch nicht signifikant, negative Korrelationen zwischen stattgefunder Apoptose und den Motilitäts- und Vitalitätsparametern.

Tabelle 9: Korrelationen zwischen den Parametern zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus bzw. der Apoptoserate und den Parametern der klassischen Samenanalyse (Gesamtkollektiv, n=48)

Parameter		Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Volumen (ml)	r	0.085	-0.028	0.197
	p	0.568	0.849	0.179
PH-Wert	r	0.073	-0.064	0.193
	p	0.623	0.664	0.189
Spermiendichte (Mio./ml)	r	0.260	0.437	0.020
	p	0.074	0.002	0.891
Globalmotilität (%)	r	0.192	0.457	-0.078
	p	0.191	0.001	0.600
Progressivmotilität (%)	r	0.110	0.299	-0.167
	p	0.456	0.039	0.258
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	0.172	0.336	-0.108
	p	0.241	0.019	0.467
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.235	0.272	-0.237
	p	0.108	0.061	0.105
Morphologie mit Normalformen (%)	r	0.204	0.319	0.127
	p	0.164	0.027	0.391
Spermiendichte nach Aufbereitung (Mio./ml)	r	0.170	0.144	0.120
	p	0.248	0.329	0.418
Motilität nach Aufbereitung (%)	r	0.257	0.569	-0.111
	p	0.078	0.000	0.454

Bei Betrachtung des IVF-Kollektivs (Tabelle 10) zeigen sich deutlich weniger signifikante Ergebnisse wie in obiger Betrachtung der Gesamtpatienten. Lediglich die signifikante Korrelation zwischen der vollständigen Chromatinkondensation (mittels Chromomycinfärbung bestätigt) und der Spermienkonzentration zeigt sich erneut ( $p=0.048$ ,  $r=0.392$ ).

Wie bereits im Gesamtkollektiv (dort jedoch nicht signifikant) zeigt sich eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Chromatinkondensationsstatus (mittels Acridinorangefärbung bestätigt) und der Membranstabilität ( $p=0.021$ ,  $r=-0.45$ ).

Auch in der IVF-Fraktion zeigen sich zwischen den Spermiogrammparametern und der Apoptoserate wenig signifikante Zusammenhänge. Es stellen sich signifikante ( $p=0.015$ ,  $r=0.474$ ) beziehungsweise gar hoch signifikante ( $p=0.001$ ,  $r=0.629$ ) Korrelationen zwischen der Apoptoserate und der Spermienkonzentration nach der Aufbereitung beziehungsweise dem Spermavolumen dar.

*Tabelle 10: Korrelationen zwischen den Parametern zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus bzw. der Apoptoserate und den Parametern der klassischen Samenanalyse (IVF-Kollektiv,  $n=26$ )*

Parameter		Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Volumen (ml)	r	0.359	-0.290	0.629
	p	0.071	0.151	0.001
PH-Wert	r	-0.023	0.000	-0.076
	p	0.910	0.998	0.713
Spermiendichte (Mio./ml)	r	0.205	0.392	0.094
	p	0.314	0.048	0.646
Globalmotilität (%)	r	-0.096	0.375	0.094
	p	0.640	0.059	0.649
Progressivmotilität (%)	r	0.024	0.159	-0.143
	p	0.906	0.439	0.487
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	-0.204	0.175	-0.091
	p	0.318	0.393	0.657
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.450	0.321	-0.164
	p	0.021	0.110	0.424
Morphologie mit Normalformen (%)	r	0.260	0.014	0.382
	p	0.199	0.944	0.054
Spermiendichte nach Aufbereitung	r	0.113	-0.063	0.474
	p	0.583	0.758	0.015

(Mio./ml)				
Motilität nach	r	0.168	0.337	-0.101
Aufbereitung (%)	p	0.411	0.092	0.624

In der ICSI-Fraktion (in Tabelle 11 dargestellt) zeigen sich kaum Signifikanzen. Es bestätigt sich die bereits im Gesamtkollektiv bestehende signifikante Korrelation zwischen den morphologischen Normalformen und der vollständigen Kernchromatinkondensation, detektiert mittels Chromomycinfärbung ( $p=0.043$ ,  $r=0.435$ ). Eine weitere signifikante Korrelation zeigt sich zwischen der Apoptoserate und dem pH-Wert ( $p=0.038$ ,  $r=0.444$ ).

*Tabelle 11: Korrelationen zwischen den Parametern zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus bzw. der Apoptoserate und den Parametern der klassischen Samenanalyse (ICSI-Kollektiv,  $n=22$ )*

Parameter		Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Volumen (ml)	r	-0.050	0.026	-0.119
	p	0.826	0.909	0.597
PH-Wert	r	0.162	-0.081	0.444
	p	0.472	0.719	0.038
Spermiendichte (Mio./ml)	r	0.167	0.294	0.075
	p	0.458	0.185	0.740
Globalmotilität (%)	r	0.065	0.139	-0.077
	p	0.772	0.536	0.733
Progressivmotilität (%)	r	-0.008	0.403	-0.175
	p	0.972	0.063	0.437
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	0.184	0.214	0.022
	p	0.412	0.338	0.921
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.223	0.321	-0.326
	p	0.318	0.146	0.138
Morphologie mit Normalformen (%)	r	0.140	0.435	-0.025
	p	0.534	0.043	0.914

Spermiendichte	r	0.122	0.108	-0.135
nach Aufbereitung (Mio./ml)	p	0.587	0.633	0.548
Motilität	r	0.049	0.380	0.027
nach Aufbereitung (%)	p	0.830	0.081	0.905

### **4.3. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN OXIDANTIEN-/ ANTIOXIDANTIENKONZENTRATIONEN UND DEN PARAMETERN DER KLASSISCHEN SAMENANALYSE**

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, gibt es zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und den oxidativen Parametern, repräsentiert durch ROS, keine signifikanten Zusammenhänge.

Durchweg signifikante Ergebnisse zeigen sich zwischen dem antioxidativen Spektrum und den Werten für Global- und Progressivmotilität. Hier stellen sich signifikant bis stark signifikant negative Korrelationen dar. Ebenso zeigen sich hoch signifikant negative Zusammenhänge zwischen Zink und Selen gegenüber dem pH-Wert (in beiden Fällen  $p=0.000$ ). Eine weitere signifikant negative Korrelation gibt es zwischen dem totalen Antioxidantienstatus und den morphologischen Normalformen ( $p=0.026$ ,  $r=-0.321$ ).

*Tabelle 12: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern der klassischen Samenanalyse (Gesamtkollektiv,  $n=48$ )*

Parameter		ROS ( $\mu\text{mol/l}$ )	TAS ( $\text{mmol/l}$ )	Vitamin E ( $\mu\text{g/dl}$ )	Selen ( $\text{mg/kg}$ )	Zink ( $\text{mg/kg}$ )
Volumen (ml)	r	-0.002	0.070	-0.085	0.135	0.286
	p	0.991	0.637	0.565	0.361	0.049
PH-Wert	r	0.232	-0.282	-0.245	-0.510	-0.489
	p	0.112	0.052	0.093	0.000	0.000
Spermiendichte (Mio./ml)	r	0.188	0.108	0.049	0.118	-0.023
	p	0.201	0.463	0.742	0.426	0.875

Globalmotilität (%)	r	0.083	-0.313	-0.351	-0.359	-0.307
	p	0.575	0.030	0.014	0.012	0.034
Progressivmotilität (%)	r	0.173	-0.409	-0.357	-0.331	-0.294
	p	0.241	0.004	0.013	0.022	0.043
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	-0.111	-0.074	-0.074	-0.047	-0.155
	p	0.453	0.616	0.616	0.752	0.291
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.042	0.209	0.022	0.001	-0.140
	p	0.778	0.154	0.883	0.996	0.341
Morphologie mit Normalformen (%)	r	-0.141	-0.321	-0.134	0.000	-0.168
	p	0.340	0.026	0.363	0.999	0.253
Spermiendichte nach Aufbereitung (Mio./ml)	r	-0.078	-0.069	-0.104	-0.049	-0.700
	p	0.597	0.640	0.482	0.740	0.638
Motilität nach Aufbereitung (%)	r	0.169	-0.150	-0.106	-0.096	-0.133
	p	0.251	0.31	0.472	0.515	0.367

Betrachtet man nun die IVF-Patientenfraktion (Tabelle 13), so sieht man fast identische Ergebnisse zum Gesamtkollektiv in Bezug auf die Signifikanzen.

Es gibt wiederum durchgehend (mit einer Ausnahme) negative Signifikanzen zwischen den Parametern des antioxidativen Spektrums und der Global- und Progressivmotilität. Weiterhin offenbart sich erneut eine stark bis hoch signifikante negative Korrelation zwischen dem pH-Wert und Selen ( $p=0.000$ ,  $r=-0.650$ ) beziehungsweise Zink ( $p=0.002$ ,  $r=-0.569$ ). Zudem zeigt sich in der IVF-Gruppe noch zusätzlich eine negative Korrelation zwischen TAS und dem pH-Wert ( $p=0.021$ ,  $r=-0.449$ ) sowie eine stark signifikante positive Korrelation zwischen ROS und dem pH-Wert ( $p=0.007$ ,  $r=0.516$ ). Ein weiterer negativer signifikanter Zusammenhang findet sich in der IVF-Gruppe zwischen Vitamin E und den morphologischen Normalformen ( $p=0.044$ ,  $r=-0.398$ ).

Tabelle 13: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern der klassischen Samenanalyse (IVF-Kollektiv, n=26)

Parameter		ROS ( $\mu\text{mol/l}$ )	TAS ( $\text{mmol/l}$ )	Vitamin E ( $\mu\text{g/dl}$ )	Selen ( $\text{mg/kg}$ )	Zink ( $\text{mg/kg}$ )
Volumen (ml)	r	-0.164	0.007	0.186	0.230	0.256
	p	0.423	0.974	0.364	0.258	0.206
PH-Wert	r	0.516	-0.449	-0.303	-0.650	-0.569
	p	0.007	0.021	0.133	0.000	0.002
Spermiendichte (Mio./ml)	r	0.361	0.165	0.226	0.170	0.175
	p	0.070	0.420	0.268	0.407	0.392
Globalmotilität (%)	r	-0.108	-0.499	-0.523	-0.529	-0.495
	p	0.601	0.009	0.006	0.005	0.010
Progressivmotilität (%)	r	0.120	-0.492	-0.466	-0.422	-0.376
	p	0.558	0.011	0.016	0.032	0.059
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	-0.288	0.045	-0.007	-0.083	-0.162
	p	0.153	0.826	0.974	0.687	0.429
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.039	0.102	0.101	-0.083	-0.100
	p	0.852	0.620	0.623	0.687	0.627
Morphologie mit Normalformen (%)	r	-0.297	-0.354	-0.398	-0.173	-0.279
	p	0.140	0.076	0.044	0.399	0.167
Spermiendichte nach Aufbereitung (Mio./ml)	r	-0.132	-0.373	-0.031	-0.037	0.033
	p	0.522	0.060	0.881	0.858	0.872
Motilität nach Aufbereitung (%)	r	0.125	-0.157	-0.090	-0.093	-0.088
	p	0.542	0.444	0.661	0.652	0.668

Interessanterweise zeigen sich in der ICSI-Gruppe (Tabelle 14) eindeutig andere Signifikanzen wie im Gesamtkollektiv oder dem IVF-Kollektiv.

So gibt es bei weitem nicht immer mehr einen negativen Zusammenhang zwischen den antioxidativen Parametern und der Global- und Progressivmotilität, sogar eine signifikant positive Korrelation zwischen Selen und der Progressivmotilität ( $p=0.045$ ,  $r=0.431$ ). Zeigte sich in der IVF-Gruppe noch eine stark positiv signifikante Korrelation zwischen ROS und dem pH-Wert, ist das Ergebnis der ICSI-Fraktion

negativ signifikant korrelierend ( $p=0.015$ ,  $r=-0.510$ ). Gleichsinnig verhält es sich zwischen ROS und der Spermiedichte ( $p=0.023$ ,  $r=-0.482$ ).

Signifikante Korrelationen zeigen sich weiterhin zwischen TAS und der Membranintegrität ( $p=0.046$ ,  $r=0.430$ ) beziehungsweise der Spermienkonzentration nach Aufbereitung ( $p=0.014$ ,  $r=0.514$ ). Eine weitere signifikant negative Korrelation findet sich zwischen Vitamin E und dem Probenvolumen ( $p=0.046$ ,  $r=-0.430$ ).

*Tabelle 14: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern der klassischen Samenanalyse (ICSI-Kollektiv,  $n=22$ )*

Parameter		ROS ( $\mu\text{mol/l}$ )	TAS ( $\text{mmol/l}$ )	Vitamin E ( $\mu\text{g/dl}$ )	Selen ( $\text{mg/kg}$ )	Zink ( $\text{mg/kg}$ )
Volumen (ml)	r	0.343	0.204	-0.430	-0.007	0.336
	p	0.118	0.363	0.046	0.975	0.126
PH-Wert	r	-0.510	-0.073	-0.171	-0.265	-0.368
	p	0.015	0.746	0.446	0.234	0.092
Spermiedichte (Mio./ml)	r	-0.482	0.251	-0.097	0.163	-0.309
	p	0.023	0.260	0.666	0.469	0.162
Globalmotilität (%)	r	0.028	0.370	-0.058	0.110	-0.191
	p	0.901	0.090	0.797	0.626	0.396
Progressivmotilität (%)	r	-0.096	0.091	0.075	0.431	-0.163
	p	0.670	0.686	0.740	0.045	0.468
Vitalitätsbestimmung (Eosin-Test) (%)	r	-0.107	0.334	-0.114	0.113	-0.204
	p	0.635	0.129	0.613	0.616	0.362
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	r	-0.108	0.430	-0.144	0.247	-0.218
	p	0.632	0.046	0.612	0.268	0.331
Morphologie mit Normalformen (%)	r	0.017	-0.230	0.238	0.406	-0.041
	p	0.939	0.303	0.287	0.061	0.856
Spermiedichte nach Aufbereitung (Mio./ml)	r	-0.217	0.514	-0.182	-0.029	-0.256
	p	0.333	0.014	0.418	0.896	0.250
Motilität nach Aufbereitung (%)	r	-0.125	0.067	-0.083	-0.070	-0.319
	p	0.579	0.767	0.714	0.758	0.148

#### **4.4. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN OXIDANTIEN-/ANTIOXIDANTIENKONZENTRATIONEN UND DEM CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS UND DER APOPTOSERATE**

Weder im Gesamtkollektiv (Tabelle 15) noch in der Einzelbetrachtung der IVF- (Tabelle 16) und ICSI-Patientengruppe (Tabelle 17) zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen der Oxidantien- oder Antioxidantienkonzentration und dem Chromatinkondensationsstatus oder der Apoptoserate. Auch fallen im Sinne von positiven oder negativen Korrelationen keine eindeutigen Zusammenhänge auf.

Zu bemerken ist jedoch, dass es jeweils positive Korrelationen zwischen ROS und dem kondensierten Chromatin im Gesamtkollektiv gibt (Tabelle 15;  $r=0.150$  und  $0.228$ ), in der IVF-Gruppe dies jedoch nur noch auf die acridinorangegefärbten Kerne zutrifft (Tabelle 16;  $r=0.310$ ) und in der ICSI-Fraktion sich dann wiederum komplett entgegengesetzt zum Gesamtkollektiv verhält (Tabelle 17;  $r=-0.093$  und  $-0.259$ ).

Interessanterweise zeigen sich im Vergleich der Korrelationen zwischen ROS und der Apoptoserate im Gesamtkollektiv (Tabelle 15) und in der IVF-Gruppe (Tabelle 16) negative Korrelationen ( $r=-0.010$  und  $r=-0.005$ ), wobei sich bei den ICSI-Patienten (Tabelle 17) positive Werte ( $r=0.132$ ) einstellen.

*Tabelle 15: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus und der Apoptoserate (Gesamtkollektiv,  $n=48$ )*

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Acridinorangegefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	r	0.150	-0.066	-0.062	0.141	0.190
	p	0.308	0.654	0.675	0.340	0.196
Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	r	0.228	0.010	-0.273	-0.052	-0.145
	p	0.119	0.944	0.060	0.724	0.326
Tunelfärbung mit grünem Ergebnis	r	-0.010	-0.117	0.094	-0.029	0.001
	p	0.948	0.426	0.524	0.847	0.993

*Tabelle 16: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus und der Apoptoserate (IVF-Kollektiv, n=26)*

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	r	0.310	-0.091	0.035	0.219	0.243
	p	0.123	0.660	0.866	0.283	0.232
Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	r	-0.082	0.114	-0.347	-0.193	-0.265
	p	0.691	0.580	0.083	0.346	0.191
Tunelfärbung mit grünem Ergebnis	r	-0.005	-0.216	0.037	0.040	0.166
	p	0.981	0.290	0.856	0.847	0.417

*Tabelle 17: Korrelationen zwischen den Parametern der Oxidantien- und Antioxidantiengruppe und den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus und der Apoptoserate (ICSI-Kollektiv, n=22)*

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	r	-0.098	0.050	-0.093	0.259	0.219
	p	0.664	0.824	0.682	0.245	0.326
Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	r	-0.299	-0.356	-0.259	0.197	-0.148
	p	0.177	0.104	0.245	0.379	0.512
Tunelfärbung mit grünem Ergebnis	r	0.132	-0.098	0.142	-0.201	-0.184
	p	0.557	0.665	0.527	0.369	0.412

#### **4.5. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS / APOPTOSERATE UND DER BEFRUCHTUNGS- UND SCHWANGERSCHAFTSRESULTATE**

In keinem der drei Kollektive (Gesamtgruppe, IVF-, ICSI-Fraktion) ergeben sich signifikante Zusammenhänge (bis auf eine eher zu vernachlässigende Ausnahme) zwischen den Parametern bezüglich Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate und den Parametern, die sich auf den Chromatinkondensationsstatus und die Apoptoserate beziehen (Tabellen 18 bis 20).

Die Parameter, die in erster Linie interessant sind für das Endergebnis der Fertilisationsprogramme, sind die Befruchtungsrate und die Anzahl an Schwangerschaften. Betrachtet man diese nun im Vergleich zum Chromatinkondensationsstatus und zur Apoptoserate, so zeigen sich folgende Resultate:

Bezüglich des Chromatinkondensationsstatus (ermittelt mit Acridinorange- und Chromomycinfärbung) zeigen sich im Gesamtkollektiv (Tabelle 18) und in der ICSI-Gruppe (Tabelle 20) negative Korrelationen zur Befruchtungsrate ( $r=-0.115$  und  $-0.060$  in der Gesamtgruppe;  $r=-0.144$  und  $-0.011$  in der ICSI-Gruppe), hingegen positive Korrelationen (mit Ausnahme der Chromomycinfärbung in der ICSI-Fraktion) zur Schwangerschaftszahl ( $r=0.067$  und  $0.070$  in der Gesamtgruppe;  $r=0.075$  und  $-0.308$  in der ICSI-Gruppe). Im IVF-Kollektiv (Tabelle 19) stellen sich andererseits durchweg positive Korrelationen zur Befruchtungsrate ( $r=0.064$  und  $0.126$ ) und zur Schwangerschaftszahl ( $r=0.074$  und  $0.200$ ) dar.

In Zusammenschau der Bezüge zwischen Apoptoserate (detektiert mit Hilfe der TUNEL-Färbung) und den Resultaten bezüglich Befruchtungsrate und Schwangerschaftszahl zeigen sich gleichsinnige Ergebnisse der Korrelationen in der Gesamt-Patientengruppe (Tabelle 18) und bei den IVF-Patienten (Tabelle 19). Hier kommt es jeweils zu positiven Korrelationen zwischen der Apoptoserate und der Befruchtungsrate ( $r=0.108$  und  $0.231$ ) und negativen Zusammenhängen zwischen der Apoptose und der Schwangerschaftszahl ( $r=-0.045$  und  $-0.046$ ). Umgekehrt verhält es sich in der ICSI-Gruppe (Tabelle 20). Hier gibt es jeweils eine negative Korrelation zur Befruchtungsrate ( $r=-0.106$ ) und eine positive Korrelation zur Zahl der Schwangerschaften ( $r=0.047$ ).

*Tabelle 18: Korrelationen zwischen den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus / der Apoptoserate und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten (Gesamtkollektiv, n=48)*

Parameter		Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Entnommene Eizellen	r	0.013	0.004	-0.201
	p	0.928	0.976	0.171

Befruchtete Eizellen	r	-0.092	-0.028	-0.078
	p	0.535	0.850	0.599
Befruchtungsrate	r	-0.115	-0.060	0.108
	p	0.435	0.683	0.466
Transferierte Eizellen	r	0.117	-0.160	0.256
	p	0.430	0.277	0.080
Schwangerschaften	r	0.067	0.070	-0.045
	p	0.652	0.639	0.763

*Tabelle 19: Korrelationen zwischen den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus / der Apoptoserate und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten (IVF-Kollektiv, n=26)*

Parameter		Acridinorangefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Entnommene Eizellen	r	-0.204	0.255	-0.147
	p	0.317	0.208	0.473
Befruchtete Eizellen	r	-0.144	0.211	0.002
	p	0.482	0.300	0.992
Befruchtungsrate	r	0.064	0.126	0.231
	p	0.755	0.540	0.256
Transferierte Eizellen	r	0.309	-0.034	0.247
	p	0.125	0.870	0.224
Schwangerschaften	r	0.074	0.200	-0.046
	p	0.718	0.327	0.822

*Tabelle 20: Korrelationen zwischen den Parametern bezüglich des Chromatinkondensationsstatus / der Apoptoserate und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (ICSI-Kollektiv, n=22)*

Parameter		Acridinorangegefärbung mit grün-gelbem Ergebnis	Chromomycinfärbung ohne Fluoreszenz	Tunelfärbung mit grünem Ergebnis
Entnommene	r	0.083	-0.469	-0.280
Eizellen	p	0.713	0.028	0.206
Befruchtete	r	-0.125	-0.344	-0.229
Eizellen	p	0.580	0.117	0.305
Befruchtungsrate	r	-0.144	-0.011	-0.106
	p	0.522	0.961	0.639
Transferierte	r	0.218	-0.061	0.217
Eizellen	p	0.329	0.786	0.332
Schwangerschaften	r	0.075	-0.308	0.047
	p	0.742	0.164	0.837

#### **4.6. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN OXIDANTIEN- / ANTIOXIDANTIENKONZENTRATIONEN UND DER BEFRUCHTUNGS- UND SCHWANGERSCHAFTSRESULTATE**

Signifikante Korrelationen finden sich auch im Vergleich der Zusammenhänge zwischen Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen mit den Ergebnissen bezüglich Befruchtungen und Schwangerschaften (Tabellen 21 bis 23) selten. Wenn man von einer zu vernachlässigenden Signifikanz absieht, gibt es zwei interessante Signifikanzen zu betrachten. Zum einen besteht im Gesamtkollektiv (Tabelle 21) eine signifikant negative Korrelation ( $p=0.045$ ;  $r=-0.290$ ) zwischen ROS und der Befruchtungsrate, zum anderen zeigt sich eine signifikant positive Korrelation ( $p=0.043$ ;  $r=0.435$ ) zwischen Zink und der Schwangerschaftszahl in der ICSI-Fraktion (Tabelle 23).

*Tabelle 21: Korrelationen zwischen den oxidativen und antioxidativen Parametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (Gesamtkollektiv, n=48)*

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Entnommene Eizellen	r	-0.158	-0.287	-0.205	-0.123	0.008
	p	0.282	0.048	0.162	0.404	0.956
Befruchtete Eizellen	r	-0.256	-0.211	-0.147	-0.065	-0.123
	p	0.079	0.149	0.319	0.662	0.407
Befruchtungsrate	r	-0.290	0.081	-0.073	0.091	-0.154
	p	0.045	0.584	0.622	0.541	0.296
Transferierte Eizellen	r	0.042	0.057	0.037	0.139	0.071
	p	0.778	0.699	0.805	0.346	0.630
Schwangerschaften	r	0.051	-0.064	-0.111	0.075	0.083
	p	0.730	0.664	0.454	0.612	0.567

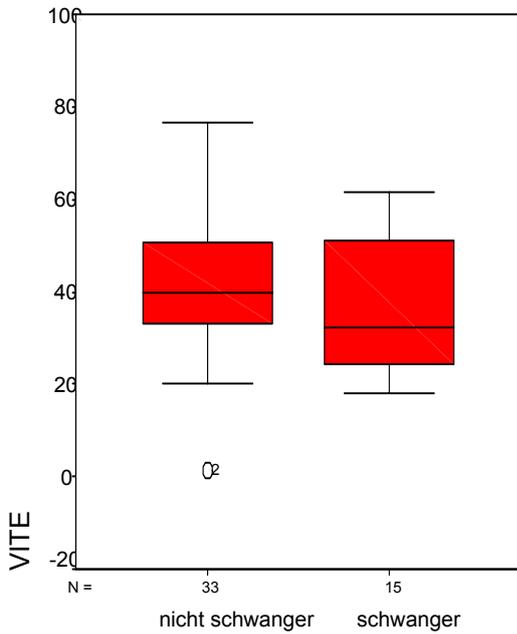
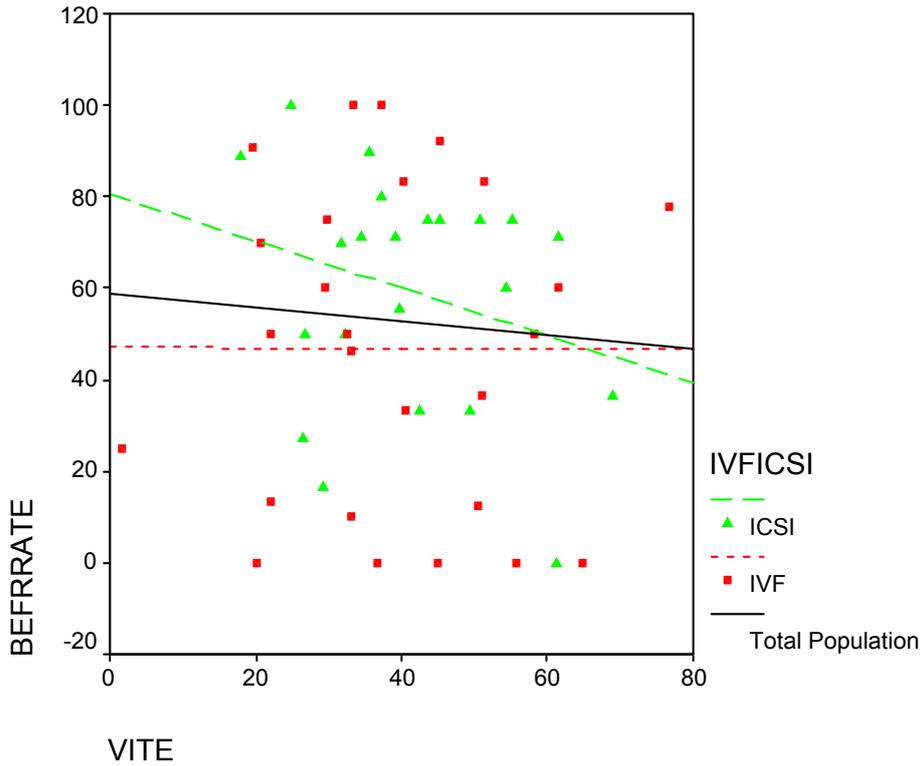
*Tabelle 22: Korrelationen zwischen den oxidativen und antioxidativen Parametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (IVF-Kollektiv, n=26)*

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Entnommene Eizellen	r	-0.174	-0.241	-0.301	-0.144	-0.076
	p	0.396	0.236	0.136	0.482	0.711
Befruchtete Eizellen	r	-0.261	-0.216	-0.149	-0.047	-0.116
	p	0.198	0.289	0.467	0.818	0.573
Befruchtungsrate	r	-0.267	-0.031	-0.002	0.116	-0.065
	p	0.187	0.881	0.993	0.573	0.753
Transferierte Eizellen	r	0.125	0.001	0.080	0.185	0.184
	p	0.543	0.997	0.698	0.364	0.368
Schwangerschaften	r	0.006	0.005	-0.015	0.055	-0.104
	p	0.976	0.980	0.940	0.788	0.615

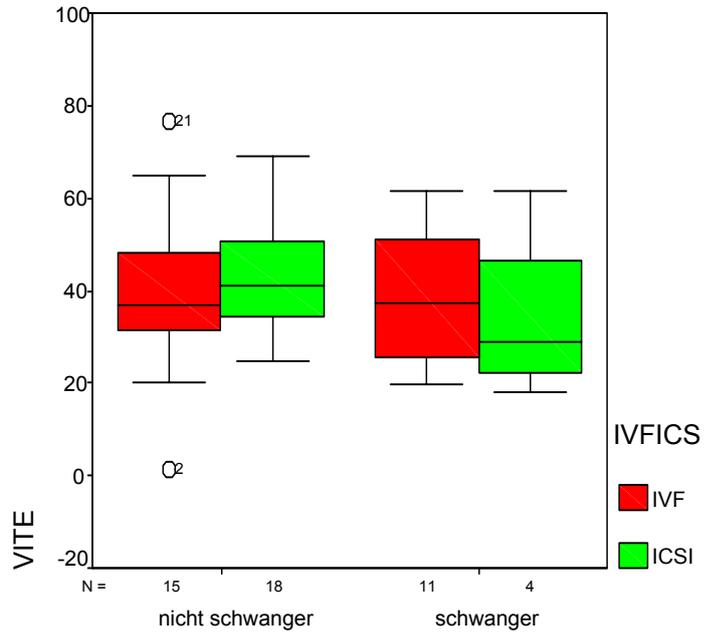
Tabelle 23: Korrelationen zwischen den oxidativen und antioxidativen Parametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (ICSI-Kollektiv, n=22)

Parameter		ROS	TAS	Vitamin E	Selen	Zink
Entnommene Eizellen	r	-0.348	-0.345	0.065	0.013	0.222
	p	0.113	0.116	0.775	0.954	0.321
Befruchtete Eizellen	r	-0.313	-0.220	-0.148	-0.137	-0.148
	p	0.156	0.324	0.512	0.544	0.512
Befruchtungsrate	r	-0.241	0.184	-0.270	-0.042	-0.333
	p	0.280	0.412	0.225	0.853	0.131
Transferierte Eizellen	r	0.065	0.017	-0.096	-0.053	-0.120
	p	0.774	0.938	0.670	0.814	0.596
Schwangerschaften	r	-0.092	-0.040	-0.246	0.234	0.435
	p	0.683	0.859	0.270	0.295	0.043

Wenn man jetzt wieder die Befruchtungsraten und Schwangerschaftszahlen in Bezug zu den oxidativen und antioxidativen Parametern betrachtet, zeigen sich insbesondere bei zwei Parametern aus dem antioxidativen Spektrum aufschlussreiche, wenn auch nicht signifikante Resultate: Vitamin E zeigt in allen drei Kollektiven (Tabellen 21 bis 23) gegenüber Befruchtungsrate ( $r=-0.073$ ;  $r=-0.002$ ;  $r=-0.270$ ) und Schwangerschaftszahl ( $r=-0.111$ ;  $r=-0.015$ ;  $r=-0.246$ ) negative Korrelationen (Graphik 1). Diametral hierzu stellen sich bei Selen in allen Fraktionen positive Korrelationen gegenüber Befruchtungsrate – mit Ausnahme der ICSI-Gruppe – ( $r=0.091$ ;  $r=0.116$ ;  $r=-0.042$ ) und Schwangerschaftszahl ( $r=0.075$ ;  $r=0.055$ ;  $r=0.234$ ) dar.



Schwangerschaft



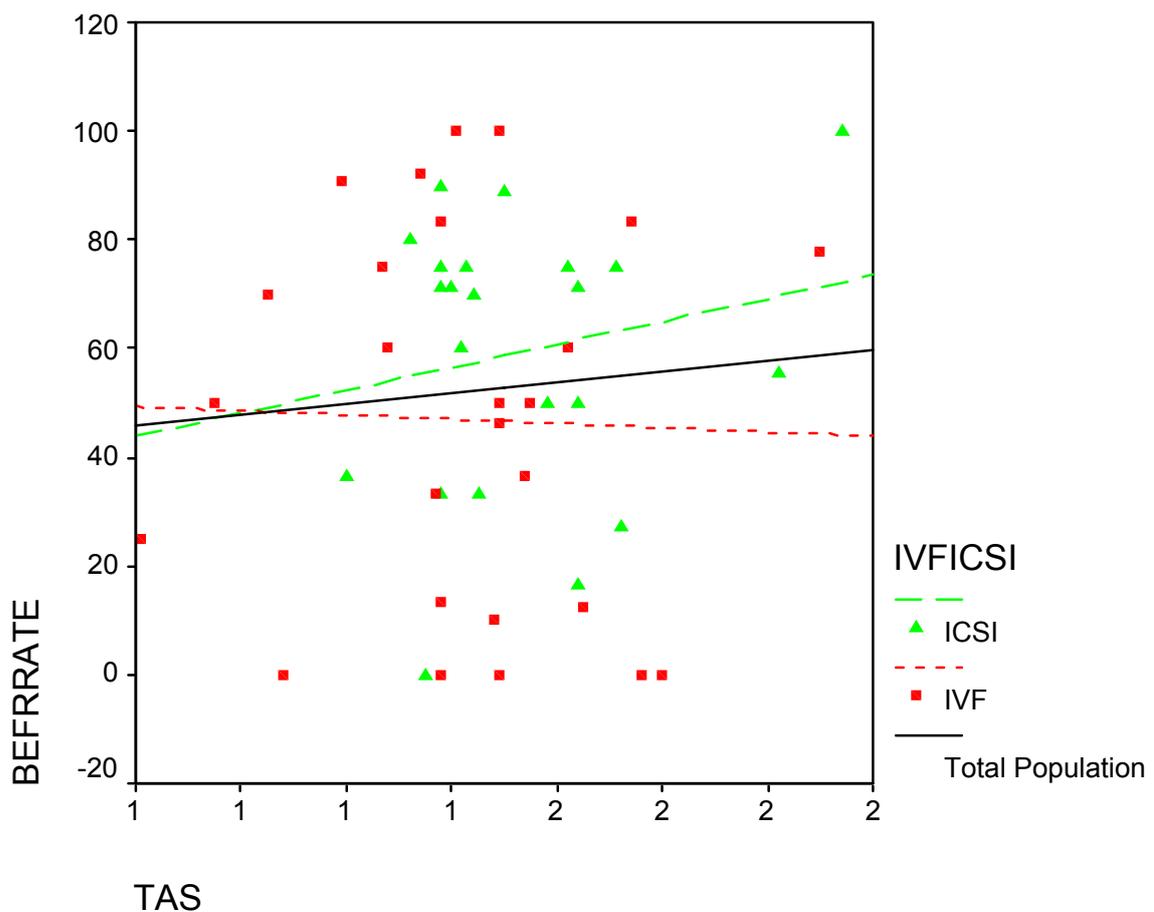
Schwangerschaft

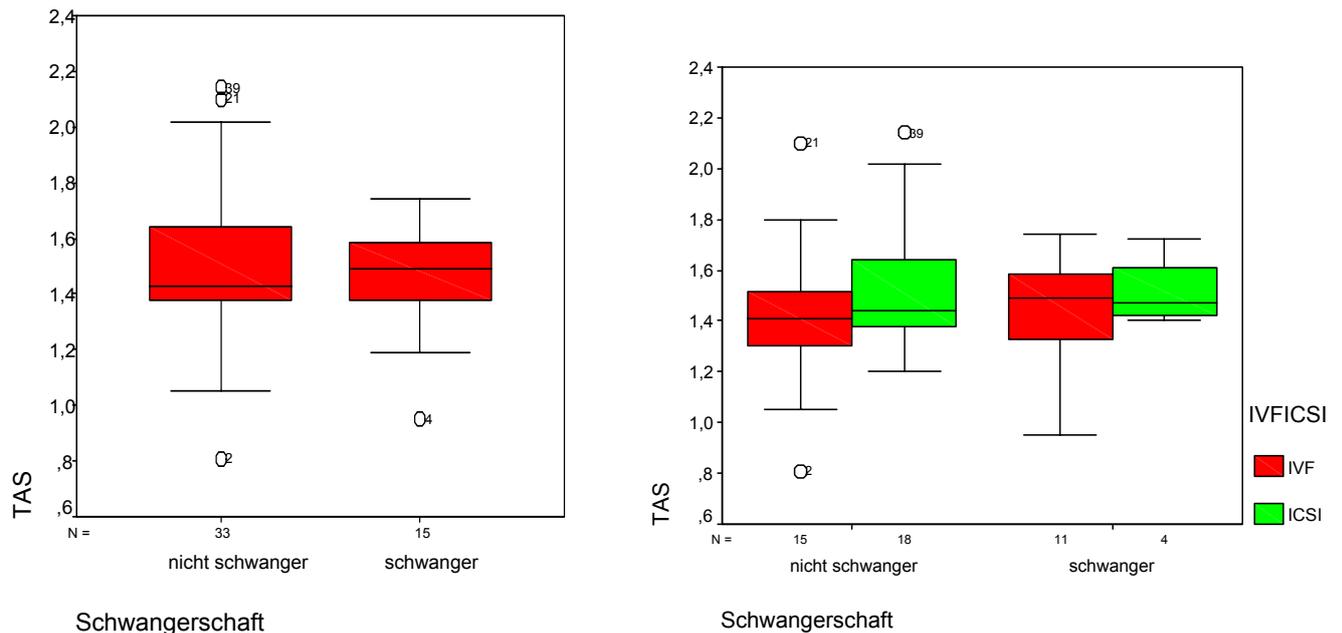
Graphik 1: Korrelationen zwischen Vitamin E und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven mittels Streudiagramm sowie Boxplotdarstellung der Korrelationen zwischen Vitamin E und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv und daneben in der Darstellung zur IVF- und ICSI-Fraktion

Bezüglich TAS und Zink gibt es keine eindeutigen positiven oder negativen Korrelationen.

Zink zeigt negative Korrelationen zur Befruchtungsrate in allen Kollektiven ( $r=-0.154$ ;  $r=-0.065$ ;  $r=-0.333$ ), jedoch unterschiedliche Korrelationen zur Schwangerschaftszahl (positiv korrelierend im Gesamtkollektiv und in der ICSI-Gruppe, in letzterer sogar signifikant; negativ korrelierend in der IVF-Patientengruppe).

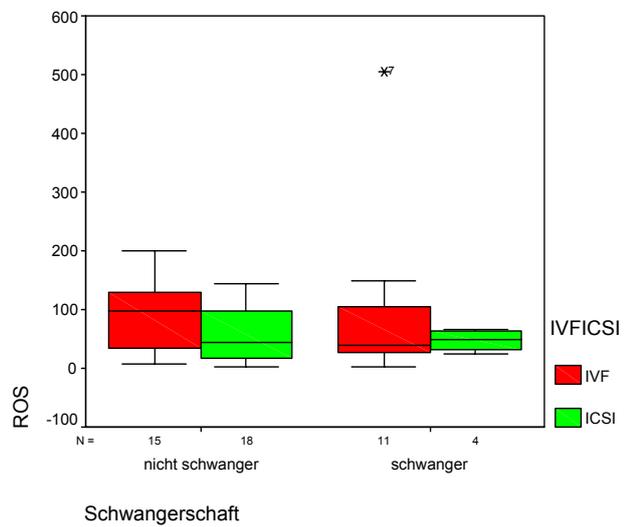
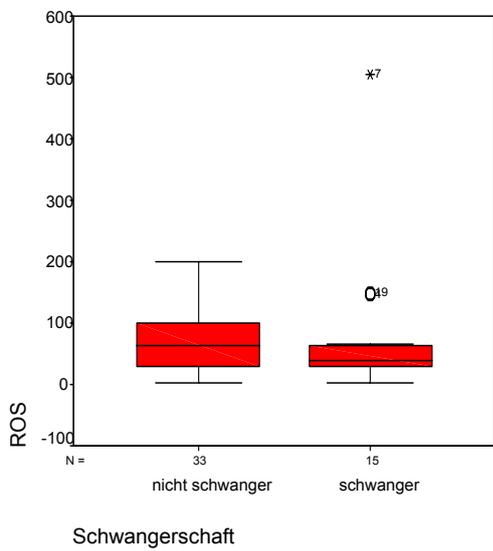
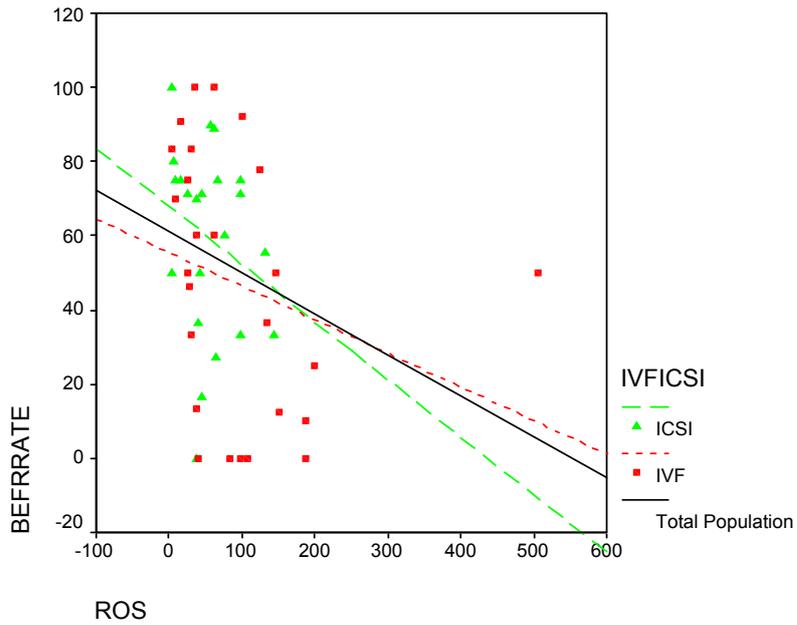
TAS (Graphik 2) korreliert positiv mit der Befruchtungsrate in der Gesamtgruppe ( $r=0.081$ ) und in der ICSI-Fraktion ( $r=0.184$ ), negativ im IVF-Kollektiv ( $r=-0.031$ ). Genau umgekehrt verhält es sich mit der Korrelation zur Schwangerschaftszahl (negativ in Gesamt- und ICSI-Gruppe, positiv in der IVF-Gruppe).





Graphik 2: Korrelationen zwischen TAS und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven mittels Streudiagramm sowie Boxplotdarstellung der Korrelationen zwischen TAS und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv und daneben in der Darstellung zur IVF- und ICSI-Fraktion

Schaut man sich zuletzt noch die ROS-Korrelationen an, so sieht man in allen Kollektiven eine negative Korrelation ( $r=-0.290$ ;  $r=-0.267$ ;  $r=-0.241$ ) zur Befruchtungsrate, wobei die in der Gesamtpatientengruppe gar signifikant ist. Positive Korrelationen ( $r=0.051$ ;  $r=0.006$ ) zeigen sich zwischen ROS und der Schwangerschaftszahl in der Gesamt- und IVF-Fraktion, eine negative ( $r=-0.092$ ) in der ICSI-Fraktion.



Graphik 3: Korrelationen zwischen ROS und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven mittels Streudiagramm sowie Boxplotdarstellung der Korrelationen zwischen ROS und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv und daneben in der Darstellung zur IVF- und ICSI-Fraktion

## **5. DISKUSSION**

### **5.1. VORBEMERKUNG ZUM AUFBAU DER DISKUSSION**

Da in der vorliegenden Dissertation Messungen und Berechnungen von vielen Parametern durchgeführt wurden, muss aufgrund der Komplexität der Daten und statistischen Auswertungen in der Beurteilung anhand der Diskussion eine klar strukturierte Gliederung vorgenommen werden.

Berücksichtigt man die eigene Fragestellung dieser Arbeit (unter 2.11. formuliert), so bietet sich folgender Aufbau der Diskussion an: Es werden nacheinander die Parameter zum Chromatinkondensationsstatus und zur Apoptoserate, dann die Parameter der oxidativen und antioxidativen Spektrums aufgeführt und diskutiert. In der Beurteilung der eigenen Daten im Vergleich zu anderen Studien kommt es dabei innerhalb der einzelnen Kapitel zur Bewertung der einzelnen Parameter in Bezug auf:

- den Einfluss auf die Parameter der klassischen Samenanalyse;
- die Beeinflussung der oben aufgeführten Parameter untereinander;
- die Auswirkungen auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsraten;
- die möglichen Unterschiede zwischen der IVF- und ICSI-Patientengruppe.

### **5.2. CHROMATINKONDENSATIONSSTATUS**

Wie unter 4.1.2. dargestellt, zeigen die in dieser Studie untersuchten Spermaproben eine erstaunlich gute Chromatinkondensation und damit vergleichsweise wenig Kernanomalien. Insgesamt ist aber wohl doch anzunehmen, dass Patientenpaare, die letztlich eine ICSI-Fertilisation unterlaufen, insgesamt eher schlechtere Ergebnisse zeigen wie Patienten aus der IVF-Gruppe, was sicherlich damit zu erklären wäre, dass ICSI-Patienten diese nicht als Primärtherapie erhalten, sondern – eventuell mehrfache – Vortherapien, zum Beispiel mit IVF, bekommen haben. In der Chromomycinfärbung zeigt sich folglich ein hoch signifikanter Unterschied ( $p=0.000$ ) beider Gruppen, in der Acridinorangegefärbung ebenfalls ein signifikantes

Ergebnis ( $p=0.041$ ), das jeweils anschaulich macht, dass im ICSI-Patientenkollektiv zum Teil deutlich schlechtere Ergebnisse bezüglich des Chromatinkondensationsstatus erzielt wurden.

Des Weiteren besteht wohl ein Zusammenhang (unter 4.2. veranschaulicht) zwischen normwertigen SpermioGrammparametern und vollständiger Kernkondensation des Spermienkopfes. Es zeigen sich bis auf die Werte zur Membranstabilität (mittels HOS-Test) durchweg positive Korrelationen zwischen normwertigen Parametern der klassischen Samenanalyse und der Chromatininstabilität. Im Gesamtpatientengut betrachtet zeigen sich Signifikanzen (bei der Chromomycinfärbung) zu den Motilitätsparametern, der Spermienkonzentration, der morphologischen Normalformen und der Vitalität. Die IVF-Gruppe allein betrachtet, zeigen sich bis auf eine positive Signifikanz zur Spermiedichte (bei Chromomycinfärbung) und eine negative Signifikanz zur Membranstabilität (bei Acridinorange-Färbung) schon deutlich weniger eindeutige Zusammenhänge. In der ICSI-Fraktion zeigt sich erneut eine positive Signifikanz zwischen kondensiertem Chromatin und morphologisch normalen Spermienformen. Insgesamt allerdings ist noch zu bemerken, dass, betrachtet man die untersuchten Proben dieser Studie, insbesondere die Motilitäts- und Vitalitätsparameter sowie die morphologischen Normalformen deutlich unter den Normwerten liegen (4.1.1.).

Der Zusammenhang zwischen dem Chromatinkondensationsstatus der Spermien und der Konzentration der oxidativen und antioxidativen Parameter (4.4.) bleibt in den Ergebnissen dieser Studie unklar. Es lassen sich keine eindeutigen Korrelationen nachweisen. Erwähnenswert sind lediglich die positiven Korrelationen zwischen ROS und dem kondensierten Chromatin in der Gesamt- und IVF-Gruppe. In der ICSI-Gruppe zeigt sich hier eine Negativkorrelation.

Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich des Chromatinkondensationsstatus mit den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten (4.5), so zeigen sich auch hier keine Signifikanzen. Wohl aber zu bemerken ist, dass es zu positiven Korrelationen zwischen dem vollständig kondensierten Chromatin und der Schwangerschaftszahl kommt, allerdings zu negativen Korrelationen (mit Ausnahme der IVF-Gruppe) bei den Befruchtungsraten.

Während der Spermatogenese gibt es vielfältige Änderungen der Kernchromatinstruktur. Diese wird auf dem Weg zum Nebenhoden zunehmend kondensierter im Zusammenspiel verschiedener Einflüsse, wie Histonen, Protaminen oder Disulphidbrücken (DADOUNE, 1995).

AGARWAL et al. (2003) postulieren, dass eine fehlerhafte DNA-Integrität durchaus einen entscheidenden Einfluss auf die männliche Fertilität zu haben scheint. Auch in der Studie von GOPALKRISHNAN et al. (1999), die mit Hilfe der Acridinorange-Färbung den Chromatinkondensationsstatus untersucht haben, zeigen sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich erniedrigte Raten an vollständig kondensiertem Chromatin in den Gruppen der in- oder subfertilen Patienten. In der Arbeitsgruppe von EVENSON et al. (1999) wird sogar beschrieben, dass denaturierte DNA-Spermatozoen, gefärbt mittels Acridinorange, den besten Vorhersagewert für das Scheitern einer Schwangerschaft bilden würden. Umgekehrt sehen RAZAVI et al. (2003) die Chromomycinfärbung als guten Parameter für die Vorhersage des Erfolges einer ICSI-Behandlung an. In einer weiteren Studie, in der eine elektronenmikroskopische Methode zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus herangezogen wurde (CHITALE et al., 1995), zeigen sich Grossteile von dekondensiertem Chromatin in einer Patientengruppe mit über Jahre fehlgeschlagenen IVF-Versuchen, etwas weniger wurde bei erfolgreichen IVF-Patienten gemessen, wohingegen bei der gesunden Kontrollgruppe die besten Ergebnisse erzielt wurden. Insofern postulieren hier die Autoren, dass zunehmende Chromatindekondensation einer der wichtigsten Gründe für männliche Infertilität zu sein scheint.

Die Ergebnisse dieser Studien lassen sich zum Teil auch in der vorliegenden Studie bestätigen. Es zeigen sich zwar keine signifikanten Ergebnisse zwischen korrekt verpacktem Chromatin und den Ergebnissen der Befruchtungsraten und der Schwangerschaften, wohl aber recht eindeutige Korrelationen. Interessanterweise konnte auch in der gegenwärtigen Arbeit der Zusammenhang von kondensiertem Chromatin und der Schwangerschaftszahl verifiziert werden, allerdings muss man kritisch hinzufügen, dass dies in Bezug auf die Befruchtungsraten (mit Ausnahme der IVF-Patientengruppe) nicht der Fall war. Insofern können wir der Ansicht einiger Autoren, dass die Färbungen zur Überprüfung des Chromatinkondensationsstatus

einen eindeutigen Prädiktor zum Fertilisationserfolg darstellen, nicht uneingeschränkt teilen. Erwähnenswert ist allerdings weiterhin, dass in der ICSI-Gruppe durchgehend signifikant schlechtere Ergebnisse bezüglich des Chromatinkondensationsstatus erzielt wurden, was wir in erster Linie (ähnlich wie CHITALE et al., 1995) auf vorausgegangene Fehlversuche mit anderen Fertilisationsverfahren zurückführen würden. Allerdings wurden in der aktuellen Dissertation, im Gegensatz zu einigen vorangegangenen Studien, erstaunlich gute Werte für die Chromatinkondensation bestimmt.

Bereits 1989 zeigten STERZIK et al. im Erstversuch mit Acridinorangefärbungen positive Korrelationen zur Spermienmotilität und zur Spermienmorphologie auf und schlossen damit auf entscheidende Zusammenhänge der korrekten Chromatinstruktur mit dem Erfolg der Befruchtung. Im Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie, regelrechter Chromatinverpackung und Fertilisationsraten gehen FRANKEN et al. (1999) in ihrer Untersuchung davon aus, dass es wohl einen signifikanten Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie und vollständiger Chromatinkondensation gibt, wobei die Autoren von einem Fehler im Kondensations-Dekondensationsprozess in bestimmten Fällen ausgehen. Auch in einer weiteren Arbeit von LIU et al. (1992) werden Zusammenhänge zwischen der DNA-Integrität und der Morphologie hergestellt und diese schließlich mit den Ergebnissen des IVF-Verfahrens verglichen. Hier zeigen sich deutlich signifikant positive Korrelationen zwischen normaler Spermienmorphologie, der Motilität und der korrekten DNA-Anordnung untereinander und zu den IVF-Ergebnissen. DURAN et al. (1998) gehen sogar so weit zu sagen, dass die Ergebnisse der Acridinorangefärbung kombiniert mit den Morphologieergebnissen einen Vorhersagewert bilden können, um den Ausgang des IVF-Verfahrens zu evaluieren. CLAASSENS et al. (1992) zeigten wiederum positive Korrelationen zwischen normaler Chromatinkondensation, detektiert mittels Acridinorangefärbung, und der Spermienmorphologie. Ebenso stellte sich in dieser Arbeit ein positiver Zusammenhang zu den in-vitro-Fertilisationsraten dar. In einer weiteren Studie (ANGELOPOULOS et al., 1998) wiederum bestätigt sich die positive Korrelation zwischen vollständiger Chromatinkondensation und normaler Morphologie, und – in dieser Studie zusätzlich – der Spermienmotilität. Allerdings konnten ANGELOPOULOS et al. (1998) nicht den Zusammenhang zu positiven IVF-

Fertilisationen bestätigen. Auch GIWERCMAN et al. (2003) sehen einen moderaten Zusammenhang zwischen den Chromatinparametern und der Motilität. In einer neueren Studie (SILLS et al., 2004) bestätigt sich der Zusammenhang zwischen den SpermioGrammparametern Dichte, Motilität und Morphologie mit dem Chromatinkondensationsstatus, wobei es in dieser Veröffentlichung hierfür lediglich Signifikanzen bei gesunden Patienten gibt und „nur“ positive Korrelationen bei Patienten mit eingeschränkter Samenqualität. ESTERHUIZEN et al. (2000) offenbarten sogar eine hoch signifikante Korrelation zwischen normaler Spermienmorphologie und den Chromatinkondensationsresultaten (detektiert mittels Chromomycinfärbung). Die Arbeitsgruppe von MOLINA et al. (2001) stellten einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer geringgradigen Chromatinkondensation und verschlechterten SpermioGrammparametern (Dichte, Motilität, Vitalität, Morphologie) fest. Daneben steht eine andere Arbeit (ZINI et al., 2002), die darstellt, dass es eine deutlich inverse Korrelation ( $p < 0.001$ ) zwischen vermehrter DNA-Denaturierung (ermittelt mittels Acridinorangefärbung) und Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie gibt.

In den im vorausgegangenen Abschnitt geschilderten zahlreichen Untersuchungen wurden im wesentlichen ähnliche Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs der Parameter der klassischen Samenanalyse (hier insbesondere Morphologie, Motilität und Spermiedichte) mit dem Chromatinkondensationsstatus wie in unserer Arbeit erreicht. Insbesondere konnten wir signifikante Korrelationen zwischen vollständig kondensiertem Chromatin und der normalen Spermienmorphologie, der Motilität und Vitalität bestätigen (ähnliche Ergebnisse wie vor allem in den Studien von MOLINA et al., 2001; ZINI et al., 2002). Zusätzlich zeigt sich bei uns in der IVF-Fraktion eine positive Signifikanz zur Spermiedichte. In den oben geschilderten Arbeiten kam es bis auf einige interindividuelle Abweichungen zur Bestätigung des Zusammenhangs zwischen der korrekten Kernchromatinkondensation und den SpermioGrammparametern Dichte, Motilität und Morphologie und damit weiter mit den Fertilisationsraten. Zu erwähnen ist aber noch, dass die in unserer Studie bestimmten Parameter in Bezug auf Morphologie und Motilität deutlich unter den Normwerten lagen.

Entgegen den oben aufgeführten Arbeiten und unserer eigenen Untersuchung wird in der Studie von SPANO et al. (2000) postuliert, dass es sehr wohl einen deutlichen

Zusammenhang zwischen schlechter Chromatinkondensation und verschlechterter Fruchtbarkeit gebe, aber ungeachtet der Resultate bezüglich Spermiedichte, -motilität oder -morphologie. Ebenso argumentieren HASHIMOTO et al. (2002), die ebenfalls keine Korrelationen zwischen Chromatinkondensationsstatus und den Parametern der klassischen Samenanalyse sehen, aber eine signifikante Korrelation zwischen der Chromatinkondensation und der Befruchtungsrate. Auch gegenteilige Ergebnisse gegenüber vielen vorangegangenen Studien zeigte die Arbeitsgruppe von HOSHI et al. (1996). Sie fanden keine Korrelationen zwischen normaler Spermienmorphologie und grün fluoreszierenden Kernen in der Acridinorange-Färbung. Außerdem postulierten sie, dass bei  $\geq 50\%$  grün angefärbten Kernen eine IVF-Befruchtung in ihrer beobachteten Gruppe immer erfolgreich war. Bei Werten darunter wurde eine ICSI-Fertilisation als Standardverfahren bevorzugt. Auch HAMMADEH et al. (1996) zeigten interessanterweise keine Zusammenhänge zwischen normalen Chromatinkondensationsraten (hier mittels Anilinblaufärbung) und normalen Morphologieformen zu den Ergebnissen des ICSI-Fertilisationsverfahrens auf. Wiederum 1998 stellten HAMMADEH et al. dar, dass es wohl einen positiven Zusammenhang zwischen normalen Morphologieformen und Befruchtungsraten gibt (diesmal im IVF-Verfahren), aber keine Korrelationen zwischen der Chromatinkondensation und den Befruchtungsergebnissen. 1999 zeigte eine weitere Arbeitsgruppe um HAMMADEH et al., dass normale Chromatinkondensationsraten und normale Spermienmorphologie eher in frisch ejakuliertem Sperma als in Spermatozoen, die direkt per Hodenbiopsie gewonnen wurden, zu finden sind ohne Einflussnahme auf die Ergebnisse des ICSI-Programms.

Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Arbeit von EGGERT-KRUSE et al. (1996), die die Acridinorange-Färbung nicht als klinisch brauchbaren Test zum „Infertilitätsscreening“ sieht. In dieser Studie zeigen sich keine Signifikanzen zwischen dem Chromatinkondensationsstatus und den Parametern der klassischen Samenanalyse (Dichte, Motilität, Morphologie, Vitalität). Ebenso zeigten sich keine Einflüsse der Chromatinkondensation auf die Fertilitätsrate.

Die in diesen zuletzt beschriebenen Untersuchungen aufgezeigten Daten bezüglich der Beziehungen zwischen der Kernchromatinkondensation, der Spermio-graphparameter und der Einflüsse auf die Ergebnisse des IVF- oder ICSI-

Programmes konnten zum Großteil in unserer Studie, wie oben detailliert ausgeführt, nicht verifiziert werden.

Letztlich ist wohl zu sagen, dass es keine allgemeingültige Aussage gibt, um den Zusammenhang zwischen den drei Komplexen Chromatinkondensationsstatus, Parameter der klassischen Samenanalyse und Befruchtungs- beziehungsweise Schwangerschaftsergebnissen zu beschreiben. Insgesamt gesehen gibt es eine Mehrheit für die Studien, zu der auch die vorliegende zählt, die einen Zusammenhang zwischen diesen drei Komplexen postulieren.

Über die Bedeutung von Zink als antioxidativer Parameter wird unter 5.5.4 noch näher eingegangen. Entscheidende zwei Arbeiten lieferte KVIST 1980 zur Beziehung von Zink und dem Chromatinkondensationsstatus. Er zeigt auf, dass Zink die Kernchromatin-Dekondensation inhibiert, die dann wohl wieder im weiblichen Genitaltrakt durch Entfernen des Zinks aufgehoben wird.

In unserer Arbeit blieb ein klarer Zusammenhang zwischen dem Chromatinkondensationsstatus und den oxidativen und antioxidativen Parametern (5.4. und 5.5.) letztendlich offen, so dass hier aus unserer Sicht keine klaren Angaben zu dieser Beziehung getroffen werden können.

### **5.3. APOPTOSE BEI SPERMATOZOEN**

Wenn man sich die Gesamtergebnisse bezüglich der Apoptoserate, bestimmt mittels der TUNEL-Färbemethode, anschaut, so ergibt sich insgesamt gesehen eine relativ geringe Apoptoserate in den von uns untersuchten Spermaproben (4.1.2.). Die Apoptoserate liegt im Schnitt bei 5%, wobei sie in der ICSI-Patientenfraktion etwas höher als in der IVF-Gruppe ist (allerdings kein signifikanter Unterschied).

Keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und den Parametern der klassischen Samenanalyse konnten gefunden werden (4.2.). Signifikanzen zeigten sich lediglich in der IVF-Gruppe im Sinne von Korrelationen zwischen der Apoptose und der Spermiedichte nach Aufbereitung und dem Probenvolumen, beziehungsweise im ICSI-Kollektiv zwischen Apoptose und dem pH-Wert des Spermas. In der Gesamtgruppe ist noch erwähnenswert, dass es negative Korrelationen, wenn auch nicht signifikant, zu den Motilitäts- und Vitalitätsparametern zeigten.

Eine eindeutige Verbindung zwischen der Apoptoserate und der oxidativen oder antioxidativen Parametern bleibt offen. Hierfür wären sicherlich weitere Untersuchungen mit mehr Probanden notwendig. Zu berichten wäre hier nur von negativen Korrelationen zwischen der TUNEL-Färbung und ROS in der Gesamt- und IVF-Gruppe, wohingegen bei den ICSI-Patienten eine positive Korrelation besteht.

Im Hinblick der Beziehung zwischen der Apoptoserate und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (4.5.) zeigen sich auch hier keine Signifikanzen. Schaut man sich die in erster Linie interessanten Parameter, nämlich die Befruchtungsrate und die Schwangerschaftszahl, in Verbindung mit den Ergebnissen der Messungen zur Apoptoserate an, so sieht man interessanterweise inverse Korrelationen bezüglich Befruchtungsrate und Schwangerschaftszahl. Im Gesamtkollektiv und der IVF-Gruppe gibt es jeweils positive Korrelationen zwischen Befruchtungsrate und Apoptoserate und eine negative Korrelation im ICSI-Kollektiv. Im Vergleich Apoptoserate und Schwangerschaftszahl zeigen sich genau diametral entgegengesetzte Ergebnisse in den drei Gruppen.

Der Prozess der Apoptose bei Spermatozoen ist äußerst komplex und hat in diversen Studien recht unterschiedliche Ergebnisse zu Ätiologie, Ablauf und Wechselwirkungen der Apoptose erbracht. Die Apoptose in Spermatozoen ist sowohl ein physiologischer Prozess, zum Beispiel bei unvollständiger Chromatinkondensation (SAKKAS et al., 2002), aber eben auch wohl ein pathologischer Vorgang, der mit verschlechterter männlicher Fertilität assoziiert zu sein scheint (HOST et al., 1999; OOSTERHUIS et al., 2000; SHEN et al., 2002). Eine gegenteilige Annahme, dass Apoptose ein physiologischer Prozess innerhalb der normalen Spermatogenese ist (KIM et al., 2002), zeigt eine Studie von LACHAUD et al. (2004), die postuliert, dass gesunde Spermatozoen „unfähig“ sind Apoptose auszulösen.

AHMADI et al. (1999) wollten mit ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen DNA-geschädigten Spermatozoen und verminderter Fertilität aufzeigen. Hierzu wurde die Spermien-DNA bewusst mit Bestrahlung vorgeschädigt. Es zeigten sich bezüglich der Fertilisationsraten keine signifikanten Differenzen zur Kontrollgruppe mit nicht-

geschädigter DNA. Interessanterweise zeigte die Studie aber auch im zweiten Untersuchungsschritt, dass die Embryoentwicklung bei der mit geschädigter DNA fertilisierten Eizellen eher gestört war als in der Kontrollgruppe, was zu einer erhöhten Rate von frühen Aborten führte. Die Autoren folgerten daraus, dass die Oozyte wohl in der Lage ist einen Teil der DNA-Schäden zu reparieren, wenn diese jedoch zu hoch sind eher ein Abort resultiert. Auch in weiteren Studien (JURISICOVA et al., 1996) zeigte sich, dass Apoptose schon in frühesten Stadien der Embryonenentwicklung verheerende Effekte haben kann, so dass es oft zum Tod des Embryos schon vor der Implantation der befruchteten Eizelle kommt. In einer recht neuen Untersuchung von HENKEL et al. (2004) zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und der Schwangerschaftszahl nach IVF-Therapie. Allerdings besteht dieser Zusammenhang nicht bezüglich der Fertilisationsrate. Die Untersucher erklären dies damit, dass trotz erhöhter DNA-Fragmentationsraten das Spermatozoon weiterhin in der Lage ist die Eizelle zu befruchten, dass jedoch später die weitere Embryonenentwicklung durch eben diese Schäden gestoppt wird und es hierdurch zum Schwangerschaftsmisserfolg kommt. Ähnliche Ergebnisse zeigte schon die vorausgegangene Studie der Arbeitsgruppe (HENKEL et al., 2003), die weder bei IVF- noch ICSI-Patienten Korrelationen zur Befruchtungs-, wohl aber zur Schwangerschaftsrate zeigte. Beide Studien zeigen also, dass erhöhte DNA-Fragmentationsraten zu einer Verminderung der Schwangerschaftsrate, nicht der Befruchtungsrate, führen. In einer prospektiven Kohortenstudie stellten DURAN et al. (2002) dar, dass die DNA-Fragmentationsrate einen entscheidenden Einfluss auf die Schwangerschaftsrate (in dieser Studie nach intrauteriner Insemination) hat. Bei Apoptoseraten  $> 12\%$  erfolgte in keinem der untersuchten Fälle einer erfolgreiche Schwangerschaft.

Da sich in der vorliegenden Studie überraschenderweise trotz des subfertilen Patientenkollektives nur eine durchschnittliche Apoptoserate von 5% zeigt (in der ICSI-Gruppe etwas höher), konnten wir zumindest die Aussage der zuletzt aufgeführten Arbeit (DURAN et al., 2002) nicht bestätigen. Ein zuverlässiger Grenzwert, der es erlauben würde eine Aussage darüber zu treffen, ob eine Befruchtung beziehungsweise Schwangerschaft überhaupt erfolgreich sein könnte, lässt sich in unseren Untersuchungen nicht erkennen. Interessant und wichtig in der Betrachtung der Gesamtergebnisse ist die in den im letzten Abschnitt aufgeführten Studien gemeinsame Feststellung, dass es wohl auch vorgeschädigten

Spermatozoen im Sinne einer DNA-Fragmentation aufgrund Apoptose möglich ist, eine Oozyte zu befruchten, es jedoch im weiteren Ablauf zu einem Abbruch des Schwangerschaftsverlaufes kommen kann (AHMADI et al., 1999; HENKEL et al., 2003 und 2004). Daher zeigen sich insbesondere in den Arbeiten von HENKEL et al. (2003 und 2004) Korrelationen zwischen der DNA-Fragmentation und der Schwangerschaftsrate, nicht aber zu der Befruchtungsrate. In unserer Arbeit konnten wir diese Ergebnisse nicht ganz so eindeutig reproduzieren. Es zeigten sich keinerlei Signifikanzen in allen Patientengruppen zwischen der Apoptoserate, der Befruchtungsrate und der Schwangerschaftszahl. Allerdings konnten auch wir sowohl in Betrachtung des Gesamtkollektives als auch der IVF-Patientengruppe die Aussage dahingehend bestätigen, dass eine erhöhte Apoptoserate negativ mit der Schwangerschaftszahl korreliert (in diesen Fällen allerdings positiv mit der Befruchtungsrate). Erstaunlicherweise zeigte sich in der ICSI-Fraktion ein genau entgegengesetztes Ergebnis, dessen Erklärung letztlich offen bleibt. Geht man in der Zusammenschau der Resultate früherer Studien und der vorliegenden davon aus, dass die oben genannte Theorie zu den „Spätfolgen“ der Apoptose in den Spermatozoen zutrifft, so konnte in der aktuellen Arbeit dies eher bestätigt denn falsifiziert werden. Dass die Korrelationen zwischen der Befruchtungsrate und der Apoptoserate nicht signifikant waren, bestätigt damit auch die Ergebnisse von HENKEL et al. (2003 und 2004), die in diesem Vergleich auch keine Signifikanzen erkennen konnten.

Die Arbeitsgruppe von BACCETTI et al. (1996) zeigte in ihrer Studie, die sich auch der TUNEL-Färbemethode bediente, eine stufenweise Zunahme von apoptotischen Spermien in unterschiedlichen Patientenkollektiven, beginnend mit gerade 0.1% apoptotischen Zellen in der fertilen Kontrollgruppe, dann immer höhere Prozentzahlen in den Patientengruppen mit Varikozele oder Infektionen (10%), mit Kryptorchismus (20%), mit unreifen Spermien (25%) und schließlich mit Seminomen (50%). Ähnliche Ergebnisse lieferten GANDINI et al. (2000). Sie zeigten eine signifikant geringere Apoptoserate bei gesunden Samenspendern im Vergleich zu Patientengruppen mit Oligoasthenoteratozoospermie, Morbus Hodgkin oder Hodenkrebs. Daraus folgerten die Untersucher, dass die Apoptoseinduktion letztlich die Folge von diversen pathologischen Vorgängen und einer Deregulation der Spermatogenese-Kontrollsysteme sein kann. BENCHAIB et al. (2003) zeigten eine

negative Korrelation zwischen der Apoptoserate und den Spermioigrammparametern auf. Zudem beobachteten sie, dass es erst ab einer Apoptoserate von > 10% zu einer signifikanten Verminderung der Befruchtungsrate kam. Auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von SUN et al. (1997) stellten negative Korrelationen zwischen der erhöhten Apoptoserate und den Parametern Spermindichte, Morphologie und Motilität sowie der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate (hier bei IVF-Patienten) fest. Wiederum SAKKAS et al. (2002) postulierten, dass bei hoher Apoptoserate eine Korrelation zu verminderter Spermindichte und verschlechterten morphologischen Spermatozoen bestand. In der Arbeit von TESARIK et al. (1998) wird auch deutlich, dass eine hohe Anzahl an fehlerhaften Spermatozoen im Sinne von Morphologiefehlformen mit einer höheren Rate an DNA-geschädigten Spermien einhergeht, was wiederum zu einer geringeren Fertilisationsrate führt. Sehr differenzierte Resultate sind in den Untersuchungen von SHEN et al. (2002) zu erkennen. Bei einer Apoptoserate im Median von 15% zeigten sich negative Korrelationen zur Motilität, Morphologie und Vitalität, und interessanterweise positive Korrelationen zur Spermindichte und dem Probenvolumen. SHEN et al. (2002) erklären diese zuletzt genannte Korrelation damit, dass diese Zellen dem natürlichen Selektionsprozess in der Spermatogenese entgangen sind und sich daher im Ejakulat wiederfinden. Gegenteilig in Bezug auf die Spermindichte äußern sich OOSTERHUIS et al. (2000), die eine hoch signifikant negative Korrelation zwischen Spermindichte und erhöhter Apoptoserate fanden.

CARRELL et al. (2003) sehen keine Zusammenhänge zwischen der Zahl der DNA-Strangbrüche und den Parametern der klassischen Samenanalyse, wohl aber eine Verbindung zwischen erhöhten Apoptoseraten und ungeklärten Fällen von Aborten. Ähnlich beschreiben auch RICCI et al. (2002) keinen direkt ersichtlichen Zusammenhang zwischen der Samenqualität und der Apoptoserate.

Eindeutige Zusammenhänge zwischen Asthenoteratozoospermie und erhöhten Raten von DNA-Fragmentation werden in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von PIASECKA et al. (2003) deutlich. Hier zeigt sich eine Kette von konsekutiven Ereignissen, die untereinander eine Verbindung zu haben scheinen. PIASECKA et al. folgern, dass eine reduzierte Spermienmotilität aufgrund von morphologischen Fehlformen, insbesondere des Mittelstückes, bedingt sei, und dass dies wiederum als mögliche Konsequenz die Induktion eines apoptotischen Mechanismus auslösen

könnte. Als Ursprungsort für diese Ereigniskette vermutet die Arbeitsgruppe Schäden in den Mitochondrien der Spermien. HOST et al. lieferten zum Thema DNA-Strangbrüche aufgrund von Apoptose mehrere Studien (1999, 1999, 2000, 2000). Zunächst stellten sie fest (HOST et al., 1999), dass eine erhöhte Zahl an Strangbrüchen mit Oligozoospermie und vermehrten pathologischen Spermatozoenformen verbunden ist. Im Unterschied hierzu wurden bei Männern mit ungeklärter Infertilität (HOST et al., 1999) ebenso erhöhte Apoptoseraten gefunden wie bei gesunden Männern, jedoch insgesamt weniger als bei der Oligozoospermiefraktion. Daher gingen HOST et al. von zwei verschiedenen Apoptosemechanismen in beiden Gruppen aus. In einer weiteren Studie (HOST et al., 2000) deckte die Arbeitsgruppe auf, dass eine erhöhte Apoptoserate bei Spermatozoen auch eine niedrige erfolgreiche IVF-Fertilisationsrate bedingt. Auch in einer Folgestudie (HOST et al., 2000) bestätigten sich diese Ergebnisse inklusive einer negativen Korrelation zwischen Apoptoseraten und der IVF-Schwangerschaftsrate. Für ICSI-Patienten konnte kein Zusammenhang zwischen den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen und der Apoptoserate gesehen werden.

In der Zusammenfassung der Beobachtung zwischen den Beziehungen der Apoptoserate mit den Parametern der klassischen Samenanalyse ergeben sich interessante Ergebnisse im Vergleich unserer Studie mit vorangegangenen. In den Untersuchungen von BACCETTI et al. (1996) und GANDINI et al. (2000) zeigten sich erhöhte Apoptoseraten in pathologischen Patientenkollektiven im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Diese Erhöhung konnte mit einer durchschnittlichen Apoptoserate von circa 5% in unserer subfertilen Patientengruppe nicht gesehen werden. Schaut man sich nun direkt die Zusammenhänge zwischen der DNA-Fragmentation und den SpermioGRAMMparametern an, so gibt es in den oben aufgeführten Arbeiten meist signifikant negative Korrelationen zwischen erhöhter Apoptoserate und bestimmten Parametern der klassischen Samenanalyse, wie Dichte (OOSTERHUIS et al., 2000), Morphologie (HOST et al., 1999; SAKKAS et al., 2002; SHEN et al., 2002; TESARIK et al., 1998) und zusätzlich noch Motilität (PIASECKA et al., 2003; SHEN et al., 2002; SUN et al., 1997). Einen generellen Zusammenhang stellten BENCHAIIB et al. (2003) dar. Keine Verbindungen zwischen den beiden Parametergruppen sehen lediglich zwei der geschilderten Studien (CARRELL et al., 2003; RICCI et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit zeigen sich

negative Korrelationen (aber nicht signifikant) in der Gesamtgruppe zwischen der DNA-Fragmentationsrate und den Motilitäts- und Vitalitätsparametern, jedoch nicht mit der Spermiedichte oder der Morphologie. Eine solche Verbindung, insbesondere zu den Vitalitätsparametern, wird nur einmalig in der Arbeit von SHEN et al. (2002) erwähnt. Interessanterweise zeigt genau diese Arbeit überraschenderweise auch positive Korrelationen zur Spermiedichte und dem Probenvolumen, was auch in der IVF-Patientengruppe der aktuellen Studie signifikant bestätigt werden konnte. Diese recht erstaunliche Signifikanz würden wir auch mit der oben bereits genannten Hypothese von SHEN et al. erklären. Sieht man von dieser positiven Signifikanz ab, so bestätigt unsere Studie zumindest den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Apoptoserate und reduzierter Spermienmotilität. Die oft beschriebene Verbindung zu morphologischen Fehlformen konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen.

Zusammenhänge zwischen erhöhter Apoptoserate und gesteigerten Werten für die reactive oxygen species (ROS) zeigten WANG et al. (2003) in ihrer Arbeit auf. Auch BARROSO et al. (2000) stellten signifikant positive Korrelationen zwischen DNA-Fragmentationen und Produktion von Sauerstoffradikalen heraus. In einer in-vitro-Untersuchung (LOPES et al., 1998) offenbarte sich nach der Inkubation einer Samenprobe mit ROS von über einer Stunde eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentationen in der Probe, was wiederum durch Vorbehandlung mit Antioxidantien verhindert werden konnte.

Im Gegensatz zu den eben genannten Untersuchungen, bleibt in der vorliegenden Dissertation eine klare Beziehung zwischen der DNA-Fragmentationsrate und den oxidativen und antioxidativen Parametern völlig offen. Nur in der ICSI-Patientengruppe konnten auch wir einen Zusammenhang (allerdings nicht signifikant) zwischen der erhöhten Apoptoserate und den Sauerstoffradikalen sehen. In Anblick des Gesamtkollektives und der IVF-Fraktion zeigten sich inverse Korrelationen zwischen den beiden Parametern. Somit können wir die Theorie, dass erhöhte ROS-Zahlen eine Zunahme der Apoptoserate verursachen in dieser Deutlichkeit nicht bestätigen. Die Ergebnisse in der ICSI-Gruppe entsprechen dann in der Tendenz am ehesten den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten (BARROSO et al., 2000; LOPES et al., 1998; WANG et al., 2003).

## **5.4. OXIDANTIENKONZENTRATION IM SEMINALPLASMA**

### **5.4.1. REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)**

In Bezug auf die Oxidantienkonzentration im seminalen Plasma, hier bestimmt und zusammengefasst unter dem Begriff der „reactive oxygen species“ (ROS), zeigten sich im Vergleich der Patientengruppen „IVF“ und „ICSI“ keine signifikanten Unterschiede (4.1.3.). Die ROS-Werte in der IVF-Gruppe fielen jedoch deutlich höher aus als in der ICSI-Gruppe (im Vergleich der Mittelwerte 94,73  $\mu\text{mol/l}$  versus 54,78  $\mu\text{mol/l}$ ).

Vergleicht man nun die ROS-Werte mit den Resultaten für die Parameter der klassischen Samenanalyse, so ergeben sich in der Gesamtpatientengruppe keinerlei Signifikanzen (4.3.). Zu erwähnen sind allerdings die Negativkorrelationen zur Membranstabilität und Morphologie, hingegen positive Korrelationen zu den Motilitätsparametern. In der IVF-Gruppe bestätigt sich dies im wesentlichen (Membranstabilität, Morphologie) und es zeigt sich eine signifikant positive Korrelation zum pH-Wert. Wiederum in der ICSI-Fraktion zeigt sich eine signifikant negative Korrelation zum pH-Wert und zusätzlich noch zur Spermiedichte. Die Negativkorrelation zur Membranstabilität lässt sich auch hier weiter nachweisen.

Auf die Verbindungen zwischen ROS und dem Chromatinkondensationsstatus beziehungsweise der Apoptoserate wurde bereits in den Kapiteln 5.2. und 5.3. eingegangen.

Es zeigt sich sowohl in Betrachtung des Gesamtkollektives als auch in den IVF- und ICSI-Fraktionen alleine eine negative Korrelation (im Gesamtkollektiv signifikant) zur Befruchtungsrate. Ebenso verhält es sich in der ICSI-Patientengruppe im Vergleich zur Schwangerschaftszahl, wohingegen es positive Korrelationen zwischen ROS und der Schwangerschaftszahl in der Gesamt- und IVF-Gruppe gibt.

Unter dem Begriff „ROS“ fasst man eine Vielzahl von freien Radikalen zusammen, die unterschiedlichen Ursprungs sein können und bei diversen physiologischen oder pathologischen Vorgängen im männlichen Reproduktionstrakt auftreten können. ROS induziert in erster Linie die Lipidperoxidation in der Spermienmembran, durch deren Funktionsverschlechterung es konsekutiv zu Störungen anderer Spermioigrammparameter und schließlich der Fertilisationsrate kommen kann. Auch Zusammenhänge zum Prozess der Apoptose scheinen mit ROS zu bestehen.

Insgesamt niedrige Werte für ROS konnten PLANTE et al. (1994) in ihrer Untersuchung bei abnormalen Spermatozoen nachweisen. Hingegen konnten sie neutrophile Granulozyten als einen Hauptproduktionsort für ROS finden. Diese hohen ROS-Zahlen hatten einen deutlich Negativeffekt auf die Spermienmotilität. Bereits 1992 sprachen KRAUSZ et al. noch von den Leukozyten als einzigen Zellen, die überhaupt „fähig“ sind ROS zu produzieren. Auch AITKEN et al. (1992) suchten nach den Ursprungszellen für die ROS-Produktion im männlichen Reproduktionstrakt. Sie bestätigten, dass Leukozyten bei normal fertilen Männern die Hauptproduktionsstätte für ROS sind, aber bei Männern mit reduzierter Spermienkonzentration eben noch die Spermatozoen selbst ROS produzieren. Ähnliches bezüglich den Leukozyten fanden auch ZALATA et al. (1995), wobei in ihrer Untersuchung noch zusätzlich ein Zusammenhang zwischen Asthenozoospermie und erhöhten ROS-Werten festgestellt wurde. BAKER et al. (2003) gehen davon aus, dass bestimmte Enzyme mitverantwortlich für die ROS-Produktion aus Spermatozoen sind. Auch die Arbeitsgruppen um SHARMA et al. (1996) und WANG et al. (1997) schreiben sowohl den Leukozyten als auch den Spermatozoen die Eigenschaft zu, ROS zu produzieren, wobei die Leukozyten mehr ROS herstellen (SHARMA et al., 1996). Darüber hinaus beschreiben FORD et al. (1997) Leukozyten als Quelle für ROS, die besonders schädlich für Spermien sind, und zeigt eine Assoziation zu verminderter Spermienkonzentration in den untersuchten Spermaproben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle eben genannten Untersuchungen zeigten, dass Leukozyten der Hauptproduktionsort für reactive oxygen species ist, aber eben auch, in bestimmten Fällen, in erster Linie unreife, Spermatozoen. Als Schlussfolgerung lässt sich hieraus ziehen, dass zum einen Entzündungsprozesse die ROS-Produktion steigern und damit die Samenqualität und Fähigkeit zur

erfolgreichen Fertilisation vermindern, zum anderen aber auch (unreife) Spermatozoen in sub- oder infertilen Patientenkollektiven eben selbst die Ursache für vermehrte Radikalbildung mit den daraus resultierenden Folgen wie Sub- oder Infertilität sind.

OCHSENDORF et al. (1994) zeigten in ihrer Chemilumineszenzmessung für ROS Assoziationen zwischen erhöhten ROS-Werten und verschlechterten Werten für Morphologie, Motilität und Membranintegrität auf. In den Versuchen, die LISSAK et al. (2004) durchführten, wurde auch eine Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von ROS und einer verminderten Spermiedichte und -motilität gezeigt. Die Arbeitsgruppe von ZABLUDOVSKY et al. (1999) stellten in ihren Untersuchungen zur Lipidperoxidation dar, dass es zwischen erhöhten ROS und der Spermiedichte und dem Spermavolumen eine negative Korrelation gibt, ebenso zur IVF-Fertilisationsrate.

AGARWAL et al. (2002) bestätigten den Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten freier Radikale und der Reduktion der Spermienmotilität. Des Weiteren heben sie hervor, dass es zur Behandlung des „oxidativen Stresses“ noch kein wirkungsvolles Behandlungskonzept, wie beispielsweise mit Antioxidantien, gibt. Ähnlich beschreiben TWIGG et al. (1998), dass es unter erhöhten Werten der Lipidperoxidation zu einem deutlichen Verlust der Spermienmotilität kommt. Zur möglichen Therapie überlegten die Forscher, dass bei der Wahl des Therapiemittels die Quelle der erhöhten oxidativen Parameter bekannt sein muss, um gezielt angreifen zu können.

PASQUALOTTO et al. (2000) hoben in ihrer Arbeit hervor, dass erhöhte ROS-Werte, die signifikant höher als in einer gesunden Kontrollgruppe waren, negativ mit der Spermiedichte, -motilität und -morphologie korrelieren. In einer weiteren Analyse von BARROSO et al. (2000) zeigt sich nicht nur eine signifikante Assoziation zwischen reduzierten Motilitätswerten und einer erhöhten DNA-Fragmentationsrate, sondern auch mit einer erhöhten Rate an reactive oxygen species. In den Untersuchungen von OLLERO et al. (2001) wird neben einem Zusammenhang zwischen vermehrter ROS-Produktion und erhöhten DNA-Fragmentationsraten auch eine Verbindung zu abnormalen Morphologieformen und zur Spermienmotilität offengelegt. Dies zeigte sich vermehrt in unreifen Spermatozoen, so dass die Untersucher davon ausgehen, dass es physiologischerweise einen

Spermatogenese-Regulationsmechanismus gibt, der auf dem Weg der Spermienmigration zum Nebenhoden eingreift und eben in Fällen erhöhter ROS-Werte nicht korrekt greift. Ähnlich beschreibt die Arbeitsgruppe von GIL-GUZMAN (2001), dass die höchsten ROS-Produktionszahlen in unreifen Spermatozoen mit abnormalen Morphologieformen und reduzierter Motilität zu finden sind.

WHITTINGTON et al. (1999) stellten dar, dass ein erhöhter ROS-Wert im seminalen Plasma mit verminderter Spermiedichte, jedoch nicht mit verminderter Spermienmotilität einhergeht. Auch TWIGG et al. (1998) sahen keine Veränderungen der Spermienmotilität bei ansteigenden ROS-Werten. DANDEKAR et al. (2002) zeigten Zusammenhänge zwischen vermehrter ROS-Produktion und morphologischen Fehlformen. Ebenso stellten AZIZ et al. (2004) fest, dass erhöhte Werte für freie Radikale negativ mit der normalen Spermienmorphologie korrelieren, jedoch positiv mit abnormalen Spermienformen.

SHANG et al. (2003) zeigten in ihren in-vitro-Versuchen einen deutlichen Zusammenhang zwischen ROS und der Spermienmotilität. Sie inkubierten Samenproben von gesunden fertilen Männern mit ROS. Nach 30 Minuten kam es zu einem deutlichen Absinken der Motilität, nach 60 Minuten Inkubation verloren die Spermien ihre Bewegungsfähigkeit. Ähnliche Zusammenhänge, auch zur DNA-Fragmentationsrate, konnten AITKEN et al. (1998) finden.

In in-vitro-Versuchen konnte allerdings interessanterweise gezeigt werden, dass ein gewisser Grad an oxidativem Stress sich sogar förderlich auf die Qualität der klassischen Spermioigrammparameter bei schon bestehender Oligozoospermie auswirken kann (GRIVEAU et al., 1998).

Betrachtet man nun die Werte für Oxidantienkonzentration im Seminalplasma im Vergleich zu den Parametern der klassischen Samenanalyse, so gibt es hierzu zahlreiche vorangegangene Studien, wie gerade im letzten Absatz dargelegt wurde. Den meisten Studien ist gemeinsam, dass sie eine Negativkorrelation zwischen der Spermienmotilität und erhöhten ROS-Werten sehen (AGARWAL et al., 2002; BARROSO et al., 2000; GIL-GUZMAN et al., 2001; LISSAK et al., 2004; OCHSENDORF et al., 1994; OLLERO et al., 2001; PASQUALOTTO et al., 2000; SHANG et al., 2003; TWIGG et al., 1998). Ausnahmen bilden hier lediglich die Arbeiten von WHITTINGTON et al. (1999) und interessanterweise TWIGG et al. (1998), der ebenfalls 1998 in einer anderen Untersuchung eine Negativkorrelation sah. In der vorliegenden Studie zeigen sich im Anblick des gesamten

Patientenkollektives erstaunlicherweise positive (allerdings nicht signifikante) Korrelationen zwischen den Motilitätsparametern und ROS. Insofern muss man sich aufgrund der aktuellen Untersuchungsergebnisse der Minderheit anschließen. Einen Negativzusammenhang zwischen vermehrtem Auftreten von ROS und einem Verlust der Motilitätsqualität konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Der zweite wichtige SpermioGrammparameter, die Morphologie, zeigte in diversen Vorstudien (AZIZ et al., 2004; DANDEKAR et al., 2002; GIL-GUZMAN et al., 2001; OCHSENDORF et al., 1994; OLLERO et al., 2001; PASQUALOTTO et al., 2000) ebenfalls eine Negativkorrelation zu vermehrter Oxidantienkonzentration im seminalen Plasma. Diese Tendenz konnten wir in der vorliegenden Arbeit (mit Ausnahme des ICSI-Patientenkollektives) bestätigen. Die in einigen Studien noch beschriebene Negativkorrelation zur Spermienkonzentration (LISSAK et al., 2004; PASQUALOTTO et al., 2000; WHITTINGTON et al., 1999; ZABLUDOVSKY et al., 1999) deckt sich auch mit unseren Ergebnissen zwischen ROS und der Spermiedichte, wo sich ebenfalls Negativkorrelationen darstellen, in der ICSI-Gruppe signifikant. Da ROS in erster Linie die Spermienmembran angreift und hier die Lipidperoxidation stattfindet, erstaunt es, dass sich nur eine Studie (OCHSENDORF et al., 1994) direkt mit dem Zusammenhang zwischen ROS und den Werten für die Membranintegrität befasst hat. Wie auch OCHSENDORF et al. (1994) konnten auch wir in den Testungen zur Membranintegrität (mittels HOS-Test) bestätigen, dass es zu negativen Verbindungen zwischen Membranstabilität und erhöhten ROS-Werten kommt. Zusammenfassend lässt sich also im Vergleich zwischen den freien Radikalen und den Parametern der klassischen Samenanalyse sagen, dass wir mit der vorliegenden Studie im wesentlichen die negativen Korrelationen zwischen erhöhten ROS-Werten und den Parametern Spermiedichte, Morphologie und Membranstabilität bestätigen konnten. Interessanterweise nicht zu verifizieren war der Negativzusammenhang zu den Motilitätsparametern, der in vielen anderen Studien gezeigt wurde. Grundsätzlich zeigen alle aufgeführten Arbeiten, dass ROS einen negativen Effekt auf die Parameter der klassischen Samenanalyse zu haben scheint, hier insbesondere zu nennen Dichte, Membranintegrität, Morphologie und wahrscheinlich auch Motilität, wenn man hierzu die Mehrzahl der Untersuchungen anschaut.

In einer Studie von ALKAN et al. (1997) wird deutlich, dass erhöhte Werte für ROS bei Männern mit idiopathischer Infertilität zu finden sind im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppe, woraus die Autoren folgern, dass erhöhter oxidativer Stress zu Infertilität führen kann. Auch SHARMA et al. (1999) konnten vermehrt Sauerstoffradikale bei Männern mit Infertilitätsgeschichte oder bei Varikozelen feststellen. Eben solche Ergebnisse zeigten Vergleiche subfertiler und fertiler Männer in Arbeiten von NAKAMURA et al. (2002) und GARRIDO et al. (2004). SALEH et al. (2003) zeigten ebenfalls in ihrer Studie, dass es bei Männern mit andrologischer und idiopathischer Infertilität zu erhöhten Werten der DNA-Fragmentation und der Produktion von ROS kommt. Je höher die Werte für ROS waren, um so geringer war die Schwangerschaftsrate. AGARWAL et al. (2002) sehen in Betrachtung ihrer in den letzten zehn Jahren durchgeführten Studien klare Korrelationen zwischen erhöhten ROS-Werten, verminderter Membranintegrität, DNA-Fragmentationen und dem Auftreten von Infertilität. Sie betrachten die freien Radikale eventuell als einen Hauptverursacher der immer schlechter werdenden Samenqualität der letzten Jahrzehnte. In einer weiteren Arbeit von PASQUALOTTO et al. (2004) zeigt sich interessanterweise, dass bei erhöhten Lipidperoxidationswerten, die hier in der Follikelflüssigkeit gemessen wurden, sich eine positive Korrelation zur Schwangerschaftsrate zeigt. Wiederum eine andere Untersuchung (ZORN et al., 2003) stellt dar, dass es bei erhöhten ROS-Werten zu geringeren Schwangerschaftsraten nach IVF-Behandlung kam und zu Störungen der Embryoentwicklung nach einer ICSI-Fertilisation.

In der Betrachtung des Einflusses von Umweltfaktoren auf das vermehrte Auftreten von freien Radikalen im Seminalplasma zeigte eine Studie von LOFT et al. (2003), dass weder Rauchen, noch Industrieabgase oder vermehrter Koffeinkonsum zu einer Erhöhung der ROS-Werte beitragen, wohl aber, dass erhöhte ROS-Werte im seminalen Plasma eine geringere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit bedingen. Eine weitere Untersuchung von POTTS et al. (2000) zeigte, dass das Seminalplasma als Medium insgesamt eher protektiv wirkt bezüglich Schäden im Sinne einer Lipidperoxidation, die durch externe Radikale zugefügt wurden. Dies bestätigte eine Studie der Arbeitsgruppe von VILLEGAS et al. (2003).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Männern mit einer Subfertilitäts- oder idiopathischer / andrologischer Infertilitätsanamnese eine direkt positive Korrelation zum Auftreten von vermehrten Sauerstoffradikalen gibt

(AGARWAL et al., 2002; ALKAN et al., 1997; GARRIDO et al., 2004; NAKAMURA et al., 2002; SALEH et al., 2003; SHARMA et al., 1999). Aufgrund dieser verminderten Fertilitätsprognose reduzierte sich eben auch die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft bei vermehrtem Auftreten von ROS (LOFT et al., 2003; SALEH et al., 2003; ZORN et al., 2003). In unseren untersuchten Patientenkollektiven zeigten sich in allen Kollektiven Negativkorrelationen zwischen erhöhten ROS-Werten und den Befruchtungsraten. Bezüglich der Schwangerschaftszahl ließ sich diese Korrelation (mit Ausnahme der ICSI-Gruppe) nicht bestätigen. Aufgrund der früher erhobenen Ergebnisse und unserer eigenen muss man sicherlich davon ausgehen, dass sich ROS vermehrt in sub- oder infertilen Patientenkollektiven findet und dies negative Einflüsse auf den Befruchtungserfolg hat. Inwieweit externe Einflüsse und Umweltfaktoren eine Rolle hierbei spielen, gilt es sicherlich noch genauer zu untersuchen. Sicher scheint wohl, dass das Seminalplasma als Medium an sich einen protektiven Effekt auf die Spermatozoen ausübt, wenn vermehrt ROS produziert wurde (POTTS et al., 2000; VILLEGAS et al., 2003).

## **5.5. ANTIOXIDANTIENKONZENTRATION IM SEMINALPLASMA**

### **5.5.1. TOTALER ANTIOXIDANTIEN-STATUS (TAS)**

Der totale Antioxidantien-Status (TAS), der alle nicht-enzymatischen Antioxidantien im seminalen Plasma zusammenfasst, zeigt in unseren Ergebnissen (4.1.3.) dazu identische Ergebnisse zwischen der IVF- (Mittelwert 1.43 mmol/l) und ICSI-Patientengruppe (Mittelwert 1.53 mmol/l).

In Zusammenschau des Vergleiches zwischen TAS und den Parametern der klassischen Samenanalyse, wie unter 4.3. ausführlich dargelegt wurde, zeigen sich negative Signifikanzen zwischen TAS und den Parametern der Spermienmotilität in der Gesamt- und IVF-Fraktion sowie eine in der Gesamtgruppe bestehende Negativsignifikanz zu den morphologischen Normalformen. Im ICSI-Patientenkollektiv gibt es positiv signifikante Korrelationen zwischen TAS und der Membranintegrität beziehungsweise der Spermiedichte.

Interessanterweise werden im Anblick von TAS zu den Befruchtungsraten und Schwangerschaftszahlen (4.6.) inverse Korrelationen deutlich: In der Gesamt- und ICSI-Fraktion zeigen sich jeweils positive Korrelationen zur Befruchtungsrate und eine Negativkorrelation bei den IVF-Patienten. Bezüglich TAS und der Schwangerschaftszahl drehen sich die Korrelationen diametral entgegengesetzt um.

Die Betrachtung des totalen Antioxidantien-Status (TAS) als Faktor des Zusammenspiels der einzelnen Antioxidantien ist gerade diesbezüglich ein sinnvoller Ansatz. Insgesamt lassen sich hierzu allerdings noch recht wenige Studien finden.

SMITH et al. (1996) zeigten als eine der ersten, dass TAS bei fertilen Männern in sehr viel höheren Werten zu finden ist als bei subfertilen Samenspendern. Des Weiteren stellten sie die Wechselwirkungen zu ROS dar. Bei erhöhten ROS-Werten war TAS niedrig und umgekehrt. Eben solche Ergebnisse lieferte eine Studie von SHARMA et al. (1999), die zusätzlich noch einen berechneten Wert, den ROS-TAS-Score mit ins Spiel bringen. Sie postulieren, dass dieser bei der Zuordnung fertiler versus infertiler Patientengruppen den alleinigen ROS-/TAS-Werten überlegen sei. In einer Untersuchung von KOCA et al. (2003) wurden signifikant höhere TAS-Werte (im Mittelwert 2.02 mmol/l) bei fertilen Männern gefunden im Gegensatz zu infertilen (im Mittelwert 1.78 mmol/l). Außerdem wurde festgestellt, dass die TAS-Werte bei Asthenozoospermie und Asthenoteratozoospermie deutlich herabgesetzt waren. Auch PASQUALOTTO et al. (2000) fanden in subfertilen Patientengruppen signifikant niedrigere TAS-Werte und zudem noch eine Korrelation zu verminderter Spermiedichte, -motilität und -morphologie.

In den bisher veröffentlichten Studien zum totalen Antioxidantien-Status (TAS) zeigen sich übereinstimmende Ergebnisse bezüglich den TAS-Werten bei fertilen beziehungsweise sub- oder infertilen Männern. In allen Studien (KOCA et al., 2003; PASQUALOTTO et al., 2000; SHARMA et al., 1999; SMITH et al., 1996) wurden höhere TAS-Werte in den fertilen Kontrollgruppen festgestellt. In unserer Studie wurden hierzu keine Messungen in einer Kontrollgruppe durchgeführt. Interessant ist, dass es kaum Unterschiede zwischen den TAS-Werten der IVF- und ICSI-Gruppe gibt. Ebenso konnten in der vorliegenden Dissertation keine klaren Aussagen bezüglich der Assoziationen zwischen TAS und den Befruchtungs- /

Schwangerschaftsraten gemacht werden. Die positiven und negativen Korrelationen zu diesen Parametern halten sich in unseren Daten die Waage, so dass man nicht allein aufgrund der TAS-Werte eine Zuordnung zu Kollektiven vornehmen kann, die eine erfolgreiche oder erfolglose Schwangerschaft als Ergebnis der Fertilitätsbehandlung aufzeigen.

Im Vergleich von TAS mit den Parametern der klassischen Samenanalyse konnten wir mit unserer Studie in der ICSI-Patientengruppe signifikante Korrelationen zur Spermiedichte feststellen, ähnlich wie PASQUALOTTO et al. (2000), und – was bisher in keiner Studie erwähnt wurde – zur Membranintegrität. In zwei vorausgegangenen Studien stellten KOCA et al. (2003) und PASQUALOTTO et al. (2000) verminderte Werte für Spermienmorphologie und –motilität bei gleichzeitig erniedrigten TAS-Werten fest. Überraschenderweise fand sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikant negative Korrelation zwischen TAS und der Motilität (mit Ausnahme der ICSI-Patientengruppe) beziehungsweise der morphologischen Normalformen (in Betrachtung des Gesamtkollektives). Insgesamt gesehen, müssen hier sicherlich noch weitere Studien erfolgen, die sich intensiv mit dem Zusammenhang zwischen TAS und den Spermioogramm-Parametern befassen, bevor man hier allgemeingültige Aussagen treffen kann.

In einer Arbeit stellen GARRIDO et al. (2004) heraus, dass es bei allen Betrachtungen von Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im menschlichen Seminalplasma zu keiner eindeutigen Antwort bisher gekommen ist, was die Relevanz dieser beiden Gruppen in der Infertilitätsforschung angeht, was diese vorliegende Studie bestätigt.

### **5.5.2. VITAMIN E**

Vitamin E, ein weiterer Parameter des antioxidativen Spektrums im seminalen Plasma, zeigt (4.1.3.) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Der Vitamin E-Wert ist im Mittelwert in der ICSI-Gruppe (41.34 µg/dl) nur etwas höher als in der IVF-Fraktion (38.94 µg/dl).

Alpha-Tocopherol stellt im Vergleich zu den Parametern der klassischen Samenanalyse (4.3.) teilweise signifikante Zusammenhänge zu diesen her. Sowohl in der IVF-Gruppe als auch in Betrachtung des Gesamtkollektivs gibt es signifikant negative Korrelationen zwischen Vitamin E und den Parametern Global- und Progressivmotilität. In der ICSI-Gruppe findet sich diese Negativkorrelation (allerdings nicht mehr signifikant) nur noch bezüglich der Globalmotilität. Zusätzliche signifikant negative Korrelationen bestehen zu den morphologischen Normalformen (in der IVF-Gruppe) und dem Spermavolumen (in der ICSI-Gruppe).

Es gibt eine negative Korrelation zwischen Vitamin E und der Befruchtungsrate beziehungsweise Schwangerschaftszahl in allen untersuchten Patientengruppen.

Die Analyse von Alpha-Tocopherol hat in der männlichen Infertilitätsforschung ihren festen Platz. Vitamin E bedingt Schutz vor der Lipidperoxidation der Spermienmembran und verbessert teilweise die Spermienfunktionsparameter. Interessant wären in diesem Zusammenhang auch Messungen von Vitamin E im Spermatozoon selbst im Vergleich zu den Werten im Seminalplasma.

In der Studie von LEWIS et al. (1997) zeigen sich nur geringe Werte von Vitamin E im Seminalplasma. Die Autoren gehen davon aus, dass Alpha-Tocopherol und Ascorbat im Zusammenspiel gegen Lipidperoxidation schützen, so dass höhere Werte für Vitamin E im seminalen Plasma eventuell nicht nötig sind.

In Tierversuchen mit Hähnen konnten DANIKOWSKI et al. (2002) darstellen, dass orale Vitamin E-Supplementation bei dann auch gemessenen erhöhten Werten im Sperma eine Verschlechterung der Spermiedichte und der –morphologie nach sich zogen. Daraus resultierten unter anderem nach BOLLE et al. (2002), dass bei Einsatz von Vitamin E als Therapeutikum oral oder in-vitro genau untersucht werden muss, welche Dosis eventuell einen fördernden Effekt auf den Schutz vor Lipidperoxidation haben kann. Wiederum KESKES-AMMAR et al. (2003) zeigten, dass sich bei oraler Gabe von Vitamin E (kombiniert mit Selen) eine Abnahme der ROS-Werte und eine Verbesserung der Spermienmotilität einstellte. Bereits 1985 stellten ENGEL et al. ähnliche Ergebnisse dar. In ihrer Arbeit kam es zu einer Verbesserung der Spermienmotilität nach oraler Vitamin E-Aufnahme, was durch den

Schutzeffekt des Alpha-Tocopherols vor der Lipidperoxidation erklärt wurde. Eben diesen Schutzeffekt sehen auch BREQUE et al. (2003) in Tierversuchen mit Hühnern und Truthähnen.

Die Arbeitsgruppe von THÉROND et al. (1996) stellte einen positiven Zusammenhang zwischen Vitamin E-Gehalt im menschlichen Seminalplasma und der Spermienmotilität, -morphologie und -vitalität fest. Insofern sehen sie die Rolle von Alpha-Tocopherol als Schutzstoff für den morphologisch-funktionellen Status der Spermatozoen. In einer Untersuchung von OMU et al. (1999) zeigte sich, dass sowohl im Blutserum als auch im seminalen Plasma bei fertilen Männern mehr Vitamin E gefunden werden konnte als in den Vergleichsgruppen mit Azoo-, Oligozoo- oder Asthenozoospermie. Sie begründeten dies mit einem vermehrten Vorhandensein von ROS in den sub- und infertilen Patientenproben.

In einem Review, der die Forschungen der letzten Jahre umfasst, fassen AGARWAL et al. (2004) gut die Rolle einiger Antioxidantien und insbesondere Vitamin E in der männlichen Fertilitätsforschung zusammen. Kritisch betrachtet haben die meisten vorausgegangenen Studien einen Benefit der Antioxidantien für die Fertilität gezeigt. Vitamin E gilt in in-vitro- und in-vivo-Studien dabei als förderlich für die Spermienmotilität, -vitalität und -morphologie. Zudem wird es dafür verantwortlich gemacht, die Werte für ROS im Seminalplasma zu senken. Teilweise wird aber auch aufgezeigt, dass Supplementationstherapien bei weitem nicht immer zu einer Verbesserung der Samenqualität-Parameter geführt haben. Man muss sich vor Augen halten, dass bei allen antioxidativen Therapieansätzen die Dosierung und die mögliche Kombination verschiedener Antioxidantien bedacht werden müssen.

Die Resultate unserer eigenen Studie zeigen insbesondere in Bezug auf die Spermienmotilität ein überraschendes Ergebnis. Entgegen einiger Studien, die einen positiven Zusammenhang zwischen Alpha-Tocopherol und der Spermienmotilität sehen (AGARWAL et al., 2004; ENGEL et al., 1995; KESKES-AMMAR et al., 2003; OMU et al., 1999; THÉROND et al., 1996), stellt man in der vorliegenden Studie meist signifikante negative Korrelationen zu Global- und Progressivmotilität in allen Patientengruppen fest. Ebenso ließ sich eine signifikante Negativkorrelation in der IVF-Patientengruppe zur Morphologie nachweisen, was auch einigen früheren

Studien widerspricht (AGARWAL et al., 2004; OMU et al., 1999; THÉRON D et al., 1996). Dies ließe sich eventuell damit erklären, dass die Vitamin E-Werte im Seminalplasma zu hoch sind, um einen positiven Effekt auf die Spermienfunktionsparameter auszuüben. So wiesen bereits LEWIS et al. (1997) und DANIKOWSKI et al. (2002) zum einen auf ausreichend niedrige Vitamin E-Werte im Seminalplasma beziehungsweise auf verschlechternde Effekte von zu hohem Vitamin E auf die Spermiedichte und –morphologie hin. Auch BOLLE et al. (2002) und schließlich AGARWAL et al. (2004) berichteten von Negativzusammenhängen bei zu hohen (in diesen Fällen oral supplementierten) Vitamin E-Dosen. Aufgrund dieser eher negativen Ergebnissen unserer Untersuchung in Bezug auf Vitamin E und die Qualität der Parameter der klassischen Samenanalyse, verwundert es auch nicht weiter, dass wir auch eine Negativkorrelation zur Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate beobachten konnten.

Letztlich müssen wir uns aufgrund dieser Ergebnisse AGARWAL et al. (2004) anschließen, dass in zukünftigen Untersuchungen noch intensiver auf die Referenzbereiche für Vitamin E im Seminalplasma geachtet werden muss, in denen es als Antioxidanz ein Benefit für die Spermienfunktionsparameter und damit schlussendlich für die Fertilitätsprognose bringen wird.

### **5.5.3. SELEN**

Der nächste Parameter der antioxidativen Reihe, der nun betrachtet wird, ist Selen. Ohne signifikanten Differenzen (4.1.3.) zeigen sich ähnliche Werte für Selen im Mittelwert in der IVF- ( $3,412 \times 10^{-2}$  mg/kg) und ICSI-Gruppe ( $3,614 \times 10^{-2}$  mg/kg).

Es gibt im Vergleich der Selenwerte mit den klassischen Spermioigrammparametern (4.3.) signifikant negative Korrelationen zur Global- und Progressivmotilität in Betrachtung des Gesamtkollektives und den IVF-Patienten. In der ICSI-Gruppe zeigen sich positive Korrelationen zwischen Selen und den Motilitätsparametern, sogar ein signifikantes Ergebnis zur Progressivmotilität. Zu erwähnen sind noch die signifikant negativen Beziehungen zum pH-Wert in der Gesamt- und IVF-Gruppe.

Zu Assoziationen zwischen Selen und der Befruchtungsrate und der Schwangerschaftszahl (4.6.) lassen sich positive Korrelationen (mit einer

Ausnahme), die allerdings nicht signifikant sind, in allen Patientenfraktionen feststellen.

Wenn man den antioxidativen Parameter Selen betrachtet, so zeigt sich, dass Selen wohl multiple Funktionen im männlichen Reproduktionstrakt wahrnimmt (wie unter 2.9.3. schon zum Teil dargestellt wurde). Innerhalb der einzelnen Interaktionen ist als eine der wichtigsten die Cofaktor-Rolle im Enzym Glutathion-Peroxidase zu nennen (VÉZINA et al., 1988), deren Aktivität durch Selen stimuliert wird (BREQUE et al., 2003). Außerdem wird in zahlreichen Studien Einflüsse Selens auf die Samenqualität beschrieben.

SAARANEN et al. (1986) beschrieben die Hoden als selenreichstes Gewebe, wobei auch die Samenbläschen wohl hauptverantwortlich für die Selen-Werte in der Samenflüssigkeit seien. In einer frühen Studie von SAARANEN et al. (1987) zeigten sich keinerlei Korrelationen zwischen Selenwerten im Seminalplasma und der Spermiedichte oder Spermienmotilität, so dass die Untersucher von einer weiter „unklaren Rolle“ von Selen in der Fertilitätsdiagnostik sprachen. Auch in einer weiteren Arbeit dieser Forschergruppe (SAARANEN et al., 1989) wurden keine Korrelationen zwischen Selen im Seminalplasma und den Samenqualitätsparametern nachgewiesen. Hingegen stellte die Arbeitsgruppe von NOACK-FÜLLER et al. (1993) dar, dass positive Korrelationen zwischen Selen und der Spermiedichte beziehungsweise -morphologie bestehen. Eben solche Ergebnisse bezüglich der Spermiedichte zeigte eine Arbeit von OLDEREID et al. (1998). XU et al. (2003) zeigten signifikant positive Korrelationen zwischen Selen und der Spermiedichte, -vitalität und -motilität sowie eine signifikant negative Korrelation zu ROS auf, woraus sie die Rolle Selens als Antioxidanz gegen oxidativen Stress folgerten.

Bei oralen Selengaben stellten KESKES-AMMAR et al. (2003) fest, dass Selen (gemeinsam mit Vitamin E) eine Verbesserung der Spermienmotilität bewirkte. In einer Arbeit von RAYMAN et al. (2002) wird darüber hinaus postuliert, dass hohe orale Selengaben einige gesundheitsfördernde Aspekte liefern würden, unter anderem eine Verbesserung der Spermienreifung und -motilität, im Gegensatz

hierzu warnt SHAMBERGER (1985) vor dem toxischen mutagenen Effekt von Selen in höheren Dosen.

Interessante Aussagen trafen BLEAU et al. (1984) in ihren Selenforschungen. So zeigten sie signifikante Korrelationen zwischen Selen und der Spermiedichte. Bezüglich der Assoziation zur Spermienmotilität fanden die Forscher einen optimalen Wertebereich für Selen, in dem die Motilität am besten war. Werte über und unter diesem Referenzbereich resultierten in schlechteren Werten für die Motilitätsparameter. Auch in Bezug auf die Schwangerschaftsraten traf dieser Referenzbereich nach BLEAU et al. (1984) zu. So zeigten sich innerhalb des optimalen Selen-Wertebereiches eine hohe Schwangerschaftsrate, wohingegen es bei Werten darüber zu erhöhten Abortraten und darunter zu verminderten Schwangerschaftsraten kam.

In der vorliegenden Studie zeigen sich keine klaren Korrelationen zu anderen Spermioigrammparametern außer der Motilität. Diverse Studien zeigten im Gegensatz zu diesen Untersuchungen Positivkorrelationen zwischen Selen und der Spermiedichte, -vitalität und -morphologie (BLEAU et al., 1984; NOACK-FÜLLER et al., 1993; OLDEREID et al., 1998; XU et al., 2003). Einige Arbeiten wiesen einen positiven Zusammenhang zwischen Selen und der Spermienmotilität nach (BLEAU et al., 1984; KESKES-AMMAR et al., 2003; RAYMAN et al., 2002; XU et al., 2003). Dieses steht im Einklang mit den ICSI-Kollektiven bei dieser vorliegenden Untersuchung. Es zeigten sich genau entgegengesetzt in der IVF-Gruppe und auch in Betrachtung aller Patienten signifikant negative Korrelationen zur Global- und Progressivmotilität. Insofern lassen sich im Vergleich aller Studien letztlich keine klaren Zusammenhänge zwischen Selen und den Spermienfunktionsparametern, insbesondere der Motilität, herstellen. Die Ergebnisse zu Selen in dieser Dissertation stimmen mit denen von SAARANEN et al. (1987 und 1989) überein.

Positive Effekte von Selen auf die Fertilitätsprognose sind natürlich eng mit der Samenqualität verknüpft. In der vorliegenden Arbeit konnten wir positive Zusammenhänge zwischen Selen und den Befruchtungsraten beziehungsweise Schwangerschaftszahlen belegen. Einen „optimalen Wertebereich“ für Selen, den BLEAU et al. (1984) postulierten, konnten wir mit unseren Ergebnissen nicht belegen.

#### **5.5.4. ZINK**

Der letzte antioxidative Parameter, Zink, ist gleichzeitig auch derjenige, der bisher in der Fertilitätsforschung am längsten und besten untersucht wurde. Die Werte für Zink sind im Mittelwert in der IVF-Gruppe (131.0 mg/kg) nahezu gleich wie in der ICSI-Gruppe (127.32 mg/kg).

Vergleichbare Ergebnisse zu Selen (5.5.3.) zeigt Zink in Beziehung zu den Parametern der klassischen Samenanalyse (4.3.). Signifikant negative Korrelationen finden sich in Betrachtung des Gesamtkollektives und der IVF-Patientengruppe zu den Motilitätsparametern und dem pH-Wert. Diese Negativkorrelationen bestehen auch in der ICSI-Gruppe, nur eben nicht mehr signifikant.

Im Anblick des Vergleiches zwischen Zink und den Fertilisationsparametern (4.6.) zeigt sich in allen Gruppen eine Negativkorrelationen zur Befruchtungsrates. Dies trifft auch auf die Assoziation zwischen Zink und der Schwangerschaftszahl in der IVF-Gruppe zu. Dagegen finden sich positive Korrelationen zwischen Zink und den Schwangerschaftsergebnissen in der Gesamt- und ICSI-Patientengruppe, in letzterer sogar signifikant.

Der bisher schon ausführliche untersuchte Parameter Zink hat multiple Eigenschaften im männlichen Reproduktionstrakt. Neben den Einflüssen auf die Hoden- und Spermienentwicklung und auf die Lebensfähigkeit der Spermien steht insbesondere die Beziehung zur Spermienmotilität immer wieder im Mittelpunkt der Untersuchungen. Hierbei gilt es sicherlich auch zwischen dem intrazellulären Zinkgehalt und dem im seminalen Plasma zu unterscheiden, da beide wohl unterschiedliche Konsequenzen auf die Samenqualität nach sich ziehen (HENKEL et al., 1999). Auch scheint Zink als temporärer Inhibitor einer Chromatindekondensation entgegenzuwirken (KVIST, 1980).

UMEYAMA et al. (1986) bestimmten Zink als zweithäufigst vorkommendes Spurenelement nach Kalzium im Seminalplasma. Sie fanden ungefähr gleich hohe Mengen bei infertilen Männern und der fertilen Kontrollgruppe, aber höhere Werte bei

infertilen Männern mit Normozoospermie, woraus die Untersucher folgerten, dass eventuell zu hohe Zinkkonzentrationen bei diesen Männern die Infertilität mitbedingen. BOSTRÖM et al. (1971) zeigten zudem auf, dass bei chronischen Genitaltraktinfektionen ein geringerer Zinkwert im Seminalplasma resultiert. Dies konnten wiederum COLLEEN et al. (1975) nur für Fälle mit Gonorrhoe bestätigen, jedoch nicht für beispielsweise chronische Prostatitiden.

In einer in-vitro-Untersuchung wiesen GAVELLA et al. (1998) nach, dass Anwesenheit von Zink einen inhibitorischen Effekt auf die Sauerstoffradikalproduktion hat. Jedoch konnte in den antioxidativen Therapieansätzen bei erhöhten ROS-Werten bisher, ähnlich wie bei anderen Antioxidantien, noch kein sicheres Therapiekonzept erstellt werden, so dass hier weitere Untersuchungen nötig sind (HAIDL, 2002).

In Studien von CHIA et al. (2000) wurde deutlich, dass Zink signifikant mit der Spermiedichte, -vitalität und -motilität korreliert. BÖTTGER (1973), SAARANEN et al. (1987) und STANWELL-SMITH et al. (1983) konnten dies nur für die Assoziation zur Spermiedichte bestätigen. ANDÓ et al. (1989) stellten auch signifikante Korrelationen zwischen Zink und der Spermienmotilität her. Gleiche Resultate wiesen LEWIS-JONES et al. (1996) und SKANDHAN / SKANDHAN et al. (1981 / 1978) nach. Sehr allgemein äußern sich DIEUDONNÉ et al. (2001), wenn sie von niederen Zinkwerten im Seminalplasma sprechen, wenn die „Abnormalitäten“ im Spermioogramm zunehmen. Auch STANKOVIC et al. (1976) schrieben sinkenden Zinkwerten im Seminalplasma die Verantwortung für eine Reduktion der „Samenaktivität“ zu.

1977 zeigten PAZ et al., dass es keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Zinkkonzentrationen im Seminalplasma und der Samenqualität gibt. NOACK-FÜLLER et al. (1993) und ebenso EGGERT-KRUSE et al. (2002) stellten keine Assoziationen zwischen den Zinkwerten und den Parametern der klassischen Samenanalyse fest. Auch COLLEEN et al. (1975), SCHOENFELD et al. (1979) und WOOD et al. (1982) konnten keine signifikanten Differenzen bezüglich des Zinkgehaltes in verschiedenen Patientengruppen mit unterschiedlichen Samenqualitäten demonstrieren. HIDIROGLOU et al. (1984) sahen keinen

Zusammenhang zwischen Zinkkonzentrationen im Seminalplasma und der Spermiedichte und Progressivmotilität. In ihrer Arbeit wurde zudem gezeigt, dass in toten und immotilen Spermatozoen selbst die höchsten Zinkkonzentrationen gefunden wurden, wobei die Zinkwerte intrazellulär deutlich höher waren als im seminalen Plasma. HENKEL et al. (1999) stellten heraus, dass es keine Korrelationen zwischen dem Zinkgehalt im seminalen Plasma und der Global- oder Progressivmotilität gibt. Interessant war in dieser Studie noch, dass sich, je höher der Zinkgehalt im Spermatozoenschwanz war, alle Motilitätsparameter signifikant verschlechterten, insbesondere die Progressivmotilität. Diese Daten konnte die Arbeitsgruppe um HENKEL et al. 2003 erneut in einer Studie zum Spermienenergieverbrauch bestätigen.

Negative Einflüsse auf Spermiedichte, -morphologie und -motilität konnte LINDHOLMER (1974) in vitro-Versuchen nachweisen, was durch Zugabe von Albumin wiederum deutlich verbessert wurde, was den Autor postulieren ließ, dass Zink und Albumin als gemeinsam wirkende Stoffe gesehen werden müssen. Sehr differenziert bezüglich des Wirkens von Zink auf die Spermienmotilität fanden SORENSEN et al. (1999), dass bei hohen Zinkkonzentrationen kein Effekt auf die Globalmotilität ausgeübt wurde, sondern interessanterweise ein supprimierender Einfluss auf die Progressivmotilität. Dagegen konnten CARRERAS et al. (1990) eine signifikant negative Korrelation zwischen Zink im Seminalplasma und der nicht-progressiven Spermienmotilität feststellen.

Vergleicht man nun die Ergebnisse in verschiedenen Studien mit denen unserer eigenen Arbeit in Bezug auf das Verhältnis zwischen Zink und den Parametern der klassischen Samenanalyse und schließlich den daraus resultierenden Fertilitätsprognosen, so gibt es, wie in den vergangenen Jahrzehnten, über teilweise kontroverse Resultate zu berichten.

Zahlreiche Untersuchungen stellten einen klar positiven Zusammenhang zwischen den Zinkwerten des seminalen Plasmas und der Spermienmotilität heraus (ANDÓ et al., 1989; CHIA et al., 2000; LEWIS-JONES et al., 1996; SKANDHAN, 1981; SKANDHAN et al., 1978). Weitere Autoren beschreiben noch (zusätzlich) eine ebensolche Assoziation zur Spermiedichte (BÖTTGER, 1973; CHIA et al., 2000; SAARANEN et al., 1987; STANWELL-SMITH et al., 1983). Andere Untersuchungen

sprechen von einer generell besseren Samenqualität bei hohen Zinkwerten im Seminalplasma (DIEUDONNÉ et al., 2001; STANKOVIC et al., 1976). Interessanterweise gibt es ähnlich viele Studien, die einen Zusammenhang zwischen Zink im Seminalplasma mit den SpermioGrammparametern verneinen (COLLEEN et al., 1975; EGGERT-KRUSE et al., 2002; HIDIROGLOU et al., 1984; NOACK-FÜLLER et al., 1993; PAX et al., 1977; SCHOENFELD et al., 1979; WOOD et al., 1982). Schließlich dann gibt es noch eine Reihe von Arbeitsgruppen, die sogar eine Negativkorrelation zwischen Zink im Spermaplasma und einigen SpermioGrammparametern ausmachen, hier insbesondere der Motilität (CARRERAS et al., 1990; LINDHOLMER, 1974; SORENSEN et al., 1999). Auch wir konnten in der vorliegenden Studie klar signifikant negative Korrelationen zwischen der Global- und Progressivmotilität und dem Seminalplasma-Zink feststellen. SORENSEN et al. (1999) beschreiben nur eine Negativkorrelation zur Progressivmotilität, CARRERAS et al. (1990) nur zur Globalmotilität. In unseren Ergebnissen sind beide Motilitätsparameter gleich stark „betroffen“. HENKEL et al. (1999 und 2003) haben zwar keine Assoziationen zwischen Zink im seminalen Plasma und der Spermienmotilität gesehen, wohl aber einen Motilitätsverlust (insbesondere der Progressivmotilität) bei hohen intrazellulären Zinkwerten in den Spermischwänzen beschreiben, müssen wir mit diesen Erkenntnissen und den Resultaten unserer eigenen Untersuchungen eventuell davon ausgehen, dass es diesen Negativeffekt von hohen Zinkwerten auf die Spermienmotilität auch im Seminalplasma geben kann.

Wenn man diese Überlegungen weiterführt, erklären sich hieraus auch unsere Ergebnisse zur Befruchtungsrates (Negativkorrelationen zu Zink in allen Patientenkollektiven). Überraschend sind dann unsere Ergebnisse bezüglich der Schwangerschaftszahlen zu werten. Auf der einen Seite steht, vergleichbar mit den Resultaten zur Befruchtungsrates, eine Negativkorrelation in der IVF-Gruppe. Auf der anderen Seite konnten wir eine signifikant positive Korrelation zwischen Zink und der Schwangerschaftszahl in der ICSI-Patientengruppe feststellen, woraus für nachfolgende Studien Überlegungen angestellt müssen bezüglich des weiteren Verlaufes der Zinkwerte nach der Ejakulation bis hin zur Befruchtung der Eizelle und dem dortigen möglichen Effekt des Zinks in der Zygote.

## **5.6. FAZIT DER DISKUSSION**

Zunächst gilt es nochmals darauf hinzuweisen, dass es bei unseren Untersuchungen bezüglich der Parameter der klassischen Samenanalyse insbesondere für Motilität, Vitalität und normale Morphologie reduzierte Normalwerte im Vergleich zu den WHO-Kriterien gab (4.1.1.). Bezüglich der Befruchtungsraten gab es in der IVF- und ICSI-Gruppe nahezu identische Ergebnisse mit circa 67 %. Die Schwangerschaftsraten beziehungsweise absolute Zahl an Schwangerschaften waren in der IVF-Patientengruppe höher als in der ICSI-Fraktion (circa 42 zu 18% beziehungsweise 11 zu 4 Schwangerschaften).

1. Die Daten zur DNA-Integrität zeigen in unserer Studie durchweg positive Ergebnisse, das heißt relativ gut kondensiertes Chromatin und eine niedere Apoptoserate. Den Zusammenhang zwischen kondensiertem Chromatin und den Spermogramm-Parametern Vitalität, Morphologie und Motilität konnten wir aufzeigen. Bei der Apoptoserate konnten wir die in vielen Untersuchungen gezeigte Assoziation zur Spermiedichte und Morphologie nicht bestätigen, wohl aber die Negativkorrelationen zur Spermienmotilität und –vitalität. Weder beim Chromatinkondensationsstatus noch bei der Apoptoserate zeigten wir Zusammenhänge zur Oxidantien- oder Antioxidantienkonzentration auf. Bezüglich der Fertilisationsergebnisse konnten wir mit unseren Ergebnissen bei beiden Parametern zur DNA-Integrität maximal tendenziell die Zusammenhänge zu den Fertilisations- und Schwangerschaftsraten vorhergehender Arbeiten verifizieren. Es besteht wohl eine Korrelation zwischen dem Chromatinkondensationsstatus der Schwangerschaftszahl. Abschließend ist noch zu erwähnen, dass sicherlich bedacht werden muss, dass eine gewisse Apoptoserate bei Spermien durchaus als physiologischer Selektionsprozess und nicht als pathologische Entität betrachtet werden muss.
2. Dass ROS-Produktion auch bis zu einem gewissen Maße physiologischerweise produziert wird, scheint auch eine gesicherte Erkenntnis zu sein. In den Resultaten unserer Studie konnten wir die oft beschriebenen Negativkorrelationen zwischen ROS und der Spermiedichte und Spermienmorphologie weitestgehend bestätigen. Auch zur Membranstabilität gibt es negative Assoziationen, wie es bisher nur OCHSENDORF et al. (1994) ausdrücklich beschrieben haben. Lediglich bezüglich des Zusammenhangs

zur Spermienmotilität müssen wir uns der Minderheit unserer Vorgänger (TWIGG et al., 1998 und WHITTINGTON et al., 1999) anschließen, die wie wir keine Negativzusammenhänge zwischen ROS und der Motilität feststellen konnten. Dass ROS vermehrt in sub- und infertilen Patientenkollektiven vorkommt, lässt sich durch unsere Negativkorrelationen zur Befruchtungsrate ebenfalls untermauern.

3. Wenn man unter den Antioxidantien zunächst TAS und Vitamin E analysiert, so gibt es bezüglich beider Parameter teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Bei TAS konnten wir weder bezüglich des Vergleichs zu den Parametern der klassischen Samenanalyse noch zu den Fertilisationsresultaten klare Ergebnisse erzielen. Es halten sich zum Großteil Negativ- mit Positivkorrelationen die Waage und Aussagen von früheren Studien lassen sich weder verifizieren noch falsifizieren. Die in der vorliegenden Studie gezeigten Negativkorrelationen von Vitamin E zur Spermienmorphologie, -motilität und Schwangerschaftszahl stehen im Gegensatz zu früheren Untersuchungsergebnissen. Als mögliche Erklärung könnten zu hohe Vitamin E-Werte im Seminalplasma herhalten, die eventuell einen negativen Effekt auf die Samenqualität haben. Wir konnten keine klaren Zusammenhänge zwischen Selen und den Samenfunktionsparametern feststellen. Allerdings ist eine eindeutig positive Verbindung zwischen Selen und den Fertilitätsparametern zu sehen. Bei Zink konnten insgesamt wenig klare Korrelationen zu den klassischen Spermioogramm-Parametern gesehen werden. Erwähnenswert ist die von uns gesehene Negativkorrelation zur Global- und Progressivmotilität. Insofern müsste man überdenken, ob die von HENKEL et al. (1999 und 2003) gesehene Negativkorrelation von intrazellulärem Zink und den Motilitätsparametern auch auf das Verhältnis im Seminalplasma übertragen werden kann. Bezüglich des Verhältnisses zwischen Zink und den Fertilitätsparametern bedarf es auch nach unseren Resultaten, die nicht als eindeutig zu werten sind, weiteren Untersuchungen.

Schlussendlich bleibt auch nach Abschluss unserer Studie zu sagen, dass die Forschungen bezüglich der untersuchten Parameter und ihrer Zusammenhänge zu den Ergebnissen der unterschiedlichen Fertilisationsprogramme noch lange nicht vor einem erfolgreichen Ende stehen. Trotz teilweiser jahrzehntelanger Forschung ist es

noch nicht gelungen in allen Bereichen letzte Klarheit zu schaffen. Bei allen Überlegungen zur Thematik muss auch bedacht werden, dass potentiell schädigende Stoffe (ROS) oder Prozesse (Apoptose) auch bis zu einem gewissen Maße physiologisch zu sein scheinen und damit notwendig für den natürlichen Selektionsprozess sind. Auf der anderen Seite muss immer noch diskutiert werden, ob potentielle Schutzstoffe (Vitamin E, Selen, Zink) nicht auch bei erhöhten Werten kontraproduktiv wirken können, was auch bei eventuellen antioxidativen Therapieoptionen bedacht werden muss. Die Frage stellt sich also hier nach „optimalen Wertebereichen“ für alle Parameter.

Was künftige Studien weiter komplizieren wird, was aber leider nötig scheint, sind auch gleichzeitig mehrere Zusammenhänge zu untersuchen. So ist es letztendlich wohl immer von Vorteil eine gesunde fertile Kontrollgruppe zum Vergleich heranzuziehen. Zum zweiten sollten auch möglichst die Parameter sowohl intrazellulär, also im Spermatozoon selbst, als auch im seminalen Plasma gemessen werden, um hier Vergleiche anzustellen. Drittens ist es auch notwendig, die einzelnen Konzentrationen nach der Befruchtung weiterzubestimmen, da auch hier noch gravierende Konsequenzen für eine erfolgreiche Schwangerschaft bestehen könnten (wie zum Beispiel anhand der Apoptoseuntersuchungen schon teilweise gezeigt wurde). Und schließlich viertens ist aufgrund der Inkonsistenz der oben genannten Ergebnisse die Komplexität des Seminalplasmas als Medium und des Spermatozoons an sich zu bedenken, die es nötig machen werden, dass insbesondere die Beziehungen der einzelnen Parameter untereinander (beispielsweise die gegenseitige Beeinflussung der Antioxidantien) gründlichst untersucht werden müssen.

Insgesamt gesehen stehen wir sicherlich noch vor Jahren intensiver Forschungen in der Reproduktionsmedizin, wofür eine interdisziplinäre Zusammenarbeit der verschiedenen Fachrichtungen, wie Gynäkologie, Urologie, Dermatologie, Innere Medizin, aber auch beispielsweise Psychiatrie und Biochemie, notwendig sein wird.

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Abou-Shakra FR, Ward NI, Everard DM (1989): The role of trace elements in male infertility. *Fertil. Steril.* 52: 307-310
2. Agarwal A, Saleh RA (2002): Utility of oxidative stress test in the male infertility clinic. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 8: 1-9
3. Agarwal A, Saleh RA (2002): Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol. Clin. North Am.* 29: 817-827
4. Agarwal A, Said TM (2003): Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 9: 331-345
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79: 829-843
6. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM (2004): Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online* 8: 616-627
7. Ahmadi A, Ng SC (1999): Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 284: 696-704
8. Aitken J, Fisher H (1994): Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *BioEssays* 16: 259-267
9. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW (1992): Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fertil.* 94: 451-462

10. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998): Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046
11. Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D (2003): Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online* 7: 65-70
12. Aitken RJ, Sawyer D (2003): The human spermatozoa – not waving but drowning. *Adv. Exp. Med. Biol.* 518: 85-98
13. Al-Hasani S, Diedrich K, Prietl G, Bauer O, van der Ven H, Krebs D, Schmutzler A (1995): Männliche Fertilitätsstörungen: gynäkologisches Management. *Gynäkol. Prax.* 19: 67-80
14. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A (1997): Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J. Urol.* 157: 140-143
15. Andó S, Carpino A, Buffone M, Maggiolini M, Sisci D (1989): The evaluation of free L-carnitine, zinc and fructose in the seminal plasma of patients with varicocele and normozoospermia. *Andrologia* 21: 155-160
16. Andolz P, Bielsa MA, Vila J (1998): Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study of 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum. Reprod.* 14: 731-740
17. Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC (1998): Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 69: 740-747

18. Annas GJ (1985): Embryo Research. Lancet 1985 (Mar 2): 522
19. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2004): Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertil. Steril. 81: 349-354
20. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P (1996): Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 28: 587-596
21. Baker MA, Krutskikh A, Aitken RJ (2003): Biochemical entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. Protoplasma 221: 145-151
22. Bals-Pratsch M, Schill T, Diedrich K (1998): Der andrologische Patient in der gynäkologischen Praxis. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg: 437-490
23. Bandhauer K, Kövesdi S (1970): Der Fertilitätsstatus des Mannes. Urologe 9: 192-199
24. Barratt CLR, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID (1992): The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface bound antibodies. Hum. Reprod. 7: 95-98
25. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000): Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum. Reprod. 15: 1338-1344
26. Bedwal RS, Bahuguna A (1994): Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia 50: 626-640

27. Behne D, Gawlik D (1989): Spurensuche. Neutronen-Aktivierungsanalyse in der Spurenelementforschung. Berichte aus dem Hahn-Meitner-Institut Berlin, Sonderdruck
28. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF (2003): Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 18: 1023-1028
29. Bleau G, Lemarbre J, Faucher G, Roberts KD, Chapdelaine A (1984): Semen selenium and human fertility. *Fertil. Steril.* 42: 890-894
30. Böttger P (1973): Zinkbestimmungen in menschlichem Sperma. *Med. Welt* 24: 374-376
31. Bolle P, Evandri MG, Saso L (2002): The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception* 65: 313-315
32. Boström K, Andersson L (1971): Creatine phosphokinase relative to acid phosphatase, lactate dehydrogenase, zinc and fructose in human semen with special reference to chronic prostatitis. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 5: 123-132
33. Breque C, Surai P, Brillard JP (2003): Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 314-323
34. Caldamone AA, Valvo JR, Cockett ATK (1981): Evaluation of the infertile or subfertile male. *Urol. Clin. North Am.* 8: 17-39
35. Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993): Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 303-311
36. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305: 609-613

37. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B (2003): Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.* 49: 49-55
38. Carreras A, Mendoza C (1990): Zinc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* 22: 279-283
39. Carstensen D, Buddemeier B, Krebs D (1977): Erfahrungen mit der in vitro Befruchtung menschlicher Eizellen. *Arch. Gynakol.* 224: 83-84
40. Chen SH, Wallach EE (1994): Five decades of progress in management of the infertile couple. *Fertil. Steril.* 62: 665-685
41. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK (2000): Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J. Androl.* 21: 53-57
42. Chitale AR, Rathaur RG (1995): Nuclear decondensation of sperm head and failure at in-vitro-fertilization: an ultrastructural study. *Hum. Reprod.* 10: 594-598
43. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF (1992): The Acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 7: 242-247
44. Colleen S, Mardh PA, Schytz A (1975): Magnesium and zinc in seminal fluid of healthy males and patients with non-acute prostatitis with and without gonorrhoea. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 9: 192-197
45. Craft I, Yovich J (1979): Implications of embryo transfer. *Lancet* 1979 (Sep 22): 642-643
46. Dadoune JP (1995): The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 26: 323-345

47. Dandekar SP, Nadkami GD, Kulkarni VS, Punekar S (2002): Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J. Postgrad. Med.* 48: 186-189
48. Danikowski S, Sallmann HP, Halle I, Flachowsky G (2002): Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 86: 376-382
49. Deichmann B (1976): Statistische Erhebungen und Korrelationen zu den Messwerten des Spermogrammes. *Z. Hautkr.* 52: 643-650
50. Diedrich K, Weiss JM, Felderbaum R (1998): In-vitro-Fertilisation. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 380-407
51. Diedrich K (2004): Machen wir's wie die Belgier. In: *Die Rheinpfalz – pfälzische Volkszeitung: Ausgabe vom 08.06.2004*
52. Dieudonné O, Godin PA, Van-Langendonck A, Jamart J, Galanti L (2001): Biochemical analysis of the sperm and infertility. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39: 455-457
53. Drevious L, Eriksson H (1966): Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 42: 136-156
54. Duran EH, Gürgan T, Günalp S, Enginsu ME, Yarali H, Ayhan A (1998): A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 13: 1235-1239
55. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S (2002): Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.* 17: 3122-3128

56. Edwards RG, Fowler RE (1970): Human embryos in the laboratory. *Sci. Am.* 223: 44-54
57. Edwards RG (1981): Test tube babies. *Nature* 293: 253
58. Edwards RG, Steptoe PC (1983): Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet* 2: 1265-1269
59. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, Tilgen W, Runnebaum B (1996): The Acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation ? *Hum. Reprod.* 11: 784-789
60. Eggert-Kruse W, Zwick EM, Batschulat K, Rohr G, Armbruster FP, Petzoldt D, Strowitzki T (2002): Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality ? *Fertil. Steril.* 77: 260-269
61. Eliasson R, Treschl L (1971): Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 22: 134-137
62. Eliasson R (1981): Analysis of semen. In: Burger H, de Kretser D (eds): *The testis*. Raven, New York: 381-399
63. Elton B (1999): *Inconceivable*. Black Swan, London Sydney Auckland Parktown
64. Engel S, Möckel C, Diezel W (1985): Der Einfluss von  $\alpha$ -Tokopherolazetat auf die Spermienmotilität. *Dermatol. Monatsschr.* 171: 800-805
65. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, van Rooyen LH (2000): Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum. Reprod.* 15: 657-661

66. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999): Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14: 1039-1049
67. Feichtinger W (1991): Environmental factors and fertility. *Hum. Reprod.* 6: 1170-1175
68. Felderbaum RE, Reissmann T, Küpker W, Bauer O, Al-Hasani S, Diedrich C, Diedrich K (1995): Fertilization rate and amount of human menopausal gonadotropin needed in controlled ovarian hyperstimulation under low-dose gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Hum. Reprod.* 10:8
69. Felderbaum RE, Baumann P, van Steirteghem A, Diedrich K (1998): Schwangerschaft und Geburt nach Sterilit tsbehandlung. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg: 424-436
70. Ford WCL, Whittington K, Williams AC (1997): Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production of leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.* 20 Suppl. 3: 44-49
71. Fornara P, Sandmann J, Jocham D (1998): Behandlung der männlichen Infertilität. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg: 491-519
72. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A (1999): Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia* 31: 361-371
73. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000): Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 830-839

74. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J (2004): Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.* 6: 59-65
75. Gavella M, Lipovac V (1998): In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrologia* 30: 317-323
76. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001): Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* 16: 1922-1930
77. Gill PW (1985): Embryo research. *Lancet* 1985 (Mar 2): 522
78. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepsen K, Frohm B, Spano M (2003): Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil. Steril.* 80: 1404-1412
79. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D (1999): Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Andrologia* 31: 277-287
80. Griveau JF, Grizard G, Boucher D, Le Lannou D (1998): Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. *Hum. Reprod.* 13: 3108-3113
81. Haidl G (1994): New aspects of the aetiology of male fertility disorders. *Arch. Gynecol. Obstet.* 255: 301-308
82. Haidl G (2002): Management strategies for male factor infertility. *Drugs* 62: 1741-1753

83. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, Schmidt W (1996): 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.* 11: 2468-2471
84. Hammadeh ME (1997): Erster Homburger "hand-on" – Workshop in assistierter Fertilisation durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Universit tskliniken des Saarlandes, Frauenklinik und Poliklinik, Sonderdruck
85. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998): Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30: 29-35
86. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K (1999): Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. *Hum. Reprod.* 14: 363-367
87. Hanf V (1998): Einfluss von Umweltfaktoren auf die Fruchtbarkeit der Frau. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 325-355
88. Hashimoto S, Yanagida K, Katayose H, Yamada H, Yamada H, Sato A (2002): Relationship between fertilizing ability of ejaculated human spermatozoa and its chromatin heterogeneity. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 54: 1-9
89. Henkel R, Bittner J, Weber R, H ther F, Miska W (1999): Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil. Steril.* 71: 1138-1143

90. Henkel R, Defosse K, Koyro HW, Weissmann N, Schill WB (2003): Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility. *Asian J. Androl.* 5: 3-8
91. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003): DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online* 7: 477-484
92. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF (2004): Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil. Steril.* 81: 965-972
93. Hidioglou M, Knipfel JE (1984): Zinc in mammalian sperm: a review. *J. Dairy Sci.* 67: 1147-1156
94. Hofmann H (1998): Andrologie. In: Jung EG (ed.): *Dermatologie. Duale Reihe.* Hippokrates, Stuttgart: 452-463
95. Hoppe I (1997): Intrazytoplasmatische Spermieninjektion – Stellenwert und Herausforderung. *WMW* 147: 90-93
96. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A (1996): The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil. Steril.* 66: 634-639
97. Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F (1999): DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 78: 336-339
98. Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F (1999): DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 78: 622-625

99. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000): DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79: 189-193
100. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000): The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79: 559-563
101. Jacobson CB, Sites JG, Arias-Bernal LF (1970): In vitro maturation and fertilization of human follicular oocytes. *Int. J. Fertil.* 15: 103-114
102. Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228
103. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF (1996): Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 93-98
104. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, Zghal K, Fki H, Damak J, Bahloul A (2003): Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch. Androl.* 49: 83-94
105. Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT, Meacham RB (2002): Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 29: 755-765
106. Köhn FM, Haidl G (2002): Andrologische Diagnostik. *Hautarzt* 53: 761-779
107. Koka Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban N (2003): Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch. Androl.* 49: 355-359

108. Kolata GB (1978): In vitro fertilization: is it safe and repeatable ?  
Science 201: 698-699
109. Kowalcek J, Stauber M (1998): Ehesterilität und Reproduktionsmedizin:  
Psychosomatische Aspekte. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität.  
Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg: 282-324
110. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ (1992): Development of a  
technique for monitoring the contamination of human sperm samples with  
leukocytes. Fertil. Steril. 57: 1317-1325
111. Küpker W, Al-Hasani S, Diedrich K (1998): Intrazytoplasmatische  
Spermieninjektion (ICSI) – assistierte Fertilisation bei schwerer männlicher  
Subfertilität. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und  
Therapie. Springer, Heidelberg: 570-590
112. Küpker W, Diedrich K (1998): Ethik in der Reproduktionsmedizin. In:  
Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.  
Springer, Heidelberg: 723-740
113. Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K (1998): Physiologie der  
Befruchtung. In: Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik  
und Therapie. Springer, Heidelberg: 356-379
114. Kupka MS, Dorn C, Richter O, Felderbaum R, van der Ven H (2003):  
Impact of reproductive history on in vitro fertilization and intracytoplasmatic  
sperm injection outcome: evidence from the German IVF Registry. Fertil.  
Steril. 80: 508-516
115. Kvist U (1980): Reversible inhibition of nuclear chromatin  
decondensation (NCD) ability of human spermatozoa induced by prostatic  
fluid. Acta Physiol. Scand. 109: 73-78

116. Kvist U (1980): Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol. Scand.* 109: 79-84
117. Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C (2004): Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum. Reprod.* 19: 607-610
118. Lanzendorf S, Maloney MK, Veeck LL (1988): A preclinical evaluation of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil. Steril.* 49: 835
119. Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS, Thompson W (1997): Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 67: 142-147
120. Lewis-Jones DI, Aird IA, Biljan MM, Kingsland CR (1996): Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum. Reprod.* 11: 2465-2467
121. Li ZL, Lin H, Zhang XN, Xiao WF (2003): Intracytoplasmic sperm injection in cases with history of in vitro fertilization failure. *Asian J. Androl.* 5: 69-72
122. Lindholmer C, Eliasson R (1972): Zinc and magnesium in human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 17: 153-160
123. Lindholmer C (1974): Toxicity of zinc ions to human spermatozoa and the influence of albumin. *Andrologia* 6: 7-16
124. Lissak A, Wiener-Megnazi Z, Reznick AZ, Shnizer S, Ishai D, Grach B, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M (2004): Oxidative stress indices in seminal plasma, as measured by the thermochemiluminescence assay, correlate with sperm parameters. *Fertil. Steril.* 81 Suppl. 1: 792-797

125. Liu DY, Baker HWG (1992): Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil. Steril.* 58: 1178-1184
126. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP (2003): Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum. Reprod.* 18: 1265-1272
127. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998): Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13: 896-900
128. Ludwig GR, Schroeder-Printzen I, Ludwig M (1997): Fertilitätsstörungen. In: Merkle W (ed.): *Urologie. Duale Reihe.* Hippokrates, Stuttgart: 261-284
129. Makler A (1980): The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.* 33: 337-338
130. Mallmann P (1998): Immunologische Aspekte in der Reproduktionsmedizin. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 266-281
131. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJVW, Kruger TE, van Zyl JA (1990): The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod.* 5: 586-592
132. Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L (2001): Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum. Reprod.* 16: 534-539
133. Montzka P, Al-Hasani S, van der Ven H, Diedrich K (1998): Grundlagen der Inseminationsbehandlung. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 491-519

134. Nakamura H, Kimura T, Nakajima A, Shimoya K, Takemura M, Hashimoto K, Isaka S, Azuma C, Koyama M, Murata Y (2002): Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 15: 155-160
135. Nieschlag E, Behre HM (eds.) (1996): *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
136. Noack-Füller G, De Beer C, Seibert H (1993): Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia* 25: 7-12
137. Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schüttau H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R (1994): Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 26: 289-293
138. Ohl DA, Menge AC (1996): Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm function. *Front. Biosci.* 1: 96-108
139. Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K (1998): Selenium in human male reproductive organs. *Hum. Reprod.* 13: 2172-2176
140. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG (2001): Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* 16: 1912-1921
141. Omu AE, Fatinikun T, Mannazhath N, Abraham S (1999): Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma alpha-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. *Andrologia* 31: 347-353

142. Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I (2000): Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality ? *Fertil. Steril.* 74: 245-250
143. Palermo G, Joris H, Devroey P (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340: 17
144. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z (1996): Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil. Steril.* 65: 899-908
145. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2000): Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.* 73: 459-464
146. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI (2004): Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil. Steril.* 81: 973-976
147. Paz GF, Sofer A, Homonnai ZT, Kraicer PF (1977): Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interrelations with sperm quality. *Int. J. Fertil.* 22: 140-147
148. Piasecka M, Laszczynska M, Gaczarzewicz D (2003): Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenoteratozoospermia. *Folia Morphol. (Warsz.)* 62: 479-481
149. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C (1994): Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil. Steril.* 62: 387-393

150. Pook M, Röhrle B, Krause W (1999): Individual prognosis for changes in sperm quality on the basis of perceived stress. *Psychother. Psychosom.* 68: 95-101
151. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM (2000): Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mut. Res.* 447: 249-256
152. Ratzel R (1998): Juristische Aspekte in der Reproduktionsmedizin. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 676-691
153. Rayman MP, Rayman MP (2002): The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.* 61: 203-215
154. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A (2003): Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 35: 238-243
155. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G (2002): Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum. Reprod.* 17: 2665-2672
156. Riedel HH (1980): Techniques for the detection of leukozytospemia in human semen. *Arch. Androl.* 5: 287-293
157. Saaranen M, Suistomaa U, Kantola M, Remes E, Vanha-Perttula T (1986): Selenium in reproductive organs, seminal fluid and serum of men and bulls. *Hum. Reprod.* 1: 61-64

158. Saaranen M, Suistomaa U, Kantola M, Saarikoski S, Vanha-Perttula T (1987): Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: comparison with semen parameters and fertility. *Hum. Reprod.* 2: 475-479
159. Saaranen M, Suistomaa U, Vanha-Perttula T (1989): Semen selenium content and sperm mitochondrial volume in human and some animal species. *Hum. Reprod.* 4: 304-308
160. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizarro D (2002): Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* 66: 1061-1067
161. Saleh RA, Ranga GM, Raina R, Nelson DR, Agarwal A (2003): Sexual dysfunction in men undergoing infertility evaluation: a cohort observational study. *Fertil. Steril.* 79: 909-912
162. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ (2003): Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil. Steril.* 79 Suppl. 3: 1597-1605
163. Sanocka D, Kurpisz M (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 12-19
164. Schenker JG (1990): Ethical, religious and legal debate on IVF and alternate assisted reproduction. In: Mashiach S et al. (eds.): *Advances in assisted reproductive technologies*. Plenum, New York: 1041
165. Schill WB, Köhn FM (1998): Andrologie. In: Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas*. Springer, Berlin Heidelberg New York: 757-793

166. Schmidt-Matthiesen H (1998): Normale Schwangerschaft. In: Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (eds.): Gynäkologie und Geburtshilfe. Lehrbuch für Studium und Praxis. Schattauer, Stuttgart New York: 133-145
167. Schoenfeld C, Amelar RD, Dubin L, Numeroff M (1979): Prolactin, fructose, and zinc levels found in human seminal plasma. *Fertil. Steril.* 32: 206-208
168. Seitel I (2003): Für die Eltern bleibt Louise ein kleines Wunder. In: Die Rheinpfalz – pfälzische Volkszeitung: Ausgabe vom 09.07.2003
169. Shamberger RJ (1985): The genotoxicity of selenium. *Mut. Res.* 154: 29-48
170. Shang XJ, Ye ZQ, Xiong CL, Huang DH, Wang YM (2003): Analysis of the changes of movement function and viability in human spermatozoa induced by reactive oxygen species. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 9: 439-442
171. Sharma RK, Agarwal A (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-849
172. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ jr., Agarwal A (1999): The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* 14: 2801-2807
173. Shekarriz M, Thomas AJ, Agarwal A (1995): Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology* 45: 103-107
174. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002): Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlation with sperm quality. *Hum. Reprod.* 17: 1266-1273

175. Sills ES, Fryman JT, Perloe M, Michels KB, Tucker MJ (2004): Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlations observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J. Obstet. Gynaecol.* 24: 74-77
176. Singh NP, Muller CH, Berger RE (2003): Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 80: 1420-1430
177. Skandhan KP, Skandhan S, Mehta YB (1978): Semen electrolytes in normal and infertile subjects. II. Zinc. *Experientia* 34: 1476-1477
178. Skandhan KP (1981): Zinc in normal human seminal plasma. *Andrologia* 13: 346-351
179. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E (1996): Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum. Reprod.* 11: 1655-1660
180. Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NHI, Bonde JPE, Stoltenberg M, Ernst E (1999): Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 331-337
181. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G, The Danish First Pregnancy Planner Study Team (2000): Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil. Steril.* 73: 43-50
182. Stankovic H, Mikac-Devic D (1976): Zinc and copper in human semen. *Clin. Chim. Acta* 70: 123-126
183. Stanwell-Smith R, Thompson SG, Haines AP, Ward RJ, Cashmore G, Stedronska J, Hendry WF (1983): A comparative study of zinc, copper, cadmium, and lead levels in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 40: 670-677

184. Stauber M (1993): Psychosomatik der ungewollten Kinderlosigkeit. BMV, Berlin
185. Steptoe PC, Edwards RG (1978): Birth after reimplantation of a human embryo. Lancet 11: 366
186. Steptoe PC, Edwards RG, Walter DE (1986): Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in-vitro fertilization. Hum. Reprod. 1: 89-94
187. Sterzik K, Rosenbusch B, Sasse V, Wild E, Hütter W, Wolf A (1989): Der Acridin-Orange-Test – ein neuer Parameter zur Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen. Zent.bl. Gynäkol. 111: 1361-1367
188. Strauss E (1999): Selenium's role in infertility explained. Science 285: 1339
189. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF (1997): Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol. Reprod. 56: 602-607
190. Swan SH, Elkin EP (1999): Declining semen quality: can the past inform the present ? BioEssays 21: 614-621
191. Swann K (1993): The soluble sperm oscollogen hypothesis. Zygote 1: 273-276
192. Taubert HD (1998): Sterilität und Infertilität. In: Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (eds.): Gynäkologie und Geburtshilfe. Lehrbuch für Studium und Praxis. Schattauer, Stuttgart New York: 117-132
193. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C (1998): Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol. Hum. Reprod. 4: 757-762

194. Thérond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P (1996):  $\alpha$ -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 739-744
195. Thiel W, Günther E, Schreiber G (1983): Untersuchungen zur Fertilitätsprognose des Mannes. *Zbl. Gynäkol.* 105: 1174-1180
196. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ (1998): Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 439-445
197. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998): Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.* 13: 1429-1436
198. Umeyama T, Ishikawa H, Takeshima H, Yoshii S, Koiso K (1986): A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 46: 494-499
199. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H (1993): Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.* 8: 1055-1060
200. Vézina D, Bleau G (1988): High-performance liquid chromatography of selenium in biological samples. *J. Chrom.* 426: 385-391
201. Villegas J, Kehr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sánchez R (2003): Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 35: 227-232

202. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ (1997): Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-925
203. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A (2003): Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 80: 531-535
204. Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MGR, Ford WCL (1999): Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int. J. Androl.* 22: 236-242
205. Wisard M, Senn A, Germond M, Leisinger HJ (2002): Role of the urologist in the management of infertile men at the time of sperm intracytoplasmatic injection. *Ann. Urol. (Paris)* 36: 223-229
206. Wood BJ, Lawrence DM, McGarrigle HHG (1982): Similar zinc levels in seminal fluid from normospermic, oligospermic and azospermic men. *Clin. Chim. Acta* 123: 329-332
207. World Health Organization (1999): WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4. Auflage. Springer, Berlin - Heidelberg - New York
208. Wykes SM, Krawetz SA (2003): The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 278: 29471-29477
209. Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, Ong CN (2003): The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mut. Res.* 534: 155-163

210. Zabludovsky N, Eltes F, Geva E, Berkovitz E, Amit A, Barak Y, Har-Even D, Bartoov B (1999): Relationship between human sperm lipid Peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrologia* 31: 91-98
211. Zalata A, Hafez T, Comhaire F (1995): Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum. Reprod.* 10: 1444-1451
212. Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K (2002): Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 60: 1069-1072
213. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrotovec H (2003): Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int. J. Androl.* 26: 279-285

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Literaturangabe	Abbildungen auf Seite
Behne D, Gawlik D (1989): Spurensuche. Neutronen-Aktivierungsanalyse in der Spurenelementforschung. Berichte aus dem Hahn-Meitner-Institut Berlin, Sonderdruck Abb. 2 Abb. 4	Abbildung 8, Seite 69 Abbildung 9, Seite 70
Diedrich K (ed.) (1998): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg Abb. 15.10. Abb. 19.6. Abb. 21.2. Abb. 21.8.d.	Abbildung 10, Seite 73 Abbildung 6, Seite 60 Abbildung 7, Seite 61 Abbildung 11, Seite 75
Fritsch P (1998): Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas. Springer, Berlin Heidelberg New York Abb. 24.4.	Abbildung 1, Seite 22
World Health Organization (1999): WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4. Auflage. Springer, Berlin - Heidelberg - New York Abb. 2.7.a. Abb. 2.8.	Abbildung 2, Seite 43 Abbildung 4, Seite 52

Abb. IV.1a-g.	Abbildung 3, Seite 48
Foto zur TUNEL-Färbung (selbst)	Abbildung 5, Seite 58

## **8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abkürzung	Erläuterung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= -acid)
HOS-Test	Hypoosmotischer Schwellungstest
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Ig	Immunglobulin
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
MAR-Test	Mixed-antiglobulin-reaction-Test
MESA	Microsurgical epididymal sperm aspiration
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
p	Signifikanzkoeffizient
PBS	Phosphat-buffered-saline
r	Korrelationskoeffizient
ROS	Reactive oxygen species
TAS	Totaler Antioxidantien-Status
TESE	Testicular sperm extraction
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
WHO	World Health Organization

## **9. DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Mohamad Eid Hammadah für die ständige theoretische und praktische Betreuung dieser Dissertation sowie für die Überlassung des Themas. Für die Benutzung des IVF-Labors inklusive bereitgestellter Geräte und Materialien sowie die freundliche Unterstützung seitens des Personals der Gynäkologischen Klinik bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Werner Schmidt (Direktor der Gynäkologischen Klinik, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar).

Weiterhin gebührt mein großer Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen des IVF-Labors, Frau Stefanie Seyfried, Frau Ellen Roth und Frau Nicole Wörner, für ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Experimente beigetragen hat.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse bin ich Herrn Diplom-Mathematiker Dr. rer. nat. Thomas Georg (Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik) zu Dank verpflichtet.

Außerdem möchte ich meinen Dank an folgende Abteilungen bzw. Institute aussprechen, die mir durch Überlassung von Geräten, Materialien sowie durch Unterstützung seitens des Personals bei der Durchführung der Versuche hilfreich zur Seite gestanden haben:

- Klinisch-Chemisches Zentrallabor der Universität des Saarlandes (Leiter: Herr Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Wolfgang Herrmann), hier insbesondere Frau Sand-Hill (Leitende MTA), Herrn Pape (Leitender MTA) und Frau Diplom-Biologin Heike Schorr;
- Institut für Physiologie der Universität des Saarlandes (Leiterin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Irene Schulz), hier insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Lutz Sternfeld;

- Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung für Virologie der Universität des Saarlandes (Leiter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Nikolaus Müller-Lantzsch), hier insbesondere Dank für die Fotodokumentationen der Fluoreszenzmikroskopergebnisse;
- Hahn-Meitner-Institut Berlin, Abteilung Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften (Leiter: Herr Prof. Dr. Dietrich Behne), hier insbesondere Frau Dr. Dorothea Alber;
- Medizinische Universität zu Lübeck, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, hier insbesondere Herrn Prof. Dr. med. vet. S. Al-Hasani.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Hans und Ilse Lorenz bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und vor allen Dingen bei meiner Kommilitonin und Mitdotorandin Karoline Spengler, die zusammen mit mir über den ganzen Zeitraum der experimentellen Bearbeitung der Dissertation die Versuche und Recherchen durchgeführt hat und alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit mir durchlebt hat.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Dr. med. Cornelia Müller für ihre kritischen und moralisch aufbauenden Anmerkungen und natürlich für so vieles mehr.

Ebenso bin ich Karoline Spengler für die Durchsicht meiner Dissertation und Bernd Nürnberg für die Hilfe bei EDV-Problemen zu großem Dank verpflichtet.

## 10. LEBENS LAUF

Name:

Lorenz, Martin Thomas

Adresse:

Hauptstrasse 11, 66851 Mittelbrunn

Geburtsdatum:

25. Februar 1977

Geburtsort:

Kaiserslautern

Familienstand:

ledig

Konfession:

evangelisch

beruflicher Werdegang:

1983-1987 Besuch der Theodor-Heuss-Grundschule Landstuhl

1987-1996 Besuch des Sickingen-Gymnasiums Landstuhl, Abitur 1996

(Leistungskurse: Latein, Biologie, Gemeinschaftskunde mit Schwerpunkt Geschichte;  
mündliches Prüfungsfach: Ethik; Facharbeit in Geschichte zum Thema „Der  
Wiederaufbau der SPD im Westen Deutschlands nach dem 2. Weltkrieg unter Kurt  
Schumacher“)

1996-1997 Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes (Kreisverband Kaiserslautern-Stadt e.V.) mit einer 13-wöchigen Ausbildung zum Rettungssanitäter

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Sep. 1999 Ärztliche Vorprüfung

März 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Mai 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1997-2004 ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz (Kreisverband Kaiserslautern Stadt e.V.)

Sommersemester 2000-2002 Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Physiologischen Institut (Fachbereich Theoretische Medizin) als Moniteur im Physiologischen Praktikum für Mediziner und Zahnmediziner, Betreuung des Versuchs „Ohr und Vestibularapparat“ (verantwortlich: Herr Priv.-Doz. Dr. phil. nat. Andreas Schmid)

Seit August 2004 Tätigkeit als Arzt im Praktikum / Assistenzarzt an der Universitätshaut- und –poliklinik Homburg / Saar (Direktor: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Tilgen)

## **ERKLÄRUNG GEMÄß § 7 ABS. 1 NR. 4**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorbestehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg / Saar, den .07.2005

Unterschrift des Promovierenden

Unterschrift des / der die Versicherung

an Eides statt aufnehmenden  
Beamten/in