

**Aus dem Bereich der Gynäkologie und Geburtshilfe**

(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. W. Schmidt)

**Klinische Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar**

---

**Untersuchungen zur Oxidantien (ROS)- und  
Antioxidantienkonzentration (TAS, Transferrin, Ferritin, Albumin)  
im humanen Seminalplasma sowie zur DNA-Integrität und ihre  
Einflüsse auf die Ergebnisse des IVF- und ICSI-Programms**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Universität des Saarlandes**

**2009**

---

**vorgelegt von:**

**Karoline Spengler**

**geb. am 12.09.1977 in Kusel**

**1. Tag der Promotion:**

**2. Dekan:**

**3. Berichtstatter:**

# Inhaltsverzeichnis

Kapitelnummer	Titel des Kapitels	Seite
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1.	Deutsche Zusammenfassung	1
1.2.	Englische Zusammenfassung (Summary)	4
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1.	Historischer Überblick	7
2.2.	Ursachen der Infertilität	9
2.2.1.	Ursachen der männlichen Infertilität	9
2.2.2.	Ursachen der weiblichen Infertilität	10
2.3.	Physiologie der Reproduktionsmedizin	10
2.3.1.	Aufbau eines Spermatozoons	10
2.3.2.	Die Spermatogenese	11
2.3.3.	Die Befruchtung	11
2.4.	Spermiogrammnormalwerte	12
2.5.	Chromatin	13
2.5.1.	Chromomycin A3-Färbung	15
2.5.2.	Acridine Orange-Färbung	15
2.6.	Apoptose	16
2.7.	Reactive oxygen species (ROS)	17
2.8.	Totaler Antioxidantienstatus (TAS)	19
2.9.	Antioxidantien im Seminalplasma	20
2.9.1.	Albumin	20
2.9.2.	Transferrin	21
2.9.3.	Ferritin	22
2.10.	Eigene Fragestellung	23
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1.	Das Patientengut	24
3.2.	Probengewinnung und Aufbereitung	24
3.2.1.	Die Probengewinnung	24
3.2.2.	Aufbereitungstechniken	25
3.2.2.1.	Swim-up Methode	25
3.2.2.2.	Mini Swim-up Methode	25
3.2.2.3.	Percoll™gradient Methode	26
3.2.2.4.	Pure-Sperm® Methode	27
3.2.2.5.	Isolate® Methode	28
3.3.	Die routinemäßige Samenanalyse	29
3.3.1.	Volumen	29
3.3.2.	pH-Wert	29
3.3.3.	Spermiendichte	29
3.3.4.	Motilität	30
3.3.5.	Eosintest	30
3.3.6.	HOS-Test (Hypoosmotischer Schwelltest)	31

3.3.7.	Morphologie	32
3.4.	Chromatinstatus	34
3.4.1.	Chromomycin A3-Färbung	34
3.4.2.	Acridine Orange-Färbung	35
3.5.	TUNEL-Assay	36
3.6.	Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma	40
3.6.1.	Ferritin	40
3.6.2.	Transferrin	41
3.6.3.	Albumin	43
3.6.4.	TAS (totaler Antioxidantienstatus)	44
3.7.	ROS (reactive oxygen species)	46
3.8.	Patientinnen	47
3.9.	Fertilisation	47
3.9.1.	In vitro Fertilisation (IVF)	47
3.9.2.	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)	48
3.10.	Befruchtungsrate und Schwangerschaftsrate	50
3.11.	Statistische Auswertung	50
3.11.1.	Deskriptive Statistik	51
3.11.2.	Korrelation stetiger Merkmale	51
3.11.3.	Korrelation kategorialer Merkmale	51
3.11.4.	Korrelation kategorialer und stetiger Merkmale	51
3.11.5.	Signifikanzniveau	51
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1.	Vergleich der Ergebnisse zwischen IVF- und ICSI-Gruppe	52
4.1.1.	Parameter der klassischen Samenanalyse	52
4.1.2.	DNA-Strangbrüche und Chromatinkondensationsstatus	54
4.1.3.	Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma	55
4.1.4.	Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate	56
4.2.	Zusammenhang zwischen Anzahl der DNA-Strangbrüche/ Chromatinkondensationsstatus und Parameter der klassischen Samenanalyse	58
4.3.	Zusammenhang zwischen Parametern der klassischen Samenanalyse und Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma	62
4.4.	Zusammenhang zwischen Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und der Anzahl der DNA-Strangbrüche/ Chromatinkondensationsstatus	65
4.5.	Zusammenhang zwischen DNA-Strangbrüchen/ Chromatinkondensationsstatus und Befruchtungs-/ Schwangerschaftsrate	67
4.6.	Zusammenhang zwischen Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und Befruchtungs- / Schwangerschaftsrate	69
4.7.	Graphische Darstellungen	71
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>

5.1.	Chromatinkondensationsstatus	87
5.2.	DNA-Strangbrüche	92
5.3.	Reactive oxygen species (ROS)	96
5.4.	Totaler Antioxidantienstatus (TAS)	101
5.5.	Albumin	105
5.6.	Transferrin	108
5.7.	Ferritin	111
5.8.	Fazit der Diskussion	113
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>142</b>
<b>8.</b>	<b>Verzeichnis häufig verwendeter Materialien</b>	<b>143</b>
8.1.	HAM'S F 10 Medium	143
8.2.	PBS-Lösung	144
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>146</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>148</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Deutsche Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Oxidantien und Antioxidantien im seminalen Plasma auf den Chromatinstatus der Spermien und auf die Ergebnisse assistierter Reproduktion.

Hierzu untersuchten wir zwei Patientengruppen, von denen eine Gruppe mittels IVF-Therapie (n=26) und die zweite Gruppe mittels ICSI-Therapie (n=22) behandelt wurde. In der für die assistierte Reproduktion verwendeten Probe wurden die Parameter der klassischen Samenanalyse (Volumen, pH-Wert, Dichte, Morphologie, Vitalität, Membranintegrität, Global- und Progressivmotilität) ermittelt. Im Seminalplasma derselben Probe bestimmten wir die Konzentrationen von Oxidantien (reactive oxygen species oder ROS) und Antioxidantien (totaler Antioxidantienstatus oder TAS, Albumin, Transferrin, Ferritin) mittels eines photometrischen Assays. Der Chromatinstatus wurde mit Hilfe von Acridine Orange- und Chromomycin A3-Färbungen sowie die DNA-Fragmentation durch die TUNEL-Färbung bestimmt.

Die Samenproben wurden nach Aufbereitung mittels Pure-Sperm<sup>®</sup>, Swim-up, Mini-Swim-up, Percoll<sup>™</sup>gradient und Isolate<sup>®</sup>-Methode der IVF- oder ICSI-Therapie zugeführt. Die assistierte Fertilisation erfolgte nach den gebräuchlichen Therapieprotokollen. Die resultierenden Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten zur jeweiligen Probe wurden ermittelt.

Die Ergebnisse wurden anschließend untereinander und auch mit der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate der assistierten Reproduktion verglichen, wobei hier auch zwischen beiden Patientengruppen differenziert wurde.

Insgesamt zeigten die Proben in der klassischen Samenanalyse reduzierte Werte bezüglich der Normalwerte morphologisch normalgeformter Spermien, Vitalität, Progressiv- und Globalmotilität mit zum Teil deutlich schlechteren Ergebnissen im ICSI-Kollektiv.

Den Chromatinstatus ermittelten wir mit Normalwerten, jedoch wieder mit deutlich niedrigeren Ergebnissen in der ICSI-Gruppe bezüglich der Chromomycin A3-Färbung. Die Apoptoserate wurde in beiden Gruppen mit erhöhten Werten ermittelt. Kein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven konnte bei der Messung von Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma gefunden werden. Ebenso zeigte sich in der IVF- und ICSI-Gruppe eine annähernd identische Befruchtungsrate bei jedoch deutlich besseren Ergebnissen in Bezug auf die Schwangerschaftsrate im IVF-Kollektiv. Bezüglich des Chromatinstatus konnten wir in dieser Arbeit Korrelationen zur Vitalität, Motilität, Spermiedichte und morphologischen Normalformen finden. Die Apoptoserate zeigte sich negativ korrelierend zur Spermiedichte und dem pH-Wert. Die Betrachtung des Vergleichs der Parameter der klassischen Samenanalyse und den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen zeigte sehr inhomogene Ergebnisse. So wurden inverse Beziehungen zwischen Transferrin und Motilität, TAS und Motilität, TAS und morphologischen Normalformen, TAS und pH-Wert sowie Albumin und Volumen ermittelt. Positiver Einfluss auf die Spermiedichte konnte im Zusammenhang mit hohen Ferritin-, hohen TAS- und niedrigen ROS-Konzentrationen beobachtet werden. Eine negative Assoziation ermittelten wir zwischen ROS und den morphologischen Normalformen und auch zwischen ROS und der Spermiedichte. Dagegen stellten wir eine positive Korrelation sowohl zwischen TAS und der Vitalität als auch zwischen Transferrin und der Vitalität fest.

Es konnte überraschenderweise keine Korrelation zwischen Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und sowohl dem Chromatinstatus als auch der Apoptoserate gefunden werden. Ausnahme hier bildet Albumin, welches positiv mit dem Chromatinstatus korreliert.

Ferner konnten wir keinerlei Zusammenhänge zwischen dem Chromatinstatus oder der Apoptoserate und den Schwangerschafts- oder Befruchtungsraten ermitteln. Interessanterweise konnten wir in dieser Arbeit jedoch eine Negativkorrelation zwischen ROS und der Fertilisationsrate nachweisen.

Wie schon bereits angeführt, war Ziel dieser Studie die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Oxidantien und Antioxidantien im seminalen Plasma auf den Chromatinstatus der Spermien und auf die Ergebnisse assistierter Reproduktion zum besseren Verständnis männlicher Sub- und Infertilität. Eine mögliche praktische Umsetzung dieser erweiterten

Kenntnisse könnte darin bestehen, zukünftig für die IVF- oder ICSI-Therapie anhand der Untersuchungsergebnisse des seminalen Plasmas individuelle Erfolgswahrscheinlichkeiten abschätzen zu können. Dieser Aspekt mag im Zeitalter der 50-Prozent-Selbstbeteiligungsrate der Kosten für Paare in der Kinderwunschsprechstunde zunehmend an Bedeutung gewinnen und möglicherweise einen wichtigen Beitrag in der Entscheidungsfindung der Patienten bezüglich einer IVF- oder ICSI-Therapie leisten.

Andererseits muss man auch noch einen Schritt weiterdenken. Besseres Verständnis der Zusammenhänge männlicher In- und Subfertilität führt zum Erkennen der Auslöser pathologischer Veränderungen, so dass die Entscheidung zum Einsatz gezielter Therapieoptionen künftig stärker zu prüfen ist. Dies gilt sowohl für die Prävention als auch für die Therapie von Fertilitätsstörungen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise eine Substitutionstherapie bei Nachweis eines Mangels bestimmter Antioxidantien.

Jedoch zeigen die Resultate dieser Studie, wie wenig weiterhin die untersuchten Parameter in ihrer kompletten Bedeutung verstanden sind, da man sieht, dass man noch weit davon entfernt ist, anhand der vorliegenden Resultate eine zuverlässige individuelle Erfolgsprognose zu erstellen. So liegt die Forderung nach künftigen Untersuchungen zu diesem Thema nahe, welche vor allem auf die Ziele ausgerichtet sein sollten, für die Parameter im seminalen Plasma Normalwerte festzulegen, eventuelle Interaktionen der Parameter untereinander zu erkennen, den Einfluss durch Substitutionstherapie zu prüfen und natürlich auch die Studien auf zusätzliche Parameter zu erweitern.



## 1.2. Englische Zusammenfassung – Summary

The aim of this study was the examination of the effect of different kinds of oxidants and antioxidants in seminal plasma on the chromatin stability of spermatozoa and on the results of assisted reproduction. We examined two groups of patients; one group was treated with IVF-therapy (n=26) and the second group with ICSI-therapy (n=22). In each sample used for assisted reproduction the parameters of classical semen analysis (volume, pH-value, density, morphology, vitality, membrane integrity, global and progressive motility) were measured. We determined the concentrations of oxidants (ROS) and antioxidants (TAS, albumin, transferrin, ferritin) in the seminal plasma of the same sample by using a photometric assay. The examination of nucleus chromatin condensation was achieved by acridine orange and chromomycin A3 staining as well as the DNA-fragmentation by TUNEL assay.

After processing of the semen samples with Pure-Sperm<sup>®</sup>, Swim-up, Mini Swim-up, Percoll<sup>™</sup> and Isolate<sup>®</sup> method the IVF- or ICSI-therapy was used. The assisted fertilization took place using current common protocols. The resulting fertilization and pregnancy rates associated with the respective semen sample were determined.

The results were compared with one another and were additionally compared with fertilization and pregnancy rates, also distinguishing between both groups of patients.

Altogether the samples showed reduced results in classical semen analysis regarding normal morphological forms, vitality, progressive and global motility, which in some cases were worse in the ICSI group.

We determined normal results regarding the chromatin status, but reduced values concerning the chromomycin A3-staining in the ICSI group. The apoptosis rate was found with increased values in both groups. There was no difference found measuring oxidant and antioxidant concentrations in the seminal plasma between both groups. The IVF and the ICSI group showed a nearly identical fertilization rate, but clearly better results concerning the pregnancy rate in the IVF group. In this study regarding the chromatin status we were able to find correlations towards vitality, motility, density and normal morphological forms. A negative correlation was found between apoptosis rate and density and pH-value. The

comparison of the parameters of the classical semen analysis and the concentrations of oxidants and antioxidants showed very inhomogeneous results. An inverse relationship between transferrin and motility, TAS and motility, TAS and normal morphological forms, TAS and pH-value and albumine and volume could be found. A positive influence of sperm density was shown in context with high ferritin and TAS levels and low ROS concentration. We determined a negative association between ROS and normal morphological forms and between ROS and sperm density. On the other hand, sperm vitality correlates positively with TAS and transferrin concentration in seminal plasma.

No correlation was found between the oxidant and antioxidant concentration in seminal plasma neither between the chromatin status nor the apoptosis rate except for albumine, which correlates positively with the chromatin status.

Also we determined a missing relationship between the chromatin status or the apoptosis rate and pregnancy or fertilization rates. But we were able to show a negative relationship between ROS and the fertilization rate in this work.

As already mentioned the aim of this study was the determination of the effect of various kinds of oxidants and antioxidants in seminal plasma on the chromatin integrity of spermatozoa and consequently on the results of assisted reproduction in order to get a better understanding of male sub- and infertility. A useful application of this growing knowledge could be the ability to estimate the probability of individual successful IVF- or ICSI-therapy by using the results of the examination of seminal plasma in the future. Regarding the present era of own contribution rates of 50 percent for couples attending consultation hours for the purpose of founding a family this aspect might become more important and contribute in the decision-making of the patients in terms of IVF- and ICSI-therapy.

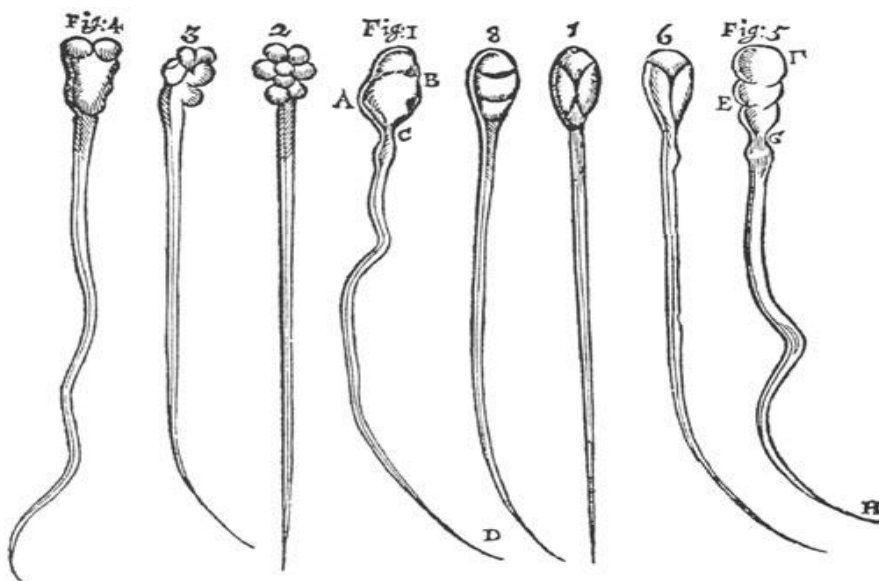
On the other hand, a better understanding of the context of male sub- and infertility results in the recognition of the reason of pathological changes, so it is important to consider the use of therapeutic options. This is an important point for the prevention and the therapy of fertilization disorders. A possible way could be a substitution therapy if there is evidence of a deficit of antioxidants.

The results of this study show how little there is known about the complete meaning of the examined parameters because it seems to be impossible to predict the individual success by watching the results. It seems to be necessary to continue future studies of this subject with the aim of finding normal values for the parameters in seminal plasma, recognizing the interactions of the parameters, observing the effect of substitution therapy and extending the studies on others parameters.

## 2. Einleitung

### 2.1. Historischer Überblick

Schon früh beschäftigten sich Wissenschaftler mit den Faktoren der menschlichen Reproduktion, wie zum Beispiel der Medizinstudent Johann HAM, der nach der Erfindung des Mikroskops im Jahr 1677 das Spermatozoon entdeckte, was von Antonj van LEEUWENHOEK (1632-1723) weiterführend untersucht wurde (PHILIPP et al., 1993; ALBRECHT und SCHULTHEISS, 2004; DE JONGE, 2005).



**Abb. 2-1: Van Leeuwenhoeks Zeichnung von Spermatozoen (1678):**

**Fig. 1-4: Spermatozoen des Menschen.**

**Fig. 5-8: Spermatozoen des Hundes.**

Die Geschichte der Reproduktionsmedizin selbst reicht mindestens bis ins Jahr 1790 zurück, als John HUNTER die erste erfolgreiche homologe Insemination beim Menschen durchführte (CHEN und WALLACH, 1994; CLARKE, 2006). Im Jahr 1878 wurde die erste in vitro Fertilisation einer Säugetiereizelle beschrieben, und von der ersten überlebenden befruchteten Eizelle nach Transfer wurde im Jahr 1890 berichtet (JACOBSON et al., 1970). Danach vergingen über 50 Jahre, bis im Jahr 1944 ROCK und MENKIN (1944) die erste in vitro Fertilisation einer menschlichen Eizelle durchführten.

Schon in den 50iger Jahren wurde die homologe und heterologe Insemination zur Therapie kinderloser Paare eingesetzt. Zur gleichen Zeit wurden Standards für die normale Samenanalyse festgelegt und erste Versuche zur Therapie der männlichen Infertilität mittels Hormonen unternommen (CHEN und WALLACH, 1994).

Von dem ersten Versuch, ein Spermium direkt in die Eizelle einer Maus zu injizieren, wird von LIN im Jahr 1966 berichtet (PALERMO et al., 1996). Spätere Versuche mit menschlichen Zellen wurden schnell wieder aufgegeben, da die Anzahl der durch dieses Verfahren zerstörten Oozyten zu groß war und es außerdem keine Möglichkeit gab, die Embryonen zu replantieren (PALERMO et al., 1996).

Ein neuer Abschnitt in der Geschichte der Reproduktionsmedizin begann im Jahr 1978, als Louise Brown am 25. Juli als erstes lebend geborenes Kind nach IVF-Therapie per Sectio geboren wurde (STEPTOE und EDWARDS, 1978). Danach dauerte es noch etwa zwei Jahre, bis die IVF-Therapie sich als Routineverfahren bei der Behandlung infertiler Paare etabliert hatte, und wiederum verstrichen drei Jahre, bis im Jahr 1983 der erste Transfer gefrorener humaner Embryonen erfolgte, welcher allerdings in einem Spontanabort endete (CHEN und WALLACH, 1994).

Da aber in Fällen von stark beeinträchtigter Spermienqualität die IVF-Therapie oftmals ohne Erfolg blieb, musste sich die Reproduktionsmedizin weiterentwickeln (LANZENDORF et al., 1988). Im Jahr 1987 wurde dorthin gehend ein weiterer Schritt von LAWS-KING et al. unternommen. Nach Injektion eines einzelnen humanen Spermiums unter die Zona Pellucida zeigten 8 von 19 Oozyten Zeichen einer Befruchtung ohne Schädigung der Oozyte. Von der ersten auf diese Weise entstandenen Schwangerschaft wird im Jahr 1988 von NG et al. berichtet (CHEN und WALLACH, 1994). Dieses Verfahren der subzonalen Spermieninsemination (SUZI) zeigte sich sogar erfolgreich, wenn die Spermien eine relativ schlechte progressive Motilität aufwiesen.

Im Jahr 1992 entstand erneut Interesse an der direkten Injektion eines einzelnen menschlichen Spermiums intrazellulär in die Oozyte, als an der Freien Universität von Brüssel bei einer SUZI-Behandlung das Spermium versehentlich aus der 3-Uhr-Position in die Oozyte injiziert wurde und anschließend Zeichen der erfolgreichen Fertilisation sichtbar wurden. Durch das Verfahren der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) entstanden schon 1992 die ersten vier Schwangerschaften, die mit der Geburt von zwei gesunden Einlingen und einem gesunden Zwillingspärchen endeten (PALERMO et al., 1992). Das ICSI-Verfahren

erwies sich als erfolgreiche Behandlungsmethode in Fällen schwerer Einschränkung der männlichen Infertilität mit stark von der Norm abweichenden SpermioGrammparametern (HOPPE et al., 1997), die besonders auch in Fällen der vergeblichen IVF- oder SUZI-Therapie oftmals zum Erfolg führte. Jedoch scheinen die nach ICSI-Behandlung geborenen im Vergleich zu den nach spontaner Konzeption geborenen Kindern eine erhöhte Missbildungsrate aufzuweisen. Ob dies lediglich an den mütterlichen und väterlichen Risikofaktoren, welche eine erhöhte Inzidenz bei Paaren aufweisen, die sich einer ICSI-Behandlung zur Reproduktion unterziehen müssen, oder aber an technikabhängigen Risiken der ICSI-Prozedur liegt, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden (KATALINIC et al., 2004). Inzwischen ist die Entwicklung dahingehend vorangeschritten, dass heute jedes 100. Kind mittels künstlicher Befruchtung und Embryotransfer gezeugt wird (SCHILL et al., 1998).

## **2.2. Ursachen der Infertilität**

Eines von sechs Paaren im reproduktionsfähigem Alter ist infertil (OLLERO et al., 2001), wobei die Ursache in bis zur Hälfte der Fälle beim Mann liegt (AGARWAL, 2004). Genauer gesagt geht man davon aus, dass in etwa 35 bis 40 Prozent die Ursache beim Mann, zu etwa 45 bis 50 Prozent bei der Frau und zu circa 15 Prozent bei beiden Partnern zu suchen ist. Jedoch kann in 10 bis 20 Prozent der Fälle keinerlei Ursache der Fertilitätsstörung gefunden werden (PFLEIDERER, 2001).

### **2.2.1. Ursachen der männlichen Infertilität**

Zahlreiche Ätiologien der männlichen Infertilität sind bekannt, wie zum Beispiel Genmutationen (zum Beispiel Klinefelter-Syndrom), systemische Erkrankungen (infektiöse Erkrankungen, Stoffwechselstörungen), Kryptorchismus, Varikozele, Ductusstenosen, Zustand nach Trauma oder Torsion, Operationsfolgen, erektile Dysfunktion und externe Faktoren (Drogen, Nikotinabusus, Arzneimittelnebenwirkungen und Zustand nach Radiatio oder Chemotherapie) (AGARWAL und SAID, 2003; HIRSH, 2003; KOLETTIS, 2003; SHEFI und TUREK, 2006), jedoch werden nahezu 50 Prozent der Fälle männlicher Infertilität als idiopathisch eingestuft (CALDAMONE et al., 1981; OLLERO et al., 2001). Wiederholt wurde der schädigende Einfluss freier Sauerstoffradikale auf die Spermatozoen als eine der

Hauptursachen der defekten Spermienfunktion und der männlichen Infertilität postuliert (TWIGG et al., 1998; SHARMA et al., 1999).

### **2.2.2. Ursachen der weiblichen Infertilität**

Zu den häufigsten Ursachen der weiblichen Infertilität gehören besondere pathoanatomische Situationen (Uterusfehlbildungen, Polypen, Myome), Antispermatozoen-Antikörper, Infektionen, Dysmukorrhoeen, tubare Stenosen, hormonelle Störungen (Hypothalamus-Hypophyse, Ovar, Nebenniere, Schilddrüse, Pankreas), erhöhtes Alter sowie Endometrioseerkrankung und auch psychogene Ursachen (FEIGE, 2001; PFLEIDERER, 2001; TAYLOR, 2003; BALEN und RUTHERFORD, 2007).

## **2.3. Physiologie der Reproduktionsmedizin**

### **2.3.1. Aufbau eines Spermatozoons**

Nach Vorgabe der „Strict Criteria“ (KRUGER et al., 1988) besteht ein normales Spermatozoon aus Kopf, Hals, Mittelstück und Geißel.

Der Kopf sollte leicht oval geformt sein und die Länge von 5 bis 6  $\mu\text{m}$  und die Breite von 2,5 bis 3,5  $\mu\text{m}$  nicht überschreiten. Das im Kopfteil vorhandene Akrosom füllt diesen bis zu 70 Prozent aus.

Der Hals sollte in seiner Ausrichtung nicht wesentlich von der Kopflängsachse abweichend sein.

Dies gilt ebenfalls für das Mittelstück, welches im Übrigen normalerweise eine Länge von maximal 9  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  aufweist.

Die Geißel ist gleichmäßig geformt, aber deutlich schmaler als das Mittelstück und circa 45  $\mu\text{m}$  lang (HAMMADEH et al., 2001).

### **2.3.2. Die Spermatogenese**

Durch mitotische Teilung findet ab der Embryogenese bis zur Pubertät die Umwandlung der Urkeimzellen in Spermatogonien statt, welche mit einem diploiden Chromosomensatz ausgestattet sind. Im Keimepithel der Tubuli seminiferi entstehen aus diesen Spermatogonien die primären Spermatozyten. Durch die erste Reifeteilung (Meiose) wird aus einem primärem Spermatozyt (welcher mit einem diploiden Chromosomensatz ausgestattet ist) zwei sekundäre Spermatozyten, auch Prä spermatiden genannt (ausgestattet mit diploidem Chromosomensatz). Nach der zweiten Reifeteilung entwickeln sich aus einem sekundären Spermatozyt insgesamt zwei Spermatisden mit einfachem Chromosomensatz, die sich zu Spermatozoen weiterdifferenzieren (IMMLER, 2008). Aus einem Spermatogonium entstehen also letztendlich vier Spermatozoen, von denen jeweils zwei mit einem X-Chromosom und zwei mit einem Y-Chromosom ausgestattet sind.

Im Nebenhoden erfolgt ein weiterer Reifungsprozess, der sich unter anderem durch Änderung der Membran- und Chromatinstruktur auszeichnet. Der Nebenhodenschwanz dient als Speicher der Spermatozoen.

Die Entwicklung von der Urkeimzelle bis zum reifen Spermium dauert insgesamt 3 Monate.

Das endgültige Ejakulat wird letztendlich von einer viskösen Suspension aus Spermien und Sekreten des Hodens, Nebenhodens, der Prostata, der Samenbläschen und der bulbourethralen Drüsen gebildet (WHO, 1999).

### **2.3.3. Die Befruchtung**

Nach der Ejakulation vieler Spermien in den weiblichen Genitaltrakt müssen diese zum Erreichen der erfolgreichen Befruchtung mehrere Barrieren überwinden. Die Fähigkeit zur progressiven Motilität ist für die Passage des weiblichen Genitaltraktes grundsätzlich notwendig. Die erste Hürde besteht aus dem Zervikalschleim, welcher nur periovulatorisch die Passage ermöglicht. An diesem Punkt werden die Spermien vom Seminalplasma isoliert (OHL und MENGE, 1996). Zusätzlich dient der Zervikalschleim auch als Spermienreservoir und Filter für Fehlformen (OHL und MENGE, 1996; DE JONGE, 2005).

Intrauterin ändert sich das Bewegungsmuster der Spermien. Mittels hyperaktivierten, hochfrequenten Flagellenschlägen kann das Spermium bis zur Zona Pellucida gelangen



(AITKEN und FISHER, 1994; SUAREZ und PACEY, 2005). Nach Kontakt des Spermiums mit einem speziellen Glykoprotein der Zona wird eine komplexe Reaktion in Gang gesetzt, die man als Akrosomenreaktion bezeichnet. Hierbei verschmilzt die Plasmamembran mit der akrosomalen Membran, und somit werden akrosomale Enzyme (Akrosin) freigesetzt, welche dem Spermium den Weg durch die Zona Pellucida ermöglichen (OHL und MENGE, 1996; HO und SUAREZ, 2001).

Im Anschluss hierzu fusionieren die Plasmamembranen der Eizelle und des Spermiums (Imprägnation). Zuletzt verschmelzen der männliche und weibliche Pronukleus, welche dekondensiertes Chromatin enthalten, unter Kondensation des Chromatins miteinander zu einer Zygote (Konjugation) (SWANN, 1993).

## 2.4. Spermioigrammnormalwerte

Zu den Basisuntersuchungen des menschlichen Ejakulates gehören routinemäßig die Bestimmung von Volumen, pH-Wert, Spermienkonzentration, Motilität, Morphologie, Leukozyten, Anzahl lebender Spermien (HOS-Test oder Eosin-Färbung) und Durchführung des MAR-Tests (zum Nachweis von auf Spermien vorhandener IgG- oder IgA- Antikörper). Die Ergebnisse dieser Analyse stellt das klassische Spermioigramm dar (WHO, 1999).

Die Ergebnisse des MAR-Tests und der Bestimmung der Leukozytenkonzentration wurden in dieser Studie nicht weiter als möglicher Einflussparameter in die Untersuchungen eingebunden.

**Tab. 2-1: Referenzwerte der klassischen Samenanalyse nach WHO (1999):**

Parameter	Referenzbereich
Volumen	Mindestens 2,0 ml
pH-Wert	Mindestens 7,2
Spermienkonzentration	Mindestens $20 \times 10^6$ / ml
Gesamtspermienzahl	Mindestens $40 \times 10^6$ im Ejakulat
Motilität	50 % mit Vorwärtsbeweglichkeit oder 25 % mit progressiver Beweglichkeit in der ersten Stunde nach Probengewinnung
Morphologie	Mindestens 15 % normal geformte Spermien

Leukozyten	Maximal $1 \times 10^6$ / ml
HOS-Test/ Eosin-Färbung	Mindestens 75 % vitale Spermien
MAR-Test	Maximal 50 % Spermien mit adhärennten Partikeln

## 2.5. Chromatin

Der Chromatinstatus unterliegt im Laufe der Zeit zwischen der Spermiogenese bis zur Imprägnation einem mehrfachen Wechsel zwischen Chromatinkondensation und -dekondensation (SINGLETON et al., 2007).

Bei den unreifen Vorstufen der Spermien in den frühen Phasen der Spermiogenese besteht die nukleosomale Struktur aus Chromatin und Histonen (DADOUNE, 1995). Jedoch werden im Verlauf der Spermiogenese 85 Prozent der Histone durch kleine Proteine mit basischem Charakter, die sogenannten Protamine, ersetzt (HAIDL und SCHILL, 1994; MOLINA et al., 2001; RAZAVI et al., 2003; SHAMSI et al., 2008). Es existieren beim Menschen zwei Sorten von Protaminen, nämlich Protamin 1 und die Familie der Protamine 2 (OLIVA, 2006; SHAMSI et al., 2008). Die cysteinreichen Protamine tragen dazu bei, dass Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten ausgebildet werden, was dem Chromatin eine bessere Stabilität verleiht (ANGELOPOULOS et al., 1998; FRANKEN et al., 1999; HAMMADEH et al., 2001; MOLINA et al., 2001; AGARWAL und SAID, 2003). So kommt es im Verlauf der Spermiogenese zur zunehmenden Chromatinkondensation (HAMMADEH et al., 1998), wobei sich das Chromatin im Karyoplasma von fein-granulierter bis hin zur dicht-kondensierten Struktur verändert (DADOUNE, 1995). Durch diese Formation kann die DNA der Spermien kompakt auf sehr kleinem Volumen gehalten werden (HAMMADEH et al., 1999). Der rigide Nukleus reifer Spermien zum Zeitpunkt der Ejakulation enthält dichtes, kondensiertes Chromatin, was eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen und sicheren Transport durch den weiblichen Reproduktionstrakt ist (DADOUNE, 1995; MOLINA et al., 2001; OLIVA, 2006), denn eine suffiziente Chromatinkondensation kann das männliche Erbgut vor schädigenden Einflüssen bewahren, wie zum Beispiel eine vermehrte DNA-Fragmentation durch oxidativen Stress (RAMOS et al., 2001; SIKORA et al., 2006).

Nach der Ejakulation bindet Zink prostatistischen Ursprungs die noch freien Thiolgruppen und stabilisiert somit die Quartärstruktur des Chromatins (DADOUNE, 1995; HAMMADEH et al., 1999).

In der Oozyte schließlich erfolgt im Anschluss an die Imprägnation die Dissoziation des Protamin-DNA-Komplexes, wobei Protamine wieder durch Histone ersetzt werden (DADOUNE, 1995; HAMMADEH et al., 1999; OLIVA, 2006). Es wird vermutet, dass Heparin als Bestandteil der Follikel- und Uterusflüssigkeit durch seine Eigenschaft als Polyanion mit der DNA um die Bindung mit Protaminen konkurriert (DADOUNE, 1995). Dadurch kommt es zur Dekondensation des nuklearen Chromatins des Spermiums (KVIST, 1980; HAMMADEH et al., 1996), wodurch die Bildung des männlichen Vorkerns erst möglich wird (HURET, 1986; GOPALKRISHNAN et al., 1991).

Dass zwischen abnormalem Chromatin menschlicher Spermien und männlicher Infertilität ein Zusammenhang besteht, wurde schon wiederholt in der Literatur beschrieben (JAGER, 1990; SPANÒ et al., 2000; MOLINA et al., 2001; SIKORA et al., 2006; TAROZZI et al., 2007).

Zum einen kann während der Spermiogenese der Austausch zwischen Histonen und Protaminen ausbleiben, so dass die Histone persistieren. Dies zieht eine fehlerhafte Chromatinkondensation nach sich (HAIDL und SCHILL, 1994), wodurch die Anfälligkeit der DNA gegenüber oxidativem Stress erhöht wird (HAMMADEH et al., 1999). Über den Zusammenhang zwischen gestörter Chromatinkondensation, abnormaler Morphologie und männlicher Infertilität sowohl in vivo als auch in vitro bezüglich IVF-Therapie wurde schon in früheren Arbeiten berichtet (HAMMADEH et al., 1999).

Nach der Imprägnation kann auch fehlerhafterweise die Dekondensation des männlichen Chromatins durch Ausbleiben des Protamin-Histon-Austauschs innerhalb der Oozyte unterbleiben. In diesem Fall kann der männliche Vorkern nicht gebildet werden, was für die erfolgreiche Fertilisation sowohl in vivo als auch in vitro bezüglich IVF- und ICSI-Therapie Voraussetzung ist (GOPALKRISHNAN et al., 1991; CHITALE und RATHAUR, 1995; HAMMADEH et al., 2001).

Es wird vermutet, dass die Ursache der fehlerhaften Chromatinformation in DNA-Strangbrüchen und im Vorhandensein defekter Protamine zu suchen ist (DADOUNE, 1995; SPANÒ et al., 2000).

Um Aussagen über den Chromatinstatus der Spermien zu machen, stehen verschiedene Färbungen zur Verfügung, wie zum Beispiel die Acridine Orange- oder die Chromomycin A3-Färbung (HAMMADEH et al., 2001).

### **2.5.1. Chromomycin A3-Färbung**

Chromomycin A3 ist ein Farbstoff, welcher spezifisch die Guanin-Cytosin-reichen Sequenzen der DNA anfärbt (BIANCHI et al., 1996). Somit kann der Grad der Chromatinkondensation bestimmt werden (BIANCHI et al., 1996; HAMMADEH et al., 2001). Die nach der Chromomycin A3-Färbung leuchtenden Spermien (RAZAVI et al., 2003) kennzeichnen somit schlechte Chromatinkompaktheit im Spermiennukleus (DADOUNE, 1995; FRANKEN et al., 1999; SAKKAS et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001). Die nicht leuchtenden Spermien zeigen die normale Qualität der Chromatinkompaktheit an (FRANKEN et al., 1999; SINGLETON et al., 2007). Die Ursache der schlechten Chromatinkompaktheit kann ein Protaminmangel mit der Folge einer zu lose gepackten DNA im Nukleus sein (HAMMADEH et al., 2001; RAZAVI et al., 2003).

Frühere Untersuchungen haben bezüglich des Chromatinstatus, gemessen mit Chromomycin, und den Parametern der klassischen Samenanalyse, der Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten im IVF- oder ICSI-Programm uneinheitliche Ergebnisse ermittelt.

### **2.5.2. Acridine Orange-Färbung**

Die Acridine Orange-Färbung dient als Indikator für den DNA-Status menschlicher Spermien (CLAASSENS et al., 1992). Die vereinfachte Methode zum Anfärben von Spermien mit Acridine Orange, über die TEJADA et al. (1984) erstmalig berichteten, differenziert aufgrund des unterschiedlichen Fluoreszenzverhaltens nach der Färbung Spermien mit intakter, doppelsträngiger von solchen mit denaturierter, einsträngiger DNA (STERZIK et al., 1989; CLAASSENS et al., 1992; HOSHI et al., 1996; BOE-HANSEN et al., 2006). Acridine Orange ist ein trizyklischer heterochromatischer Farbstoff (DOBRINSKI et al., 1994), wobei grüne Fluoreszenz intakte, doppelsträngige DNA und rote Fluoreszenz denaturierte, einsträngige DNA markiert (EGGERT-KRUSE et al., 1996; ANGELOPOULOS et al., 1997; GOPALKRISHNAN et al., 1999; SAKKAS et al., 2000; SHAMSI et al., 2007).

Acridine Orange bildet im Falle doppelsträngiger DNA aktivierte Monomere zwischen den parallelen Basen aus und fluoresziert somit grün. Bei der Einzelstrang-DNA entstehen

ionische Bindungen zwischen Acridine Orange-Polymeren und dem DNA-Strang, was zur roten oder orangenen Fluoreszenz führt (CLAASSENS et al., 1992).

Es wurde schon mehrfach in der Literatur berichtet, dass sich im Ejakulat fertiler Männer bei der Acridine Orange-Färbung mehr grün fluoreszierende Spermien befinden als bei infertilen (SUKCHAROEN, 1995; EGGERT-KRUSE et al., 1996; HOSHI et al., 1996; GOPALKRISHNAN et al., 1999; ZINI et al., 2002).

Aber noch kein Konsensus konnte bezüglich des Zusammenhanges zwischen mit Acridine Orange grün gefärbten Spermien und anderen Routine-Spermiogrammparametern wie Spermindichte, Motilität und Morphologie gefunden werden (TEJADA et al., 1984; IBRAHIM und PEDERSEN, 1988; STERZIK et al., 1989; CLAASSEN et al., 1992; EGGERT-KRUSE et al., 1996; HOSHI et al., 1996; EVERSON und JOST, 2000; KHALILI et al., 2006). Die Fertilisationsrate wurde in der Literatur als positiv korrelierend mit der Anzahl von Acridine Orange grün gefärbten Spermien bei IVF- und ICSI-Patienten beschrieben (CLAASSENS et al., 1992; VIRANT-KLUN et al., 2002; CEBESOV et al., 2006). Des Weiteren kam man zu dem Erkenntnis, dass das Ergebnis der IVF-Therapie von der Anzahl der mit Acridine Orange grün gefärbten Spermien abhängig sein könnte (STERZIK et al., 1989; HOSHI et al., 1996).

## **2.6. Apoptose**

Apoptose ist ein Vorgang des programmierten Zelltods (EILISH et al., 2000), der entweder durch externe Stimuli oder durch zellinterne Vorgänge induziert wird. Eine wichtige Rolle spielt die Apoptose in der Entwicklung und Differenzierung normaler Zellfunktionen jeglicher Gewebearten (PLYMALE et al., 1995; HOST et al., 1999), wie zum Beispiel bei der Spermio-genese im Hoden (HOST et al., 1999). Einer der wichtigsten Prozesse im Rahmen der Apoptose ist Aktivierung der Ca/Mg-abhängigen Endonuklease, welche DNA-Strangbrüche verursacht (GANDINI et al., 2000). Als weitere morphologische Veränderungen zeigen sich im Ablauf der Apoptose Zellschrumpfung, Membranzerstörung, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation (DONNELLY et al., 2000; CHEN et al., 2006; EILISH et al., 2000). Die vermehrte DNA-Fragmentation kann durch exogene Einflüsse, wie zum Beispiel Strahlen, Gifte, Hitze und Chemikalien zurückzuführen sein (AHMADI und NG, 1999). Ein endogener Verursacher von DNA-Strangbrüchen sind freie Sauerstoffradikale (HOST et al., 2000; RAMOS

et al., 2001; CHOCHAN et al., 2006; ZINI und LIBMAN, 2006; AGARWAL et al., 2008; SHAMSI et al., 2008).

Jedoch wird die Apoptose nicht nur im Zusammenhang mit der normalen Zellfunktion gesehen, sondern wird auch als mögliche Ursache bislang ungeklärter männlicher Infertilität erwogen (HOST et al., 2000; SHEN et al., 2002; SERGERIE, et al., 2005). So kann eine hyperaktivierte Apoptose, ausgelöst zum Beispiel durch erhöhte ROS-Konzentrationen, eine Oligozoospermie verursachen (HOST et al., 1999; CHOCHAN et al., 2006). Von SAKKAS et al. (2002) wird ein direkter Zusammenhang zwischen schlechter Spermienqualität und nukleärer DNA-Fragmentation beschrieben, was allerdings durch die Arbeit von RICCI et al. (2002) nicht bestätigt werden konnte. Man geht davon aus, dass während der Spermio-genese unzureichend kondensiertes Chromatin eine höhere Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress besitzt und eine größere DNA-Fragmentationsrate aufweist (RAMOS et al., 2001; SIKORA et al., 2006).

Da die DNA-Fragmentation ein fundamentales Element der Apoptose ist (HOST et al., 2000), können über die Ermittlung der DNA-Fragmentation über die Markierung der 3'OH Enden mittels TUNEL-Technik Rückschlüsse bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen gezogen werden (SAKKAS et al., 2002). Da die Befruchtung mit fragmentierte DNA enthaltenden Spermien mit verminderter Implantation, niedrigeren Schwangerschaftsraten, schlechterer Embryonalentwicklung und erhöhter Abortrate einhergeht (AITKEN und DE IULIIS, 2007), scheint eine logische Konsequenz die Bestimmung der Chromatinintegrität der Spermien infertiler Männer vor assistierter Reproduktion zu sein (CHOCHAN et al., 2006; TAROZZI et al., 2007; SHAMSI et al., 2008).

## **2.7. Reactive oxygen species (ROS)**

Unter dem Namen reactive oxygen species (ROS) werden Sauerstoffradikale, wie zum Beispiel Superoxidanionen  $O_2^-$ , Hydroperoxyradikale  $HO_2\cdot$ , Hydroxylradikale  $OH\cdot$  oder Hydrogenperoxid  $H_2O_2$  zusammengefasst (AITKEN et al., 1998), die das gemeinsame Merkmal der ungeheuren Reaktionsfreudigkeit auszeichnet (COCUZZA et al., 2007). Diese Reaktionsfreudigkeit resultiert aus dem Vorhandensein eines ungepaarten Elektrons (SHARMA et al., 1996). Denn es bedarf mehr Energie, zwei Atome bzw. Moleküle mit je einem ungepaarten Elektron aufrechtzuerhalten, als die Fusion beider zu einem Molekül mit

geteiltem Elektronenpaar als kovalente Bindung. Bei diesen Sauerstoffradikalen verhält sich also die Reaktionsfreudigkeit umgekehrt proportional zur Stabilität (AITKEN et al., 1998).

Als Ursprung für das Vorhandensein von ROS im Seminalplasma sind zwei Quellen bekannt (AGARWAL et al., 2005; FINGEROVA et al., 2007; TREMELLEN, 2008). Zum einen können im Ejakulat auch physiologischerweise vorkommende Leukozyten, genauer gesagt Makrophagen und neutrophile Granulozyten, zum Abtöten eingewanderter Zellen und Organismen ROS produzieren (AITKEN et al., 1994; DE LAMIRANDE und GAGNON, 1995; OLLERO et al., 2001; AGARWAL et al., 2005). Andererseits sind auch Spermatozoen zur ROS-Produktion fähig (NOVOTNY et al., 2003; GARRIDO et al., 2004). Erste Daten dazu stammen aus dem Jahr 1943, als der Androloge John MCLEOD entdeckte, dass humane Spermatozoen  $H_2O_2$  bilden und freisetzen können (AITKEN et al., 1994). Eine vermehrte ROS-Produktion wird dadurch erklärt, dass bei den späten Stadien der fehlerhaften Spermiogenese ein Überschuss an Zytoplasma verbleibt (SHAMSI et al., 2008). In diesem zusätzlichen intrazellulären Raum befinden sich viele zytoplasmatische Enzyme, wie zum Beispiel Kreatinkinase, Laktatdehydrogenase oder Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Durch den hohen Gehalt an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird die Bildung von NADPH stimuliert, wodurch mittels der NADPH-Oxidase in der Spermienzellwand ROS produziert wird (AITKEN et al., 1998; GRIVEAU et al., 1998; DURU et al., 2000).

Eine kontrollierte ROS-Produktion in Maßen ist aber durchaus nicht als pathologisch zu werten. Einige physiologische Vorgänge der Reproduktion in vivo sind sogar ROS-abhängig, wie zum Beispiel die Kapazitation, Akrosomenreaktion und die Fusion von Spermium mit der Oozyte (OCHSENDORF et al., 1994; PASQUALOTTO et al., 2000; ZORN et al., 2003; AGARWAL et al., 2005; SHAMSI et al., 2008).

Ein erhöhter ROS-Level im Seminalplasma scheint jedoch in negativer Korrelation zur Samenqualität zu stehen (FORD et al., 2002; ZORN et al., 2003; GARRIDO et al., 2004; DAS et al., 2008; HAMMADEH et al., 2008). Bei 25-40 Prozent der infertilen Männer kann ein erhöhter ROS-Wert im Seminalplasma gemessen werden (GRIVEAU et al., 1998; SHARMA et al., 1999). Durch den sehr hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran von Spermatozoen sind diese anfällig für Lipidperoxidation durch Sauerstoffradikale (ZABLUDOVSKY et al., 1999; PASQUALOTTO et al., 2000). Dadurch kann es zur Störung der Membranintegrität mit nachfolgender Permeabilitätssteigerung kommen (GEVA et al., 1998). Dies hat viele negative Folgen auf die Zellfunktionen der Spermatozoen,

wie zum Beispiel Membranzerstörung, Fehlbildung von Flagellen, DNA-Strangbrüche, Motilitätsstörungen und eine erhöhte Fehlbildungsrate (PLANTE et al., 1994; AITKEN et al., 1998; ZABLUDOVSKY et al., 1999; VILLEGAS et al., 2003). Eine reduzierte Schwangerschaftsrate in vivo ist als Resultat dieser eingeschränkten Spermienqualität zu sehen (AITKEN et al., 1992). Ob und inwiefern die Schwangerschaftsrate in vitro dadurch beeinträchtigt wird, ist in der Literatur noch kein Konsensus zu finden. Nach AITKEN und DE IULIIS (2007) kann es durch vermehrten ROS-Gehalt zur verminderten Fertilisation bei der IVF-Prozedur, schlechteren Embryonalentwicklung mit erhöhter Abortrate und erhöhter Morbidität der Nachkommen kommen.

## **2.8. Totaler Antioxidantienstatus (TAS)**

Der totale Antioxidantienstatus (TAS) oder die totale Antioxidantienkapazität (TAC) beschreibt alle enzymatischen und nicht-enzymatischen vor der Wirkung der freien Sauerstoffradikale schützende Antioxidantien, die sowohl intrazytoplasmatisch in den Spermatozoen als auch im Seminalplasma zu finden sind (SMITH et al., 1996; SHARMA et al., 1999; GALLARDO et al., 2007). Da die Spermatozoen nur eine geringe Menge an Zytoplasma besitzen, sind auch die schützenden zytoplasmatischen Enzyme wie Katalase, Superoxid Dismutase oder Gluthationperoxidase eher in geringen Mengen vorhanden (AITKEN und FISHER, 1994; GARRIDO et al., 2004). Zum Ausgleich dienen dazu zahlreiche Antioxidantien als Radikalfänger im Seminalplasma wie zum Beispiel Albumin, Transferrin, Ferritin, Vitamin E, Selen oder Zink (AITKEN und FISHER, 1994; SMITH et al., 1996; TWIGG et al., 1998; AGARWAL, 2004). Die schützende Wirkung der Antioxidantien besteht darin, die Bildung von ROS zu verhindern, ROS zu beseitigen, bevor die Möglichkeit überhaupt besteht, schädigend zu wirken, oder die nachfolgende Kettenreaktion der Lipidperoxidation zu beenden (DANDEKAR et al., 2002; FUJII et al., 2003).

Für die Erhaltung der normalen Zellfunktionen ist eine Balance zwischen der Produktion von ROS und TAS von Nöten (AGARWAL, 2003; FINGEROVA et al., 2007; GALLARDO et al., 2007). Kommt es zu einer verstärkten ROS-Produktion oder ist die Bildung von TAS reduziert, so wird das antioxidative Defensivsystem überfordert, und oxidativer Stress entsteht (COCUZZA et al., 2007). Dies erklärt die negative Korrelation zwischen der TAS-Konzentration im Seminalplasma und der Lipidperoxidation in der Arbeit von SMITH et al. (1996). Als Folge des



oxidativen Stresses werden vermehrtes Auftreten von Zell- und DNA-Schädigungen angenommen (SHARMA et al., 1999; DANDEKAR et al., 2002).

Ein Ansatzpunkt bei der Untersuchung ungeklärter Infertilität des Mannes könnte die Bestimmung der TAS-Konzentration im Seminalplasma sein. So wurde schon wiederholt beobachtet, dass bei infertilen Männern signifikant niedrigere Werte als bei fertilen Kontrollgruppen gemessen wurden (SHARMA et al., 1999; OZBEK et al., 2000; PASQUALOTTO et al., 2000; KOCA et al., 2003). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass zwischen der Konzentration von TAS im Seminalplasma und den Spermioigrammparametern wie zum Beispiel Motilität und Morphologie eine positive Korrelation besteht (PASQUALOTTO et al., 2000; KOCA, et al., 2003) und bei IVF-Patienten eine positive Korrelation zwischen der TAS-Konzentration im Seminalplasma und der Schwangerschaftsrate gefunden wird (PASQUALOTTO et al., 2004).

Kritische Stimmen bemängeln, dass bei mancher Technik der assistierten Reproduktion die Spermien vom Seminalplasma und somit auch von dessen schützenden antioxidativen Systemen getrennt werden und somit der erhöhten Gefahr der Zell- oder DNA-Schädigung durch freie Radikale ausgesetzt sind (SMITH et al., 1996).

## **2.9. Antioxidantien im Seminalplasma**

Zum Ausgleich des geringen zytoplasmatischen Enzymschutzes der Spermatozoen gegen den Einfluss freier Sauerstoffradikale finden sich im Seminalplasma zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Stoffe, die als Radikalfänger fungieren (AGARWAL, 2004; TREMELLEN, 2008). Diese Systeme können entweder präventiv wirken, also schon den Beginn der Lipidperoxidationskaskade unterbinden, diese unterbrechen (Eingreifen) oder den schon entstandenen Schaden ausbessern (Reparatur) (SALEH und AGARWAL, 2002).

### **2.9.1. Albumin**

Der Hauptanteil des im Seminalplasma vorkommenden Proteins Albumin entstammt der Prostata (LINDHOLMER und ELIASSON, 1974; ELZANATY et al., 2007), aber auch die Sertolizellen im Hoden (ORLANDO et al., 1988) und auch der Nebenhoden fungieren als

Bildungsstätte des Albumins (ELZANATY et al., 2007). Die physiologische Bedeutung des seminalen Albumins ist noch nicht vollständig geklärt (LINDHOLMER et al., 1974), jedoch ist die Funktion als nicht-enzymatisches Antioxidans im Seminalplasma gesichert (GEVA et al., 1998; AGARWAL, 2004). Untersuchungen zeigten, dass in Anwesenheit von Albumin die Lipidoxidation nicht verhindert wird, jedoch kann es Lipidperoxide binden, die Kettenreaktion der Lipidperoxidation unterbrechen und somit deren zytotoxischen Effekt neutralisieren (TWIGG et al., 1998; AGARWAL und SAID, 2003). Auf diese Weise wird Albumin selbst oxidiert und bewahrt somit das Spermatozoon vor dem Einfluss des oxidativen Stresses (TREMELLEN, 2008).

Zusätzlich ist aus der Literatur bekannt, dass die Verwendung von Albumin bei der Spermienaufbereitung zur signifikanten Verbesserung der Motilität und Vitalität führt (AKERLOF et al., 1989; RISOPATRÓN et al., 2002; AGARWAL, 2004).

### **2.9.2. Transferrin**

Transferrin, ein in der Leber gebildetes für den Eisentransport zuständiges Glykoprotein, ist sowohl im Blut- als auch im Seminalplasma zu finden (SUELDO et al., 1984; ORATORE et al., 1987).

Da bei Männern ein Jahr nach Vasektomie die Transferrinwerte im Seminalplasma auf bis zu weniger als 20 Prozent des Ausgangswertes fielen, wurde auf einen testikulären Ursprung des Transferrins geschlossen (ORLANDO et al., 1985; ORATORE et al., 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die testikulären Sertolizellen die Hauptquelle des Transferrins im Seminalplasma darstellen (MALLEA et al., 1987; CANALE et al., 1988; ANAPLIOTOU et al., 1995). Sertolizellen nehmen bei der Spermiohistogenese eine zentrale Stellung ein (SIGG et al., 1994). Transferrin wird als Aktivitätsmarker der Sertolizellen angesehen (MALLEA et al., 1988), jedoch ist seine genaue Funktion nicht gänzlich geklärt. Es wird vermutet, dass Transferrin durch die Versorgung mit Eisen bei der Entwicklung und Differenzierung der Keimzellen beteiligt ist (HOLMES et al., 1982; BARTHELEMY et al., 1988; BER et al., 1990).

Frühere Untersuchungsergebnisse zeigten, dass bei infertilen Männern die Konzentration signifikant niedriger war als bei der fertilen Kontrollgruppe (ORLANDO et al., 1985; MALLEA et al., 1988; ANAPLIOTOU et al., 1995). Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen der Transferrinkonzentration im Seminalplasma und der Spermienkonzentration bzw. -dichte

festgestellt (CALDINI et al., 1986; FUSE et al., 1992; PAPADIMAS et al., 1992; IRISAWA et al., 1993). Die bei niedrigen seminalen Transferrinwerten reduzierte Fertilitätsrate in vitro lässt sich vermutlich auf eine Dysfunktion der Sertolizellen zurückführen (SUELDO et al., 1984).

Zusätzlich zählt Transferrin nach SANOCKA und KURPISZ (2004) zu den wichtigsten Antioxidantiensystemen im Seminalplasma. Denn durch seine Fähigkeit, freies Eisen zu binden, kann Transferrin der Fenton-Reaktion Eisen in Funktion als Katalysator entziehen. Bei der Fenton-Reaktion wird während der Lipidperoxidationskaskade hochreaktives OH<sup>•</sup> gebildet (AGARWAL et al., 2005). Durch die Bildung eines Chelatkomplexes zwischen Transferrin und Eisen ist letzteres nicht mehr frei verfügbar und kann an der Fenton-Reaktion nicht teilnehmen (AGARWAL et al., 2004; AITKEN und FISHER, 2005). Durch diesen Mechanismus kann Transferrin die Initiierung der Lipidperoxidation der Plasmamembran verhindern (AGARWAL et al., 2005) und wird somit zu den präventiven Antioxidantien gezählt (SIES, 1993).

### **2.9.3. Ferritin**

Ferritin gehört zu den nicht-enzymatischen Antioxidantiensystemen des seminalen Plasmas (AGARWAL et al., 2005).

Bei Ferritin handelt es sich um ein Protein, welches für den Transport und die Speicherung von Eisen zuständig ist. Es ist in großen Mengen im Seminalplasma zu finden (BROTHERTON, 1990).

Die schützende Wirkung des Ferritins vor dem Einfluss von Sauerstoffradikalen wird durch die eisenspeichernde Funktion erklärt. Denn bei der Kaskade der Lipidoxidation nimmt freies Eisen an der sogenannten Fentonreaktion teil (BAKER und AITKEN, 2005), bei der zweiwertiges Eisen zusammen mit Hydrogenperoxid zu dreiwertigem Eisen und Hydroxylradikal reagiert (AITKEN und FISHER, 1994; GEVA et al., 1998; AGARWAL et al., 2005). Wird aber das freie Eisen von Ferritin gebunden, steht es somit nicht zur Reaktion in der Kaskade der Lipidoxidation zur Verfügung (KWENANG et al., 1987).

Bei früheren Untersuchungen wurden jedoch bei infertilen und fertilen Männern keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die seminale Ferritinkonzentration gefunden (KWENANG et al., 1987).

Interessant ist, dass nach Sichtung der aktuellen Literatur offenbar wenige Studien bezüglich der proklamierten Antioxidantienrolle des Transferrins und vor allem auch des Ferritins durchgeführt worden sind.

## **2.10. Eigene Fragestellung**

Das Ziel dieser Studie ist, verschiedene Oxidantien und Antioxidantien im menschlichen Seminalplasma zu bestimmen und deren Einfluss auf den Chromatinstatus von Spermien einerseits und das IVF- bzw. ICSI-Ergebnis (Schwangerschafts- und Befruchtungsrate) andererseits zu untersuchen.

Die als protektiv deklarierten Antioxidantien Albumin, Transferrin, Ferritin und der totale Antioxidantienstatus (TAS) werden in dieser Studie herangezogen. Ebenso wird der schädigende Einfluss von reactive oxygen species (ROS) im Seminalplasma von IVF- bzw. ICSI-Patienten untersucht und der Chromatinstatus anhand von Chromomycin A3-, Acridine Orange- und TUNEL-Färbung bestimmt. Weitere Daten der klassischen Samenanalyse (Volumen, pH-Wert, Dichte, Motilität, HOS-Test, Eosintest und Morphologie) werden zusätzlich noch als Einflussgrößen in Betracht gezogen.

Die Zielsetzung lässt sich in sechs Fragen zusammenfassen:

- 1) Gibt es bezüglich der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die entweder IVF- oder ICSI-Therapie erhielten?
- 2) Korreliert der Chromatinstatus mit den Parametern der klassischen Samenanalyse?
- 3) Besteht ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien bzw. Oxidantien im menschlichen Seminalplasma und den Parametern der klassischen Samenanalyse?
- 4) Korreliert die Konzentration von Antioxidantien bzw. Oxidantien mit dem Chromatinstatus?
- 5) Korreliert der Chromatinstatus mit dem IVF- bzw. ICSI-Ergebnis?
- 6) Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien bzw. Oxidantien im menschlichen Seminalplasma und dem IVF- bzw. ICSI-Ergebnis?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Das Patientengut**

An der vorliegenden Untersuchung nahmen 48 Paare teil, die sich aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches einer Sterilitätsbehandlung am Universitätsklinikum des Saarlandes unterzogen. 26 der Paare wurden mittels IVF- und 22 Paare mittels ICSI-Verfahren therapiert. Die Unterteilung der Gruppen erfolgte im Rahmen des geplanten Fertilisationsprogramms.

### **3.2. Probengewinnung und Aufbereitung**

#### **3.2.1. Die Probengewinnung**

Die Samenproben der Patienten werden nach mindestens viertägiger Karenz in einem dafür vorgesehenen Raum am Universitätsklinikum des Saarlandes durch Masturbation in ein steriles Kunststoffgefäß gewonnen. Die Patienten werden zuvor über die korrekte Art der Probenabgabe instruiert. Die unter 3.3. aufgeführten Spermioqrammuntersuchungen werden gemäß WHO – Kriterien (1992) routinemäßig innerhalb der ersten Stunde nach Probengewinnung im Labor der Frauenklinik vom Fachpersonal angefertigt und die Ergebnisse in standardisierten Bögen festgehalten.

Von jeder Nativprobe eines Patienten werden nach einer Liquefizienzzeit von 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur 5 dünne Ausstrichpräparate auf Objektträgern (MENZEL-Gläser, Braunschweig) angefertigt, für 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend mit Fixierspray (Merckofix-Fixierspray® für Zytodiagnostik, Merck, Darmstadt) besprüht.

Die nach Zentrifugation zur weiteren Aufbereitung der Proben für die IVF- bzw. ICSI-Prozedur anfallenden Überstände an Seminalplasma werden abpipettiert, auf mehrere sterile Kunststoffgefäße verteilt und bei -40 °C in einer dafür vorgesehenen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tonne (Bio 36, Messer, Griesheim) bis zur weiteren Untersuchung tiefgefroren.

Die in den Pellets enthaltenen Spermien werden mit den unter 3.2.2. aufgeführten Methoden aufbereitet und für die IVF- bzw. ICSI-Behandlung verwendet, so dass sich die

Erhebung der Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten direkt auf die untersuchten Proben beziehen.

### **3.2.2. Aufbereitungstechniken**

Die verschiedenen Arten der Spermienaufbereitung dienen der Selektion möglichst motiler und morphologisch normal geformter Spermien aus jeder nativen Probe, um somit die Erfolgswahrscheinlichkeit für die assistierte Fortpflanzung zu erhöhen.

#### **3.2.2.1. Swim-up Methode**

Das Ejakulat wird nach Verflüssigung im Verhältnis 1:1 bis 1:4 mit dem Kulturmedium Ham`s F 10 vermischt und für 10 Minuten bei 500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 1 ml Medium überschichtet. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 37° C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> für 2 – 3 Stunden im Brutschrank (Inkubator HERAEUS). Dadurch wird eine Trennung der nach oben schwimmenden motilen und morphologisch normalen Spermien vom Sediment beabsichtigt. Diese Spermien werden anschließend für die weitere IVF- oder ICSI-Therapie in ein steriles Reagenzglas abpipettiert (HAMMADEH, 1997).

#### **3.2.2.2. Mini Swim-up Methode**

Das Ejakulat wird nach Verflüssigung in einem sterilen 10 ml Reagenzglas über 10 Minuten bei 500 U/Min zentrifugiert und das Pellet nach Abpipettieren des Überstandes in 1 ml Ham`s F 10 Kulturmedium resuspendiert. Nach anschließendem Umfüllen in ein Eppendorf-Röhrchen wird erneut bei 500 U/Min über 3-5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abpipettiert und das Pellet mit 20-50 µl Kulturmedium überschichtet. Das Eppendorf-Röhrchen wird dann im Brutschrank bei 37° C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> für etwa 2 Stunden inkubiert (Inkubator HERAEUS). Während dieser Zeit erfolgt eine Abtrennung der motilen Spermien vom Pellet, indem diese in den Überstand schwimmen. Diese Spermien werden

anschließend für die weitere IVF- oder ICSI-Therapie in ein steriles Reagenzglas abpipettiert (HAMMADEH, 1997).

### **3.2.2.3. Percoll™gradient Methode**

#### **Herstellen der Percoll™-Lösungen**

##### ***Percoll™grundlösung (100 Prozent)***

Zur Herstellung der Percoll™grundlösung wird 45 ml Percoll (Percoll™ Sterile, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) mit 5 ml Ham's F 10 Medium (10fach konzentriert) vermischt.

##### ***Percoll™lösung A (40 Prozent)***

10 ml der Percoll™grundlösung werden mit 15 ml Ham's F 10 Medium vermischt.

##### ***Percoll™lösung B (70 Prozent)***

17,5 ml der Percoll™grundlösung werden mit 7,5 ml Ham's F 10 Medium vermischt.

##### ***Percoll™lösung C (90 Prozent)***

22,5 ml der Percoll™grundlösung werden mit 2,5 ml Ham's F 10 Medium vermischt.

#### **Herstellen des Percoll™-Gradienten in einem sterilen Reagenzglas**

Zuerst wird von der 90-prozentigen Percoll™lösung C 1 ml in mehrere Röhrchen einpipettiert. Dann wird die 70-prozentige Percoll™lösung B aufpipettiert. Mit der 40-prozentigen Percoll™lösung A wird ebenso verfahren. Vor dem Benutzen werden die Röhrchen 1 Stunde im Inkubator aufbewahrt (Inkubator HERAEUS).

## **Percoll™zentrifugation**

Nach Verflüssigung wird 1 ml des Ejakulates vorsichtig auf die Percoll™säulen mehrerer Röhrrchen aufpipettiert und die Röhrrchen werden anschließend über 20 Minuten bei 500 U/Min zentrifugiert. Am Boden des Röhrrchens bildet sich ein weiches Pellet. Die obersten Schichten des Röhrrchens werden entfernt, so dass nur das Pellet übrig bleibt. Die Pellets mehrerer Röhrrchen werden gesammelt, mit 0,8-1 ml Medium beschichtet und in schräger Position für 2 Stunden inkubiert (Inkubator HERAEUS). Anschließend wird die oberste Schicht abgehoben, gut gemischt und für die weitere IVF- oder ICSI-Therapie aufbewahrt.

Ziel dieser Aufbereitungsmethode ist es, vitale von avitalen Spermien zu trennen (HAMMADEH, 1997).

### **3.2.2.4. Pure-Sperm® Methode**

#### **Herstellen des Pure-Sperm® Gradienten**

Für jede Samenprobe werden 2 ml einer 40-prozentigen Pure-Sperm® Lösung (Nidacon International AB, Gothenburg, Schweden) in ein konisches Röhrrchen pipettiert und anschließend 2 ml der 80-prozentigen Pure-Sperm® Lösung (Nidacon International AB, Gothenburg, Schweden) mit Hilfe einer langen Kanüle direkt auf den Boden des Röhrrchens platziert, ohne dass sich die beiden Lösungen dabei vermischen.

Für jede Samenprobe werden zwei Röhrrchen mit Pure-Sperm® Lösungsschichten vorbereitet.

#### **Samenaufbereitung**

Die Pure-Sperm® Lösungen werden vorsichtig mit einer sterilen Pipette mit bis zu 1,5 ml der liquefizierten, nativen Samenprobe bedeckt und dann bei 300 U/Min über 20 Minuten zentrifugiert. Nach Abheben der oberen Seminalplasmaschicht werden die Schichten mit 40-prozentiger Pure-Sperm® Lösung vermischt. Das Pellet wird nach vorsichtigem Einbringen einer sterilen Pipettenspitze aspiriert. Beide Pellets einer Samenprobe werden in ein



gemeinsames Gefäß platziert und in 5 ml Pure-Sperm® Waschlösung (Pure-Sperm® Wash, Nidacon International AB, Gothenburg, Schweden) resuspendiert. Erneut wird bei 500 U/min über 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt, wobei mindestens 1 mm Flüssigkeit oberhalb des Pellets zurückgelassen wird. Dieses Pellet wird dann in 1 ml Medium resuspendiert und für weitere IVF- bzw. ICSI-Behandlung verwendet.

### **3.2.2.5. Isolate® Methode**

Diese Aufbereitungsmethode trennt motile Spermien von toten Zellen, Leukozyten und Zellschutt.

#### **Herstellen der Upper-layer Lösung – 50 Prozent**

4,5 ml des Konzentrats (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) werden zusammen mit 5,5 ml der modifizierten humanen Tubenflüssigkeit (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) in einem sterilen Röhrchen vermischt.

#### **Herstellen der Lower-layer Lösung – 90 Prozent**

8,1 ml des Konzentrats (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) werden mit 1,9 ml modifizierter humaner Tubenflüssigkeit (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) in einem sterilen Röhrchen vermischt.

#### **Erstellen des Isolate® Gradienten**

Zuerst werden 1,5 – 2 ml der Lower-layer Lösung in eine sterile konische Eppendorfpipette pipettiert und anschließend ebenfalls 1,5 – 2 ml der Upper-layer Lösung in einer spiralförmigen Bewegung auf die Lower-layer Schicht vorsichtig aufgetragen. Dann werden 1,5 – 2 ml der liquifizierten nativen Samenprobe auf die oberste Schicht platziert und für 10 – 20 Minuten bei 200 – 300 U/Min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird das Pellet in 2 – 3 ml Sperm Washing Medium (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) resuspendiert,

erneut bei 200 U/Min für 8 – 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut entfernt. Dieser Schritt wird wiederholt und anschließend das Pellet nach Entfernen des Überstandes mit geeignetem Medium bedeckt.

### **3.3. Die routinemäßige Samenanalyse**

#### **3.3.1. Volumen**

Das Volumen der jeweiligen Samenprobe wird mittels eines Röhrchens bestimmt, welches eine nach unten hin spitz zulaufende Zylinderform hat. Der Normalwert des Ejakulatvolumens beträgt mindestens 2 ml (WHO-Laborhandbuch, 1999).

#### **3.3.2. pH-Wert**

Für die pH-Wert-Messung wird 30 Minuten nach der Probengewinnung ein Tropfen des Ejakulates gleichmäßig auf ein Spezialindikatorpapier (pH 6,5 – 10,0, Merck, Darmstadt) gestrichen. Nach 30 Sekunden wird dann die Farbveränderung auf dem Indikatorpapier mit der Farbskala des Kalibrationsstreifens verglichen. Der pH-Wert soll mindestens 7,2 betragen (WHO-Laborhandbuch, 1999).

#### **3.3.3. Spermiendichte**

Die Spermiendichte wird mittels einer Maklerzählkammer ermittelt, in die ein Probenvolumen von 10 µl eingebracht wird. Bei einer 20-fachen Vergrößerung werden von den 100 Quadraten der Maklerzählkammer in 30 die Spermien ausgezählt. Bildet man den Mittelwert der Spermienzahl pro Quadrat und multipliziert diesen Wert mit dem Faktor 1000000, erhält man die Spermiendichte pro Milliliter.

Der Referenzwert der Spermienkonzentration beträgt mindestens  $20 \times 10^6$  Spermien/ ml (WHO-Laborhandbuch, 1999).

Diese Prozedur wird nach der Aufbereitung wiederholt, um die Dichte nach Spermienaufbereitung zu bestimmen.

### 3.3.4. Motilität

Zur Motilitätsbestimmung der Spermien wird ebenfalls die Maklerzählkammer verwendet. Nach Verflüssigung der Probe bei Raumtemperatur werden 10 µl der nativen Probe in die Vertiefung der Maklerzählkammer gegeben. Es werden jeweils in möglichst vielen Quadraten jeweils 100 Spermien ausgezählt und bezüglich ihrer Motilität bewertet. Nach WHO-Richtlinien (WHO, 1999) werden 4 verschiedene Kategorien der Spermienmotilität unterschieden:

- 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

Es wurde hier lediglich zwischen globaler (entsprechend Kategorie a, b und c) und progressiver (entsprechend Kategorie a und b) Motilität unterschieden.

Die globale Motilität soll mindestens 50 Prozent und die progressive Motilität mindestens 25 Prozent innerhalb 60 Minuten nach Probengewinnung betragen (WHO-Laborhandbuch, 1999).

Nach Aufbereitung wird diese Auszählung erneut durchgeführt.

### 3.3.5. Eosintest

Dieser Test dient der Unterscheidung vitaler und avitaler Spermien. Aufgrund von Spermienmembrandefekten lassen sich die avitale Spermien im Gegensatz zu vitalen Spermien durch die Eosinlösung anfärben.

Ein Tropfen einer 0,5 prozentigen Eosinlösung wird zusammen mit 10 µl Ejakulat auf einem Objektträger vermischt, mit einem Deckgläschen bedeckt und nach 30 Sekunden bei 400facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop angesehen. Aufgrund einer geschädigten Plasmamembran färben sich die toten Spermien rot, und die vitalen Spermien bleiben weiß (ELIASSON und TREICHL, 1971). Im Normalfall sollen mindestens 75 Prozent der Spermien vital sein (WHO-Laborhandbuch, 1999).

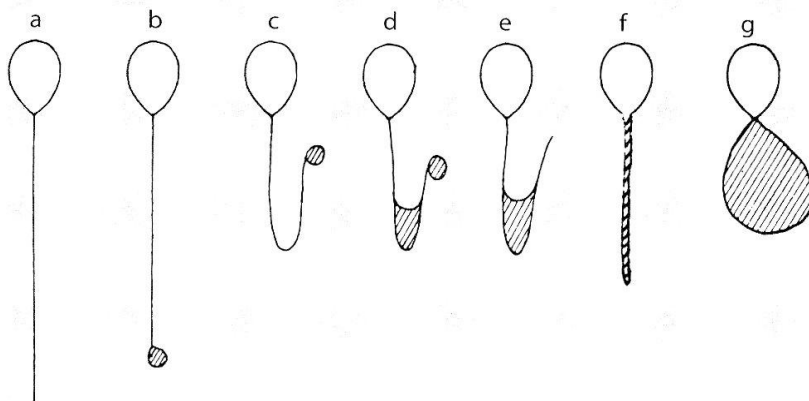
### 3.3.6. HOS-Test (Hypoosmotischer Spermischwelltest)

Auch dieser Test dient der Vitalitätsbestimmung der Spermien. Bei intakter Spermienmembran kommt es aufgrund der Semipermeabilität bei Zugabe von hypoosmolarer Lösung zum Wassereinstrom ins Zytoplasma und somit zum Anschwellen des Spermiums (DREVIUS und ERIKSSON, 1966; WHO-Laborhandbuch, 1999).

Die Schwelllösung besteht aus einer Mischung von 0,735 g Natriumzitat, 100 ml destilliertem Wasser und 1,351 g Fruktose.

1 ml der Schwelllösung wird mit 0,1 ml liquefiziertem Ejakulat vermischt und bei 37 ° C inkubiert (Inkubator HERAEUS). Nach 90 Minuten werden 5 bis 10 µl auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen belegt und unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet (Jeyendran et al., 1984).

Ein durch hypoosmotischen Wassereinstrom bedingtes Schwellen der Spermien ist an der Veränderung der Schwanzform zu erkennen. Dabei zeigt das Anschwellen der Spermienchwänze die Vitalität der Spermien an. Von 200 Spermien wird der Anteil der geschwollenen Spermienchwänze ausgezählt, welcher im Normalfall über 75 Prozent liegen soll (WHO Laborhandbuch, 1999).



**Abb. 3-1: Schematische Darstellung typischer morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen nach Kontakt mit hypoosmotischer Lösung:**

**a: keine Veränderung**

**b-g: unterschiedliche Schwanzveränderungen (die ein Schwellen anzeigenden Schwanzregionen sind schraffiert gekennzeichnet).**

### 3.3.7. Morphologie

Zur Untersuchung der Spermienmorphologie werden die Nativausstriche mit einer speziell für Spermien modifizierten Papanicolaou-Färbung angefärbt.

#### Probenvorbereitung

Die Ausstriche der Proben werden auf einem Objektträger (MENZEL-Gläser, Braunschweig) luftgetrocknet und anschließend mit Fixierspray (Merckofix®-Fixierspray für Zytodiagnostik, Merck, Darmstadt) für 5 bis 15 Minuten fixiert.

#### Färbung

Die sehr komplexe Färbung wird nach folgendem Schema maschinell erstellt:

**Tabelle 3-2 : Standardisierte, modifizierte maschinelle Färbung nach Papanicolaou**

Färbelösung	Vorgang
Ethanol 80 % (Merck, Darmstadt)	2x1 Minute eintauchen
Dest. Wasser (Seromed, Berlin)	1 Minute eintauchen
Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)	Exakt 3 Minuten eintauchen
Dest. Wasser (Seromed, Berlin)	1 Minute eintauchen
Fließendes Wasser	2x3 Minuten eintauchen
Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt)	1 Minute eintauchen
Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt)	2x1 Minute eintauchen
Orange G6 (Merck, Darmstadt)	2 Minuten eintauchen
Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt)	3x1 Minute eintauchen
Polychrom (Merck, Darmstadt)	2 Minuten 30 Sekunden eintauchen
Ethanol 95 % (Merck, Darmstadt)	1 Minute eintauchen
Ethanol 99 % (Merck, Darmstadt)	3x1 Minute eintauchen
Xylol (Merck, Darmstadt)	4x1 Minute eintauchen

Nach der Färbung werden die Präparate sofort mit Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

## **Auswertung**

Bei einer 100-fachen Vergrößerung mit Immersionsöl werden pro Objektträger 100 Spermien nach den Strict Criteria ausgewertet. Die Strict Criteria werden wie folgt dargestellt (HAMMADEH, 1997):

### ***Der Kopf***

Normal: leicht oval, 5-6 µm lang und 2,5-3,5 µm breit, das Akrosom deutlich abgegrenzt sichtbar und bildet 40-70 Prozent des Kopfes

Leicht deformiert: leichte Abweichung von der normalen Kopfform, leicht gestreckt, 2-2,5 µm breiter Spermienkopf, normal ausgebildetes Akrosom

Schwer deformiert: keine ovale Kopfform, kein Akrosom ausgebildet, bzw. < 30 Prozent oder > 70 Prozent des Gesamtkopfes, Hals und Mittelstück zusätzlich defekt.

### ***Der Hals***

Normal: muss vorhanden sein und sich in axialer Lage im Verhältnis zum Spermienkopf befinden.

### ***Das Mittelstück***

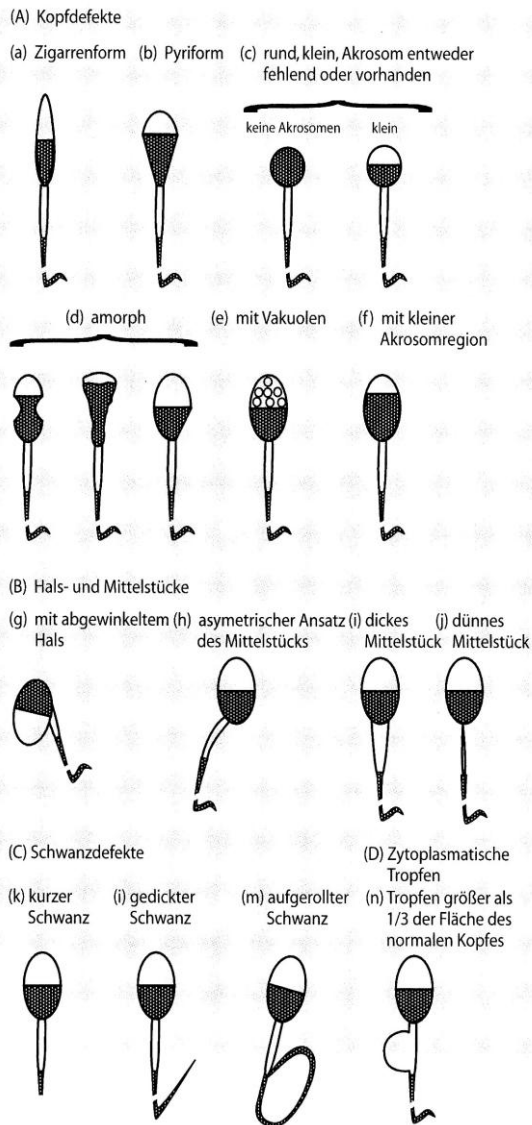
Normal: sollte dem Hals axial anhaften, ca. 1 µm Durchmesser, 1,5-mal länger als die Länge des Kopfes, in der Umgebung kein Zytoplasma bzw. bei sichtbaren Zytoplasmaresten sollten diese nicht größer als die Hälfte des Kopfes sein.

### ***Die Geißel***

Normal: gleichmäßig geformt, etwas schmaler als das Mittelstück, nicht spiralisiert und ca. 45 µm lang.

Die Ergebnisse der Auswertung werden in einem Bewertungsbogen festgehalten.

Als Proben mit guter Morphologie werden diejenigen bezeichnet, deren Fehlformen 15 Prozent nicht überschreiten (WHO-Laborhandbuch, 1999).



**Abb. 3-2: Schematische Zeichnung von abnormalen Formen menschlicher Spermien.**

### 3.4. Chromatinstatus

#### 3.4.1. Chromomycin A 3-Färbung

Diese Färbung dient der Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus.

#### Probenvorbereitung

Die Objektträger mit den fixierten Spermaausstrichen werden für mindestens 2 Stunden in eine Lösung (Carnoy's Solution), die aus einem Viertel Essigsäure (Merck, Darmstadt) und aus

drei Vierteln Methanol (Merck, Darmstadt) besteht, eingetaucht und anschließend kurz trocknen gelassen.

## **Färbung**

Die Färbelösung wird aus 0,25 mg Chromomycin A3 (Sigma, St. Louis, USA) und 1 ml PBS-Lösung hergestellt. Unter abgedunkelten Lichtbedingungen wird jeder Objektträger mit 100 µl der Chromomycin A3-Färbelösung beschichtet. Nach 20 Minuten wird die Färbelösung mit PBS abgespült und die Objektträger mit Glycerin und dünnen Glasdeckgläschen eingedeckt.

## **Auswertung**

Die Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen) mit einem 490 nm Exzitationsfilter bei 100 facher Vergrößerung mit Ölimmersion. Von jedem Objektträger werden 200 Spermien ausgezählt, die in eine fluoreszierende und nicht fluoreszierende Gruppe unterschieden werden (BIANCHI et al., 1996). Durch das fluoreszierende Signal wird die unvollständige Kernchromatinkondensation angezeigt, welche aus dem unvollständigen Ersatz von Histonen zu Protaminen resultiert.

### **3.4.2. Acridine Orange-Färbung**

Diese Färbemethode dient dem Nachweis eines normalen Kernchromatinstatus (Kondensationszustand).

## **Probenvorbereitung**

Die Ausstrichpräparate werden über Nacht mit Carnoys Lösung, bestehend aus drei Teilen Methanol (Merck, Darmstadt) und einem Teil Essigsäure (Merck, Darmstadt) fixiert.



## **Färbung**

Die Stock Lösung wird durch Vermischen von 50 mg Acridine Orange (Sigma, St. Louis, USA) mit 50 ml destilliertem Wasser hergestellt und dann filtriert. Die am Tag der Färbung jeweils frisch angesetzte Färbelösung besteht aus 30 ml Stock Lösung, 120 ml 0,1 M Zitronensäure (Merck, Darmstadt) und 7,5 ml 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt).

Die Objektträger werden für 5 Minuten mit der Färbelösung beschichtet und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Deckgläschen werden auf die Objektträger gelegt, bevor diese getrocknet sind.

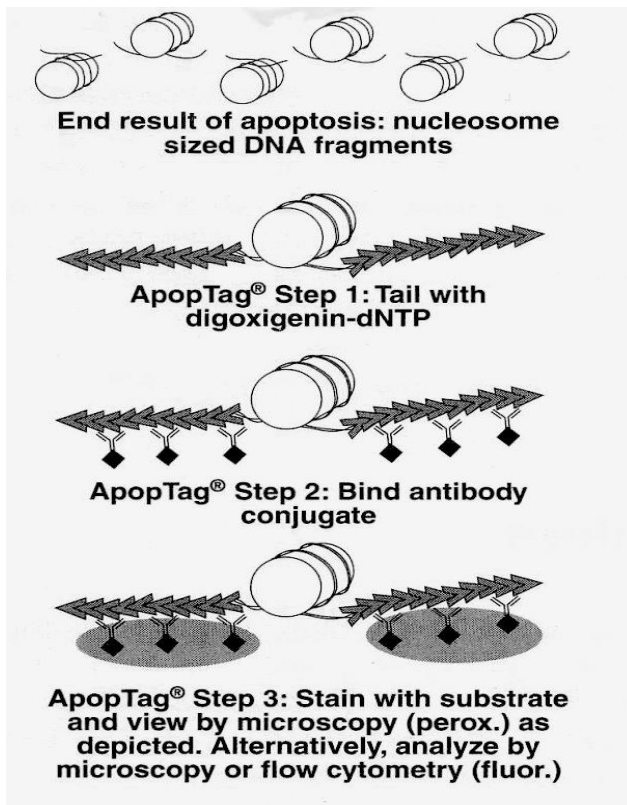
## **Auswertung**

Es erfolgt noch am Tag der Färbung die Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen) bei 100 facher Vergrößerung mit Ölimmersion. Es wird ein 490 nm Exzitationsfilter verwendet. Pro Objektträger werden jeweils 200 Spermien ausgewertet. Grün-gelb leuchtende Spermien werden unter dem Begriff „Acridine Orange positiv“, also Kennzeichnung eines normalen Kernchromatinstatus, und alle orange und rot leuchtenden Spermien unter dem Begriff „Acridine Orange negativ“ zusammengefasst.

## **3.5. TUNEL-Assay**

### **Prinzip**

Diese Färbung detektiert fragmentierte DNA in apoptotischen Zellen. Das Prinzip beruht darauf, dass die 3`-OH Enden der DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen enzymatisch mit modifizierten Nukleotiden, nämlich Digoxigenin-Nukleotiden, markiert werden. Durch Zugabe von Anti-Digoxigeninantikörpern, die mit Fluoreszein konjugiert sind, können die DNA-Strangbrüche der apoptotischen Zellen unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. DNA in nicht-apoptotischen Zellen haben eine nur so geringe Anzahl an freien 3`-OH Enden, dass diese sich nicht mit TUNEL, sondern nur mit der Propidium-Iodid-Gegenfärbung anfärben können.



**Abb. 3-3: Die Apop Tag® Methodik zur indirekten Färbung von 3' -OH Enden der DNA-Strangbrüche mit Digoxigenin-Nukleotiden, an welche sich Anti-Digoxigeninantikörper binden.**

## Probenvorbereitung

Auch hier werden mit Fixierspray (Merckofix®-Fixierspray für Zytodiagnostik, Merck, Darmstadt) behandelte Ausstrichpräparate des Spermas genutzt. Die verwendeten Materialien entstammten dem Apop Tag® Plus in situ Apoptosis Detection Kit für indirekte Fluoreszenzfärbung (INTERGEN, Oxford, Großbritannien).

## **Vorbereitung der Reagenzien (für die Färbung von 10 Objektträgern)**

### ***Working Strength TdT Enzym:***

385 µl des Reaktionspuffers (Nukleotide) (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) werden mit 165 µl TdT Enzym (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) gut vermischt.

### ***Working Strength Stop / Waschpuffer:***

2 ml des Stop / Waschpuffers (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) werden mit 68 ml destilliertem Wasser vermischt.

### ***Working Strength Fluorescein Solution:***

340 µl der Blocklösung (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) werden mit 310 µl des anti-Digoxigeninkonjugates (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) unter Lichtschutz gut gemischt.

### ***Propidium Iodid Gegenfärbung:***

Die Konzentration der Propidium Iodid Gegenfärbung beträgt 0,5 µl / ml.

## **Färbung**

Auf jeden Objektträger mit Spermaausstrichen werden 75 µl des im Kit (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) vorhandenen Equilibrationspuffers direkt aufgetragen und bei Raumtemperatur für 10 Sekunden inkubiert.

Unmittelbar danach werden 55 µl des Working Strength TdT Enzym auf jeden Objektträger pipettiert und über eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert (Inkubator HERAEUS).

Anschließend werden die Objektträger für 15 Minuten in ein Gefäß getaucht, welches Working Strength Stop / Waschpuffer enthält und dann bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert.

Die probentragenden Objektträger werden dann dreimal für jeweils 1 Minute in PBS gewaschen.

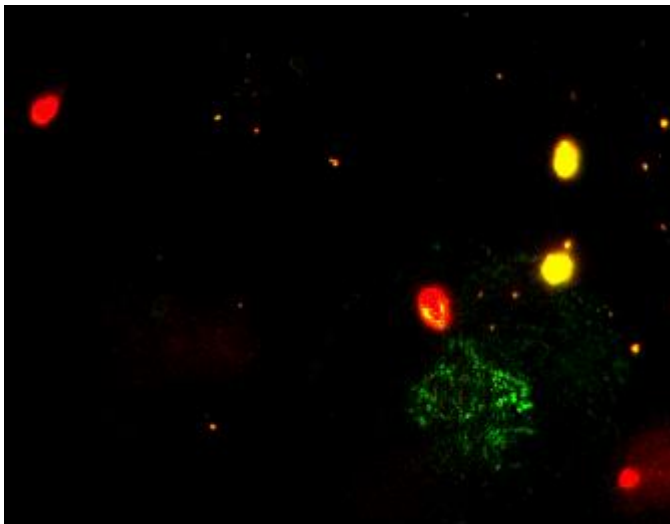
Das im Kit (Apop Tag<sup>®</sup>, Intergen Company) enthaltene Anti-Digoxigenin-Konjugat wird unter Lichtschutz auf Raumtemperatur erwärmt und davon 65 µl auf jeden Objektträger aufpipettiert. Wieder erfolgt eine Inkubation in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Lichtschutz.

Danach werden die Proben viermal für jeweils 2 Minuten wieder in PBS gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgt anschließend unter Verwendung von 15 µl Propidium Iodid pro Objektträger. Ein Deckgläschen wird aufgebracht und die Proben unter Lichtschutz bei –20 °C bis zur Begutachtung unter dem Mikroskop gelagert.

### **Auswertung**

Die Proben werden wenige Tage nach der Färbung ausgewertet. Es werden 100 Spermien pro Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop (LEITZ, Oberkochen, Deutschland) mit einem 490 nm-Exzitationsfilter ausgezählt, wobei zwischen grün und rot fluoreszierenden unterschieden wird. Die grün leuchtenden Spermien zeigen DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen an, während die roten Spermien als nicht apoptotisch gewertet werden.



**Abb. 3-4 : Fluoreszenzmikroskopie von mit TUNEL gefärbten grünen und roten Spermien.**

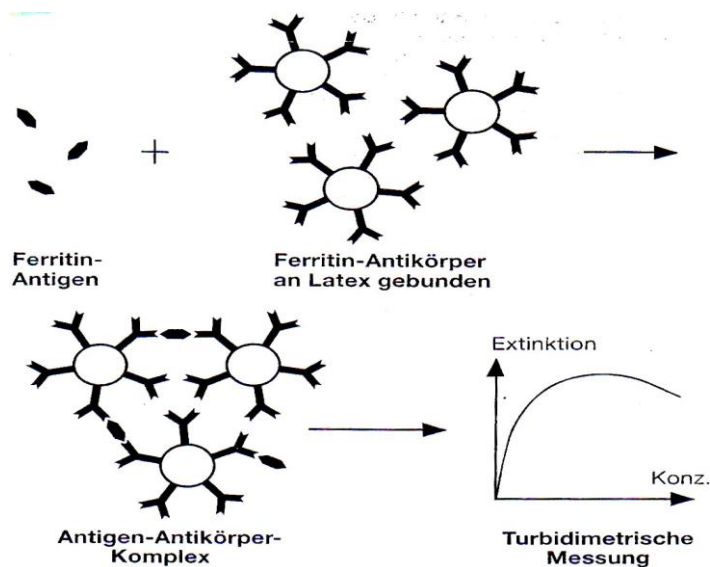
## 3.6. Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma

### 3.6.1. Ferritin

Der Gehalt an Ferritin im Seminalplasma wird mittels eines immunologischen Trübungstestes, Tina-quant® Ferritin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten durchgeführt.

#### Prinzip

Das Ferritin-Antigen im Seminalplasma agglutiniert mit zugegebenen Ferritin-Antikörpern, welche an Latex gebunden sind. Die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes wird turbidimetrisch gemessen.



**Abb. 3-5: Bildung eines Ferritin-Antikörper-Komplexes mit anschließender turbidimetrischer Ferritin-Messung.**

## **Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösungen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)**

Puffer:

TRIS-Puffer (Trishydroxymethylaminomethan): 0,18 mol / L, pH 8,2; Natriumchlorid: 100 mmol / L; Konservierungsmittel

Ferritin-Antikörper-Latex:

Latexpartikel, beladen mit polyklonalem Anti-Human-Ferritin-Antikörper (Kaninchen); Konservierungsmittel

### **Messung**

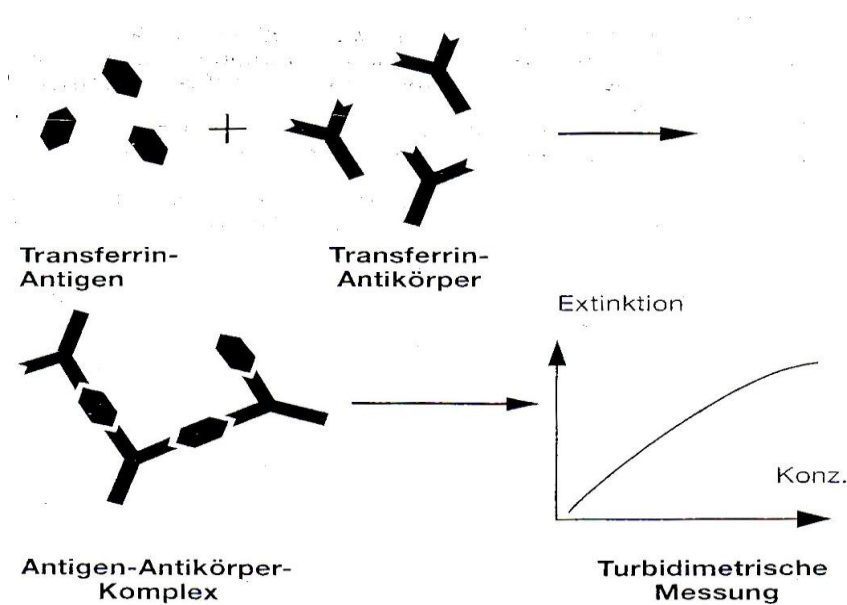
Die turbidimetrische Messung erfolgt vollautomatisch in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten (HITACHI 917).

### **3.6.2. Transferrin**

Der Gehalt an Transferrin im Seminalplasma wird mittels eines immunologischen Trübungstests, Tina-quant®Transferrin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten durchgeführt.

### **Prinzip**

Das im Seminalplasma vorhandene Transferrin reagiert mit den zugegebenen Transferrin-Antikörpern zu einem Antigen-Antikörper-Komplex. Diese Agglutination wird turbidimetrisch gemessen. Zugabe von Polyethylenglykol zur Reaktion ermöglicht einen schnelleren Endpunkt und erhöht die Empfindlichkeit.



**Abb. 3-6: Bildung eines Transferrin-Antikörper-Komplexes mit anschließender turbidimetrischer Messung.**

## **Konzentrationen gebrauchsfertiger Lösungen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)**

Puffer:

Phosphatpuffer: 50 mmol / L, pH 7,2; NaCl: 25 mmol / L; Polyethylenglykol: 5 Prozent;  
Konservierungsmittel

Transferrin-Antikörper / NaCl:

Anti-Human-Transferrin-Antikörper (Kaninchen) : abhängig vom Titer ; NaCl : 100 mmol / L ;  
Konservierungsmittel

## **Messung**

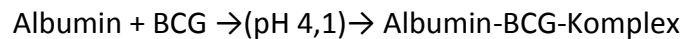
Die turbidimetrische Messung erfolgt vollautomatisch in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten (HITACHI 917).

### **3.6.3. Albumin**

Die Messung der Albuminkonzentration im Seminalplasma erfolgt photometrisch mittels eines Farb-Tests mit Endpunkt-Methode (Albumin-BCG-Methode) in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten.

#### **Prinzip**

Albumin weist bei einem pH-Wert von 4,1 einen genügend kationischen Charakter auf, um eine Bindung mit dem Anionenfarbstoff Bromcresolgrün (BCG) unter Bildung eines blaugrünen Komplexes einzugehen. Die Farbintensität der blaugrünen Farbe, welche direkt proportional zur Albuminkonzentration ist, wird photometrisch gemessen.



#### **Konzentrationen gebrauchsfertiger Lösungen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)**

Puffer:

Citrat-Puffer: 95 mmol / L, pH 4,1; Konservierungsmittel

Substrat:

Citrat-Puffer: 95 mmol / L, pH 4,1; Bromcresolgrün: 0,66 mmol / L; Konservierungsmittel

#### **Messung**

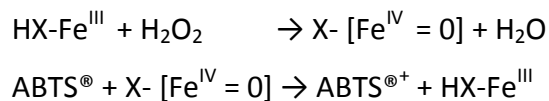
Die photometrische Messung erfolgt vollautomatisch in einem klinisch-chemischen Analyseautomaten (HITACHI 917).



### 3.6.4. TAS (totaler Antioxidantienstatus)

#### Prinzip

Die Bestimmung des totalen Antioxidantienstatus TAS im Seminalplasma erfolgt mittels einer photometrischen Methode. ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-Äthylbenzthiazolin Sulfonat]) (Boehringer, Mannheim) wird mit einer Peroxydase (Metmyoglobin) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um das radikale Kation ABTS<sup>®+</sup> (Boehringer, Mannheim) herzustellen, welches eine relativ stabile blaugrüne Farbe hat, die bei 600 nm gemessen werden kann. Die Antioxidantien in der zugefügten Probe unterdrücken diese Farbbildung proportional zu ihrer in der Messprobe vorhandenen Konzentration.



Legende:

HX-Fe<sup>III</sup> = Metmyoglobin

X- [Fe<sup>IV</sup> = O] = Ferrylmyoglobin

#### Herstellung der Lösungen

Der Puffer (Phosphat gepufferte Saline, 80 mmol/l, pH 7,4) wird schon gebrauchsfertig vom Hersteller des TAS-Kits (RANDOX, Crumlin, Großbritannien) mitgeliefert.

10 ml Chromogen (Metmyoglobin 6,1 µmol/l und ABTS<sup>®</sup> 610 µmol/l) wird mit 10 ml des Puffers aufbereitet.

1ml des Substrates (stabilisiertes Wasserstoffsuperoxid 250 µmol/l) wird mit 1,5 ml Puffer gemischt.

1 ml Eichmaß (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroma-2-Karbonsäure) wird mit 1 ml doppelt entionisiertem Wasser aufbereitet.

## Untersuchungsmethode

Die Bestimmung der Absorption erfolgt bei 600 nm Wellenlänge, 1 cm Lichtpfad in der Küvette, Temperatur von 37 °C und gegen die Luft.

**Tab 3-3: Pipettierschema in der Küvette**

	<b>Blindreagenz</b>	<b>Eichmaß</b>	<b>Probe</b>
<b>DDH<sub>2</sub>O</b>	20 µl	-	-
<b>Eichmaß</b>	-	20 µl	-
<b>Probe</b>	-	-	20 µl
<b>Chromogen</b>	1 ml	1 ml	1 ml

Nach gutem Vermischen erfolgt die Bestimmung der Anfangsabsorption (A1) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Anschließend werden jeweils noch 200 µl Substrat hinzugefügt, wieder gut gemischt und gleichzeitig die Stoppuhr gestartet. Nach genau 3 Minuten wird ein zweites Mal das Absorptionsvermögen bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (A2).

## Berechnung des totalen Antioxidantien-Status

Zunächst wird die Differenz zwischen A1 und A2 jeder Messung gebildet:

$$A2 - A1 = \Delta A .$$

Dann wird ein Faktor nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Faktor} = \text{Konzentration des Eichmaßes} : (\Delta A \text{ Blind} - \Delta A \text{ Eichmaß})$$

Die Konzentration des totalen Antioxidantien-Status in mmol/l errechnet sich dann aus folgender Formel:

$$\text{TAS [mmol/l]} = \text{Faktor} \times (\Delta A \text{ Blind} - \Delta A \text{ Probe}).$$

### 3.7. ROS (reactive oxygen species)

#### Prinzip

Die Bestimmung der reactive oxygen species erfolgt hier mittels der Messung der Konzentrationen von Peroxiden, welche mit den Konzentrationen freier Radikale korrelieren. Die Konzentration der Peroxide im Seminalplasma wird durch die Reaktion biologischer Peroxide mit Peroxidase und der nachfolgenden Farbreaktion mit TMB (Tetramethylbenzidin) als Substrat ermittelt. Nach Zugabe der Stopp-Lösung wird die farbige Flüssigkeit bei 450 nm photometrisch gemessen.

#### Messung

Der im Reaktionskit (Biomedica OxyStat®, Wien, Österreich) enthaltene Reaktionspuffer wird in 600 µl Verdünnungspuffer aufgelöst, wobei darauf geachtet wird, dass die Reagenzien nicht dem Licht exponiert werden. Einer der Kalibratoren wird mit 250 µl Rekonstitutionslösung vermischt und dann bei Raumtemperatur 5 Minuten lang gut durchmischt. Direkt vor der Messung werden 5 ml Probenpuffer, 100 µl Reaktionspuffer und 5 µl Enzymlösung gemischt (Reaktionsgemisch).

Dann werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 10 µl Kalibrator bzw. Seminalplasmaproben pipettiert. Nach anschließender Zugabe von 100 µl Probenpuffer erfolgt die erste photometrische Messung bei 450 nm in einem ELISA-Reader.

Nun wird von dem vor der Messung frisch angesetzten Reaktionsgemisch 100 µl in jede Vertiefung zugegeben, bei 37 °C 15 Minuten inkubiert und dann jeweils 50 µl Stopplösung hinzugefügt. Die zweite photometrische Messung erfolgt wieder bei 450 nm.

Die Differenz beider Messergebnisse ( $\Delta$  OD) ist proportional zur Peroxidkonzentration der Proben. Die genaue Peroxidkonzentration einer Probe errechnet sich nach folgender Formel:

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

### **3.8. Patientinnen**

An dieser Studie nahmen 48 Paare teil, die sich in einem Zeitraum von 12 Monaten am Universitätsklinikum des Saarlandes entweder einer IVF- oder ICSI-Behandlung unterzogen.

Die Daten der Patientinnen wurden retrospektiv den Krankenakten entnommen. Die Patientinnen wurden nach einer Down-Regulation einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation unterzogen und anschließend transvaginal unter sonographischer Kontrolle punktiert. Die so gewonnenen Eizellen wurden kultiviert und zur weiteren Befruchtung verwendet (IVF bzw. ICSI).

Die ovarielle Hyperstimulation erfolgt nach dem Long-Protokoll. Dafür werden die Patientinnen ab dem 21. Tag des vorhergehenden Zyklus mit einem GnRH-Analogen (Gonadotropin-releasing-hormone), down-reguliert und anschließend erfolgt die Follikelstimulation ab Tag 1 des Punktionszyklus mit dem rekombinanten hCG (humanes Chorion-Gonadotropin) über subkutane Injektion von Decapeptyl®.

36 Stunden nach Ovulationsinduktion am 12. Stimulationstag mittels 10000 Injektionseinheiten (IU) hCG werden unter vaginal-sonographischer Kontrolle die Follikel durch den transvaginalen Zugang punktiert. Die somit gewonnenen Oozyten werden kultiviert und zur Befruchtung im Rahmen der IVF- bzw. ICSI-Behandlung verwendet. Etwa 48 Stunden nach Follikelpunktion erfolgt der transvaginale intrauterine Embryotransfer von maximal 3 morphologisch unauffälligen Embryonen. Zum Schwangerschaftsnachweis wird jeweils am 12. und am 14. Tag nach Embryotransfer eine quantitative HCG-Bestimmung im Serum der Patientinnen durchgeführt und die Schwangerschaft im Verlauf sonographisch kontrolliert. Die Lutealphase wird durch intravaginale Progesterongaben über 14 Tage unterstützt.

### **3.9. Fertilisation**

#### **3.9.1. In vitro Fertilisation (IVF)**

Nach der Punktion werden die gewonnenen Eizellen in Kulturmedium gewaschen und dann im Inkubator bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> aufbewahrt (Inkubator HERAEUS). Im gleichen

Medium werden die Eizellen anschließend auf eine Vier-Loch-Platte gesetzt. Die Spermien, welche bereits wie unter 3.2.2 beschrieben aufbereitet und durch Zentrifugation vom Seminalplasma isoliert wurden, werden jeweils jeder Kultur zugefügt. Nach einer Inkubationsphase von 15 bis 20 Stunden kann per Mikroskopie die erfolgte Befruchtung durch das Vorhandensein zweier Vorkerne (Pronuclei) überprüft werden. Die erfolgreich befruchteten Eizellen werden nun für weitere 24 Stunden inkubiert und spätestens im 8-Zell-Stadium in den Uterus transferiert. Es dürfen pro Patientin maximal 3 Embryonen transferiert werden, um das Risiko einer höhergradigen Mehrlingsschwangerschaft zu vermindern.

### **3.9.2. Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)**

#### **Benötigte Instrumentarien**

Ein Interphase-Differential-Mikroskop (NIKON/ NARISHIGE, Model IM-69, Japan), zwei Manipulations-Sets (NIKON/ NARISHIGE, Model MM-188, Japan), eine Haltepipette (10 MPH-120, 35°, Micro-Pipets, HUMAGEN, Charlottesville, USA) und eine Injektionspipette (10 MIC, 35°, Micro-Pipets, HUMAGEN, Charlottesville, USA).

#### **Prinzip**

Die Oozyten werden etwa 1 bis 2 Stunden nach der Punktion in ein 280 IU/ml Hyaluronidase enthaltendes Medium überführt, welches die Kumuluszellen von der Eizelle trennen soll. Die Ablösung des Kumulus erfolgt meist nach 1 bis 2 Minuten und wird mit Hilfe einer feinen Pipette mechanisch unterstützt. Damit kein weiteres maternales Erbmaterial in die Oozyte bei der Spermieninjektion mit eingebracht wird, ist die vollständige Entfernung der Kumuluszellen wichtig.

Die Oozyten werden in Kulturmedium, bestehend aus Ham's F 10 und 10 prozentigem inaktivierten Patientenserum bzw. Humanalbumin, mehrmals gewaschen und für mindestens 30 Minuten vor der Injektion im Kulturmedium belassen.

Mikroskopisch wird der Reifegrad der Eizellen überprüft. Hat die Eizelle ein Polkörperchen abgestoßen, entsprechend Metaphase II, wird diese als reif eingestuft und kann direkt für die Spermieninjektion verwendet werden.

Die unreifen Eizellen, welche ein Germinal vesicle aufzeigen, werden zur Überführung in die Metaphase II für etwa 24 Stunden bei 5 Prozent CO<sub>2</sub> und 37 °C in den Inkubator gestellt (Inkubator HERAEUS).

In die Mitte eines Kulturschälchens werden 5 µl 10 %iges Polyvinylpyrrolidon aufgetragen. Kreisförmig um den Zentraltropfen herum werden 8 Tropfen von 5 µl Kulturmedium aufgetragen und anschließend alle Tropfen mit sterilem Paraffin- oder Mineralöl abgedeckt. Auf jeden der 8 äußeren Tropfen wird eine Eizelle und auf den Zentraltropfen 1 µl aufbereitete Spermiasuspension pipettiert.

Unter dem Mikroskop wird ein Spermium durch Abbrechen der Geißel immobilisiert und in die Injektionspipette aspiriert. Die Oozyte wird zur weiteren Prozedur mittels Sog der Haltepipette fixiert. Hierbei sollte sich das Polkörperchen bei 12 oder 6 Uhr befinden, um eine Verletzung des Spindelapparates an der Injektionsstelle bei 3 Uhr zu verhindern (KÜPKER et al., 1998). Im 90 ° - Winkel wird das aspirierte, immobile Spermium in die Oozyte injiziert und anschließend die Injektionspipette langsam zurückgezogen (HAMMADEH, 1997). Nach der Injektion werden die Oozyten mehrfach mit Kulturmedium gewaschen und danach für 24 Stunden bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> inkubiert (Inkubator HERAEUS). Der Erfolg der Befruchtung wird durch das Vorhandensein des zweiten Polkörperchens kontrolliert. Ab diesem Zeitpunkt werden lediglich maximal 3 Eizellen für eine weitere Inkubation über 24 Stunden ausgewählt und für den anschließenden Embryotransfer bereitgestellt.



**Abb. 3-7: ICSI: Injektion eines immobilisierten Spermiums aus der 3 Uhr-Position in die Oozyte.**

### **3.10. Befruchtungsrate und Schwangerschaftsrate**

Die Befruchtungsrate wird mittels der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Befruchtungsrate (\%)} = (\text{befruchtete Eizellen/gewonnene Eizellen}) \times 100.$$

Die Schwangerschaftsrate errechnet sich durch folgende Formel:

$$\text{Schwangerschaftsrate (\%)} = (\text{alle Schwangeren/ alle Patientinnen}) \times 100.$$

### **3.11. Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde das SPSS-Programm Version 10.0 für Windows® verwendet.

### **3.11.1. Deskriptive Statistik**

Für die ermittelten Parameter wurden die Häufigkeitsverteilungen mit Mittelwert und Standardabweichung sowohl für das Gesamtkollektiv als auch getrennt für die IVF- und ICSI-Gruppe bestimmt.

### **3.11.2. Korrelation stetiger Merkmale**

Die Korrelation zwischen stetigen Merkmalen erfolgte mittels linearer Regression. Zur graphischen Darstellung wurden Streudiagramme erstellt.

### **3.11.3. Korrelation kategorialer Merkmale**

Die Korrelation zwischen kategorialen Merkmalen erfolgte durch den Chi-Quadrat-Test. Graphisch wurde der Zusammenhang mittels Boxplots verdeutlicht.

### **3.11.4. Korrelation kategorialer und stetiger Merkmale**

Die Korrelation zwischen kategorialen und stetigen Merkmalen, wobei das stetige Merkmal die abhängige Variable darstellte, wurde durch den T-Test für mathematische Stichproben und den Mann-Whitney-U-Test ermittelt, wobei die kategorialen Merkmale nur zwei Ausprägungen annehmen können. Stellte das kategoriale Merkmal die abhängige Variable dar, so wurde die Korrelation durch logistische Regression bestimmt.

Die graphische Darstellung erfolgte über Boxplots.

Zur Überprüfung der Varianzgleichheit wurde der Levene-Test herangezogen.

### **3.11.5. Signifikanzniveau**

Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als signifikant, ein p-Wert  $\leq 0.01$  als stark signifikant und ein p-Wert  $\leq 0.001$  als hoch signifikant bezeichnet.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vergleich der Ergebnisse zwischen IVF- und ICSI-Gruppe

#### 4.1.1. Parameter der klassischen Samenanalyse

Die erste Tabelle zeigt die Ergebnisse der klassischen Samenanalyse der IVF- und ICSI-Patienten gemeinsam als Gesamtkollektiv (n=48).

**Tab. 4-1: Parameter der klassischen Samenanalyse im Gesamtkollektiv (n=48).**

	IVF/ICSI (n=48)	
	M±SD	Median
Volumen (ml)	3.51±1.51	3.5
pH	8.57±0.34	8.5
Dichte (Mio/ml)	60.84±40.25	57.5
Globale Motilität (%)	32.19±19.51	30
Progressive Motilität (%)	3.33±6.95	17.5
Vitalität (Eosin) (%)	40.33±25.91	37.5
Membranintegrität (HOS) (%)	61.25±17.12	60
Dichte nach Aufbereitung (Mio/ml)	24.59±24.95	16.5
Motilität nach Aufbereitung (%)	60.31±30.08	75
Morphologie (normal) (%)	8.65±6.03	7.5

Nach Vorgabe der WHO-Norm liegen im Gesamtkollektiv Normalwerte für Volumen, pH-Wert, Dichte sowie Motilität nach der Aufbereitung vor. Unterhalb der Norm belaufen sich nur die Ergebnisse für globale und progressive Motilität, Vitalität, Membranintegrität und morphologische Normalformen.

Dagegen stellt Tabelle 4-2 die Ergebnisse bezüglich der IVF- (n=26) und der ICSI-Gruppe (n=22) einander gegenüber und zeigt deren Signifikanzunterschiede auf.

**Tab. 4-2: Parameter der klassischen Samenanalyse von IVF- oder ICSI-Patienten. Signifikanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen.**

	IVF (n=26)		ICSI (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	8.55±0.34	8.5	8.58±0.33	8.6	0.747
Dichte (Mio/ml)	73.85±34.92	75.0	45.47±41.44	30.0	0.013
Globale Motilität (%)	42.88±18.56	40.0	19.55±11.54	15.0	0.000
Progressive Motilität (%)	5.38±8.71	17.5	0.91±2.51	5.0	0.018
Vitalität (Eosin) (%)	48.85±23.85	50.0	30.27±25.09	20.0	0.012
Membranintegrität (HOS) (%)	61.73±18.65	65.0	60.68±15.53	60.0	0.835
Dichte 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
Morphologie (normal) (%)	9.58±5.67	10.5	7.55±6.38	6.5	0.249

In diesem Zusammenhang fällt auf, dass bezüglich des Volumens ( $p=0.542$ ), des pH-Wertes ( $p=0.747$ ), der Membranintegrität ( $p=0.835$ ), der Dichte nach Aufbereitung ( $p=0.126$ ) und der Morphologie ( $p=0.249$ ) zwischen der IVF- und der ICSI-Gruppe keine signifikanten Unterschiede bestehen. Vergleicht man jedoch die Dichte ( $p=0.013$ ), die progressive Motilität ( $p=0.018$ ) und die Vitalität ( $p=0.012$ ), so herrscht hier ein stark signifikanter Unterschied zwischen beiden beobachteten Gruppen.

Bezüglich der globalen Motilität ( $p=0.000$ ) und der Motilität nach Aufbereitung ( $p=0.000$ ) ist der Unterschied zwischen der IVF- und ICSI-Gruppe sogar als hoch signifikant anzusehen.

Die von der WHO festgesetzten Normalwerte erreicht die IVF-Gruppe für Volumen, pH-Wert, Dichte sowie Motilität nach Aufbereitung. Zu gering sind die Ergebnisse der progressiven und globalen Motilität, der Vitalität, der Membranintegrität, der Dichte nach Aufbereitung und morphologischen Normalformen.

Die ICSI-Gruppe dagegen erreicht die Normalwerte der Spermogramm-Parameter nur bezüglich des Volumens, des pH-Wertes und der Dichte. Globale und progressive Motilität, Vitalität, Dichte nach Aufbereitung, Motilität nach Aufbereitung und morphologische Normalformen unterschreiten hier die Grenze zum Normalwert.

#### 4.1.2. DNA-Strangbrüche und Chromatinkondensationsstatus

Tabelle 4-3 zeigt die Ergebnisse des Gesamtkollektivs bezüglich der Färbungen mit Acridine Orange und Chromomycin zur Bestimmung des Chromatinkondensationsstatus der Spermien sowie die Ergebnisse des TUNEL-Assays zur Messung der DNA-Strangbrüche.

**Tab. 4-3: Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung) und DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) im Gesamtkollektiv (n=48).**

	IVF/ICSI (n=48)	
	M±SD	Median
AO positiv (%)	96.38±5.70	98.50
TUNEL grün (%)	5.02±4.38	4.00
CMA3 nicht-leuchtend (%)	71.02±19.39	75.00

Im Gesamtkollektiv wird mittels der Acridine Orange-Färbung mit 96.38 Prozent eine hohe Anzahl von normalen Kernen der Spermienköpfe nachgewiesen. Der Chromatinstatus, gemessen mittels Chromomycin-Färbung, erreicht mit 71.02 Prozent im Mittelwert ein etwas schlechteres Ergebnis. Die Anzahl der DNA-Strangbrüche der Spermien nach Ergebnis des TUNEL-Assays ist mit einem Mittelwert von 5.02 Prozent als gering einzustufen.

Die folgende Tabelle 4-4 schlüsselt wiederum die Resultate der Anzahl der DNA-Strangbrüche und der Anzahl von Kernanomalien nach der jeweiligen Patientengruppe in IVF oder ICSI auf.

**Tab. 4-4: Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung) und DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) in der IVF- und ICSI-Gruppe. Signifikanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen.**

	IVF (n=26)		ICSI (n=22)		p-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
AO positiv (%)	98.04±2.74	99.50	94.41±7.51	98.0	0.041
TUNEL grün (%)	4.38±3.82	3.50	5.77±4.95	5.0	0.279
CMA3 nicht-leuchtend (%)	79.88±11.62	84.00	60.55±21.64	66.5	0.000

Die deutlich besseren Ergebnisse der Färbemethoden zur Beurteilung des Chromatinstatus erreichen die Patienten der IVF-Gruppe mit Mittelwerten der mit Acridine Orange gelb-grün gefärbten Spermienköpfe von 98.04 Prozent und der mit Chromomycin nicht-leuchtenden Spermienköpfe von 79.88 Prozent. Die Patienten der ICSI-Gruppe erreichen in der Acridine Orange-Färbung nur einen Mittelwert von 94.41 Prozent gelb-grüne Spermienköpfe und nur 60.55 Prozent nicht-leuchtende Spermienköpfe in der Chromomycin-Färbung. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist bei der Acridine Orange-Färbung ( $p=0.041$ ) als signifikant und bei der Chromomycin-Färbung ( $p=0.000$ ) sogar als hoch-signifikant einzustufen.

Im Unterschied dazu sind bei dem TUNEL-Assay die Ergebnisse mit einem Mittelwert der Anzahl der DNA-Strangbrüche von 4.38 Prozent in der IVF- und 5.77 Prozent in der ICSI-Gruppe von geringer Differenz. Zwischen den beiden Gruppen liegt kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der DNA-Strangbrüche vor ( $p=0.279$ ).

#### 4.1.3. Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma

Tabelle 4-5 listet die Ergebnisse der Konzentrationen von Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma des Gesamtkollektivs auf.

**Tab. 4-5: Konzentrationen von Albumin, Ferritin, Transferrin, totaler Antioxidantienstatus (TAS) und reactive oxygen species (ROS) im Gesamtkollektiv (n=48).**

	IVF/ICSI (n=48)	
	M $\pm$ SD	Median
Albumin (g/l)	7.59 $\pm$ 3.86	6.4
Ferritin (ng/ml)	264.10 $\pm$ 126.25	235.5
Transferrin (mg/dl)	4.23 $\pm$ 4.43	3.0
TAS (mmol/l)	1.48 $\pm$ 0.26	1.45
ROS ( $\mu$ mol/l)	76.42 $\pm$ 82.09	51.94

Ob diese Ergebnisse Normalwerten entsprechen oder nicht, ist relativ schwer zu beurteilen, da sich in der Literatur sehr verschiedene Meinungen diesbezüglich verteilen. Im folgenden Kapitel soll diese Thematik aber noch einmal behandelt werden.

Der Vergleich der Konzentrationen der Oxidantien und Antioxidantien in beiden Patientengruppen wird in Tabelle 4-6 ersichtlich.

**Tab. 4-6: Konzentrationen von Antioxidantien und reactive oxygen species (ROS) der IVF- oder ICSI-Gruppe. Signifikanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen.**

	IVF (n=26)		ICSI (n=22)		p-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
Albumin (g/l)	8.46±5.05	6.45	6.57±0.96	6.3	0.074
Ferritin (ng/ml)	241.23±139.33	206.5	291.14±105.60	279.5	0.175
Transferrin (mg/dl)	3.62±4.85	2.00	4.96±3.86	4.0	0.302
TAS (mmol/l)	1.43±0.28	1.45	1.53±0.22	1.45	0.153
ROS (µmol/l)	94.73±102.84	62.15	54.78±39.83	44.85	0.093

In der IVF-Gruppe wurden im Mittelwert höhere Mengen an Albumin (8.46 g/l) und ROS (94.73 µmol/l) gemessen als im ICSI-Kollektiv (Mittelwert für Albumin 6.57 g/l, für ROS 54.78 µmol/l). Ferritin mit 291.14 ng/ml, Transferrin mit 4.96 mg/dl und TAS mit 1.53 mmol/l sind im Mittelwert vermehrt im Seminalplasma der ICSI-Patienten vorhanden gegenüber der IVF-Gruppe (Mittelwerte für Ferritin 241.23 ng/ml, für Transferrin 3.62 mg/dl und für TAS 1.43 mmol/l).

Jedoch liegen keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen von Oxidantien (ROS mit p=0.093) und der Konzentrationen von Antioxidantien (Albumin mit p=0.074, Ferritin mit p=0.175, Transferrin mit p=0.302 und TAS mit p=0.153) zwischen der IVF- und ICSI-Gruppe vor.

#### **4.1.4. Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate**

Tabelle 4-7 gibt einen Gesamtüberblick bezüglich der IVF- und ICSI-Ergebnisse. Aufgeführt werden die Anzahl gewonnener, fertilisierter und transferierter Eizellen sowie die Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten des Gesamtkollektivs. Von den untersuchten 48 Paaren kam es in 15 Fällen zur Entstehung einer Schwangerschaft.

**Tab. 4-7: Anzahl gewonnener, befruchteter, transferierter Eizellen mit Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate sowie Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv (n=48).**

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

Tabelle 4-8 zeigt den Vergleich der oben genannten Parameter zwischen den beiden verschiedenen Patientengruppen.

**Tab. 4-8: IVF- und ICSI-Ergebnisse. Signifikanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen.**

	IVF (n=26)		ICSI (n=22)		p-Wert
	M±SD	Median	M±SD	Median	
Gewonnene Eizellen	10.69±7.24	9.00	9.09±4.14	9.00	0.364
Fertilisierte Eizellen	5.46±6.59	3.00	5.36±3.62	5.00	0.951
Fertilisationsrate (%)	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	---	---

Im IVF-Kollektiv können mehr Eizellen gewonnen (Mittelwert=10.46) und fertilisiert (Mittelwert=5.46) werden als in der ICSI-Gruppe (Mittelwerte=9.09 und 5.36). Außerdem zeigt sich eine höhere Schwangerschaftsrate (42.3 Prozent) und eine höhere Zahl der absoluten Schwangerschaften (11) im IVF-Kollektiv gegenüber der ICSI-Gruppe (Schwangerschaftsrate=18.20 Prozent und Zahl der absoluten Schwangerschaften=4). Betrachtet man die Befruchtungsrate und die Zahl der transferierten Zellen, so erreichen die ICSI-Patienten etwas bessere Ergebnisse (67.87 Prozent und Mittelwert=2.18) gegenüber der IVF-Gruppe (67.26 Prozent und Mittelwert=1.73).

Dennoch sind die Unterschiede zwischen den Patientengruppen bezüglich keines der Parameter signifikant.

## 4.2. Zusammenhang zwischen Anzahl der DNA-Strangbrüche/ Chromatinkondensationsstatus und Parameter der klassischen Samenanalyse

Die Ergebnisse der klassischen Samenanalyse werden in Tabelle 4-9 mit denen der Färbungen zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus bzw. der Anzahl der DNA-Strangbrüche im Gesamtkollektiv in Zusammenhang gestellt.

**Tab. 4-9: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und Parametern der klassischen Samenanalyse im Gesamtkollektiv (n=48).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Volumen	r	0.085	-0.028	0.197
	p	0.568	0.849	0.179
pH	r	0.073	-0.064	0.193
	p	0.623	0.664	0.189
Dichte	r	0.260	0.437	0.020
	p	0.074	0.002	0.891
Globale Motilität	r	0.192	0.457	-0.078
	p	0.191	0.001	0.600
Progressive Motilität	r	0.110	0.299	-0.167
	p	0.456	0.039	0.258
Vitalität (Eosin)	r	0.172	0.336	-0.108
	p	0.241	0.019	0.467
Membranintegrität (HOS)	r	-0.235	0.272	-0.237
	p	0.108	0.061	0.105
Dichte nach Aufbereitung	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
Morphologie (gut)	r	0.204	0.319	0.127
	p	0.164	0.027	0.391

Die Ergebnisse der Acridine Orange-Färbung, verglichen mit den Parametern der klassischen Samenanalyse, zeigen bis auf das Resultat des HOS-Testes positive Korrelationen. Diese Zusammenhänge können allerdings nicht als signifikant gewertet werden (bezüglich der p-Werte).

Betrachtet man den Vergleich zwischen den Resultaten der Chromomycin-Färbung (DNA-Integrität) und den Parametern der klassischen Samenanalyse, so findet man lediglich bei

der Volumen- und pH-Bestimmung negative Korrelationen zur vollständigen Chromatinkondensation (nicht-leuchtende Spermienköpfe). Ansonsten liegen nur positive Korrelationen vor. Signifikante Zusammenhänge herrschen bezüglich der progressiven Motilität ( $p=0.039$ ,  $r=0.299$ ), der Vitalität ( $p=0.019$ ,  $r=0.336$ ) und den morphologischen Normalformen ( $p=0.027$ ,  $r=0.319$ ) zur vollständigen Chromatinkondensation. Stark signifikante Zusammenhänge findet man zwischen der Spermiedichte ( $p=0.002$ ,  $r=0.437$ ) und sogar hochsignifikante Zusammenhänge zwischen globaler Motilität ( $p=0.001$ ,  $r=0.457$ ) und der Motilität nach Aufbereitung ( $p=0.000$ ,  $r=0.569$ ) mit den nicht-leuchtenden, mit vollständig kondensiertem Chromatin ausgestatteten Spermienköpfen in der Chromomycin-Färbung.

Die Resultate der DNA-Strangbrüche im TUNEL-Assay zeigen einen nicht signifikanten Zusammenhang mit den Parametern der klassischen Samenanalyse. Es bestehen negative Korrelationen zwischen globaler und progressiver Motilität sowie Vitalität, Membranintegrität und Motilität nach Aufbereitung mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche. Positive Korrelationen können zwischen Volumen, pH-Wert, Dichte, Dichte nach Aufbereitung und den morphologischen Normalformen mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche gefunden werden.

Der Zusammenhang zwischen dem Chromatinkondensationsstatus beziehungsweise der Anzahl der DNA-Strangbrüche und Parametern der klassischen Samenanalyse in der IVF-Gruppe werden in Tabelle 4-10 erläutert.



**Tab. 4-10: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und Parametern der klassischen Samenanalyse in der IVF-Gruppe (n=26).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Volumen	r	0.359	-0.290	0.629
	P	0.071	0.151	0.001
pH	r	-0.023	0.000	-0.076
	p	0.910	0.998	0.713
Dichte	r	0.205	0.392	0.094
	p	0.314	0.048	0.646
Globale Motilität	r	-0.096	0.375	0.094
	p	0.640	0.059	0.649
Progressive Motilität	r	0.024	0.159	-0.143
	p	0.906	0.439	0.487
Vitalität (Eosin)	r	-0.204	0.175	-0.091
	p	0.318	0.393	0.657
Membranintegrität (HOS)	r	-0.450	0.321	-0.164
	p	0.021	0.110	0.424
Dichte nach Aufbereitung	r	0.113	-0.063	0.474
	p	0.583	0.758	0.015
Motilität nach Aufbereitung	r	0.168	0.337	-0.101
	p	0.411	0.092	0.624
Morphologie (gut)	r	0.260	0.014	0.382
	p	0.199	0.944	0.054

Der Vergleich der Parameter der klassischen Samenanalyse mit den Ergebnissen der Acridine Orange-Färbung zeigt positive Korrelationen bezüglich vollständiger Chromatinkondensation und Volumen, Spermiedichte, progressiver Motilität, Dichte nach Aufbereitung, Motilität nach Aufbereitung sowie morphologischer Normalformen. Zwischen pH-Wert, globaler Motilität, Vitalität, Membranintegrität und vollständiger Chromatinkondensation, gemessen mit Acridine Orange-Färbung, herrschen negative Korrelationen. Einen signifikanten, negativen Zusammenhang findet man zwischen vollständiger Chromatinkondensation und der Membranintegrität ( $p=0.021$ ,  $r=-0.450$ ).

Betrachtet man die Parameter der klassischen Samenanalyse im Vergleich zu den Ergebnissen der Chromomycin-Färbung, so zeigen sich positive Korrelationen zwischen pH-Wert, Dichte, globaler und progressiver Motilität, Vitalität, Membranintegrität, Motilität nach Aufbereitung sowie morphologischen Normalformen mit der vollständigen Chromatinkondensation. Negative Korrelationen wiederum haben Volumen und

Spermiendichte nach Aufbereitung mit der vollständigen Chromatinkondensation. Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen der vollständigen Chromatinkondensation und der Dichte ( $p=0.048$ ,  $r=0.392$ ).

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche, gemessen mittels des TUNEL-Assays, zeigt sich positiv korrelierend zu Volumen, Dichte, globaler Motilität, Dichte nach Aufbereitung und morphologischen Normalformen und dagegen negativ korrelierend zu pH-Wert, progressiver Motilität, Vitalität, Membranintegrität und Motilität nach Aufbereitung. Der Zusammenhang zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und Spermiendichte nach Aufbereitung wird als signifikant ( $p=0.015$ ,  $r=0.474$ ) und zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und Volumen als hoch signifikant ( $p=0.001$ ,  $r=0.629$ ) angesehen.

Die folgende Tabelle 4-11 bezieht sich im gleichen Zusammenhang auf das ICSI-Kollektiv.

**Tab. 4-11: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ Anzahl der DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und Parametern der klassischen Samenanalyse in der ICSI-Gruppe (n=22).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Volumen	r	-0.050	0.026	-0.119
	p	0.826	0.909	0.597
pH	r	0.162	-0.081	0.444
	p	0.472	0.719	0.038
Dichte	r	0.167	0.294	0.075
	p	0.458	0.185	0.740
Globale Motilität	r	0.065	0.139	-0.077
	p	0.772	0.536	0.733
Progressive Motilität	r	-0.008	0.403	-0.175
	p	0.972	0.063	0.437
Vitalität (Eosin)	r	0.184	0.214	0.022
	p	0.412	0.338	0.921
Membranintegrität (HOS)	r	-0.223	0.321	-0.326
	p	0.318	0.146	0.138
Dichte nach Aufbereitung	r	0.122	0.108	-0.135
	p	0.587	0.633	0.548
Motilität nach Aufbereitung	r	0.049	0.380	0.027
	p	0.830	0.081	0.905
Morphologie (gut)	r	0.140	0.435	-0.025
	p	0.534	0.043	0.914

Nach dieser Tabelle zeigen sich positive Korrelationen zwischen der vollständigen Chromatinkondensation, gemessen mit der Acridine Orange-Färbung, und dem pH-Wert, der Dichte, der globalen Motilität, der Vitalität, der Dichte nach Aufbereitung, der Motilität nach Aufbereitung und den morphologischen Normalformen.

Betrachtet man die mit der Chromomycin-Färbung nicht-leuchtenden Spermienköpfe, so finden sich außer einer negativen Korrelation zum pH-Wert nur positive Korrelationen. Ein signifikanter Zusammenhang kann außerdem zwischen den morphologischen Normalformen und der Chromatinkondensation in der Chromomycin-Färbung ( $p=0.043$ ,  $r=0.435$ ) bestätigt werden.

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche, gemessen mittels TUNEL-Assay, korreliert lediglich positiv mit dem pH-Wert, der Dichte, der Vitalität und der Motilität nach Aufbereitung. Der einzige signifikante Zusammenhang lässt sich hier nur zum pH-Wert ( $p=0.038$ ,  $r=0.444$ ) feststellen.

#### **4.3. Zusammenhang zwischen Parametern der klassischen Samenanalyse und Oxidantien- / Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma**

Tabelle 4-12 bringt die Parameter der klassischen Samenanalyse mit den Oxidantien und Antioxidantien im Gesamtkollektiv miteinander in Verbindung.

**Tab. 4-12: Korrelation zwischen Albumin, Ferritin, Transferrin und Parametern der klassischen Samenanalyse im Gesamtkollektiv (n=48).**

		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Volumen	r	-0.208	-0.022	-0.146	0.070	-0.002
	p	0.156	0.882	0.321	0.637	0.991
pH	r	-0.084	-0.164	0.008	-0.282	0.232
	p	0.568	0.266	0.955	0.052	0.112
Dichte	r	0.150	0.150	0.252	0.108	0.188
	p	0.476	0.308	0.085	0.463	0.201
Globale Motilität	r	0.021	-0.251	-0.310	-0.313	0.083
	p	0.887	0.086	0.032	0.030	0.575
Progressive Motilität	r	-0.137	-0.252	-0.340	-0.409	0.173
	p	0.353	0.083	0.018	0.004	0.241
Vitalität (Eosin)	r	0.059	-0.110	-0.200	-0.074	-0.111
	p	0.692	0.458	0.173	0.616	0.453
Membranintegrität (HOS)	r	0.156	-0.051	0.075	0.209	-0.042
	p	0.289	0.919	0.614	0.154	0.778
Dichte nach Aufbereitung	r	0.018	-0.024	-0.011	-0.069	-0.078
	p	0.901	0.874	0.939	0.640	0.597
Motilität nach Aufbereitung	r	0.143	-0.123	-0.060	-0.150	0.169
	p	0.333	0.405	0.683	0.310	0.251
Morphologie (gut)	r	0.022	-0.235	-0.221	-0.321	-0.141
	p	0.882	0.107	0.130	0.026	0.340

Zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und den Oxidantien (ROS) können an keiner Stelle signifikante Korrelationen ermittelt werden.

Ebenso zeigen sich keine Signifikanzen zwischen Albumin und Ferritin mit den Routineparametern der klassischen Samenanalyse.

Dagegen finden sich mehrere signifikante Zusammenhänge bei Betrachtung von sowohl Transferrin als auch TAS in Verbindung mit der globalen und progressiven Motilität. So bestehen signifikante, negative Korrelationen zwischen Transferrin und der globalen ( $p=0.032$ ,  $r=-0.310$ ) und progressiven ( $p=0.018$ ,  $r=-0.340$ ) Motilität. TAS wiederum korreliert signifikant negativ mit der globalen ( $p=0.030$ ,  $r=-0.313$ ) und stark signifikant negativ mit der progressiven Motilität ( $p=0.004$ ,  $r=-0.409$ ).

Zusätzlich findet sich noch ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen TAS und den morphologischen Normalformen ( $p=0.026$ ,  $r=-0.321$ ).

Der Zusammenhang zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und den Oxidantien beziehungsweise Antioxidantien im IVF-Kollektiv wird in Tabelle 4-13 dargestellt.

**Tab. 4-13: Korrelation zwischen Albumin, Ferritin, Transferrin und Parametern der klassischen Samenanalyse in der IVF-Gruppe (n=26).**

		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Volumen	r	-0.391	0.226	-0.064	0.007	-0.164
	p	0.048	0.226	0.755	0.974	0.423
pH	r	-0.063	-0.347	-0.184	-0.449	0.516
	p	0.761	0.082	0.367	0.021	0.007
Dichte	r	-0.020	0.397	0.296	0.165	0.361
	p	0.923	0.044	0.141	0.420	0.070
Globale Motilität	r	-0.207	-0.242	-0.458	-0.499	-0.108
	p	0.311	0.233	0.019	0.009	0.601
Progressive Motilität	r	-0.260	-0.265	-0.418	-0.492	0.120
	p	0.199	0.191	0.034	0.011	0.558
Vitalität (Eosin)	r	-0.093	-0.069	-0.381	0.045	-0.288
	p	0.652	0.739	0.055	0.826	0.153
Membranintegrität (HOS)	r	0.170	-0.106	-0.158	0.102	-0.039
	p	0.407	0.607	0.440	0.620	0.852
Dichte nach Aufbereitung	r	-0.087	-0.007	-0.212	-0.373	-0.132
	p	0.672	0.973	0.299	0.060	0.522
Motilität nach Aufbereitung	r	-0.051	0.094	0.010	-0.157	0.125
	p	0.805	0.648	0.963	0.444	0.542
Morphologie (gut)	r	-0.067	-0.327	-0.279	-0.354	-0.297
	p	0.744	0.103	0.167	0.076	0.140

Bei Betrachtung der Oxidantien (ROS) in Korrelation mit den Parametern der klassischen Samenanalyse besteht hier ein stark signifikanter positiver Zusammenhang mit dem pH-Wert ( $p=0.007$ ,  $r=0.516$ ).

Weitere signifikante, jedoch negative Korrelationen existieren zwischen Albumin und dem Volumen ( $p=0.048$ ,  $r=-0.391$ ), Transferrin und globaler Motilität ( $p=0.019$ ,  $r=-0.458$ ), Transferrin und progressiver Motilität ( $p=0.034$ ,  $r=-0.418$ ), TAS und pH-Wert ( $p=0.021$ ,  $r=-0.449$ ) sowie zwischen TAS und progressiver Motilität ( $p=0.011$ ,  $r=-0.492$ ).

Ein stark signifikanter negativer Zusammenhang kann zwischen TAS und der globalen Motilität festgestellt werden ( $p=0.009$ ,  $r=-0.499$ ).

Außerdem korreliert der Ferritingehalt signifikant positiv mit der Spermiedichte ( $p=0.044$ ,  $r=0.397$ ).

**Tab. 4-14: Korrelation zwischen Albumin, Ferritin, Transferrin und Parametern der klassischen Samenanalyse in der ICSI-Gruppe (n=22).**

		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Volumen	r	0.230	-0.323	-0.232	0.204	0.343
	p	0.304	0.142	0.298	0.363	0.118
pH	r	-0.253	0.098	0.289	-0.073	-0.510
	p	0.256	0.666	0.192	0.746	0.015
Dichte	r	0.264	0.048	0.389	0.251	-0.482
	p	0.234	0.830	0.074	0.260	0.023
Globale Motilität	r	0.152	0.019	0.155	0.370	0.028
	p	0.501	0.932	0.492	0.090	0.901
Progressive Motilität	r	0.269	0.972	0.103	0.091	-0.096
	p	0.227	0.053	0.648	0.686	0.670
Vitalität (Eosin)	r	0.276	-0.002	0.157	0.334	-0.107
	p	0.213	0.992	0.484	0.129	0.635
Membranintegrität (HOS)	r	0.196	0.173	0.509	0.430	-0.108
	p	0.381	0.440	0.016	0.046	0.632
Dichte nach Aufbereitung	r	0.230	0.070	0.391	0.514	-0.217
	p	0.304	0.757	0.072	0.014	0.333
Motilität nach Aufbereitung	r	-0.005	-0.048	0.090	0.067	-0.125
	p	0.981	0.831	0.692	0.767	0.579
Morphologie (gut)	r	0.208	-0.054	-0.103	-0.230	0.017
	p	0.353	0.811	0.647	0.303	0.939

In diesem Kollektiv existieren signifikante negative Zusammenhänge sowohl zwischen ROS und dem pH-Wert ( $p=0.015$ ,  $r=-0.510$ ) als auch zwischen ROS und der Spermiedichte ( $p=0.023$ ,  $r=-0.482$ ).

Weitere signifikante positive Korrelationen liegen sowohl zwischen Transferrin und der Membranintegrität ( $p=0.016$ ,  $r=0.509$ ), TAS und der Membranintegrität ( $p=0.046$ ,  $r=0.430$ ) als auch zwischen TAS und der Dichte nach Aufbereitung ( $p=0.014$ ,  $r=0.514$ ) vor.

#### **4.4. Zusammenhang zwischen Oxidantien- / Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und der Anzahl der DNA-Strangbrüche/ Chromatinkondensationsstatus**

Die Zusammenhänge zwischen den Oxidantien beziehungsweise Antioxidantien im Seminalplasma und der Anzahl der DNA-Strangbrüche und dem Chromatinkondensationsstatus werden hier dargestellt.

Die folgende Tabelle 4-15 bezieht sich auf das gesamte Patientenkollektiv.

**Tab. 4-15: Korrelation zwischen totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS), Albumin, Ferritin, Transferrin und Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) im Gesamtkollektiv (n=48).**

		TAS	ROS	Albumin	Ferritin	Transferrin
AO positiv	r	-0.066	0.150	0.114	0.037	0.009
	p	0.654	0.308	0.439	0.805	0.951
TUNEL grün	r	-0.117	-0.010	-0.243	0.237	-0.039
	p	0.426	0.948	0.096	0.104	0.794
CMA3 nicht-leuchtend	r	0.010	0.228	0.220	-0.074	0.024
	p	0.944	0.119	0.133	0.617	0.872

Es ist festzustellen, dass hier weder positive noch negative signifikante Korrelationen zwischen den aufgeführten Parametern im Gesamtkollektiv gefunden werden können.

Es folgt die Beobachtung des gleichen Zusammenhangs, jetzt jedoch bezogen auf die IVF-Gruppe.

**Tab. 4-16: Korrelation zwischen totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS), Albumin, Ferritin, Transferrin und Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) von IVF-Patienten (n=26).**

		TAS	ROS	Albumin	Ferritin	Transferrin
AO positiv	r	-0.091	0.310	-0.038	0.254	0.205
	p	0.660	0.123	0.689	0.210	0.315
TUNEL grün	r	-0.216	-0.005	-0.297	0.268	0.021
	p	0.290	0.981	0.141	0.185	0.918
CMA3 nicht-leuchtend	r	0.114	-0.082	0.221	0.023	0.084
	p	0.580	0.691	0.278	0.911	0.682

Ähnlich der Ergebnisse des Gesamtkollektivs finden sich auch hier keinerlei statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den geprüften Parametern.

Tabelle 4-17 stellt die Zusammenhänge der Oxidantien beziehungsweise Antioxidantien im Seminalplasma mit dem Chromatinkondensationsstatus und der Apoptoserate im ICSI-Kollektiv her.

**Tab. 4-17: Korrelation zwischen totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS), Albumin, Ferritin, Transferrin und Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) von ICSI - Patienten (n=22).**

		TAS	ROS	Albumin	Ferritin	Transferrin
AO positiv	r	0.050	-0.098	0.434	0.058	0.001
	p	0.824	0.664	0.044	0.798	0.998
TUNEL grün	r	-0.098	0.132	-0.186	0.162	-0.168
	p	0.665	0.557	0.407	0.472	0.456
CMA3 nicht-leuchtend	r	-0.356	-0.299	0.037	0.043	0.163
	p	0.104	0.177	0.871	0.851	0.468

Hier zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Albumingehalt des Seminalplasmas und der vollständigen Chromatinkondensation, ermittelt mit der Acridine Orange-Färbung ( $p=0.044$ ,  $r=0.434$ ).

Die übrigen Resultate zeigen keine signifikanten Korrelationen.

#### **4.5. Zusammenhang zwischen DNA-Strangbrüchen/ Chromatinkondensationsstatus und Befruchtungs- / Schwangerschaftsrate**

Dieser Abschnitt behandelt mögliche Zusammenhänge zwischen dem Chromatinkondensationsstatus und der Anzahl der DNA-Strangbrüche mit den Ergebnissen der verschiedenen Fertilisationsmethoden.



**Tab. 4-18: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und IVF-/ ICSI-Ergebnis (n=48).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Gewonnene Eizellen	r	0.013	0.004	-0.201
	p	0.928	0.976	0.171
Fertilisierte Eizellen	r	-0.092	-0.028	-0.078
	p	0.535	0.850	0.599
Fertilisationsrate	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

Es zeigen sich keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen den hier beobachteten Parametern im Gesamtkollektiv.

**Tab. 4-19: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und IVF-Ergebnis (n=26).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Gewonnene Eizellen	r	-0.204	0.255	-0.147
	p	0.317	0.208	0.473
Fertilisierte Eizellen	r	-0.144	0.211	0.002
	p	0.482	0.300	0.992
Fertilisationsrate	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

Auch hier finden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen der untersuchten Parameter im IVF-Kollektiv.

Anschließend stellt die Tabelle 4-20 die oben genannten Parameter in der ICSI-Patientengruppe zueinander in Beziehung.

**Tab. 4-20: Korrelation zwischen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung)/ DNA-Strangbrüche (TUNEL-Assay) und ICSI-Ergebnis (n=22).**

		AO positiv	CMA3 nicht-leuchtend	TUNEL grün
Gewonnene Eizellen	r	0.083	-0.469	-0.280
	p	0.713	0.028	0.206
Fertilisierte Eizellen	r	-0.125	-0.344	-0.229
	p	0.580	0.117	0.305
Fertilisationsrate	r	-0.144	-0.011	-0.106
	p	0.522	0.961	0.639
Transferierte Eizellen	r	0.218	-0.061	0.217
	p	0.329	0.786	0.332
Schwangerschaften	r	0.075	-0.308	0.047
	p	0.742	0.164	0.837

Es zeigt sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der Anzahl gewonnener Eizellen und der vollständigen Chromatinkondensation, gemessen mittels der nicht-leuchtenden Spermienköpfe in der Chromomycin-Färbung (p=0.028, r=-0.469).

Ansonsten sind keine der verglichenen Parameter in signifikanter Korrelation zu sehen.

#### **4.6. Zusammenhang zwischen Oxidantien- / Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und Befruchtungs- / Schwangerschaftsrate**

In diesem Abschnitt und in der folgenden Tabelle 4-21 wird der Zusammenhang zwischen den Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma in Abhängigkeit zu den Resultaten der künstlichen Fertilisation, bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv behandelt.

**Tab. 4-21: Korrelation zwischen Albumin, Transferrin, Ferritin, totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS) und IVF-/ ICSI-Ergebnis (n=48).**

		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Gewonnene Eizellen	r	0.488	-0.062	0.053	-0.287	-0.158
	p	0.000	0.676	0.720	0.048	0.282
Fertilisierte Eizellen	r	0.437	-0.024	0.070	-0.211	-0.256
	p	0.002	0.870	0.637	0.149	0.079
Fertilisationsrate	r	0.033	-0.022	0.019	0.081	-0.290
	p	0.822	0.883	0.897	0.584	0.045
Transferierte Eizellen	r	-0.149	0.054	-0.084	0.057	0.042
	p	0.313	0.713	0.570	0.699	0.778
Schwangerschaften	r	0.104	-0.151	-0.097	-0.064	0.051
	p	0.482	0.306	0.513	0.664	0.730

Auffällig sind hier einige signifikante Zusammenhänge, wie zum Beispiel eine signifikante negative Korrelation zwischen ROS und der Fertilisationsrate ( $p=0.045$ ,  $r=-0.290$ ).

Darüber hinaus korreliert auch TAS signifikant, aber negativ mit der Anzahl gewonnener Eizellen ( $p=0.048$ ,  $r=-0.287$ ), und Albumin korreliert sowohl stark signifikant mit der Anzahl fertilisierter Eizellen ( $p=0.002$ ,  $r=0.437$ ) als auch hoch signifikant mit der Anzahl gewonnener Eizellen ( $p=0.000$ ,  $r=0.488$ ).

**Tab. 4-22: Korrelation zwischen Albumin, Transferrin, Ferritin, totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS) und IVF-Ergebnis (n=26).**

		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Gewonnene Eizellen	r	0.529	0.029	0.099	-0.241	-0.174
	p	0.005	0.890	0.631	0.236	0.396
Fertilisierte Eizellen	r	0.529	0.110	0.168	-0.216	-0.261
	p	0.005	0.594	0.411	0.289	0.198
Fertilisationsrate	r	0.140	0.000	0.010	-0.031	-0.267
	p	0.495	0.998	0.961	0.881	0.187
Transferierte Eizellen	r	-0.088	0.141	-0.072	0.001	0.125
	p	0.670	0.492	0.728	0.997	0.543
Schwangerschaften	r	0.033	-0.069	0.004	0.005	0.006
	p	0.872	0.737	0.985	0.980	0.976

So liegt auch in der IVF-Gruppe ein stark signifikanter Zusammenhang zwischen Albumin und der Zahl gewonnener ( $p=0.005$ ,  $r=0.529$ ) als auch fertilisierter Eizellen ( $p=0.005$ ,  $r=0.529$ ) vor. Weiterhin finden sich in dieser Tabelle keine weiteren signifikanten Ergebnisse.

Die nachfolgende Tabelle 4-23 bezieht sich im gleichen Zusammenhang auf das ICSI-Patientenkollektiv. Auch hier finden sich keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern.

**Tab. 4-23: Korrelation zwischen Albumin, Transferrin, Ferritin, totalem Antioxidantienstatus (TAS), reactive oxygen species (ROS) und ICSI-Ergebnis (n=22).**

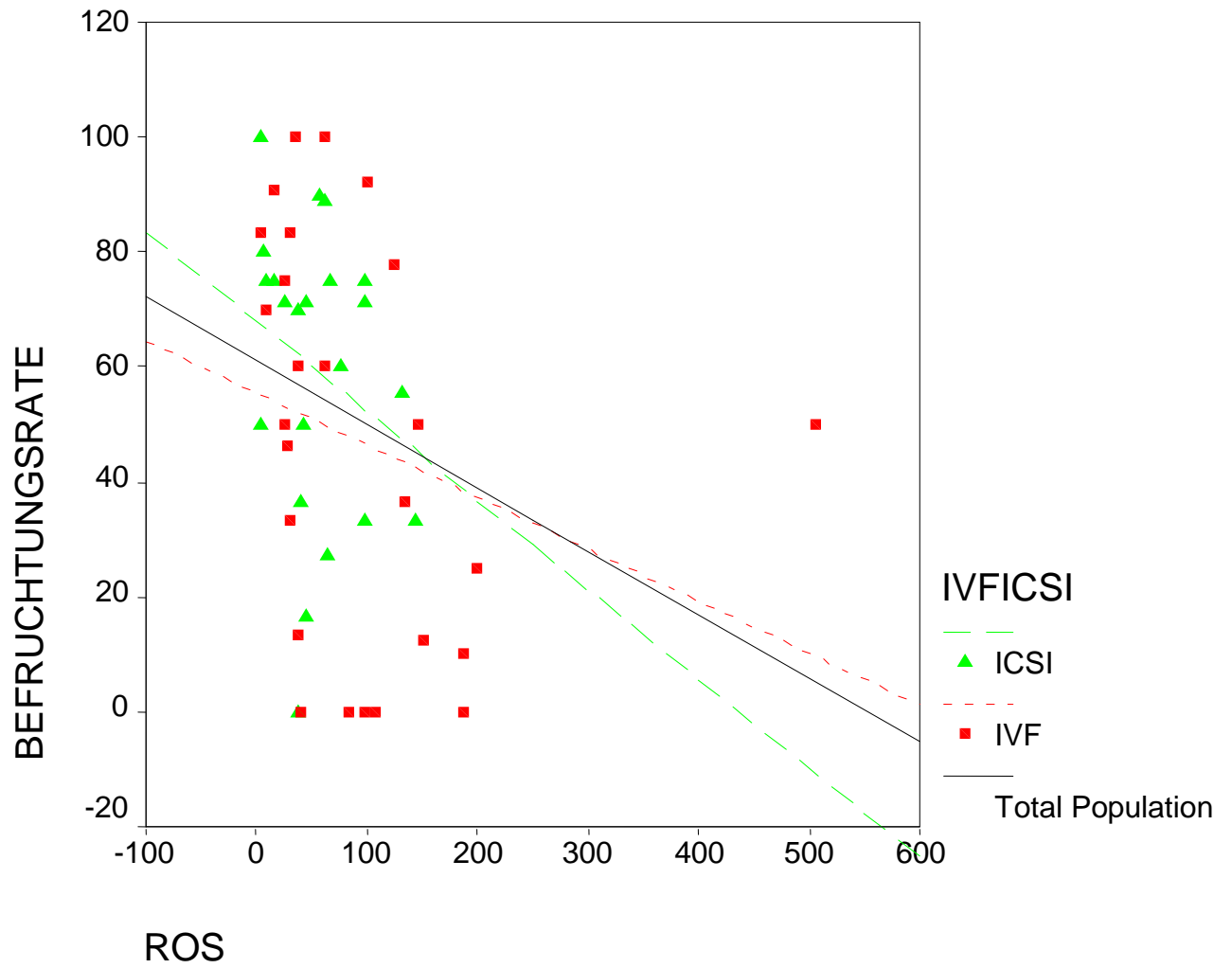
		Albumin	Ferritin	Transferrin	TAS	ROS
Gewonnene Eizellen	r	0.148	-0.215	0.015	-0.345	-0.348
	p	0.510	0.336	0.947	0.116	0.113
Fertilisierte Eizellen	r	-0.230	-0.403	-0.186	-0.220	-0.313
	p	0.303	0.063	0.407	0.324	0.156
Fertilisationsrate	r	-0.286	-0.202	-0.056	0.184	-0.241
	p	0.197	0.368	0.805	0.412	0.280
Transferierte Eizellen	r	-0.243	-0.261	-0.230	0.017	0.065
	p	0.274	0.241	0.303	0.938	0.774
Schwangerschaften	r	0.165	-0.177	-0.182	-0.040	-0.092
	p	0.464	0.432	0.418	0.859	0.683

#### 4.7. Graphische Darstellungen

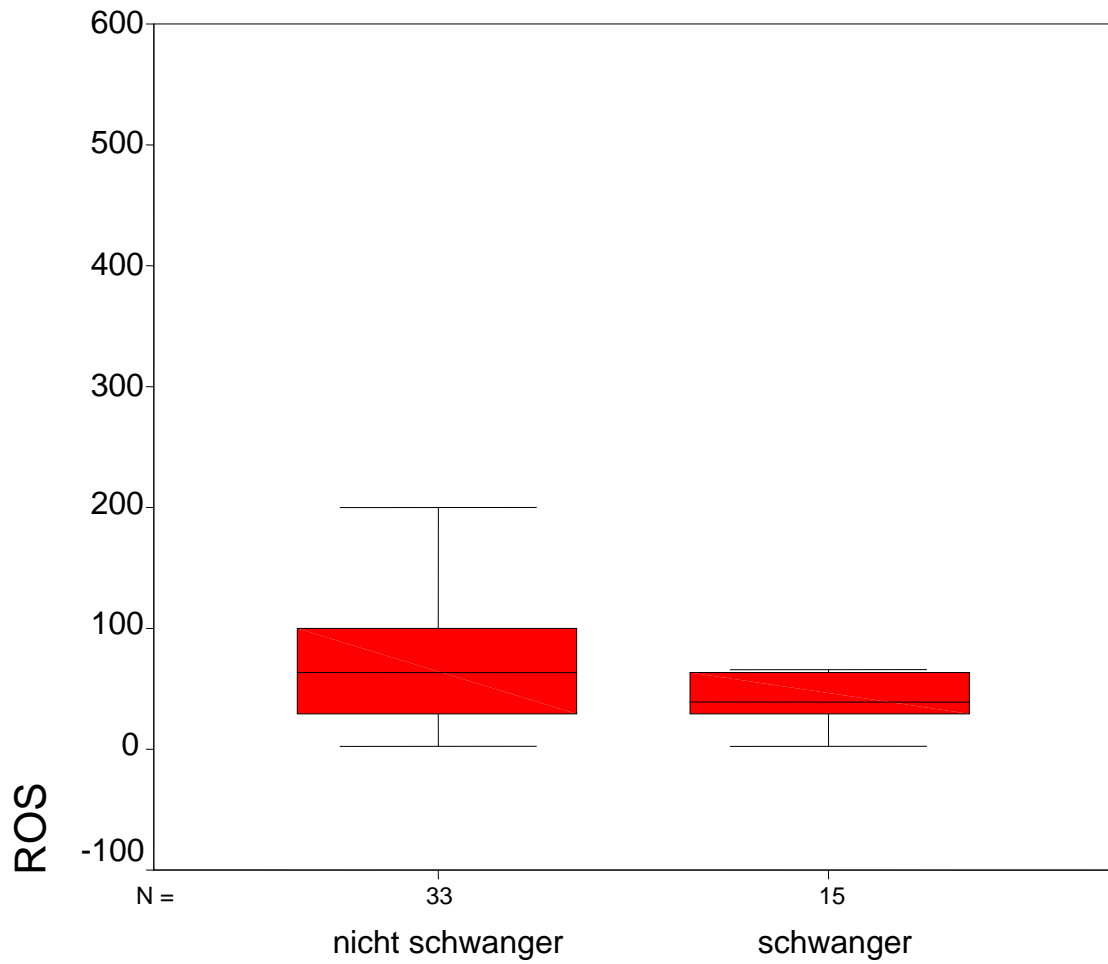
Nachfolgend finden sich einige graphische Darstellungen, welche noch einmal die Beziehungen der Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma zu den IVF- bzw. ICSI-Ergebnissen veranschaulichen sollen.

So stellt Graphik 4-1 die jeweils negativen Korrelationen ( $r=-0.290$ ,  $r=-0.267$ ,  $r=-0.241$ ) zwischen ROS und der Befruchtungsrate dar, welche zwar für das Gesamtkollektiv ( $p=0.045$ ), nicht aber für die aufgeteilten Patientengruppen (IVF:  $p=0.187$ ; ICSI:  $p=0.280$ ) statistisch signifikant sind.

Die Korrelationen zwischen ROS und der Schwangerschaftszahl sind nicht signifikant ( $p=0.730$ ,  $p=0.976$ ,  $p=0.683$ ) und auch nicht immer einheitlich geartet (Graphik 4-2 und 4-3). So finden sich im Gesamtkollektiv und in der IVF-Gruppe jeweils positive Korrelationen ( $r=0.051$ ,  $r=0.006$ ), und dagegen liegt im ICSI-Kollektiv diesbezüglich eine negative Korrelation vor ( $r=-0.092$ ).

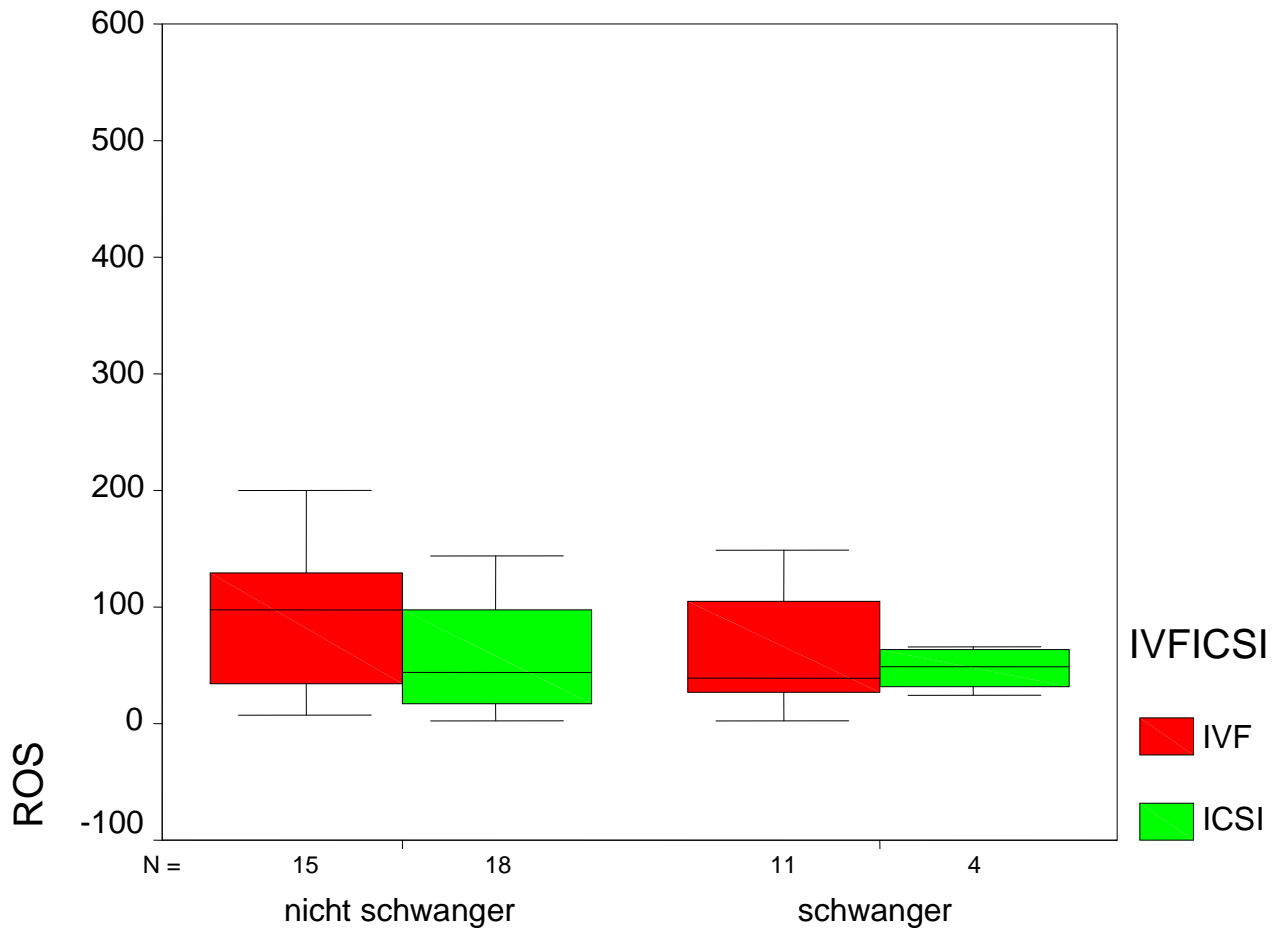


**Graphik 4-1: Korrelation zwischen ROS und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven.**



### Schwangerschaft

**Graphik 4-2: Korrelation zwischen ROS und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv (n=48).**

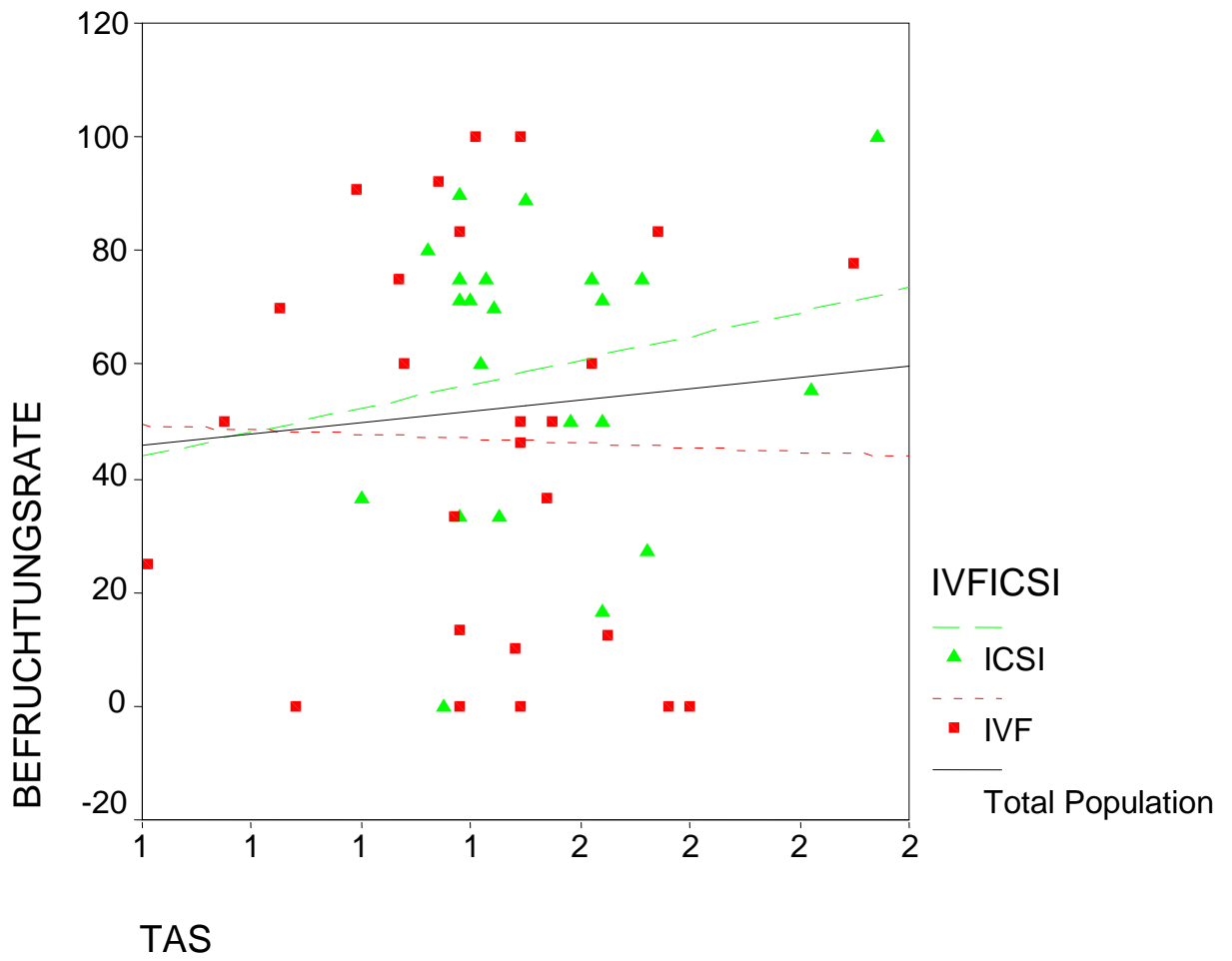


## Schwangerschaft

**Graphik 4-3: Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Schwangerschaftszahl in der IVF- und ICSI-Patientengruppe.**

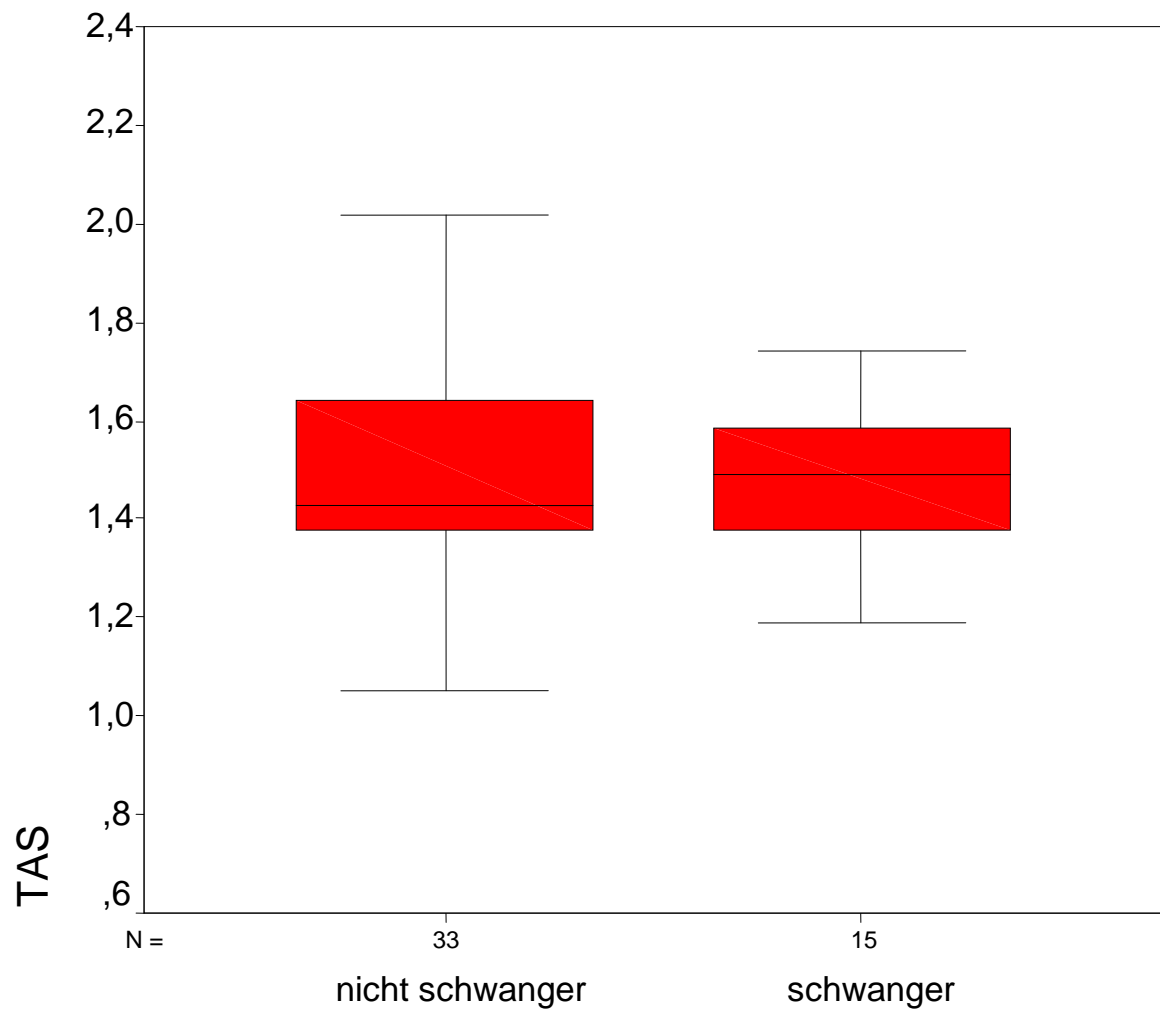
Die nachfolgenden Graphiken 4-4 bis 4-6 beziehen sich auf den Einfluss von TAS auf die Befruchtungsrate und die Schwangerschaftszahl. Bezüglich TAS und der Befruchtungsrate liegen im Gesamt- und ICSI-Kollektiv nicht signifikante ( $p=0.584$ ,  $p=0.412$ ) positive Korrelationen vor ( $r=0.081$ ,  $r=0.184$ ). Als Ausnahme besteht in der IVF-Gruppe hier jedoch eine nicht signifikante negative Korrelation ( $p=0.881$ ,  $r=-0.031$ ).

Auch bezüglich der Schwangerschaftszahl sind in keiner Gruppe Signifikanzen zu sehen ( $p=0.664$ ,  $p=0.980$ ,  $p=0.859$ ). Eine Ausnahme stellt die IVF-Patientengruppe dar, welche im Gegensatz zum Gesamt- und ICSI-Kollektiv ( $r=-0.064$ ,  $r=-0.040$ ) eine positive Korrelation bietet ( $r=0.005$ ).



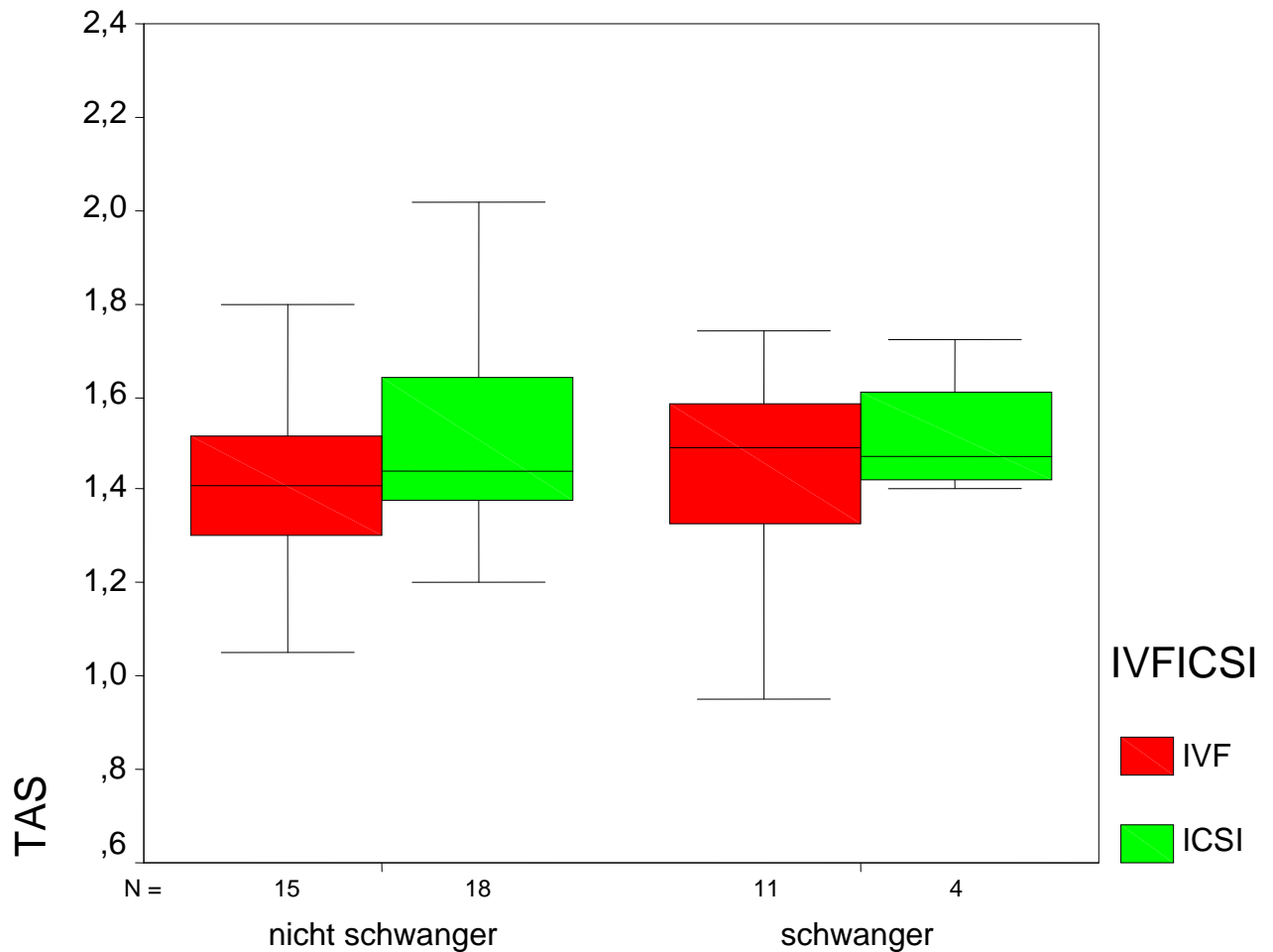
**Graphik 4-4: Korrelation zwischen dem totalen Antioxidantienstatus (TAS) und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven.**





### Schwangerschaft

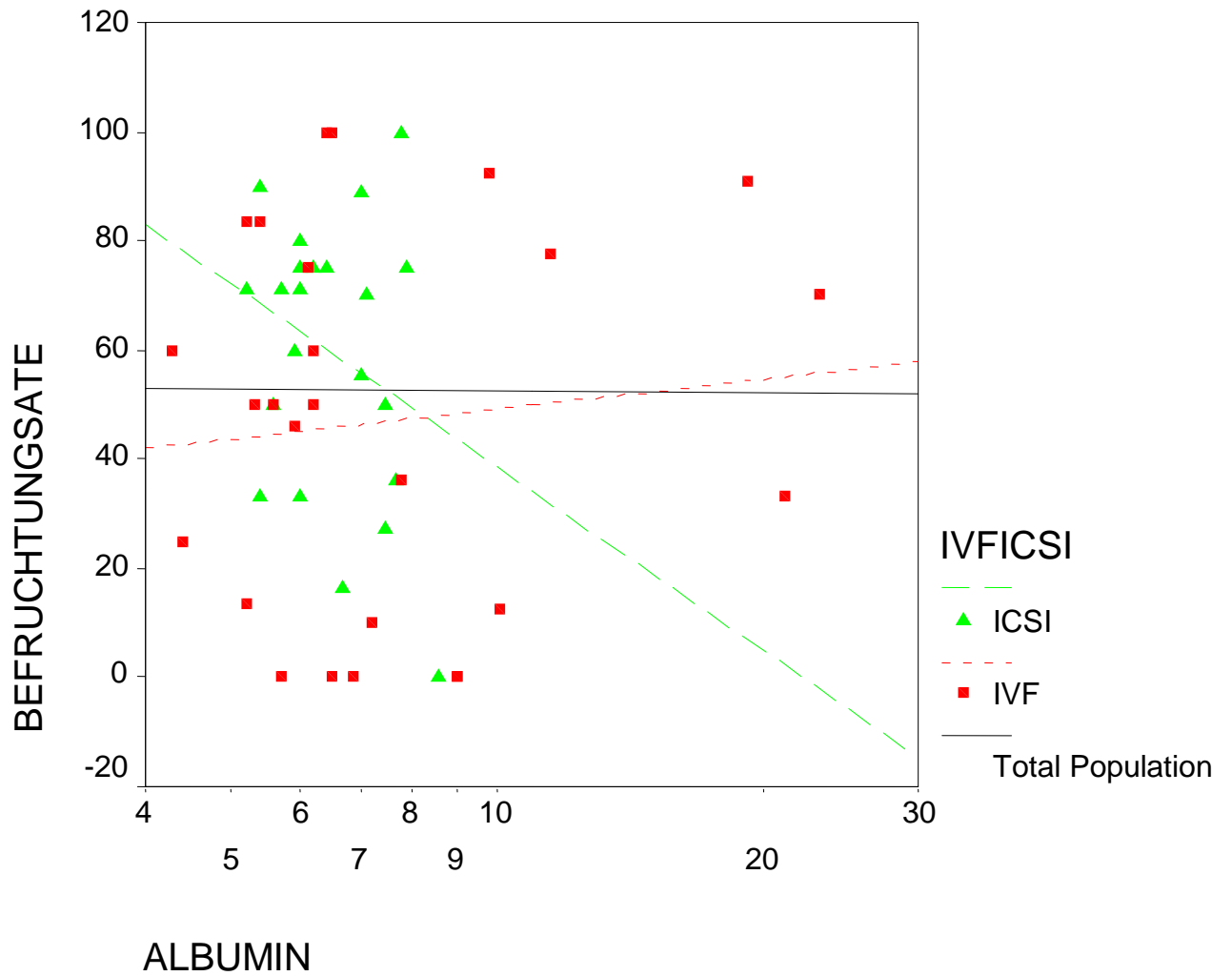
**Graphik 4-5: Korrelation zwischen dem totalen Antioxidantienstatus (TAS) und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv (n=48).**



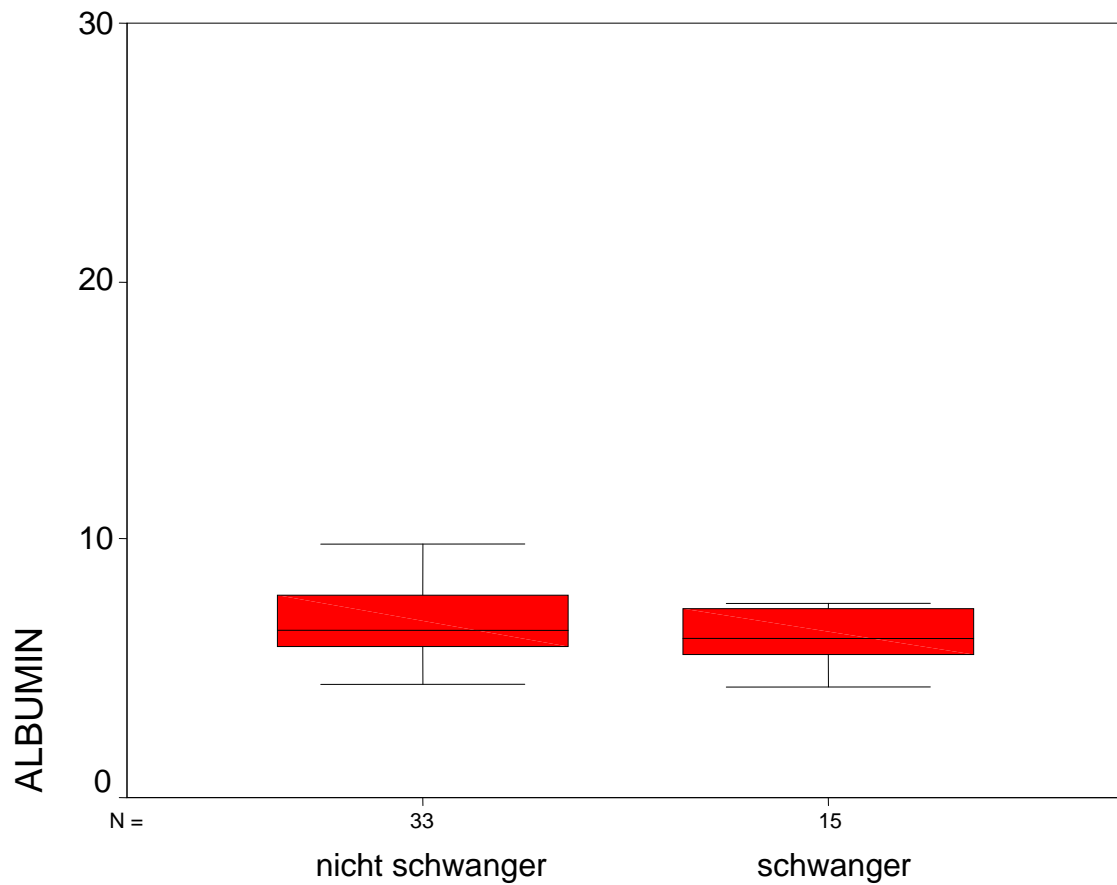
## Schwangerschaft

**Graphik 4-6: Korrelation zwischen dem totalen Antioxidantienstatus (TAS) und der Schwangerschaftszahl sowohl in der IVF- als auch in der ICSI-Gruppe.**

Die Graphiken 4-7 bis 4-9 verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Befruchtungsrate und Schwangerschaftszahl mit dem seminalen Albumingehalt. Diesbezüglich liegen keine signifikanten Zusammenhänge vor ( $p=0.822$ ,  $p=0.495$ ,  $p=0.197$  und  $p=0.482$ ,  $p=0.872$ ,  $p=0.464$ ). Die einzige negative Korrelation liegt im ICSI-Kollektiv bezüglich der Befruchtungsrate vor ( $r=-0.286$ ).

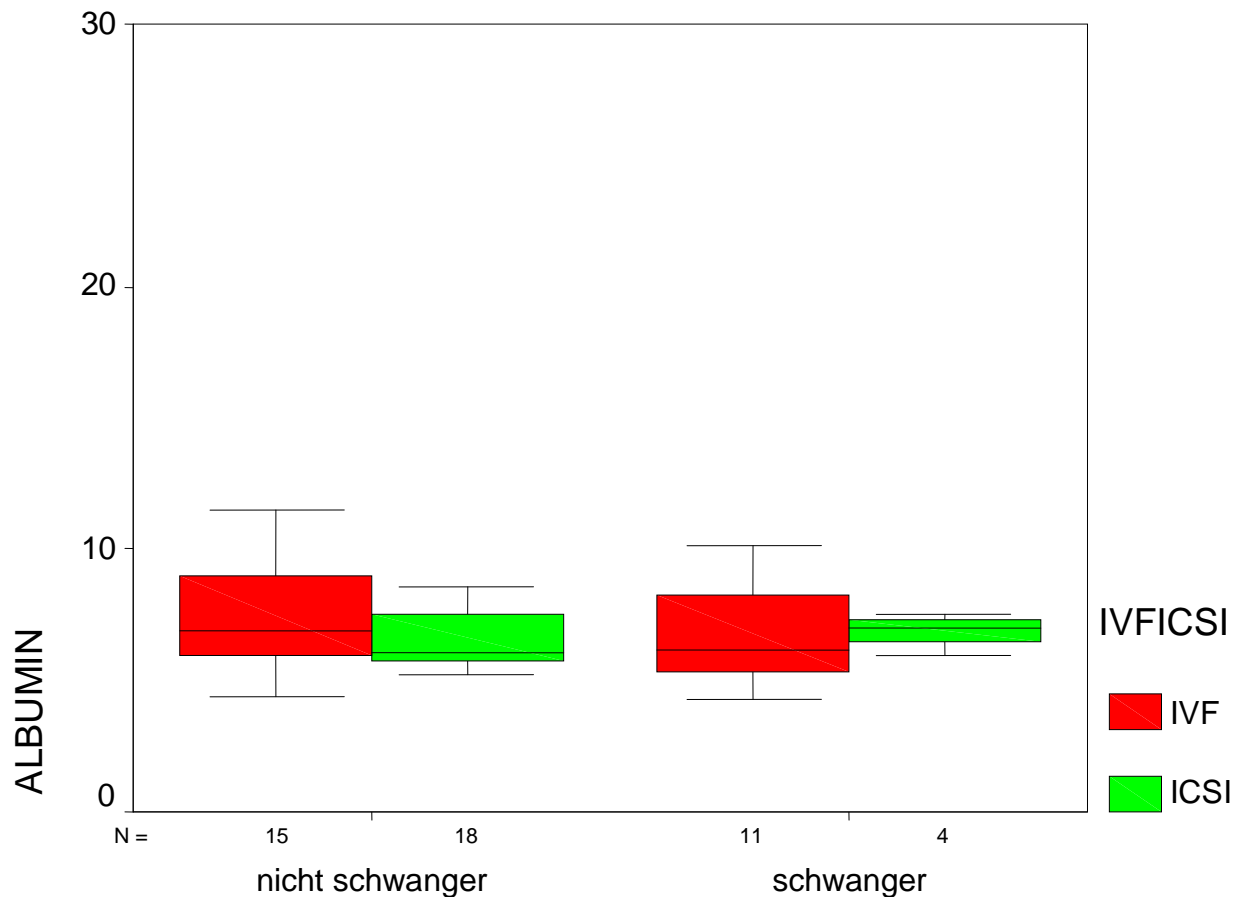


**Graphik 4-7: Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im seminalen Plasma und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven.**



### Schwangerschaft

**Graphik 4-8: Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im seminalen Plasma und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv (n=48).**

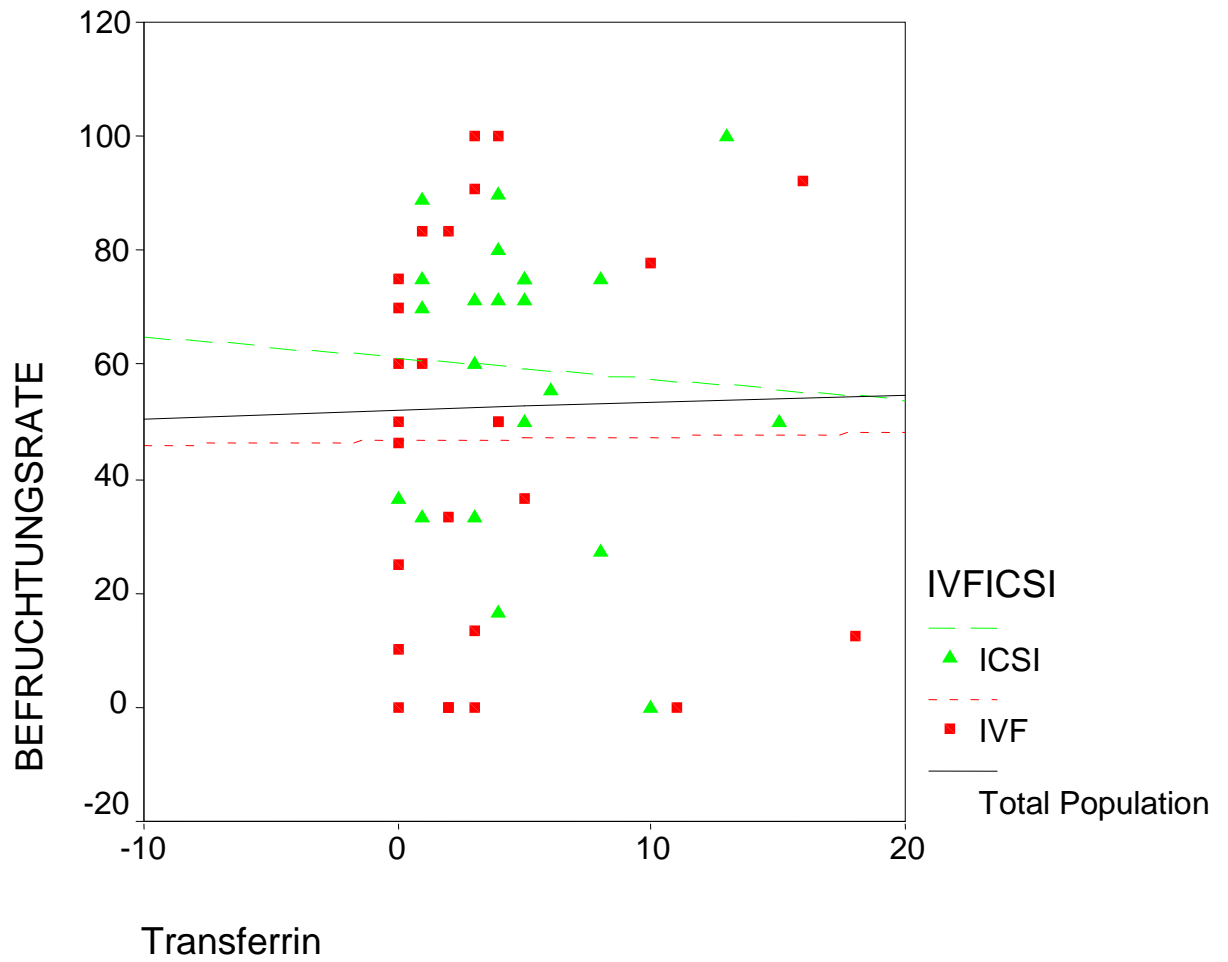


### Schwangerschaft

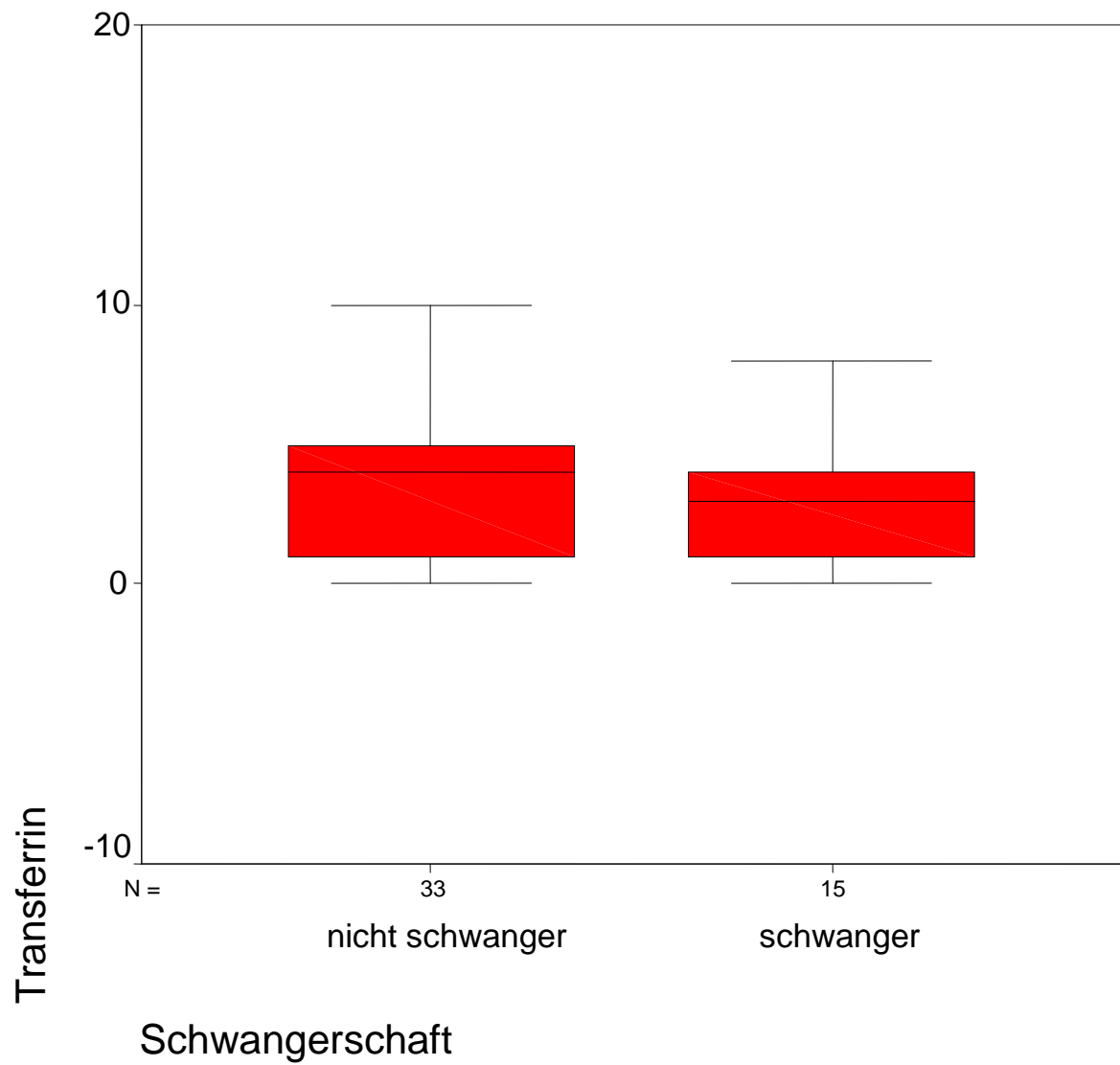
**Graphik 4-9: Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im seminalen Plasma und der Schwangerschaftszahl sowohl in der IVF- als auch in der ICSI-Gruppe.**

Die Zusammenhänge sowohl zwischen der Befruchtungsrate als auch der Schwangerschaftszahl und Transferrin sind uneinheitlich innerhalb der verschiedenen Patientengruppen und außerdem nicht statistisch signifikant.

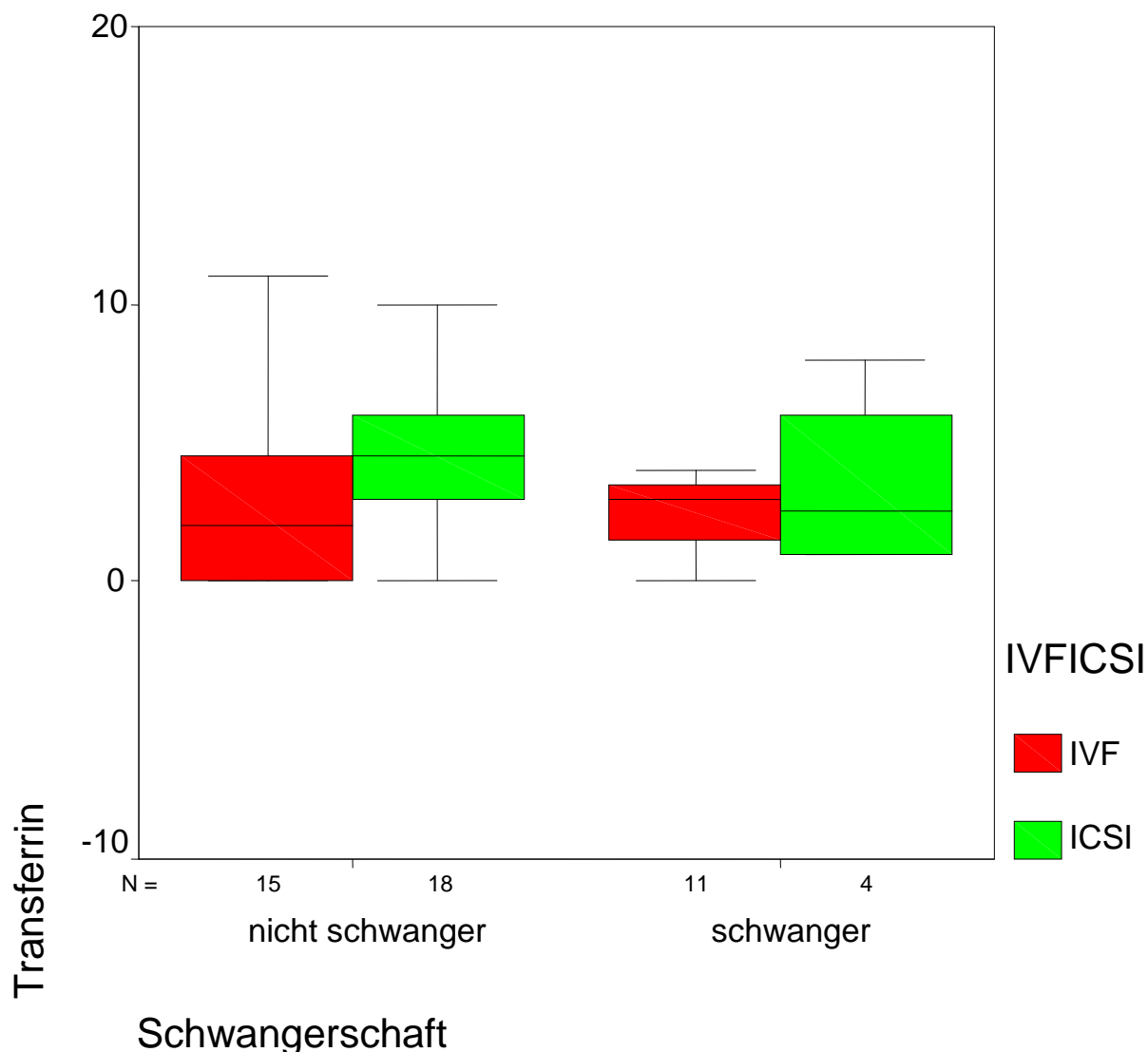
So liegen also positive Korrelationen zwischen Transferrin und der Befruchtungsrate im Gesamt- und IVF-Kollektiv ( $r=0.019$ ,  $r=0.010$ ) und zwischen Transferrin und der Schwangerschaftszahl in der IVF-Gruppe ( $r=0.004$ ) vor. Negativ sind die Korrelationen zwischen Transferrin und der Befruchtungsrate der ICSI-Patienten ( $r=-0.056$ ) und zwischen Transferrin und der Schwangerschaftszahl im Gesamt- und ICSI-Kollektiv ( $r=-0.097$ ,  $r=-0.182$ ).



**Graphik 4-10: Korrelation zwischen der Transferrinkonzentration im seminalen Plasma und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven.**



**Graphik 4-11: Korrelation zwischen der Transferrinkonzentration im seminalen Plasma und der Schwangerschaftszahl im Gesamtkollektiv (n=48).**

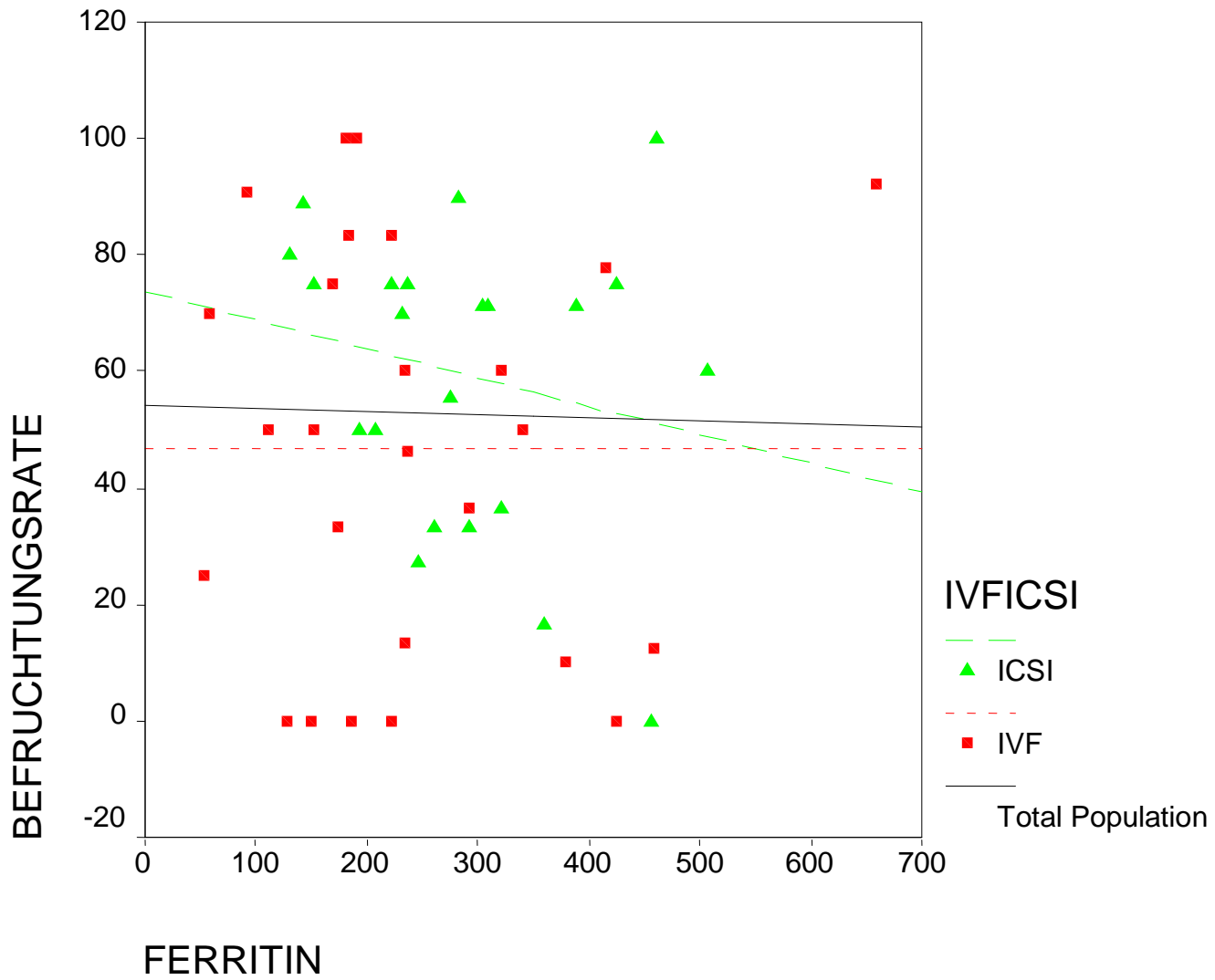


**Graphik 4-12: Korrelation zwischen der Transferrinkonzentration im seminalen Plasma und der Schwangerschaftszahl sowohl in der IVF- als auch in der ICSI-Gruppe.**

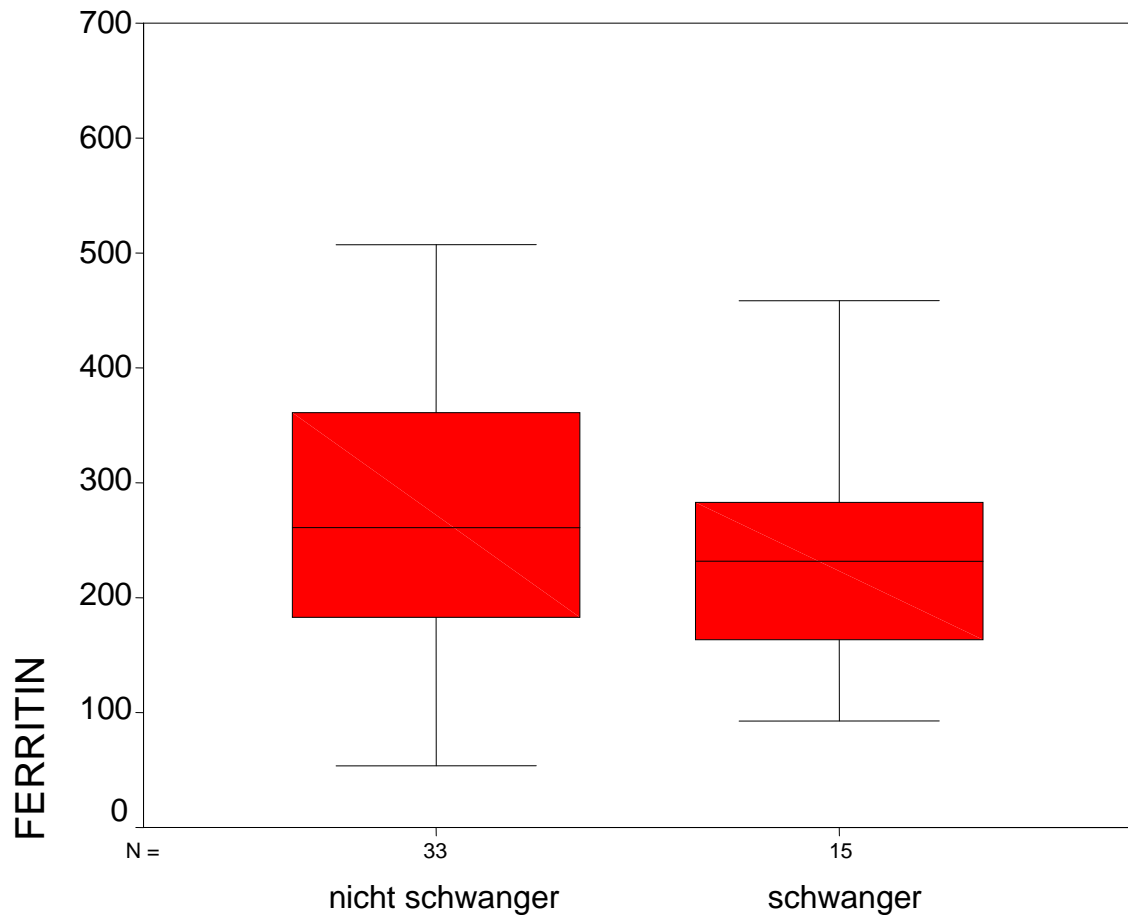
Die Beobachtung des Zusammenhangs zwischen der seminalen Ferritinmenge und der Befruchtungsrate und der Schwangerschaftszahl sind in den Graphiken 4-13 bis 4-15 abgebildet.

In diesem Gebiet liegen nur nicht signifikante negative Korrelationen vor ( $r=-0.022$ ,  $r=-0.202$  und  $r=-0.151$ ,  $r=-0.069$ ,  $r=-0.177$ ). Nur im IVF-Kollektiv gibt es eine neutrale Korrelation zur Fertilisationsrate ( $r=0.000$ ).



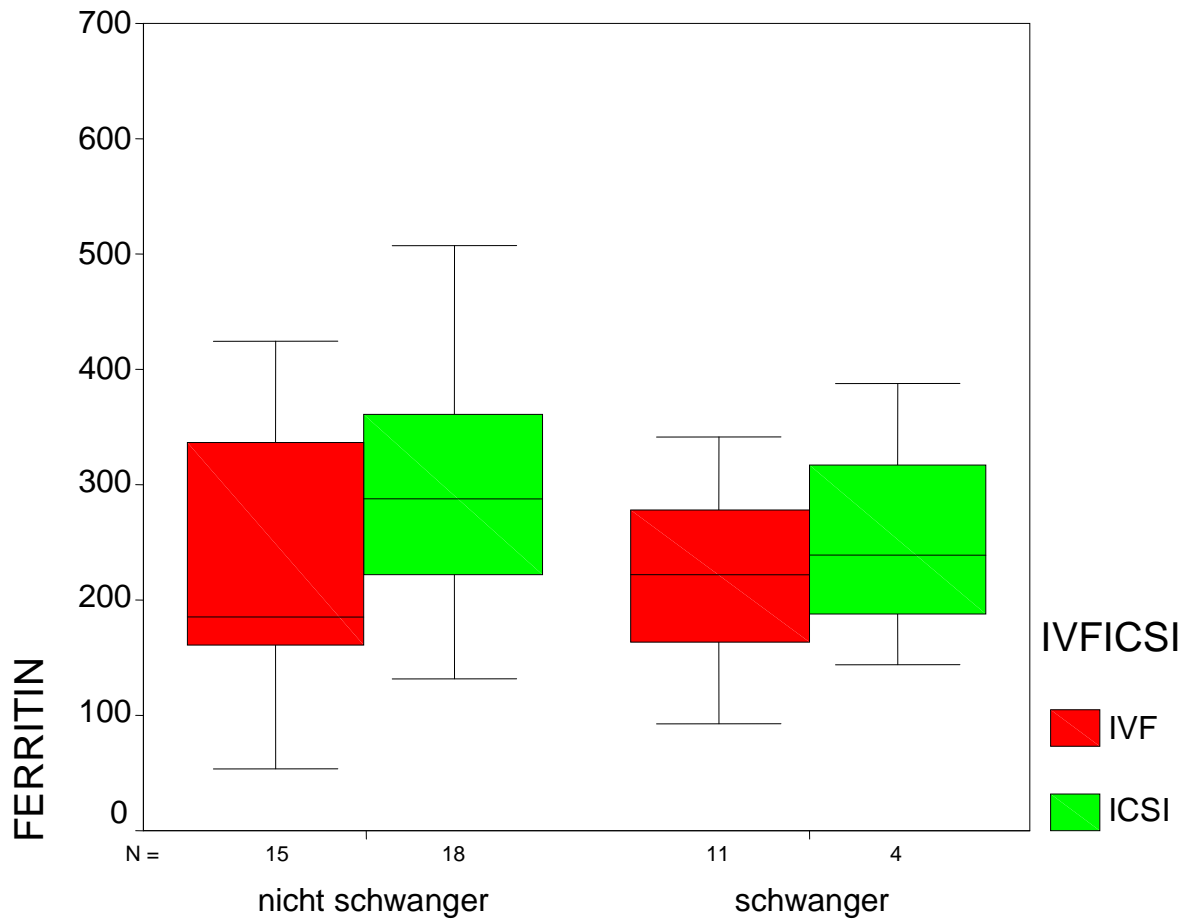


**Graphik 4-13: Korrelation zwischen der Ferritinkonzentration im seminalen Plasma und der Befruchtungsrate in allen drei Kollektiven.**



### Schwangerschaft

**Graphik 4-14: Korrelation zwischen der Ferritinkonzentration im seminalen Plasma und der Befruchtungsrate im Gesamtkollektiv (n=48).**



### Schwangerschaft

**Graphik 4-15: Korrelation zwischen der Ferritinkonzentration im seminalen Plasma und der Befruchtungsrate sowohl in der IVF- als auch in der ICSI-Gruppe.**

## 5. Diskussion

### 5.1. Chromatinkondensationsstatus

Die Ergebnisse der Bestimmungen des Chromatinkondensationsstatus mittels der Acridine Orange- und der Chromomycin-Färbung sind im Kapitel 4.1.2. aufgelistet. Das Gesamtkollektiv erreicht bezüglich der Acridine Orange-Färbung sehr gute Ergebnisse, wobei die Resultate für die Chromomycin-Färbung jedoch etwas reduzierter ausfallen.

Beachtlich ist auf jeden Fall der signifikante Unterschied zwischen der IVF- und ICSI-Patientengruppe in Bezug auf den Chromatinkondensationsstatus. Gemessen mit der Acridine Orange-Färbung haben die IVF-Patienten im Durchschnitt ein signifikant höheres Ergebnis ( $p=0.041$ ) als die ICSI-Gruppe. Auch bei den Ergebnissen der Chromomycin-Färbung schneiden die IVF-Patienten besser ab, hier mit einem hoch signifikant besseren Ergebnis ( $p=0.000$ ).

Die Einflüsse des Chromatinkondensationsstatus im Zusammenhang mit den Parametern der klassischen Samenanalyse wurden schon in Kapitel 4.2. dargestellt.

Hier wurde deutlich, dass im Gesamtkollektiv, in der IVF-Gruppe und in der ICSI-Gruppe nur positive signifikante Korrelationen vorliegen. Eine Ausnahme bildet die negative Korrelation zwischen den mit Acridine Orange gelb-grün gefärbten Spermien und der Membranintegrität in der IVF-Gruppe.

Bei den positiven Korrelationen gibt es mehrere signifikante Ergebnisse. Im Gesamtkollektiv korrelieren die Resultate der Chromomycin-Färbung signifikant mit der progressiven Motilität ( $p=0.039$ ,  $r=0.299$ ), Vitalität ( $p=0.019$ ,  $r=0.336$ ), morphologischen Normalformen ( $p=0.027$ ,  $r=0.319$ ), stark signifikant mit der Spermiedichte ( $p=0.002$ ,  $r=0.437$ ), globalen Motilität ( $p=0.001$ ,  $r=0.457$ ) und hoch signifikant mit der Motilität nach Aufbereitung ( $p=0.000$ ,  $r=0.569$ ). Die ICSI-Gruppe bietet nur eine Signifikanz ( $p=0.043$ ,  $r=0.435$ ) zwischen den morphologischen Normalformen und der vollständigen Chromatinkondensation (Chromomycin-Färbung).

Sieht man also von den genannten Ausnahmen ab, ist davon auszugehen, dass umso mehr normales Kernchromatin zu erwarten ist, je besser die Resultate der klassischen

Samenanalyse ausfallen. Besonders ist hier die Chromomycin-Färbung als guter Detektor diesbezüglich herauszuheben.

Die Untersuchung des möglichen Zusammenhangs zwischen dem Kernchromatinstatus und dem Oxidantien- und Antioxidantiengehalt im seminalen Plasma war relativ unergiebig (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17). Der einzige signifikante positive Zusammenhang wird zwischen dem Albumingehalt und der vollständigen Chromatinkondensation (Acridine Orange-Färbung) im ICSI-Kollektiv gefunden ( $p=0.044$ ,  $r=0.434$ ).

Ebenso wenig ertragreich ist die Untersuchung der Verbindung zwischen dem Kernchromatinstatus zu den Schwangerschafts- und Befruchtungsergebnissen (siehe Tabellen 4-18, 4-19 und 4-20). Die einzige signifikante Korrelation zeigt sich in inverser Weise zwischen der Anzahl gewonnener Eizellen und der vollständigen Chromatinkondensation (Chromomycin-Färbung) im ICSI-Kollektiv ( $p=0.028$ ,  $r=-0.469$ ). In den untersuchten Patientengruppen zeigt sich eine Positivkorrelation zwischen dem vollständigen Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange-Färbung) und der Schwangerschaftszahl, welche aber statistisch nicht signifikant sind (Gesamtkollektiv  $r=0.067$ , IVF-Gruppe  $r=0.074$ , ICSI-Gruppe  $r=0.075$ ).

In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob zwischen dem Kernchromatinstatus und den Parametern der klassischen Samenanalyse, den Oxidantien sowie Antioxidantien und den Schwangerschafts- bzw. Befruchtungsergebnissen Zusammenhänge bestehen.

Nach GOPALKRISHNAN et al. (1999) ist die Integrität des Chromatins der menschlichen Spermien für eine erfolgreiche Fertilisation und anschließende Entwicklung des Embryos wichtig. Da das Spermium durch ein relativ stark reduziertes Zytoplasma auf wenig zellinterne Schutzmechanismen zurückgreifen kann, gibt es zwei wesentliche Faktoren, die auf die DNA-Integrität positiven Einfluss haben können, nämlich das seminale Plasma und die Chromatinbündelung (HAMMADEH et al., 1999). Letzteres kann sich aber schon während der Spermiogenese fehlerhaft entwickeln (RAVAZI et al., 2003). Bei der Spermiogenese werden 85 Prozent der nukleären Histone durch Protamine ersetzt (MANICARDI et al., 1995; GOPALKRISHNAN et al., 1999; ESTERHUIZEN et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001; SHAMSI et al., 2008), welche mit ihren vielen Cysteinmolekülen stabile kovalente Disulfidbrücken

intra- und intermolekular ausbilden (HOSHI et al., 1996; HAMMADEH et al., 2001; SHAMSI et al., 2008). Dadurch wird die DNA der reifen Spermien stark kondensiert (MANICARDI et al., 1995; SINGLETON et al., 2007) und insgesamt kompakter (HAMMADEH et al., 1999). Eine so erreichte gute Chromatinbündelung ist für den sicheren Transport und den Erhalt der Integrität des männlichen Erbgutes wichtig (MOLINA et al., 2001), denn eine gut gebündelte, durch viele Disulfidbrücken der Protamine stabilisierte DNA ist gegenüber denaturierenden Noxen viel resistenter (STERZIK et al., 1989; HOSHI et al., 1996; SPANO et al., 2001). Ebenso muss eine während der Spermiogenese korrekt gebündelte DNA in der Lage sein, im Zytoplasma der Eizelle nach der Penetration (in vivo oder IVF) oder Injektion (ICSI) durch erneuten Austausch von Protamine gegen Histone problemlos zu dekondensieren (GOPALKRISHNAN et al., 1991; HAMMADEH et al., 2001).

Der Grad der Chromatinkondensation kann mittels der Acridine Orange-Färbung und der Chromomycin-Färbung bestimmt werden (HAMMADEH et al., 2001). Dabei zeigt die Chromomycin-Färbung eine durch einen Protaminddefekt zu locker gebündelte DNA oder denaturierte DNA mit leuchtendem Signal an (DADOUNE, 1995; SAKKAS et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001). Mittels der Acridine Orange-Färbung kann das Maß der DNA-Denaturierung gemessen werden. Native, doppelsträngige DNA färbt sich hierbei gelb-grün und denaturierte Einzelstrang-DNA fluoresziert orange-rot (CLAASSENS et al., 1992; HOSHI et al., 1996; SHAMSI et al., 2008). Ob die Beurteilung des Chromatinstatus eine Erfolgswahrscheinlichkeit für Befruchtung oder Schwangerschaft berechnen kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (ANGELOPOULOS et al., 1998; EVENSON et al., 1999; CEBESYOY et al., 2006; NASR-ESFAHANI et al., 2008; TAVALAEE et al., 2008).

Auf die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich der Ergebnisse des Kernchromatinstatus wurde bereits eingegangen. Da die IVF-Patienten zwar auch eine reduzierte, jedoch gegenüber den ICSI-Patienten eine bessere Spermienfunktion haben, wären in dieser Gruppe auch insgesamt die besseren Ergebnisse bezüglich des Kernchromatinstatus zu erwarten. Diese Vermutung bestätigt sich auch bei Betrachtung der Signifikanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen (Acridine Orange-Färbung  $p=0.041$ , Chromomycin-Färbung  $p=0.000$ ). Auch SAKKAS et al. (1998) kamen diesbezüglich zu einem korrespondierenden Ergebnis, als sie in der ICSI-Gruppe einen höheren Anteil an mit der

Chromomycin-Färbung leuchtenden Spermien, also mit abnormalem Kernchromatinstatus, nachgewiesen haben.

Viele Studien ziehen aber keinen Vergleich zwischen dem IVF- und ICSI-Patientengut, sondern setzen fertile und infertile Patientengruppen einander gegenüber. So fanden SUKCHAROEN (1995) und ZINI et al. (2002) in den fertilen Kontrollgruppen mehr grün-fluoreszierende Spermien (Acridine Orange-Färbung) als in der infertilen Patientengruppe. Dagegen konnten KHALILI et al. (2006) keinen Unterschied zwischen einer infertilen Patientengruppe und einer fertilen Kontrollgruppe bezüglich des Chromatinstatus, ermittelt durch die Acridine Orange-Färbung, feststellen.

Es existieren in der Literatur zahlreiche Ergebnisse bezüglich der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und dem Kernchromatinstatus. Nach EVERSON und JOST (2000) und auch nach den Ergebnissen der Untersuchung von KHALILI et al. (2006) finden sich keine Korrelationen zwischen den Ergebnissen der klassischen Samenanalyse und dem Kernchromatinstatus (Acridine Orange-Färbung). Auch IBRAHIM et al. (1988), EGGERT-KRUSE et al. (1996) und HOSHI et al. (1996) konnten keine signifikante Korrelation zwischen der Motilität und dem Kernchromatinstatus, gemessen mit der Acridine Orange-Färbung, und KARYDIS et al. (2005) zwischen der Motilität und dem Kernchromatinstatus, ermittelt mit der Chromomycin-Färbung, feststellen. Ebenfalls wurden sowohl zwischen den morphologischen Normalformen als auch zwischen der Spermiedichte und dem Chromatinkondensationsstatus (Acridine Orange-Färbung) nach EGGERT-KRUSE (1996), HOSHI et al. (1996) und KHALILI et al. (2006) keine signifikanten Korrelationen gefunden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von STERZIK et al. (1989), HIGHLAND (1991), CLAASSENS et al. (1992), ZINI et al. (2002) und HENKEL et al. (2004), bei denen eine positive Korrelation zwischen dem normalen Kernchromatinstatus (Acridine Orange-Färbung) und der Motilität und/ oder den morphologischen Normalformen beschrieben werden. Den gleichen Zusammenhang, jedoch Detektion mittels der Chromomycin-Färbung, ergaben die Arbeiten von BIANCHI et al. (1996), FRANKEN et al. (1999), ESTERHUIZEN et al. (2000) und IRANPOUR (2000).

Der Kondensationsprozeß während der Spermiogenese und der Transport durch den Nebenhoden ist für die spätere Befruchtungsfähigkeit von enormer Bedeutung, was KARYDIS et al. (2005) in ihrem review-Artikel bereits beschrieben haben. Dazu gehört auch der korrekte Austausch von Histonen zu Protaminen (DOBRINSKI et al., 1994; GOPALKRISHNAN

et al., 1999; HAMMADEH et al., 2001; SHAMSI et al., 2008). Ein Grund für das Ausbleiben der in vitro Fertilisation kann eine mangelhafte Chromatinkondensation und daraus resultierende ausbleibende Spermiendekondensation sein (ESTERHUIZEN et al., 2000; SAKKAS et al., 2000).

So fanden sich auch in der Literatur mehrere Arbeiten mit dem schlüssigen Ergebnis der positiven Korrelation des normalen Kernchromatins (gemessen mit der Acridine Orange- oder Chromomycin-Färbung) und der Befruchtungs- oder Schwangerschaftsrate (LUI et al., 1992; ESTERHUIZEN et al., 2000; VIRANT-KLUN et al., 2002; RAZAVI et al., 2003; CEBESOIY et al., 2006). HOSHI et al. (1996) vermuteten, dass bei einem Anteil von mit Acridine Orange grün gefärbten Spermien von über 50 Prozent die IVF-Therapie immer erfolgreich war, jedoch bei einem Resultat unterhalb der 50 Prozent-Marke die ICSI-Therapie bessere Ergebnisse erbrachte. Auch NASR-ESFAHANI et al. (2008) und TAVALAEE et al. (2008) konnten in ihren Studien eine positive Beziehung zwischen dem Chromatinkondensationsstatus, ermittelt mit der Chromomycin-Färbung, und der Befruchtungsrate herstellen. Im Gegensatz dazu wurde durch KARYDIS et al. (2005) in ihrem rückblickenden Artikel in keiner Arbeit ein signifikanter Zusammenhang festgestellt zwischen der Befruchtungsrate und dem Chromatinkondensationsstatus, gemessen mit der Chromomycin-Färbung. Dies entspricht weitgehend den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Die Korrelation im IVF-Kollektiv zwischen der Fertilisationsrate und sowohl der Chromomycin-Färbung ( $p=0.540$ ,  $r=0.126$ ) als auch der Acridine Orange-Färbung ( $p=0.755$ ,  $r=0.064$ ) ist statistisch nicht signifikant (siehe Tabelle 4-19). In der ICSI-Gruppe liegen ebenfalls keine signifikanten Korrelationen zwischen der Befruchtungsrate und der Chromomycin-Färbung ( $p=0.961$ ,  $r=-0.011$ ) und auch zwischen der Befruchtungsrate und der Acridine Orange-Färbung ( $p=0.522$ ,  $r=-0.144$ ) in dieser Arbeit vor (siehe Tabelle 4-20). Ob ein erfolgreiches IVF- oder ICSI-Ergebnis mittels der Bestimmung des Kernchromatinstatus vorherzusagen ist, kann also nicht bestätigt werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Betrachtung zum Beispiel der Acridine Orange-Ergebnisse ist nach STERZIK et al. (1989), dass sicherlich bei der Auswertung der Acridine Orange-Färbung das Auszählen der gefärbten Spermien einer subjektiven Auslegung unterliegt. Dies kann als mögliche Fehlerquelle dieser Messungen auf jeden Fall nicht komplett ausgeschlossen werden. Es gibt aber dennoch mehrere Autoren, welche die Nichtidentifizierung von



Chromatinanomalien mittels der standardisierten Samenanalyse bemängeln (GOPALKRISHNAN et al., 1999; SAKKAS et al., 2000).

## 5.2. DNA-Strangbrüche

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung der Anzahl der DNA-Strangbrüche findet sich im Kapitel 4.1.2.. Es wurde verdeutlicht, dass die Anzahl der DNA-Strangbrüche im Gesamtkollektiv im Mittelwert bei 5.02 Prozent liegt. Die ICSI-Gruppe übertrifft das Resultat der IVF-Gruppe leicht mit 5.77 Prozent versus 4.38 Prozent im Mittelwert, aber der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ist statistisch nicht signifikant ( $p=0.279$ ).

Interessant ist auch der Vergleich mit den Ergebnissen der klassischen Samenanalyse (siehe Tabellen 4-9, 4-10 und 4-11). So zeigen sich positive signifikante Korrelationen zwischen dem pH-Wert und der Anzahl der DNA-Strangbrüchen in der ICSI-Gruppe ( $p=0.038$ ,  $r=0.444$ ), zwischen der Dichte nach Aufbereitung und Anzahl der DNA-Strangbrüche im IVF-Kollektiv ( $p=0.015$ ,  $r=0.474$ ) sowie auch eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Volumen und der Anzahl der DNA-Strangbrüche im IVF-Kollektiv ( $p=0.001$ ,  $r=0.629$ ). Darüber hinaus zeigen sich keiner der weiteren geprüften Zusammenhänge als statistisch signifikant. Es ist zu bemerken, dass zusätzlich negativen Korrelationen zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und allen Motilitäts- und Vitalitätswerten im Gesamtkollektiv vorliegen, welche aber nicht signifikant sind.

Keine signifikanten Zusammenhänge zeigen sich bei der Untersuchung zur Korrelation der Anzahl der DNA-Strangbrüche zu den oxidativen und antioxidativen Parametern des Seminalplasmas (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17). Konstant in jeder der untersuchten Patientengruppen hält sich die jeweils negative, aber statistisch nicht signifikante Korrelation zwischen TAS und Albumin zur Anzahl der DNA-Strangbrüche (TAS: Gesamtkollektiv  $r=-0.117$ , IVF-Gruppe  $r=-0.216$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.098$ ; Albumin: Gesamtkollektiv  $r=-0.243$ , IVF-Gruppe  $r=-0.297$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.186$ ). Bemerkenswerterweise korreliert Ferritin jeweils positiv, aber nicht signifikant mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche (Gesamt-Kollektiv  $r=0.237$ , IVF-Gruppe  $r=0.268$ , ICSI-Gruppe  $r=0.162$ ).

Wie auch schon im Abschnitt 4.5. erwähnt, können zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und den Schwangerschafts- und Befruchtungsergebnissen keine Signifikanzen gefunden werden. Die jeweiligen Korrelationen sind recht uneinheitlich. Auffallend sind sicherlich die negativen Korrelationen zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und der Schwangerschaftszahl im Gesamt- und IVF-Kollektiv ( $r=-0.045$  und  $r=-0.046$ ), nicht jedoch in der ICSI-Gruppe ( $r=0.047$ ).

Die Apoptose als eine Form des programmierten Zelltods (PLYMALE et al., 1995; EILISH et al., 2000) stellt einerseits einen biologisch wichtigen Mechanismus dar, um unnötige Zellen zu entsorgen. Zu diesem Prozess gehören unter anderem morphologische Veränderungen der Zellen wie Zellschrumpfung, Plasmamembranzerstörung und auch Chromatinveränderungen mit DNA-Fragmentation (EILISH et al., 2000). Bei der Entwicklung und Differenzierung der menschlichen Organe ist die Apoptose ein physiologischer, gewollter Prozess (PLYMALE et al., 1995). Andererseits wurde aber die Apoptose und die DNA-Fragmentation auch immer wieder in engem Zusammenhang mit der männlichen Infertilität gesehen (SHEN et al., 2002; CHOCHAN et al., 2006; SIKORA et al., 2006; NICOPOULLOS et al., 2008). Eine erhöhte Rate an DNA-Strangbrüchen kann im Allgemeinen eine Reaktion auf verschiedene externe Stimuli, wie zum Beispiel Hitze, Strahlen, Chemikalien und Gifte sein (AHMADI und NG, 1999). Ein bekannter endogener Verursacher von DNA-Strangbrüchen ist ROS (HOST et al., 2000; RAMOS et al., 2001; CHOCHAN et al., 2006; ZINI und LIBMAN, 2006; AGARWAL et al., 2008; SHAMSI et al., 2008). Auf diesen Zusammenhang wird an späterer Stelle eingegangen. Es wird vermutet, dass Störungen während der Spermiogenese zur unzureichenden Chromatinkondensation führen, was möglicherweise eine erhöhte Anfälligkeit der DNA gegenüber Fragmentation nach sich zieht (RAMOS et al., 2001; SIKORA et al., 2006). Nach DADOUNE (1995) ist der nukleare Zellstatus sogar der Schlüsselwert bei der Bestimmung der männlichen Fertilität.

Der postulierte Zusammenhang zwischen Infertilität und erhöhter Anzahl an DNA-Strangbrüchen wurde schon mehrfach untersucht. So ergaben sich bei einer Vergleichsmessung des Gehalts an DNA-Fragmentationen zwischen einem bewiesenen fertilen Kollektiv und einer infertilen Patientengruppe deutlich höhere Ergebnisse in der infertilen Gruppe (BACCETTI et al., 1996; HOST et al., 1999; ZINI et al., 2001; SERGERIE et al., 2005; NICOPOULLOS et al., 2008). In der eigenen Arbeit war keine fertile Kontrollgruppe

herangezogen worden, es wurde hier lediglich zwischen IVF- und ICSI-Patienten unterschieden.

Der Einfluss der Anzahl an DNA-Strangbrüchen auf die Parameter der klassischen Samenanalyse ist schon wiederholt untersucht worden. VARUM et al. (2006) behaupten im Allgemeinen, dass zwischen der Samenqualität und der DNA-Fragmentationsrate ein inverser Zusammenhang bestünde. In anderen Untersuchungen demonstrierten sich negative Zusammenhänge zwischen dem Grad an DNA-Fragmentation und der Spermienmotilität (SUN et al., 1997; MURATORI et al., 2000; ZINI et al., 2001; SHEN, 2002; HENKEL et al., 2004; APPASAMY et al., 2007; CAGLAR et al., 2007; COHEN-BACRIE et al., 2008; LIN et al., 2008; ZHANG et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit ist dies ebenso im Gesamtkollektiv (globale Motilität  $r=-0.078$ , progressive Motilität  $r=-0.167$ ), in der ICSI-Gruppe (globale Motilität  $r=-0.077$ , progressive Motilität  $r=-0.175$ ) und für die progressive Motilität auch in der IVF-Gruppe ( $r=-0.143$ ) der Fall. Nach den Studien von SUN et al. (1997), OOSTERHUIS et al. (2000), ZINI et al. (2001), SAKKAS et al. (2002) und CAGLAR et al. (2007) lag auch bezüglich der Spermiedichte eine negative Korrelation vor, was allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden kann. Beim Vergleich von Männern mit idiopathischer Oligozoospermie gegenüber Männern mit normaler Spermiedichte fanden SMITH et al. (2007) eine erhöhte DNA-Fragmentationsrate vor. SHEN (2002) jedoch stellte überraschenderweise eine positive Korrelation zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Spermiedichte fest. Diese Feststellung lässt sich durch die „mislungene Apoptosen-Theorie“ von SAKKAS et al. (1999) erklären, wobei sich die für die Apoptose bestimmten Zellen der Vernichtung während der Spermiogenese entziehen und somit im späteren Ejakulat zwar durch ihr Vorhandensein die Dichte anheben, jedoch aber die Qualität der Spermien insgesamt mindern. Ebenfalls wichtig sind die in der Literatur aufgeführten Zusammenhänge zwischen DNA-Strangbrüchen und der Spermienmorphologie. Hier sind die Aussagen identisch, welche eine negative Korrelation zwischen der DNA-Fragmentationsrate und den morphologischen Normalformen beschreiben (SUN et al., 1997; MURATORI et al., 2000; ZINI et al., 2001; SAKKAS et al., 2002; SHEN et al., 2002; CAGLAR et al., 2007; COHAN-BACRIE et al., 2008; ERENPREISS et al., 2008; NICOPOULLOS et al., 2008). Dieses kann in der vorliegenden Studie jedoch nur im ICSI-Kollektiv nachvollzogen werden ( $r=-0.025$ ).

Die anschließende Fragestellung zielt auf den möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl der DNA-Strangbrüche und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen ab. In der IVF-Gruppe wurde nach den Studien von SUN et al. (1997), HOST et al. (2000), BAKOS et al. (2008) und LEWIS et al. (2008) bei erhöhter Anzahl an DNA-Strangbrüchen eine erniedrigte Befruchtungsrate und nach den Studien von HENKEL et al. (2004) und LI et al. (2006) eine reduzierte Schwangerschaftsrate ermittelt. Nach HENKEL et al. (2004) ist das TUNEL-Assay gut geeignet, um das Ergebnis der IVF-Therapie bei dem jeweiligen Patienten vorhersagen zu können. Zum Abschätzen der Erfolgswahrscheinlichkeit sollte nach Meinung von SHAFIK et al. (2006), ZINI und LIBMAN (2006), BENCHAIB et al. (2007) und TAROZZI et al. (2007) vor Durchführung einer assistierten Reproduktionstechnik generell die DNA-Fragmentationsrate bestimmt werden. In der vorliegenden Studie korreliert die Schwangerschaftszahl ( $p=0.822$ ,  $r=-0.046$ ), nicht aber die Befruchtungsrate ( $p=0.256$ ,  $r=0.231$ ) negativ, wenn auch statistisch nicht signifikant mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche (siehe Tabelle 4-19).

Im ICSI-Kollektiv fanden HOST et al. (2000) und LI et al. (2006) keine Korrelation zum ICSI-Ergebnis, wohingegen BENCHAIB et al. (2003) bei den ICSI-Patienten, nicht jedoch in der IVF-Gruppe, an der Anzahl der DNA-Strangbrüche das ICSI-Ergebnis abschätzen konnten. Auch BAKOS et al. (2008) stellten zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Schwangerschaftsrate im ICSI-Kollektiv und BENCHAIB et al. (2007) zwischen der DNA-Fragmentationsrate und der Befruchtungsrate in der ICSI-Gruppe eine inverse Beziehung her. Dagegen konnten jedoch NICOPOULLOS et al. (2008) keinen Zusammenhang zwischen der DNA-Fragmentationsrate und dem ICSI-Ergebnis sehen. Dieser Zusammenhang wird durch den von CAGLAR et al. (2007) verfassten review-Artikel nochmals verdeutlicht. Nach der vorliegenden Arbeit ist lediglich die Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der Anzahl der DNA-Strangbrüche negativ ermittelt worden ( $r=-0.106$ , siehe Tabelle 4-20). SHAMSI et al. (2008) kamen zu dem gleichen Ergebnis und bestätigten somit die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung. Es wurde von SHAMSI et al. (2008) jedoch eine später gehäuft auftretende gestörte Embryonalentwicklung beobachtet. In dieser Studie wird lediglich der Zusammenhang zur Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate hergestellt ohne Berücksichtigung der Entwicklung im Verlauf der Fetal- und Embryonalphase bis zur Geburt, was sich natürlich aber wiederum für künftige Untersuchungen als interessanter Beobachtungsparameter anbieten würde.

Da die routinemäßig durchgeführten Untersuchungen bei der klassischen Samenanalyse nur moderate Aussagen über den Fertilitätsstatus des jeweiligen Patienten machen (CHEN et al., 2006) und auch somit das IVF- beziehungsweise ICSI-Ergebnis kaum vorhersagen können, stellt sich nun die Frage, ob eine routinemäßig durchgeführte Untersuchung der Anzahl der DNA-Strangbrüche in Zukunft bezüglich der Wahrscheinlichkeitsberechnung des Therapieerfolges bei assistierter Reproduktion von Nutzen sein wird. Denn aktuell wird Anhand der Ergebnisse der klassischen Samenanalyse entschieden, ob für den jeweiligen Patienten eine IVF- oder ICSI-Behandlung in Frage kommt.

Da diese Studie keine eindeutige Verbesserung der Erfolgskalkulation für eine erfolgreiche IVF- oder ICSI-Therapie durch Messung der DNA-Fragmentationsrate erkennen lässt, bleibt diese Frage an dieser Stelle unbeantwortet.

### **5.3. Reactive oxygen species (ROS)**

Im Kapitel 4.1.3. waren die Konzentrationen von ROS in den verschiedenen untersuchten Patientengruppen bereits zusammengefasst. Im Mittelwert zeigt sich hier in der IVF-Gruppe gegenüber dem ICSI-Kollektiv eine erhöhte ROS-Konzentration mit 94.73 versus 54.78  $\mu\text{mol/l}$ . Allerdings ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p=0.093$ ).

Die erstellte Verbindung zu den Parametern der klassischen Samenanalyse (siehe Kapitel 4.3.) ergibt zwischen den einzelnen Patientengruppen recht uneinheitliche Ergebnisse. Im ICSI-Kollektiv finden sich statistisch signifikant negative Zusammenhänge zwischen dem ROS-Gehalt und der Spermiedichte ( $p=0.023$ ,  $r=-0.482$ ) und dem pH-Wert ( $p=0.015$ ,  $r=-0.510$ ) (siehe Tabelle 4-14). In der IVF-Gruppe dagegen zeigt sich eine stark signifikant positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert ( $p=0.007$ ,  $r=0,516$ ). Sowohl zur Motilität, zur Morphologie und auch zur Spermiedichte ist keine eindeutige Linie erkennbar. Bemerkenswert ist lediglich die konstant negative, aber statistisch nicht signifikante Relation zur Vitalität und Membranintegrität in allen untersuchten Gruppen (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14).

Im Vergleich des ROS-Gehalts mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche beziehungsweise dem Chromatinkondensationsstatus sind keine signifikanten Resultate ermittelt worden (siehe

Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17). Hier sind die Ergebnisse ebenfalls relativ uneinheitlich. Im IVF-Kollektiv findet sich eine negative Korrelation zwischen dem ROS-Gehalt und sowohl der Anzahl der DNA-Strangbrüche ( $r=-0.005$ ) als auch der Chromatinkondensationsrate, gemessen mit der Chromomycin-Färbung ( $r=-0.082$ ), dagegen eine positive Korrelation zum Chromatinkondensationsstatus, ermittelt mit der Acridine Orange-Färbung ( $r=0.310$ ). Im ICSI-Kollektiv sind die Korrelationen beider Färbungen zur Beurteilung des Chromatinkondensationsstatus in negativer Beziehung zum ROS-Gehalt (Acridine Orange  $r=-0.098$ , Chromomycin  $r=-0.299$ ), wohingegen die Anzahl der DNA-Strangbrüche mit ROS positiv korreliert ( $r=0.132$ ).

Die Betrachtung des Einflusses des ROS-Gehalts auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate ist aufschlussreich (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-1, 4-2 und 4-3). In jeder der untersuchten Gruppen ist die Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Befruchtungsrate negativ (IVF-Gruppe  $r=-0.267$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.241$ ), im Gesamtkollektiv sogar statistisch signifikant ( $p=0.045$ ,  $r=-0.290$ ). Nur im ICSI-Kollektiv zeigt sich im Gegensatz dazu aber auch noch die Schwangerschaftszahl zusätzlich noch in negativer Korrelation zum ROS-Gehalt ( $r=-0.092$ ).

Als unterschätzter Grund für die männliche idiopathische Infertilität wird eine Überproduktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS) angenommen (FORD et al., 1997). Diese Gruppe von freien Radikalen zeichnet das Vorhandensein eines ungepaarten Elektronenpaars aus, welches zu einer aggressiven Reaktionsfreudigkeit führt (SHARMA und AGARWAL, 1996; COCUZZA et al., 2007). Zur Gruppe der Sauerstoffradikalen gehören zum Beispiel Wasserstoffperoxide, Hydroxylradikale, Superoxidanionen, Hydroperoxyradikale und Nitridoxide (WHO, 1999). Es ist aber nicht prinzipiell davon auszugehen, dass Vorhandensein von ROS nur negative Effekte auf den Organismus hat. In geringen Mengen vollzieht ROS physiologische Aufgaben im menschlichen Samen als second messenger bei der Kapazitation, der Akrosomenreaktion, der Hyperaktivierung und der Zona-Pellucida-Bindung der Spermien (AITKEN et al., 1989; OCHSENDORF et al., 1994; SHARMA und AGARWAL, 1996; FORD, 2002; MAIORINO und URSINI, 2002; VILLEGAS et al., 2003; AGARWAL et al., 2005). Bei einer exzessiven Menge an vorhandenem ROS werden jedoch viele pathologische Wirkungen beschrieben (FORD, 2002; AGARWAL et al., 2005; GALLARDO,

2007), wie zum Beispiel eine verminderte Befruchtungsrate bei der IVF-Therapie, schlechtere Embryonalentwicklung mit erhöhter Abortrate und auch erhöhte Morbidität der Nachfahren (AITKEN und DE IULIIS, 2007). Da die Plasmamembran der Spermien viele mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthält, ist diese gegenüber Oxidantien sehr anfällig (ZABLUDOVSKY et al., 1999; OLLERO et al., 2001; SIKKA et al., 2001; AITKEN und SAWYER, 2003; SHEWEITA et al., 2005). Unter dem Einfluss von ROS kommt es hier zur vermehrten Lipidperoxidation mit nachfolgendem Schaden der Plasmamembran und Störung der Spermienintegrität (AITKEN et al., 1998; ZABLUDOVSKY et al., 1999; AGARWAL et al., 2005). Wo genau die Grenze zwischen physiologischer und pathologischer ROS-Konzentration zu sehen ist, kann nach den bisher durchgeführten Studien aber noch nicht klar festgelegt werden (NOVOTNY et al., 2003). Quellen der ROS-Produktion sind erstens Leukozyten (DE LAMIRANDE und GAGNON, 1995; ZALATA et al., 1995; GRIVEAU et al., 1998; SHEN et al., 2000; OLLERO et al., 2001; NOVOTNY et al., 2003; AGARWAL et al., 2005), genauer gesagt Makrophagen und neutrophile Granulozyten (AGARWAL et al., 2005), zweitens werden die unreifen Spermien in einer Ejakulatfraktion ebenso mit einer erhöhten ROS-Produktion in Verbindung gebracht (OCHSENDORF et al., 1994; AITKEN et al., 1998; DURU et al., 2000; OLLERO et al., 2001; NOVOTNY et al., 2003). Es handelt sich im Besonderen um diese Art von Spermien, welche - am ehesten durch eine Störung der frühen Spermiogenese- vermehrt Zytoplasmareste aufweisen und von abnormaler Morphologie sind (OLLERO et al., 2001; NOVOTNY et al., 2003). Durch die vermehrte Konzentration zytoplasmatischer Enzyme in diesen unreifen Spermien kann es zu einer gesteigerten Stimulation für die Produktion von ROS kommen (AITKEN et al., 1998; GEVA et al., 1998). Dies gereicht dagegen vor allem den normal geformten, mit wenig Zytoplasma ausgestatteten Spermien zum Nachteil. Das geringe Zytoplasmavolumen enthält wenig Mechanismen, welche gegen die schädigenden Einflüsse der Oxidantien ankämpfen (NOVOTNY et al., 2003; AGARWAL et al., 2005; COCUZZA et al., 2007). Durch diese Zusammenhänge wird die wichtige Funktion des Seminalplasmas als Quelle weiterer antioxidativ wirkender Defensivsysteme klar (NOVOTNY et al., 2003). Für das Fertilitätspotential erscheint also die ausgeglichene Balance zwischen der ROS-Produktion und dem Antioxidantiengehalt im seminalen Plasma von zentraler Bedeutung (DURU et al., 2000; VILLEGAS et al., 2003; AGARWAL et al., 2005).

Zum negativen Einfluss der ROS-Konzentration im seminalen Plasma auf die Parameter der klassischen Samenanalyse existieren einige Studien (DAS et al., 2008; HAMMADEH et al., 2008). Mehrfach wurde von abnehmender Spermienmotilität bei zunehmendem ROS-Einfluss berichtet (OCHSENDORF et al., 1994; GRIVEAU et al., 1995; MAZZILLI et al., 1995; SHARMA und AGARWAL, 1996; GRIVEAU und LE LANNOU, 1997; AITKEN et al., 1998; WHITTINGTON et al., 1999; AGARWAL und SALEH, 2002; AITKEN und SAWYER, 2003; COCUZZA et al., 2007; KAO et al., 2008). Als Erklärung hierfür führten MAZZILLI et al. (1995) die erhöhte Lipidperoxidation der Spermienmembran an. Diesen Erkenntnissen kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14) nur bezüglich der globalen Motilität in der IVF-Gruppe ( $r=-0.108$ ) und der progressiven Motilität in der ICSI-Gruppe ( $r=-0.096$ ) angeschlossen werden. CHEN et al. (2001) waren überrascht über die ermittelte positive Korrelation zwischen dem ROS-Gehalt und der Spermienmotilität, entsprechend der progressiven Motilität der IVF- und der globalen Motilität der ICSI-Gruppe in dieser Studie ( $r=0.120$  und  $r=0.028$ ). PLANTE et al. (1994) beschreiben, dass ROS, jedoch nur in geringer Konzentration, auf die Spermienmotilität keinen Einfluss habe. Von dem inversen Verhältnis der Morphologie zur ROS-Konzentration berichten auch einige Autoren (OCHSENDORF et al., 1994; SHARMA und AGARWAL, 1996; CHEN et al., 2001; ZORN et al., 2003; AZIZ et al., 2004). Als Erklärung dieser Tatsachen ist möglicherweise die erhöhte abnormale Spermienmorphologie nicht als Folge, sondern als Ursache für die erhöhte ROS-Produktion, wie oben beschrieben, zu sehen. In der eigenen Arbeit ist das gleiche Ergebnis im Gesamtkollektiv ( $r=-0.141$ ) und in der IVF- ( $r=-0.297$ ), nicht aber in der ICSI-Gruppe ( $r=0.017$ ) ermittelt worden. Hier darf allerdings nicht vergessen werden, dass auch bei fertilen Männern anormale Spermienformen bis zu 80 Prozent gefunden worden sind (NOVOTNY et al., 2003). Als eine weitere mögliche Folge der Membranschädigung durch die Lipidperoxidation kommt die verminderte Spermienvitalität in Frage (MAZZILLI et al., 1995). OCHSENDORF et al. (1994) und MAZZILLI et al. (1995) berichten in ihren Studien von einer negativen Korrelation zwischen dem ROS-Gehalt und der Vitalität. Dieses Ergebnis kann hier in allen untersuchten Patientengruppen nachvollzogen werden (Gesamtkollektiv  $r=-0.111$ , IVF-Gruppe  $r=-0.288$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.107$ ). Die Spermienkonzentration wurde durch SHARMA und AGARWAL (1996) sowie durch ZABLUDOVSKY et al. (1999) in negativer Relation zur ROS-Konzentration gefunden. Nach den Ergebnissen der Arbeit von SMITH et al. (2007) konnte eine erhöhte ROS-Produktion und ein erhöhter resultierender DNA-Schaden bei einer



Gruppe von Männern mit idiopathischer Oligozoospermie gegenüber einer Kontrollgruppe beobachtet werden. In dieser Studie kann in der ICSI-Gruppe ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der Spermiedichte und der ROS-Konzentration ( $p=0.023$ ,  $r=-0.482$ ) ermittelt werden (sogar mit signifikantem Ergebnis) und bezüglich der Dichte nach Aufbereitung für jede untersuchte Patientengruppe (Gesamtkollektiv  $r=-0.078$ , IVF-Gruppe  $r=-0.132$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.217$ ). Nach COCUZZA et al. (2007) konnte kein klarer Zusammenhang zwischen dem seminalen ROS-Gehalt und den Parametern der klassischen Samenanalyse hergestellt werden. Als Erklärung hierfür wird erwogen, dass möglicherweise die ROS-Konzentration zwar hoch genug sein kann, um die Fertilität zu beeinträchtigen, nicht aber hoch genug zur Reduktion der Parameter der klassischen Samenanalyse.

Die Verursachung von DNA-Strangbrüchen durch ROS mittels Lipidperoxidation mit möglicherweise anschließendem Zelltod ist ein bekannter Mechanismus (AITKEN et al., 1998; BARROSO et al., 2000; AGARWAL und SALEH, 2002; NOVOTNY et al., 2003; SALEH et al., 2003; VILLEGAS et al., 2003; AZIZ et al., 2004; AGARWAL et al., 2006). Die Arbeit von MOUSTAFA et al. (2004) zeigte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Apoptoserate und der ROS-Konzentration im seminalen Plasma. Nach einem Versuch von DURU et al. (2000), welche Spermien mit Hydrogenperoxyd inkubierten, konnte der Zusammenhang zur vermehrten Lipidperoxidation und Induktion von DNA-Strangbrüchen bei steigenden ROS-Konzentrationen gesehen werden. Dies kann in der vorliegenden Studie (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17) nur für die ICSI-Gruppe ( $r=0.132$ ) nachvollzogen werden. Der Grund für die negative Korrelation zwischen ROS und der Anzahl der DNA-Strangbrüche im Gesamt- ( $r=-0.010$ ) und IVF-Kollektiv ( $r=-0.005$ ) bleibt unklar.

Eine erhöhte ROS-Produktion im menschlichen Samen wird oft als wichtige Ursache der männlichen Infertilität genannt (ZABLUDOVSKY et al., 1999; NOVOTNY et al., 2003; AGARWAL et al., 2006). Nach SHARMA et al. (1999) sind in 25-40 Prozent der Samenproben infertiler Männer erhöhte ROS-Konzentrationen enthalten. Eine verminderte Schwangerschaftsrate bei erhöhten ROS-Werten fanden OCHSENDORF et al. (1994), dagegen GRIVEAU und LE LANNOU (1997) sowie COCUZZA et al. (2007) eine verminderte Befruchtungsrate. Speziell nur auf die IVF-Patienten bezogen berichteten ZABLUDOVSKY et al. (1999) und AGARWAL et al. (2003) unter diesen Voraussetzungen über eine verminderte

Schwangerschaftsrate und ZORN et al. (2003) zusätzlich noch über eine reduzierte Befruchtungsrate. Über eine isolierte Beobachtung eines ICSI-Kollektivs konnte wenig in der Literatur gefunden werden. Nach ZORN et al. (2003) wurde zwischen ROS und der Befruchtungsrate kein Zusammenhang gesehen, jedoch war die Embryonalentwicklung in dieser Gruppe bis zum Blastozystenstadium deutlich reduziert. DAS et al. (2008) konnten in einer mit ICSI therapierten Gruppe dennoch einen Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und sowohl der Befruchtungs- als auch der Schwangerschaftsrate herstellen. In der eigenen Arbeit (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-1, 4-2 und 4-3) wird jedoch die negative Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und dem seminalen ROS-Gehalt in jedem untersuchten Kollektiv deutlich (Gesamtkollektiv  $r=-0.290$ , IVF-Gruppe  $r=-0.267$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.241$ ). Die Schwangerschaftszahl dagegen findet sich lediglich in der ICSI-Patientengruppe in negativer Korrelation zu ROS ( $r=-0.092$ ).

Für zukünftige Untersuchungen zu diesem Thema bietet die ergänzende Beobachtung der weiteren Embryonalentwicklung sicherlich ein guter Anknüpfungspunkt, denn viele kritische Stimmen bemängeln, dass mittels der assistierten Reproduktionsmedizin die natürlichen Barrieren ausgeschaltet werden, welche das Eindringen abnormaler Spermien in die Eizelle verhindern sollen (RAZAVI et al., 2003). Sollte die erhöhte ROS-Produktion unter anderem eine verminderte, unnormale Embryonalentwicklung nach sich ziehen, so könnte eine routinemäßig durchgeführte ROS-Messung im Seminalplasma nicht nur als prognostisches, sondern auch als diagnostisches Instrument durchaus Sinn machen (ZORN et al., 2003).

#### **5.4. Totaler Antioxidantienstatus (TAS)**

Die durchschnittlichen Mengen des totalen Antioxidantienstatus der unterschiedlichen Patientengruppen, die in dieser Studie untersucht wurden, sind bereits im Kapitel 4.1.3. tabellarisch dargestellt. Die IVF-Gruppe mit einem etwas geringeren seminalen TAS-Gehalt (IVF-Gruppe 1,43 mmol/l; ICSI-Gruppe 1,53 mmol/l) unterscheidet sich diesbezüglich aber nicht signifikant von der ICSI-Gruppe ( $p=0.153$ ).

Der Vergleich zu den Parametern der klassischen Samenanalyse (siehe Kapitel 4.3.) zeigt in der Gesamt- und in der IVF-Gruppe zu allen Motilitätsparametern negative Korrelationen.

Nur im ICSI-Kollektiv herrschen positive Korrelationen zur globalen ( $r=0.370$ ), progressiven ( $r=0.091$ ) und Motilität nach Aufbereitung ( $r=0.067$ ). Ebenso korrelieren Dichte (IVF  $r=0.165$ , ICSI  $r=0.251$ ), Vitalität (IVF  $r=0.045$ , ICSI  $r=0.334$ ) und Membranintegrität (IVF  $r=0.102$ , ICSI  $r=0.430$ ) im IVF- und ICSI-Kollektiv positiv mit der TAS-Konzentration. Zu den morphologischen Normalformen besteht in jeder Gruppe eine negative Beziehung, im Gesamtkollektiv sogar statistisch signifikant ( $p=0.026$ ,  $r=-0.321$ ).

Auf mögliche bestehende Beziehungen zwischen dem seminalen TAS-Gehalt und dem Chromatinkondensationsstatus beziehungsweise der Anzahl der DNA-Strangbrüche war bereits im Kapitel 4.4. eingegangen worden (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17). Obwohl sich keine statistisch signifikanten Resultate ergeben, wird doch die in allen Patientengruppen vorhandene negative Korrelation zwischen TAS und der Anzahl der DNA-Strangbrüche deutlich (Gesamtkollektiv  $r=-0,117$ , IVF-Gruppe  $r=-0.216$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.098$ ). Zum Chromatinkondensationsstatus sind die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Patientenkollektiven und den zwei verschiedenen Färbungen uneinheitlich und somit nicht sehr aussagekräftig.

Bezüglich den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-4, 4-5 und 4-6) sind die Zahlen ebenfalls teilweise widersprüchlich. So korreliert sowohl im Gesamtkollektiv ( $r=0.081$ ) als auch in der ICSI-Gruppe ( $r=0.184$ ) die Befruchtungsrate positiv, die Schwangerschaftsrate aber negativ mit der seminalen TAS-Konzentration (Gesamtkollektiv  $r=-0.064$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.040$ ). Im IVF-Kollektiv sind diese Verhältnisse gerade umgekehrt (Befruchtungsrate  $r=-0.031$ , Schwangerschaftsrate  $r=0.005$ ).

Durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in ihrer Plasmamembran sind Spermien oxidativem Stress gegenüber sehr anfällig (NOVOTNY et al., 2003). Im Verlauf der Spermio-genese wird den Spermien normalerweise ein Großteil des Zytoplasmas entzogen, so dass auch insgesamt wenig zytoplasmatische Enzyme mit antioxidativer Funktion zur Verfügung stehen (GEVA, 1998; AGARWAL, 2004). Zum Ausgleich sind im seminalen Plasma mehrere Abwehrsysteme vorhanden, welche die Funktion eines Radikalfängers übernehmen können (SMITH et al., 1996; ALKAN et al., 1997; OZBEK et al., 2000; GALLARDO, 2007).

Eingeteilt werden diese Abwehrsysteme in enzymatische (zum Beispiel Superoxiddismutase, Gluthationperoxidase, Katalase) und niedermolekulare nicht-enzymatische Antioxidantien (zum Beispiel Albumin, Vitamin E) (AITKEN und FISHER, 1994; SMITH et al., 1996; AGARWAL, 2003). Nach dem Wirkungsmechanismus kann man diese Antioxidantiensysteme auch in die Präventions-, Interventions- und Reparaturgruppe einteilen. Das heißt, je nach Gruppenzugehörigkeit, können Antioxidantien das Entstehen von freien Radikalen unterbinden, die Lipidperoxidationskaskade unterbrechen oder schon entstandenen Schaden beheben (SALEH und AGARWAL, 2002; FUJII et al., 2003). Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen der ROS-Produktion und der ROS-Entsorgung durch die Antioxidantien ist für das Fertilitätspotential eine wichtige Voraussetzung (AGARWAL, 2003; GALLARDO, 2007). Gerät dieses Verhältnis aus dem Gleichgewicht, entsteht oxidativer Stress, welcher mit Zell- und DNA-Schädigung einhergeht (SHARMA et al., 1999; DANDEKAR et al., 2002). Dieser Mechanismus kann nach ALKAN et al. (1997) und KAO et al. (2008) einer der Hauptgründe für die männliche idiopathische Infertilität sein. Damit wird klar, dass Spermien in Abwesenheit des schützenden Seminalplasmas einer höheren Gefahr der Schädigung durch freie Radikale ausgesetzt sind (SMITH et al., 1996). Diese Situation liegt zum Beispiel vor, wenn Spermien für bestimmte Reproduktionstechniken (wie zum Beispiel IVF oder ICSI) aufbereitet werden. So gesehen macht es Sinn, die Kulturmedien mit Antioxidantien wie Albumin zu versetzen (SHARMA, 1996; AGARWAL, 2003).

Um diese Zusammenhänge zu bestätigen, verglichen SMITH et al. (1996) in einer Studie die Samenproben von bewiesenen 15 fertilen und 101 infertilen Männern. Bestimmt wurden neben den routinemäßig durchgeführten Samenuntersuchungen die Lipidperoxidation und der TAS-Gehalt. Dabei wurde eine deutlich negative Korrelation zwischen der Lipidperoxidation und den Antioxidantien ermittelt, was also eine wichtige Rolle bei der Ursache für männliche Infertilität zu spielen scheint. Zu den Parametern der klassischen Samenanalyse bietet diese Studie auch aufschlussreiche Ergebnisse. Der TAS-Gehalt zeigt sich positiv korrelierend mit der progressiven Spermienmotilität und den morphologischen Normalformen. Die Arbeit von PASQUALOTTO et al. (2000) untersuchte eine ähnliche Konstellation. Hier wurden auch Proben von fertilen und infertilen Männern auf Routinespermiogrammparameter und den seminalen TAS-Gehalt geprüft. Es ergab sich eine negative Korrelation zwischen der TAS-Konzentration und der Spermienmotilität, was sich in

der vorliegenden Studie im Gesamt- und IVF-Kollektiv gleichermaßen gezeigt hat (globale Motilität: Gesamtkollektiv  $p=0.030$ ,  $r=-0.313$ , IVF-Gruppe  $p=0.009$ ,  $r=-0.499$ ; progressive Motilität: Gesamtkollektiv  $p=0.004$ ,  $r=-0.409$ , IVF-Gruppe  $p=0.011$ ,  $r=-0.492$ ). Die Arbeit von PASQUALOTTO et al. (2000) berücksichtigte unter den infertilen Männern verschiedene Diagnosegruppen, welche die Infertilität begründen. Unter den verschiedenen Untergruppen zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation zur Morphologie. Die Varikozelengruppe und die Infektions-Fraktion kombiniert mit Varikozele boten eine Negativkorrelation zwischen morphologischen Normalformen und der TAS-Konzentration. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie in allen untersuchten Patientengruppen (Gesamtkollektiv  $r=-0.321$ , IVF-Gruppe  $r=-0.354$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.230$ ). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeit von KHOSROWBEYGI und ZARGHAMI (2007) sowohl bezüglich der morphologischen Normalformen als auch der Motilität zur TAS-Konzentration im seminalen Plasma eine positive Korrelation ermitteln. Auch KOCA et al. (2003) stellten eine positive Korrelation diesbezüglich fest. Zusätzlich sei an dieser Stelle angemerkt, dass die eigenen ermittelten TAS-Konzentrationen mit denen der Studie von KOCA et al. (2003) gut im Einklang sind (1.48 mmol/l versus 1.78 mmol/l).

Viele der durchgeführten Studien folgten dem Prinzip, eine infertile Patientengruppe einem Kontrollkollektiv gegenüberzustellen. Im Großteil dieser Arbeiten findet man die TAS-Werte in der Patientengruppe gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert (SMITH et al., 1996; ALKAN et al., 1997; SHARMA et al., 1999; KOCA et al., 2003; GARRIDO et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnten SMITH et al. (2007) zwischen Männern mit idiopathischer Oligozoospermie und der Kontrollgruppe keinen Unterschied feststellen. In der vorliegenden Studie wurde keine Kontrollgruppe zum Vergleich der Werte herangezogen, jedoch in IVF- und ICSI-Patienten differenziert (siehe Tabelle 4-6). Hierbei stellt sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht als statistisch signifikant heraus ( $p=0.153$ ).

POTTS et al. (2000) beschreiben einen Versuchsaufbau, bei dem Spermien entweder isoliert oder mit Zusatz von Seminalplasma künstlich mit verschiedenen Dosen ROS inkubiert wurden. Dabei zeigte sich durch die Zugabe von Seminalplasma eine deutlich geringere DNA-Fragmentation, was sich möglicherweise auf die reichlichen Antioxidantienmengen im Seminalplasma zurückführen lässt. Dieses Ergebnis wird in der vorliegenden Studie durch die negative Korrelation zwischen TAS-Gehalt und DNA-Fragmentationsrate weitgehend reproduziert (Gesamtgruppe  $r=-0.117$ , IVF-Gruppe  $r=-0.216$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.098$ ).

Es bleibt zu klären, welche Bedeutung die Behandlung mit Antioxidantien für die Reproduktionsmedizin darstellt. Ebenso strittig ist die Effizienz derselben (AGARWAL et al., 2005). GRECO et al. (2005) konnten nach oraler Substitution mit Vitamin C und E über zwei Monate im Vergleich zu einem früheren Versuch eine steigende Schwangerschaftsrate nach ICSI-Prozedur und verminderte DNA-Fragmentation messen. Die Befruchtungsrate war jedoch unverändert geblieben. LEWIN und LAVON (1997) konnten nach einer Behandlung mit dem Antioxidans Koenzym Q10 eine Verbesserung der Fertilisationsrate bei ICSI verzeichnen. Nach den Ergebnissen dieser Studie war zwar keine Behandlung mit Antioxidantien durchgeführt worden, aber dennoch sieht man im Gesamt- und ICSI-Kollektiv den positiven Zusammenhang zwischen TAS-Gehalt und der Befruchtungsrate, nicht aber der Schwangerschaftsrate (Befruchtungsrate: Gesamtkollektiv  $r=0.081$ , ICSI-Gruppe  $r=0.184$ ; Schwangerschaftsrate: Gesamtkollektiv  $r=-0.064$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.040$ ).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass nach den Ergebnissen einiger Studien, eingeschlossen der eigenen, sich ein erhöhter Antioxidantiengehalt im Seminalplasma positiv auf die Ergebnisse der assistierten Reproduktion auswirkt. Die Effektivität der antioxidativen Therapie ist durch die sehr uneinheitlichen Erfahrungen über verschiedene Substanzen, Dosierungen und Behandlungsschemata noch recht umstritten und bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen.

## **5.5. Albumin**

Die durchschnittliche Albuminkonzentration im Gesamtkollektiv beträgt 7.59 g/l (siehe Kapitel 4.1.3.). Die IVF-Gruppe ist mit einem Wert von 8.46 g/l d der ICSI-Gruppe (6.57 g/l) überlegen, aber dieser Unterschied zeigt sich als statistisch nicht signifikant ( $p=0.074$ ).

Verglichen mit den Parametern der klassischen Samenanalyse (siehe Kapitel 4.3.) ergeben sich uneinheitliche Ergebnisse bezüglich der Motilität. So korreliert im Gesamtkollektiv die globale, nicht aber die progressive Motilität positiv mit dem Albumingehalt des seminalen Plasmas ( $r=0.021$ ). Nur Negativkorrelationen liegen bezüglich der Motilitätsparameter im IVF-Patientengut vor. Dagegen korreliert in der ICSI-Gruppe die progressive ( $r=0.269$ ) und globale ( $r=0.152$ ) Motilität positiv mit der Albuminkonzentration. Ebenso ergeben sich im

ICSI- und Gesamtkollektiv Positivkorrelationen zu den Vitalitätsparametern, der Dichte und den morphologischen Normalformen. Im IVF-Kollektiv herrschen zusätzliche negative Korrelationen zwischen Spermiendichte ( $r=-0.020$ ), Vitalität ( $r=-0.093$ ), morphologischen Normalformen ( $r=-0.067$ ) und der Albuminkonzentration vor. Jedoch liegen in keinem der erwähnten Fälle Signifikanzen vor (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14).

In Kapitel 4.4. wurden die Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen Chromatinkondensationsstatus beziehungsweise Anzahl der DNA-Strangbrüche und den Oxidantien sowie Antioxidantien bereits dargelegt (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17). In allen untersuchten Gruppen korreliert interessanterweise die Albuminkonzentration negativ mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche (Gesamtkollektiv  $r=-0.243$ , IVF-Gruppe  $r=-0.297$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.186$ ). Mit Ausnahme der Acridine Orange-Färbung im IVF-Kollektiv liegen auch durchweg nur positive Korrelationen zum Chromatinstatus vor.

Der Vergleich der Albuminkonzentration und der Befruchtungs- beziehungsweise Schwangerschaftsrate (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-7, 4-8 und 4-9) zeigt in jeder Gruppe eine positive Korrelation (Befruchtungsrate: Gesamtkollektiv  $r=0.033$ , IVF-Gruppe  $r=0.140$ ; Schwangerschaftsrate: Gesamtkollektiv  $r=0.104$ , IVF-Gruppe  $r=0.033$ , ICSI-Gruppe  $r=0.165$ ). Ausnahme bildet die ICSI-Gruppe, in der die Fertilitätsrate negativ zum Albumingehalt korreliert ( $r=-0.286$ ). Als statistisch signifikant kann die positive Korrelation zwischen Albumin und der Anzahl fertilisierter Eizellen im Gesamt- und IVF-Kollektiv ermittelt werden (Gesamtkollektiv  $p=0.002$ ,  $r=0.437$ , IVF-Gruppe  $p=0.005$ ,  $r=0.529$ ).

Wie oben erwähnt gibt es enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfängersysteme im Seminalplasma. Zu Letzteren gehört Albumin, ein Protein, welches physiologischerweise im seminalen Plasma vorkommt (GEVA et al., 1998; AGARWAL, 2004). Über den Bildungsort gibt es in der Literatur verschiedene Ansichten. Ältere Arbeiten vermuten einen prostatistischen Ursprung, da der Albumingehalt in der ersten Ejakulatfraktion am größten ist (LINDHOLMER et al., 1974). ORLANDO et al. (1988) sehen jedoch den Hoden, genauer gesagt die Sertolizellen als dessen Bildungsort an. ELZANATY et al. (2007) bestimmten als Ursprungsort von seminalem Albumin sowohl den Hoden, den Nebenhoden als auch die Prostata.

Da Albumin als Bestandteil des Seminalplasmas eine antioxidative Wirkung nachgesagt wird, wurde es als Parameter in diese Studie mit eingebunden und unter anderem die Zusammenhänge mit den Ergebnissen von der IVF- und ICSI-Prozedur hergestellt.

Über den möglichen Zusammenhang zwischen Albumin und den Parametern der klassischen Samenanalyse sind in der Literatur wenige Informationen zu finden. LINDHOLMER et al. (1974) fanden keine lineare Abhängigkeit in ihrer Studie zwischen dem Albumingehalt und der Motilität. ELZANATY et al. (2007) stellten in ihrer Arbeit eine negative Korrelation zwischen dem Albumingehalt und dem Volumen, dagegen aber eine positive Beziehung von Albumin zur Dichte und Morphologie fest. Jedoch konnte keine Assoziation zwischen Albumin und der Motilität beobachtet werden. Durch die sehr uneinheitlichen Ergebnisse der eigenen Studie kann diese Feststellung bestätigt werden. Dagegen konnten LINDHOLMER et al. (1974), LORNAGE et al. (1983), AKERLOF et al. (1989) und JARVI et al. (1993) durch den Versuch der Albuminzugabe in Abhängigkeit der jeweiligen Dosis eine Verbesserung der Spermienmotilität erzielen. Zum Probenvolumen beschreiben LINDHOLMER et al. (1974) eine negative Korrelation, was sich in der eigenen Arbeit auch für das Gesamt- und das IVF-Kollektiv reproduzieren lässt (Gesamtkollektiv  $r=-0.208$ , IVF-Gruppe  $r=-0.391$ ). ORLANDO et al. (1988) konnten eine schwach positive Korrelation zwischen dem seminalen Albumingehalt und der Spermiedichte verzeichnen. Betrachtet man diese Arbeit, so stimmt dies mit den Ergebnissen im Gesamt- und ICSI-Kollektiv überein, nicht jedoch mit denen der IVF-Gruppe (Gesamtkollektiv  $r=0.150$ , IVF-Gruppe  $r=-0.020$ , ICSI-Gruppe  $r=0.264$ ). Zusätzlich findet sich die Information, dass im Versuch nach Albuminsubstitution ein verlängertes Spermienüberleben ermittelt werden konnte (LINDHOLMER et al., 1974). Heute macht man sich dies zum Nutzen, indem man albuminhaltige Medien bei der Spermienaufbereitung verwendet (AGARWAL, 2004). Gerade zum Feststellen eines möglichen Zusammenhangs zwischen seminalem Albumin und der Spermienmorphologie fordern ELZANATY et al. (2007) die Durchführung weiterer Untersuchungen, da in der aktuellen Literatur sehr wenig zu diesem Thema zu finden ist.

Nach SHARMA und AGARWAL (1996) sowie SMITH et al. (1996) trägt Albumin zum Zellschutz gegenüber freien Radikalen bei. Nach den Ausführungen von TWIGG et al. (1998) und AGARWAL (2004) kann Albumin die Lipidperoxidation selbst nicht verhindern, aber durch



Komplexbildung mit Lipidperoxiden der Plasmamembran vermag Albumin diese zu neutralisieren und deren zytotoxischen Effekt zu verhindern. Auf diese Weise schützt Albumin indirekt vor DNA-Fragmentation (TWIGG et al., 1998). Dazu geht das Ergebnis dieser Studie mit negativer Korrelation zwischen Anzahl der DNA-Strangbrüche und Albumingehalt in jeder Gruppe konform (Gesamtkollektiv  $r=-0.243$ , IVF-Gruppe  $r=-0.297$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.186$ ).

## 5.6. Transferrin

Die durchschnittliche Transferrinkonzentration im seminalen Plasma beträgt in dieser Studie 4.23 mg/dl (siehe Tabellen 4-5 und 4-6). Der etwas höhere Wert liegt in der ICSI-Gruppe gegenüber dem IVF-Kollektiv vor (3.62 mg/dl versus 4.96 mg/dl), aber dieser Unterschied zeigt sich statistisch nicht signifikant ( $p=0.302$ ).

Im Vergleich des seminalen Transferringehalts zu den Parametern der klassischen Samenanalyse (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14) finden sich positive, aber statistisch nicht signifikante Korrelationen zur Spermiedichte in allen Gruppen (Gesamtkollektiv  $r=0.252$ , IVF-Gruppe  $r=0.296$ , ICSI-Gruppe  $r=0.389$ ). Bezogen auf die morphologischen Normalformen liegen nicht signifikante negative Korrelationen in jeder Gruppe vor (Gesamtkollektiv  $r=-0.221$ , IVF-Gruppe  $r=-0.279$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.103$ ). Uneinheitliche Ergebnisse ergeben sich bezüglich der Korrelationen vom Transferringehalt zu den Motilitätsparametern, der Vitalität und Membranintegrität. Bemerkenswert sind an dieser Stelle sicherlich die signifikant negativen Korrelationen zur globalen und progressiven Motilität im Gesamt- und IVF-Kollektiv (globale Motilität: Gesamtkollektiv  $p=0.032$ ,  $r=-0.310$ , IVF-Gruppe  $p=0.019$ ,  $r=-0.458$ ; progressive Motilität: Gesamtkollektiv  $p=0.018$ ,  $r=-0.340$ , IVF-Gruppe  $p=0.034$ ,  $r=-0.418$ ) und die signifikant positive Korrelation zur Membranintegrität in der ICSI-Patientengruppe ( $p=0.016$ ,  $r=0.509$ ).

Betrachtet man nun den Zusammenhang zwischen Transferringehalt des seminalen Plasmas und der Anzahl der DNA-Strangbrüche (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17), so zeigen sich hier negative, aber nicht statistisch signifikante Korrelationen mit Ausnahme der IVF-Gruppe (Gesamtkollektiv  $r=-0.039$ , IVF-Gruppe  $r=0.021$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.168$ ). Der

Kernchromatinstatus korreliert jeweils positiv mit dem Transferringehalt (Acridine Orange-Färbung: Gesamtkollektiv  $r=0.009$ , IVF-Gruppe  $r=0.205$ , ICSI-Gruppe  $r=0.001$ ; Chromomycin-Färbung: Gesamtkollektiv  $r=0.024$ , IVF-Gruppe  $r=0.084$ , ICSI-Gruppe  $r=0.163$ ). Auch diese Ergebnisse sind nicht signifikant.

Es ergeben sich im Vergleich der Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate mit dem Transferringehalt interessanterweise sehr verschiedene Resultate (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-10, 4-11 und 4-12). Im Gesamt- und IVF-Kollektiv finden sich im Gegensatz zur ICSI-Gruppe positive Korrelationen zwischen Befruchtungsrate und Transferringehalt (Gesamtkollektiv  $r=0.019$ , IVF-Gruppe  $r=0.010$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.056$ ). Dagegen stehen im IVF-Kollektiv die Schwangerschaftsrate mit dem Transferringehalt in positiver Korrelation zueinander ( $r=0.004$ ).

Transferrin ist ein Glykoprotein, welches im Blutserum und verschiedenen anderen Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel im Seminalplasma, vorkommt und für den Eisentransport zu den Zellen verantwortlich ist (SUELDO et al., 1983; MALLEA et al., 1987; ORATORE et al., 1987; ZALATA et al., 1996). Bis zu 80 Prozent des seminalen Transferrins wird von den testikulären Sertolizellen produziert (HOLMES et al., 1982; ANAPLIOTOU et al., 1995), so dass vielzählige Studien immer wieder Transferrin als guten Marker der Sertolizellfunktion deklarieren (SUELDO et al., 1983; MALLEA et al., 1987; BARTHELEMY et al., 1988; CANALE et al., 1988; IRISAWA et al., 1993; ZALATA et al., 1996). Der restliche Anteil wird wahrscheinlich durch die Prostata oder Samenbläschen gebildet oder entsteht durch Serumtranssudation (BARTHELEMY et al., 1988). Durch die Versorgung der Zellen mit Eisen, welches bei der Entwicklung und Differenzierung von Keimzellen wichtige Aufgaben hat, ist Transferrin möglicherweise ein wichtiger Bestandteil der Spermiogenese (HOLMES et al., 1982; BARTHELEMY et al., 1988; CANALE et al., 1988; BER et al., 1990; ANAPLIOTOU et al., 1995). Transferrinrezeptoren sind in der Membran unreifer Vorstufen von Spermien entdeckt worden (BER et al., 1990; ANAPLIOTOU et al., 1995).

Nach SANOCKA und KURPISZ (2003) zählt Transferrin ebenfalls zu den wichtigsten Antioxidantien des Seminalplasmas. Mit Eisen als Katalysator entsteht bei der sogenannten Fenton-Reaktion hochreaktives  $\text{OH}\cdot$  im Verlauf der Lipidperoxidationskaskade. In Anwesenheit von Transferrin kommt es zur Chelatbildung mit Eisen, welches dann nicht

mehr frei verfügbar ist und es somit nicht zur Fenton-Reaktion kommen kann (AITKEN und FISHER, 1994; AGARWAL et al., 2005). Eisen trägt also indirekt zur Lipidperoxidationskaskade bei (AYDEMIR et al., 2006) und durch die Eisenbindung bietet Transferrin Schutz vor Lipidperoxidation der Plasmamembran (AGARWAL et al., 2005).

Der durchschnittliche seminale Transferringehalt in dieser Studie mit 4.23 mg/dl stimmt gut überein mit der Arbeit von BHARSHANKAR und BHARSHANKAR (2000) mit 5.35 mg/dl bei fertilen Männern und 4.63 mg/dl bei infertilen Patienten.

Es existiert eine große Anzahl von Studien, welche Parameter der klassischen Samenanalyse mit dem seminalen Transferringehalt in Verbindung bringen (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14). HOLMES et al. (1982), SUELDO et al. (1983), ORLANDO et al. (1985), CALDINI et al. (1986), CHAN et al. (1986), KHALFOUN et al. (1986), MALLEA et al. (1987), CANALE et al. (1988), ORLANDO et al. (1988), BER et al. (1990), CEK et al. (1992), FUSE et al. (1992), PAPADIMAS et al. (1992), SHERIFF und LEGNAIN (1992), IRISAWA et al. (1993), SIGG et al. (1994), ANAPLIOTOU et al. (1995) sowie BHARSHANKAR und BHARSHANKAR (2000) beschreiben alle eine positive Korrelation zwischen der Spermiedichte und dem Transferringehalt, was in dieser Arbeit nachzuvollziehen ist (Gesamtkollektiv  $r=0.252$ , IVF-Gruppe  $r=0.296$ , ICSI-Gruppe  $r=0.389$ ). In der Literatur existieren jedoch verschiedene Ergebnisse bezüglich der Motilität. SUELDO et al. (1983), CHAN et al. (1986), MALLEA et al. (1987), CANALE et al. (1988), ORLANDO et al. (1988), SIGG et al. (1994) und ANAPLIOTOU et al. (1995) konnten keine Korrelation zwischen Transferrin und der Spermienmotilität feststellen, jedoch BER et al. (1990), ZALATA et al. (1996) sowie BHARSHANKAR und BHARSHANKAR (2000) fanden in diesem Zusammenhang eine positive Korrelation vor. Die Ergebnisse der eigenen Studie ergeben im Gesamt- und IVF-Kollektiv negative, im ICSI-Kollektiv jedoch positive Korrelationen (globale Motilität: Gesamtkollektiv  $r=-0.310$ , IVF-Gruppe  $r=-0.458$ , ICSI-Gruppe  $r=0.155$ ; progressive Motilität: Gesamtkollektiv  $r=-0.340$ , IVF-Gruppe  $r=-0.418$ , ICSI-Gruppe  $r=0.103$ ). Zur Vitalität konnten MALLEA et al. (1987), ORLANDO et al. (1988) und BER et al. (1990) keine Korrelation ermitteln, was sich mit den eigenen Ergebnissen weitgehend deckt. Ebenso wurden zwischen Transferrin und den morphologischen Normalformen von CHAN et al. (1986), CANALE et al. (1988), ORLANDO et al. (1988), SIGG et al. (1994) sowie BHARSHANKAR und BHARSHANKAR (2000) keine

Korrelation festgestellt. Hier ist in dieser Arbeit die Tendenz zur Negativkorrelation in jeder Gruppe deutlich geworden (Gesamtkollektiv  $r=-0.221$ , IVF-Gruppe  $r=-0.279$ , ICSI-Gruppe  $r=-0.103$ ), wobei die Ursache der unterschiedlichen Resultate unklar bleibt. Übereinstimmend sind die Ergebnisse zur Positivkorrelation zwischen Transferrin und der Membranintegrität hier in der ICSI-Gruppe ( $p=0.016$ ,  $r=0.509$ ) mit den Resultaten der Arbeit von FUSE (1994).

Bislang scheint sich noch keine Arbeit mit dem Zusammenhang zwischen Transferringehalt und Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten beschäftigt zu haben. Somit ist es relativ schwierig, die Wertigkeit der eigenen Ergebnisse einschätzen zu können (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23).

Nach SUELDO et al. (1983) konnte eine deutlich höhere Konzentration von seminalem Transferrin bei den Patienten festgestellt werden, die mittels der IVF-Therapie Erfolg hatten. Auch in dieser Arbeit liegt eine positive Korrelation zwischen der Transferrinkonzentration und der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate im IVF-Kollektiv vor (Befruchtungsrate  $r=0.010$ , Schwangerschaftsrate  $r=0.004$ ). Die meisten Untersuchungen fanden jedoch im Vergleich zwischen infertilen und bewiesen fertilen Männern statt. Dabei stellten MALLEA et al. (1987) und ANAPLIOTOU et al. (1995) fest, dass in der fertilen Kontrollgruppe deutlich höhere Transferrinkonzentrationen gemessen werden konnten. In der Arbeit von CHAN et al. (1986) zeigte sich dagegen keine Korrelation zwischen Transferrin und der Fertilisationskapazität, ermittelt mit dem Zona-freien Hamsterpenetrationstest. Nach den eigenen Ergebnissen kann wiederum nicht uneingeschränkt in jeder Gruppe von einer verbesserten Befruchtungs- oder Schwangerschaftsrate durch erhöhten Transferringehalt im Seminalplasma ausgegangen werden. Die sehr uneinheitlichen Ergebnisse beweisen, dass noch weiterführende Untersuchungen in gleicher Richtung von Interesse sein können.

## **5.7. Ferritin**

In dieser Studie wird die durchschnittliche Ferritinmenge im Seminalplasma mit 264.10 ng/ml bestimmt (siehe Tabellen 4-5 und 4-6), wobei zwischen dem Ergebnis der IVF- und ICSI-Gruppe kein signifikanter Unterschied vorliegt ( $p=0.175$ ). Eine etwas höhere Ferritinkonzentration existiert hierbei im ICSI-Kollektiv (291.14 ng/ml versus 241.23 ng/ml).

Wie im Kapitel 4.3. bereits beschrieben weist Ferritin im Gesamt- und IVF-Kollektiv fast ausschließlich Negativkorrelationen zu den Parametern der klassischen Samenanalyse auf (siehe Tabellen 4-12, 4-13 und 4-14). Ausnahme bildet die Spermiedichte, welche im Fall der IVF-Gruppe signifikant positiv mit dem seminalen Ferritingehalt korreliert ( $p=0.044$ ,  $r=0.397$ ). Anders sind die Verhältnisse in der ICSI-Gruppe. Hier zeigen sich außer Negativkorrelationen zum Volumen ( $r=-0.323$ ), zur Vitalität ( $r=-0.002$ ), zur Motilität nach Aufbereitung ( $r=-0.048$ ) und zu den morphologischen Normalformen ( $-0.054$ ) vor allem positive Korrelationen, die allesamt aber keine statistische Signifikanz aufweisen.

Im Vergleich des Chromatinstatus mit dem Ferritingehalt des Seminalplasmas (siehe Tabellen 4-15, 4-16 und 4-17) finden sich vorwiegend Positivkorrelationen zur vollständigen Chromatinkondensation (Acridine Orange-Färbung: Gesamtkollektiv  $r=0.037$ , IVF-Gruppe  $r=0.254$ , ICSI-Gruppe  $r=0.058$ ; Chromomycin-Färbung: IVF-Gruppe  $r=0.023$ , ICSI-Gruppe  $r=0.043$ ). Ausnahme bildet hier nur das Ergebnis der Chromomycin-Färbung im Gesamtkollektiv ( $r=-0.074$ ). Überraschenderweise liegen in jeder der untersuchten Gruppen positive, nicht signifikante Korrelationen zur Anzahl der DNA-Strangbrüche vor (Gesamtkollektiv  $r=0.237$ , IVF-Gruppe  $r=0.268$ , ICSI-Gruppe  $r=0.162$ ).

Nach Kapitel 4.6. wird deutlich, dass zwischen dem seminalen Ferritingehalt und der Befruchtungsrate oder auch der Anzahl von Schwangerschaften keine Positivkorrelationen zu finden sind (siehe Tabellen 4-21, 4-22 und 4-23 sowie Graphiken 4-13, 4-14 und 4-15).

Ferritin ist ein Protein, welches sowohl im Blutplasma als auch im Seminalplasma vorkommt (BROTHERTON, 1990). Die Konzentration im Seminalplasma ist sogar höher als die des Blutplasmas. Zu den Hauptaufgaben des Ferritins gehört die Eisenspeicherung im Gewebe (BROTHERTON, 1990). Nach GARRIDO et al. (2004) und AGARWAL et al. (2005) ist Ferritin ein Bestandteil des nicht-enzymatischen Abwehrsystems gegen oxidativen Stress. Bislang ist diese Bedeutung des Ferritins jedoch kaum untersucht worden. Es ist bekannt, dass für den Vorgang der Lipidperoxidation Eisen als Katalysator notwendig ist. Eisen (II) kann dabei mit  $H_2O_2$  zur Bildung von aggressiven Hydroxylradikalen führen. Dafür kommt aber nur freies Eisen in Frage, nicht also an Ferritin oder Transferrin gebundenes Eisen. Durch die Bindung an eines dieser beiden Moleküle wird freies Eisen der Lipidperoxidationskaskade entzogen,

so dass hier von einem schützenden Effekt ausgegangen werden kann (KWENANG et al., 1987). Bemerkenswerterweise liegen zu diesem Zusammenhang so gut wie keine Studien vor. Lediglich KWENANG et al. (1987) fand heraus, dass zwischen einer Gruppe infertiler Männer und einer Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich des seminalen Ferritingehalts bestanden.

Da bislang offenbar noch keine vergleichbaren Versuche durchgeführt worden sind, wird die Diskussion zu diesem Thema etwas einseitig. Durch die schlechten Resultate der Proben bezüglich Parameter der klassischen Samenanalyse, DNA-Fragmentationsrate und Schwangerschafts- oder Befruchtungsergebnisse bei höherer seminaler Ferritinkonzentration muss letztlich aber der Benefit des Ferritins gegenüber der Samenqualität in Frage gestellt werden. Wünschenswert ist wiederum sicherlich, dass sich zur Verifizierung dieser Aussage weitere experimentelle Arbeiten zu diesem Thema anschließen werden.

## **5.8. Fazit der Diskussion**

Zum Abschluss soll erneut versucht werden, konkret auf die sechs Kernfragen dieser Studie Antworten zu finden.

- 1) Gibt es bezüglich der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die entweder IVF- oder ICSI-Therapie erhielten?
- 2) Korreliert der Chromatinstatus mit den Parametern der klassischen Samenanalyse?
- 3) Besteht ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien bzw. Oxidantien im menschlichen Seminalplasma und den Parametern der klassischen Samenanalyse?
- 4) Korreliert die Konzentration von Antioxidantien bzw. Oxidantien mit dem Chromatinstatus?
- 5) Korreliert der Chromatinstatus mit dem IVF- bzw. ICSI-Ergebnis?
- 6) Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Antioxidantien bzw. Oxidantien im menschlichen Seminalplasma und dem IVF- bzw. ICSI-Ergebnis?

- 1) Da davon auszugehen ist, dass diejenigen Patienten, welche keine IVF-, sondern ICSI-Therapie erhielten, eine deutlich eingeschränkte Samenqualität aufweisen,

wurden alle in dieser Studie bestimmten Parameter für IVF- und ICSI-Patienten getrennt ermittelt und auf einen signifikanten Unterschied geprüft. Keine nennenswerten Abweichungen zwischen den Gruppen liegen im Bereich der Antioxidantien, der Oxidantien und der DNA-Fragmentationsrate vor. Die größten Unterschiede bieten die Parameter der klassischen Samenanalyse, welche natürlich auch routinemäßig bestimmt werden und zur Entscheidungsfindung der anzuwendenden Fertilisierungstechnik dienen. Wie zu erwarten, liegen im IVF-Kollektiv die jeweils besseren Ergebnisse zur Dichte, Vitalität, globalen und progressiven Motilität und zur Motilität nach Aufbereitung vor. Auch die Resultate der Acridine Orange- und Chromomycin-Färbung differieren zwischen beiden Gruppen jeweils zugunsten der IVF-Gruppe.

- 2) In dieser Studie können die Zusammenhänge zwischen gutem Chromatinstatus und den Parametern der klassischen Samenanalyse, wie zum Beispiel Motilität, Vitalität, Morphologie und Dichte hergestellt werden. Vor allem die Ermittlung des Chromatinstatus mittels der Chromomycin A3-Färbung steht in enger Verbindung mit den Ergebnissen der klassischen Samenanalyse.

Die zu erwartenden Negativkorrelationen zwischen Anzahl der DNA-Strangbrüche und den Ergebnissen der klassischen Samenanalyse bleiben weitestgehend aus, mit Ausnahme der Vitalität und Motilität. Eine überraschend positive Korrelation zur Spermiedichte in allen Gruppen war auch schon durch SAKKAS et al. (1999) beschrieben worden, welcher diesen Zusammenhang mit einer durch ausbleibende Apoptose gesteigerte, jedoch qualitativ schlechtere Spermienzahl im Sinne der „misslungenen Apoptosentheorie“ erklärte. Hier fehlen auch nach eingehender Literatursuche weitere Studien mit vergleichbarem Versuchsaufbau, um Ergebnisse untereinander vergleichen und bewerten zu können. Da die Anzahl der DNA-Strangbrüche insgesamt relativ niedrig ermittelt wurde und ein gewisser Prozentsatz apoptotischer Zellen als physiologisch angesehen werden muss, ist vielleicht hiermit der größtenteils fehlende Zusammenhang zu erklären.

- 3) Der erste Eindruck dieser Ergebnisse ist sicherlich durch die relativ starke Heterogenität geprägt. Überraschenderweise zeigen sich zum Teil in manchen

Gruppen Transferrin und TAS negativ korrelierend mit der Motilität, der Morphologie und dem pH-Wert. Der beschriebene Zusammenhang zwischen TAS und Morphologie findet sich auch in einer Arbeit von PASQUALOTTO et al. (2000), jedoch in Abhängigkeit zur Infertilitätsursache. Da viele Studien diesbezüglich andere Ergebnisse ermittelt haben, vertreten PASQUALOTTO et al. und die eigene Arbeit eine Mindermeinung. Wie auch durch LINDHOLMER et al. (1974) und ELZANATY et al. (2007) wird Albumin zum Volumen im inversen Verhältnis ermittelt. Dagegen kann der positive Einfluss zwischen sowohl TAS als auch Transferrin auf die Membranintegrität (HOS-Test) und zusätzlich auch TAS auf die Spermiedichte nach Aufbereitung verdeutlicht werden.

Ferritin zeigt außer einer Positivkorrelation zur Spermiedichte im IVF-Kollektiv keine weiteren aufschlussreichen Zusammenhänge zu den Parametern der klassischen Samenanalyse.

Bezüglich der ROS-Ergebnisse kann eine überraschende positive Korrelation zum pH-Wert im IVF-Kollektiv und auch negative Korrelationen zum pH-Wert und zur Spermiedichte verzeichnet werden. Letzteres deckt sich mit den Erkenntnissen von SHARMA und AGARWAL (1996). Grundsätzlich kann kein eindeutiger Trend der Korrelationen zur Motilität und Morphologie erkannt werden. Wie auch von OCHSENDORF et al. (1994) und MAZZILLI et al. (1995) festgestellt, bestehen in allen Gruppen zwischen Vitalität beziehungsweise Membranintegrität und ROS-Gehalt negative Korrelationen. Zu bedenken ist hierbei jedoch immer, dass in geringen Mengen eine physiologische ROS-Produktion vorliegt, die sich allerdings im Gleichgewicht mit den schützenden Faktoren - wie zum Beispiel Antioxidantien – befinden sollten. Erst eine übermäßige ROS-Produktion führt zu einem schädigenden Effekt der Zellfunktionen.

- 4) Zum möglichen Zusammenhang zwischen Konzentrationen der Antioxidantien und Oxidantien zum Chromatinstatus findet sich als einziges statistisch signifikantes Ergebnis die Positivkorrelation zwischen Albumin und der Acridine Orange-Färbung in der ICSI-Gruppe. Die inverse, jedoch schwache Beziehung zwischen Anzahl der DNA-Strangbrüche und Albumin wird in jeder untersuchten Patientengruppe deutlich. Somit kann vermutet werden, dass sich ein höherer Albumingehalt des seminalen



Plasmas protektiv auf den Chromatinstatus der Spermien auswirken kann. Auch ein vermehrter seminaler TAS-Gehalt geht nach den Resultaten dieser Arbeit mit einer verminderten Anzahl an DNA-Strangbrüchen einher. Der negative Einfluss erhöhter ROS-Konzentrationen auf den Chromatinstatus kann im ICSI-Kollektiv nachvollzogen werden, was der Arbeit von MOUSTAFA et al. (2004) bezüglich des Verhältnisses zwischen ROS und der Apoptoserate entspricht.

5) Die mögliche Verbindung von reduziertem Erfolg der IVF- und ICSI-Prozedur bei eingeschränktem Chromatinstatus kann in dieser Studie im Gegensatz zu den Ergebnissen vieler anderer Studien nicht verifiziert werden. Bemerkenswert sind lediglich die Positivkorrelationen zwischen der Acridine Orange-Färbung und der absoluten Schwangerschaftszahl in allen Gruppen.

6) Zum möglichen Zusammenhang zwischen Antioxidantien- oder Oxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Resultaten bezüglich Schwangerschafts- oder Befruchtungserfolg können vor allem im Gesamt- und IVF-Kollektiv aufschlussreiche Erkenntnisse erlangt werden. Albumin korreliert hier positiv mit der Anzahl gewonnener und fertilisierter Eizellen und mit der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate. Ebenso bemerkenswert sind die Negativkorrelationen von ROS zur Fertilisationsrate in jeder Patientengruppe. Die Ergebnisse der Studien von GRIVEAU und LE LANNOU (1997) sowie ZORN (2003), für das ICSI-Kollektiv auch von DAS et al. (2008) können damit bestätigt werden.

Die Bedeutung der negativen Korrelation zur Anzahl gewonnener Eizellen kann sicherlich als irrelevant bezeichnet werden.

In Zukunft ist es sicherlich von Bedeutung, dass in diese Richtung weiterhin Forschungen angestellt werden, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Die Wertung der eigenen Ergebnisse ist etwas erschwert, da es zu vielen der untersuchten Parametern noch keinen Konsensus über einen standardisierten Normalwertbereich gibt. Somit ist Pathologie von Physiologie nicht immer eindeutig zu trennen, was aber für die weiterführende Infertilitätsdiagnostik als unerlässlich erachtet werden muss. Der Einsatz einer fertilen Kontrollgruppe ist sicherlich diesbezüglich aufschlussreich und sollte bei künftigen

Untersuchungen möglicherweise mit eingebunden werden. Ebenso wurde in dieser Arbeit die Ursache für das Vorliegen der Infertilität beziehungsweise der Grund zur Indikationsstellung der IVF- oder ICSI-Therapie nicht berücksichtigt, was jedoch auch als eine auf die Resultate einflussnehmende Größe in Betracht gezogen werden kann. Der Punkt der Antioxidantientherapie ist für künftige Studien auch ein wichtiges Thema, wobei die entsprechenden Substanzen, ihre Darreichungsform, Dosierung, Therapieschemata und, nicht zu vergessen, mögliche Nebenwirkungen eine breite Basis für mögliche Untersuchungen finden können. Die Hintergründe und Zusammenhänge, welche das Thema dieser Arbeit bilden, können zum Abschluss noch lange nicht als ausreichend verstanden bezeichnet werden. Gerade auch die Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Studien untereinander oder zur eigenen machen deutlich, dass auch nach einem langen Zeitraum intensiver Forschungen und Bemühungen manche Hintergründe noch unklar geblieben sind.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Agarwal, A., Saleh, R.A. (2002):** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urol Clin North Am*, 29, 817-827.
2. **Agarwal, A., Said, T.M. (2003):** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage. *Hum Reprod Update*, 9, 331-345.
3. **Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. (2003):** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79, 829-843.
4. **Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S.R., Said, T.M. (2004):** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *RBM Online*, 8, 616-627.
5. **Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. (2005):** Oxidative stress and its implications in female infertility-a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online*, 11, 641-650.
6. **Agarwal, A., Prabakaran, S.A., Said, T.M. (2005):** Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*, 26, 654-660.
7. **Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S. (2006):** The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 18, 325-332.
8. **Agarwal, A., Nandipati, K.C., Sharma, R., Zippe, C.D., Raina, R. (2006):** Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl*, 27, 335-347.
9. **Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, A.J. Jr., Alvarez, J.G., Sikka, S.C. (2006):** Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*, 86, 878-885.
10. **Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008):** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, 59, 2-11.
11. **Ahmadi, A., Ng, S.C. (1999):** Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool*, 284, 696-704.

12. **Aitken, R.C., Clarkson, J.S., Fishel, S. (1989):** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod*, 41, 183-197.
13. **Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W. (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 Fert*, 94, 451-462.
14. **Aitken, J., Fisher, H. (1994):** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bio Essays*, 16, 259-267.
15. **Aitken, J.R., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, S.D. (1998):** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 59, 1037-1046.
16. **Aitken, R.J., Sawyer, D. (2003):** The human spermatozoon—not waving but drowning. *Adv Exp Biol*, 518, 85-98.
17. **Aitken, R.J., de Iuliis, G.N. (2007):** Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online*, 14, 727-733.
18. **Akerlof, E., Fredricsson, B., Gustafson, O., Lunell, N.O., Nylund, L., Rosenborg, L., Slotte, H., Pousette, A. (1989):** Serum factors stimulate the motility of human spermatozoa. *Int J Androl*, 12, 124-130.
19. **Albrecht K., Schultheiss, D. (2004):** Proof of paternity: historical reflections on an andrological-forensic challenge. *Andrologia*, 36, 31-37.
20. **Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G., Kervancioglu, E., Özveri, H., Yalcin, S., Akdas, A. (1997):** Reactive oxygen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*, 157, 140-143.
21. **Anapliotou, M.L.G., Goulandrīs, N., Douvara, R. (1995):** Seminal fibronectin-like antigen and transferrin concentrations in infertile

and fertile men. *Andrologia*, 27, 137-142.

22. **Angelopoulos, T., Moshel, Y., Lu, L., Macanas, E., Grifo, J.A., Krey, L.C. (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.
23. **Appasamy, M., Muttukrishna, S., Pizzey, A.R., Ozturk, O., Groome, N.P., Serhal, P., Jauniaux, E. (2007):** Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. *Reprod Biomed Online*, 14, 159-165.
24. **Aydemir, B., Kiziler, A.R., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Akyolcu, M.C. (2006):** Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biol Trace Elem Res*, 112, 193-203.
25. **Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A.J. 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.
26. **Baccetti, B., Collodel, G., Piomboni, P. (1996):** Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 28, 587-596.
27. **Baker, M.A., Aitken, R.J. (2005):** Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 29, 3-67.
28. **Bakos, H.W., Thompson, J.G., Feil, D., Lane, M. (2008):** Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int J Androl*, 31, 518-526.
29. **Balen, A.H., Rutherford, A.J. (2007):** Management of infertility. *BMJ*, 335, 608-611.
30. **Bandhauer, K., Kövesdi, S. (1970):** Der Fertilitätsstatus des Mannes. *Der Urologe*, 9, 192-199.
31. **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.

32. **Barthelemy, C., Khalifoun, B., Guillaumin, J.M., Lecomte, P., Bardos, P. (1988):** Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J Reprod Fert*, 82, 113-118.
33. **Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guerin, J.F. (2003):** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, 18, 1023-1028.
34. **Benchaib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B., Francois Guerin, J. (2007):** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*, 87, 93-100.
35. **Ber, A., Vardinon, N., Yogev, L., Homonnai, Z.T., Yust, I., Paz, G.F. (1990):** Transferrin in seminal plasma and in serum of men: its correlation with sperm quality and hormonal status. *Hum Reprod*, 5, 294-297.
36. **Bharshankar, R.N., Bharshankar, J.R. (2000):** Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol*, 44, 456-460.
37. **Bianchi, P.G., Manicardi G.C., Urner, F., Campana, A., Sakkas, D. (1996):** Chromatin packing and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2, 139-144.
38. **Bianchi, P.G., Manicardi, G., Bizzarro, D., Campana, A., Bianchi, U., Sakkas, D. (1996):** Use of the guanine-cytosine (GC) specific fluorochrom, chromomycin A3, as an indicator of poor sperm morphology. *J Assist Reprod Genet*, 13, 246-250.
39. **Boe-Hansen, G.B., Fedder, J., Ersbøll, A.K., Christensen, P. (2006):** The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in human fertility clinic. *Hum Reprod*, 21, 1576-1582.
40. **Brotherton, J. (1990):** Ferritin: another pregnancy-specific protein in

human seminal plasma and amniotic fluid, as estimated by six methods. *Andrologia*, 22, 597-607.

41. **Caglar, G.S., Köster, F., Schöpfer, B., Asimakopoulos, B., Nehls, B., Nikolettos, N., Diedrich, K., Al-Hasani, S. (2007):** Semen DNA fragmentation index, evaluated with both TUNEL and Comet assay, and the ICSI outcome. *In Vivo*, 21, 1075-1080.
42. **Caldamone, A.A., Valvo, J.R., Cockett, A.T.K. (1981):** Evaluation of the infertile or subfertile male. *Urol Clin N Am*, 8, 17-39.
43. **Caldini, A.L., Orlando, C., Barni, T., Messeri, G., Pazzagli, M., Baldi, E. (1986):** Measurement of transferrin in human seminal plasma by a chemiluminescent method. *Clin Chem*, 32, 153-156.
44. **Canale, D., Voliani, S., Izzo, P.L., Esposito, G., Giorni, P.M., Ferdeghini, M., Meschini, P., Menchini-Fabris, G.F. (1988):** Human seminal transferrin: correlation with seminal and hormonal parameters. *Andrologia*, 20, 379-383.
45. **Cebesoy, F.B., Aydos, K., Unlu, C. (2006):** Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl*, 52, 397-402.
46. **Cek, M., Curgul, S., Ertas, M., Sözer, T., Alpacar, Z. (1992):** Seminal transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Urol Int*, 49, 218-221.
47. **Chan, S.Y.W., Loh, T.T., Wang, C., Tang, L.C.H. (1986):** Seminal plasma and seminiferous tubular dysfunction. *Fertil Steril*, 45, 687-691.
48. **Chen, Q., Ng, V., Mei, J., Chia, S.E. (2001):** Comparison of seminal vitamin B12, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males. *Wei Sheng Yan Jiu*, 30, 80-82.
49. **Chen, S.H., Wallach, E.E. (1994):** Five decades of progress in management of the infertile couple. *Fertil Steril*, 62, 665-685.
50. **Chen, Z., Hauser, R., Trbovich, A.M., Shifren, J.L., Dorer, D.J., Godfrey-Bailey, L., Singh, N.P. (2006):** The relationship between

- human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl*, 27, 112-120.
51. **Chitale, A.R., Rathaur, R.G. (1995):** Nuclear decondensation of sperm head and failure at in-vitro fertilization: an ultrastructural study. *Hum Reprod*, 10, 594-598.
  52. **Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., Carrell, D.T. (2006):** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*, 27, 53-59.
  53. **Claassens, O.E., Menkveld, R., Franken, D.R., Pretorius, E., Swart, Y., Lombard, C.J., Kruger, T.F. (1992):** The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 7, 242-247.
  54. **Clarke G.N. (2006):** A.R.T. and history, 1678-1978. *Hum Reprod*, 21, 1645-1650.
  55. **Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, K.S., Agarwal., A. (2007):** Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analyse. *Int Braz J Urol*, 33, 601-621.
  56. **Cohen-Bacrie, P., Belloc, S., Menezo, Y.J., Clement, P., Hamidi, J., Benkhalifa, M. (2008):** Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prognostic study of 1633 patients. *Fertil Steril*, 24, epub ahead of print.
  57. **Dadoune, J.-P. (1995):** The nuclear status of human sperm cells. *Micron*, 26, 323-345.
  58. **Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., Punekar, S. (2002):** Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *JPGM*, 48, 186-189.
  59. **Das, S., Chattopadhyay, R., Jana, S.K., Narendra, B.K., Chakraborty, C., Chakravarty, B., Chaudhury, K. (2008):** Cut-off value of reactive oxygen species for predicting semen quality and fertilization outcome. *Syst Biol Reprod Med*, 54, 47-54.
  60. **Dasgupta, P.R., Chopra, S.K., Kar, A.B., Srivastava, A., Mukerjee, K.C. (1973):** Seminal urea level and sperm-count. *The Lancet*, 7, 770-



771.

61. **De Jonge, C. (2005):** Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*, 11, 205-214.
62. **De Lamirande, E., Gagnon, C. (1995):** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*, 10, 15-21.
63. **Dobrinski, I., Hughes, H.P.A., Barth, A.D. (1994):** Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J Reprod Fertil*, 101, 531-538.
64. **Drevius, E.Z., Eriksson, H. (1966):** Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res*, 42, 136-156.
65. **Duru, N.K., Morshedi, M., Oehninger, S. (2000):** Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 74, 1200-1207.
66. **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.
67. **Eilish, T.D., O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S.E.M. (2000):** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod*, 15, 1552-1561.
68. **Eliasson R., Treichl L. (1971):** Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 22, 134-137.
69. **Elzanaty, S., Erenpreiss, J., Becker, C. (2007):** Seminal plasma albumin: origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia*, 39, 60-65.
70. **Erenpreiss, J., Elzanaty, S., Giwercman, A. (2008):** Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl*, 10, 786-790.
71. **Esterhuizen, A.D., Franken, D.R., Lourens, J.G.H., Prinsloo, E., van Rooyen, L.H. (2000):** Sperm chromatin packing as an indicator of in-

- vitro fertilization rates. Hum Reprod, 15, 657-661.
72. **Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O.P. (1999):** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod, 14, 1039-1049.
73. **Everson, D., Jost, L. (2000):** Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. Methods Cell Sci, 22, 169-189.
74. **Feige, A., Rempfen, A., Würfel, W., Jawny, J., Rohde, A. (2006):** Frauenheilkunde. ©Elsevier GmbH, München, Urban und Fischer Verlag, 3. Auflage.
75. **Fingerova, H., Novotny, J., Barborik, J., Brezinova, J., Svobodova, M., Krskova, M., Oborna, I. (2007):** Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS RANDOX<sup>®</sup>. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 151, 37-40.
76. **Ford, W.C. (2002):** Male infertility: tales of progress and frustration. Hum Fertil (Camb), 5, 53-60.
77. **Ford, W.C.L., Whittington, K., Williams, A.C. (1997):** Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. Int J Androl, 20, 44-49.
78. **Franken, D.R., Franken, C.J., de la Guerre, H., de Villiers, A. (1999):** Normal sperm morphology and chromatin packing: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. Andrologia, 31, 361-371.
79. **Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishii, T. (2003):** Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian J Androl, 5, 231-242.
80. **Fuse, H., Satomi, S., Okumura, M., Katayama, T. (1992):** Seminal plasma transferrin concentration: relationship with seminal parameters and plasma hormone levels. Urol Int, 49, 158-162.
81. **Fuse, H., Okumura, M., Kazama, T., Katayama, T. (1994):** Correlation of seminal plasma transferrin concentration and hypoosmotic

swelling of the sperm. Arch Androl, 32, 95-100.

82. **Gallardo, J.M. (2007):** Evaluation of antioxidant system in normal semen. Rev Invest Clin, 59, 42-47.
83. **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.
84. **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.
85. **Geva, E., Lessing, J.B., Lerner-Geva, L., Amit, A. (1998):** Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. Hum Reprod, 13, 1422-1424.
86. **Gopalkrishnan, K., Hinduja, I.N., Kumar T.C. (1991):** In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential. Arch Androl, 27, 43-50.
87. **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, 277-282.
88. **Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M.G., Ubaldi, F., Rienzi, L., Tesarik, J. (2005):** ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. Hum Reprod, 20, 2590-2594.
89. **Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J.P., Le Lannou, D. (1995):** Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J Reprod Fertil, 103, 17-26.
90. **Griveau, J.F., Le Lannou, D. (1997):** Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. Int J Androl, 20, 61-69.
91. **Griveau, J.F., 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.

92. **Haidl, G., Schill, W.B. (1994):** Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. Arch Androl, 32, 263-266.
93. **Hammadeh, M.E., Al-Hasani, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., K pker, 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.
94. **Hammadeh, M.E. (1997):** Erster Homburger "hand-on" – Workshop in assistierter Fertilisation durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Universit tskliniken des Saarlandes, Frauenklinik und Poliklinik, Sonderdruck.
95. **Hammadeh, M.E., 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.
96. **Hammadeh, M.E., 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.
97. **Hammadeh, M.E., Askari, A.S., Georg, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (1999):** Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. Int J Androl, 22, 155-162.
98. **Hammadeh, M.E., Al-Hasani, S., Gau , C., Rosenbaum, P., Georg, T., Diedrich, K., Schmidt, W. (2001):** Predictive value of chromatin decondensation in vitro on fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Int J Androl, 24, 311-316.
99. **Hammadeh, M.E., K hnen, A., Amer, A.S., Rosenbaum, P., Schmidt,**

- W. (2001):** Comparison of sperm preparation methods: effects on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl*, 24, 360-370.
- 100. Hammadeh, M.E., Strehler, E., Zeginiadou, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (2001):** Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Arch Androl*, 47, 83-87.
- 101. Hammadeh, M.E., Zavos, P.M., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (2001):** Comparison between the quality and function of semen after semen processing with two different methods. *Asian J Androl*, 3, 125-130.
- 102. Hammadeh, M.E., Zeginiadov, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W., Strehler, E. (2001):** Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*, 46, 99-104.
- 103. Hammadeh, M.E., Al Hasani, S., Rosenbaum, P., Schmidt, W., Fischer, Hammadeh, C. (2008):** Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet*, 277, 515-526.
- 104. Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W.B., Kruger, T.F. (2004):** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, 81, 965-972.
- 105. Highland, H.N., Rao, M.V., Chinoy, N.J., Shah, V.C. (1991):** Analysis of functional and nuclear integrity of human spermatozoa. *Int J Fertil*, 36, 43-47.
- 106. Hirsh, A. (2003):** ABC of subfertility. *BMJ*, 327, 669-672.
- 107. Ho, H.C., Suarez, S.S. (2001):** Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122, 519-526.
- 108. Holmes, S.D., Lipshultz, L.I., Smith, R.G. (1982):** Transferrin and gonadal dysfunction in man. *Fertil Steril*, 38, 600-604.

109. **Hoppe I. (1997):** Intrazytoplasmatische Spermieninjektion – Stellenwert und Herausforderung. *WMW* 4, 90-93.
110. **Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Rimura, 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.
111. **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.
112. **Host, E., Lindenberg, S., Kahn, J.A., 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.
113. **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.
114. **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.
115. **Huret, J.L. (1986):** Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arch Androl*, 16, 97-109.
116. **Ibrahim, M.E., Pedersen, H. (1988):** Acridine orange fluorescence as male fertility test. *Arch Androl*, 20, 125-129.
117. **Immler, S. (2008):** Sperm competition and sperm cooperation: the potential role of diploid and haploid expression. *Reprod*, 135, 275-283.
118. **Iranpour, F.G., Nasr-Esfahani, M.H., Valojerdi, M.R., al-Taraihi, T.M. (2000):** Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *Assist Reprod Genet*, 17, 60-66.
119. **Irisawa, C., Nakada, T., Kubota, Y., Sasagawa, I., Adachi, Y., Yaguchi,**

- H. (1993):** Transferrin concentration in seminal plasma with special reference to serum hormone levels in infertile men. *Arch Androl*, 30, 13-21.
- 120. Jacobson, C.B., Sites, J.G., Arias-Bernal, L.F. (1970):** In vitro maturation and fertilization of human follicular oocytes. *Int. J. Fertil.*, 15, 103-114.
- 121. Jager, S. (1990):** Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch Androl*, 25, 253-259.
- 122. Jarvi, K., Roberts, K.D., Langlais, J., Gagnon, C. (1993):** Effect of platelet-activating factor, lyso-activating factor, and lysophosphatidylcholine on sperm motion: importance of albumin for motility stimulation. *Fertil Steril*, 59, 1266-1275.
- 123. Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J. (1984):** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70, 219-228.
- 124. Kao, S.H., Chao, H.T., Chen, H.W., Hwang, T.I., Liao, T.L., Wei, Y.H. (2008):** Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*, 89, 1183-1190.
- 125. Karydis, S., Asimakopoulos, B., Papadopoulos, N., Vakalopoulos, I., Al-Hasani, S., Nikolettos, N. (2005):** ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. *In Vivo*, 19, 921-925.
- 126. Katalinic, A., Rosch, C., Ludwig, M., German ICSI Follow-Up Study Group (2004):** Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study. *Fertil Steril*, 81, 1604-1616.
- 127. Khalfoun, B., Barthelemy, C., Crouzat-Reynes, G., Bardos, P. (1986):** A simple and sensitive solid-phase radioimmunoassay for measuring the transferrin content of human biological fluids: its application to seminal plasma. *Int J Biochem*, 18, 1135-1139.

128. **Khalili, M.A., Aghaie-Maybodi, F., Anvari, M., Talebi, A.R. (2006):** Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urol J*, 3, 154-159.
129. **Khosrowbeygi, A., Zarghami, N. (2007):** Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol*, 1, 6.
130. **Koca, Y., Ozdal, O.L., Celik, M., Unal, S., Balaban, N. (2003):** Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch Androl*, 49, 355-359.
131. **Kolettis, P. (2003):** Evaluation of the subfertile man. *Am Fam Physician*, 67, 2165-2172.
132. **Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F., Oehninger, S. (1988):** Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 49, 112-117.
133. **Küpker, W., Al-Hasani, S., Diedrich, K. (1998):** Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) – assistierte Fertilisation bei schwerer männlicher Subfertilität. Weibliche Sterilität, Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg, 356-379.
134. **Kvist, U. (1980):** Reversible inhibition of nuclear chromatin decondensation (NCD) ability of human spermatozoa induced by prostatic fluid. *Acta Physiol Scand*, 109, 73-78.
135. **Kwenang, A., Kroos, M.J., Koster, J.F., van Eijk, H.G. (1987):** Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum Reprod*, 2, 387-388.
136. **Lanzendorf, S.E., Maloney, M.K., Veeck, L.L., Slusser, J., Hodgen, G.D., Rosenwaks, Z. (1988):** A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*, 49, 835-842.
137. **Lewin, A., Lavon, H. (1997):** The effect of coenzyme Q 10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med*, 18, 213-219.
138. **Lewis, S.E., Agbaie, I., Alvarez, J. (2008):** Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*, 54, 111-125.
139. **Li, Z., Wang, L., Cai, J., Huang, H. (2006):** Correlation of sperm DNA



damage with IVF and ICSI outcomes: a systemic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*, 23, 367-376.

- 140. Lin, M.H., Kuo-Kuang Lee, R., Li, S.H., Lu, C.H., Sun, F.J., Hwu, Y.M. (2008):** Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*, 90, 352-359.
- 141. Lindholmer, C., Carlström, A., Eliasson, R. (1974):** Occurrence and origin of proteins in human seminal plasma with special reference to albumin. *Andrologia*, 6, 181-196.
- 142. Lindholmer, C., Eliasson, R. (1974):** The effects of albumin, magnesium and zinc on human sperm survival in different fractions of split ejaculates. *Fertil Steril*, 25, 424-431.
- 143. Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992):** Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril*, 58, 1178-1184.
- 144. Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., Casper, R.F. (1998):** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 13, 896-900.
- 145. Lornage, J., Guerin, J.F., Czyba, J.C., Menezo, Y. (1983):** Influence of cations and albumin on human spermatozoa. *Arch Androl*, 10, 119-125.
- 146. Maiorino, M., Ursini, F. (2002):** Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol Chem*, 383, 591-597.
- 147. Mallea, L., Mas, J., Padron, R.S., Diaz, J.W. (1988):** Transferrin in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia*, 20, 15-20.
- 148. Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azioni, P., Bizzarro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1995):** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3. *Biol Reprod*, 52, 864-867.
- 149. Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F.M., Rapone, S., Dondero, F., Gazzaniga, P.P. (1995):** Human sperm cryopreservation

- and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil*, 26, 145-148.
150. **Molina, J., Castilla, J.A., Castaño, J.L., 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.
151. **Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J. Jr., Agarwal, A. (2004):** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*, 19, 129-138.
152. **Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G., Maggi, M. (2000):** Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*, 21, 903-912.
153. **Nasr-Esfahani, M.H., Razavi, S., Tavalae, M. (2008):** Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertil Steril*, 89, 892-898.
154. **Nicopoulos J.D., Gilling-Smith, C., Almeida, P.A., Homa, S., Norman-Taylor, J.O., Ramsay, J.W. (2008):** Sperm DNA fragmentation in subfertile men: the effect on the outcome of intracytoplasmic sperm injection and correlation with sperm variables. *BJU Int*, 101, 1553-1560.
155. **Novotny, J., Oborna, I., Brezinova, J., Svobodova, M., Hrbac, J., Fingerova, H. (2003):** The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. *Biomed Papers*, 147, 173-176.
156. **Ochsendorf, F.R., Thiele, J., Fuchs, J., Schüttau, H., Freisleben, H.J., Buslau, M., Milbradt, R. (1994):** Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia*, 26, 289-293.
157. **Ohl, D.A., Menge, A.C. (1996):** Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm function. *Front Bios*, 1, 96-108.

158. **Oliva, R. (2006):** Protamines and male infertility. *Hum Reprod Online*, 12, 417-435.
159. **Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A.J., Alvarez, J.G. (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.
160. **Oosterhuis, G.J., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J., Vermes, I. (2000):** Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril*, 74, 245-250.
161. **Oratore, A., D'Alessandro, A.M., Santiemma, V. (1987):** Isolation and partial characterization of transferrin in human seminal fluid. *Cell Mol Biol*, 33, 593-599.
162. **Orlando, C., Caldini, A.L., Barni, T., Wood, W.G., Strasburger, C.J., Natali, A., Maver, A., Forti, G., Serio, M. (1985):** Ceruloplasmin and transferrin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubar function? *Fertil Steril*, 43, 290-294.
163. **Orlando, C., Casano, R., Caldini, A.L., Forti, G., Barni, T., Bonfanti, L., Serio, M. (1988):** Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *J Androl*, 9, 220-223.
164. **Orlando, C., Casano, R., Forti, G., Barni, T., Vannelli, G.B., Balboni, G.C., Serio, M. (1988):** Immunologically reactive albumin-like protein in human testis and seminal plasma. *J Reprod Fert*, 83, 687-692.
165. **Ozbek, E., Turkoz, Y., Gokdeniz, R., Kocak, I., Soyulu, A. (2000):** Depressed total antioxidant enzyme activity in the seminal plasma of patients with varicocele. *Adv Reprod*, 23, 17-24.
166. **Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Steirteghem, A.C. (1992):** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18.
167. **Palermo, G.D., Cohen, J., Rosenwaks, Z. (1996):** Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure.

- Fertil Steril, 65, 899-908.
168. **Papadimas, I., Papadopoulou, F., Ioannidis, S., Katsaveli, R., Tarlatzis, B., Bontis, I., Mantalenakis, S. (1992):** Seminal plasma transferrin in infertile men. Arch Androl, 28, 125-133.
169. **Pasqualotto, E.B., Agarwal, A., Sharma, R.K., Izzo, V.M., Pinotti, J.A., Joshi, N.J., Rose, B.I. (2004):** Effects of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. Fertil Steril, 81, 973-976.
170. **Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. (2000):** Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril, 73, 459-464.
171. **Pfleiderer, A., Breckwoldt, M., Martius, G. (2002):** Gynäkologie und Geburtshilfe. ©Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
172. **Philipp, E.E. (1993):** An overview of the development of infertility research and treatment. Int J Fertil Menopausal Stud, 38, 134-138.
173. **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.
174. **Plymale, D.R., Ng Tang, D.S., Fermin, C.D., Lewis, D.E., Martin, D.S., Garry, R.F. (1995):** Comparison of DNA fragmentation and colour thresholding for objective quantitation of apoptotic cells. Scanning Microscopy, 9, 833-842.
175. **Potts, R.J., Notarianni, L.J., Jefferies, T.M. (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.
176. **Ramos, L., Wetzels, A.M.M. (2001):** Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. Hum Reprod, 16, 1703-1707.
177. **Razavi, S., Nasr-Esfahani, M.H., Mardani, M., Mafi, A., Moghdam, A.**

- (2003): Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*, 35, 238-243.
178. **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 presence of leukocytes. *Hum Reprod*, 17, 2665-2672.
179. **Risopatrón, J., Catalán, S., Miska, W., Schill, W.B., Sánchez, R. (2002):** Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reprod Dom Anim*, 37, 347-351.
180. **Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Shoukir, Y., Campana, A. (1998):** Sperm nuclear damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, 13, 11-19.
181. **Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U. (1999):** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*, 4, 31-37.
182. **Sakkas, D., Manicardi, G.C., Tomlinson, M., Mandrioli, M., Bizzarro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U. (2000):** The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*, 15, 1112-1116.
183. **Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D. (2002):** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*, 66, 1061-1067.
184. **Saleh, R.A., Agarwal, A. (2002):** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*, 23, 737-752.
185. **Saleh, R.A., Agarwal, A., Nada, E.A., El-Tonsy, M.H., Sharma, R.K., Meyer, A., Nelson, D.R., Thomas, A.J. (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,

1597-1605.

186. **Sanocka, D., Kurpisz, M. (2004):** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endol*, 2, 1-7.
187. **Schill, W.B., Köhn, F.M. (1998):** Andrologie. In: Fritsch, P.: *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas.* Springer, Berlin Heidelberg New York, 757-793.
188. **Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., Bleau, G. (2005):** Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*, 20, 3446-3451.
189. **Shafik, A., Shafic, A.A., El Sibai, O. (2006):** Sperm DNA fragmentation. *Arch Androl*, 52, 197-208.
190. **Shamsi, M.B., Kumar, R., Dada, R. (2008):** Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res*, 127, 115-123.
191. **Sharma, R.K., Agarwal, A. (1996):** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48, 835-849.
192. **Sharma, R.K., Pasqualotto, F.F., Nelson, D.R., Thomas, A.J., 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.
193. **Shefi, S., Turek, P.J. (2006):** Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol*, 32, 385-397.
194. **Shen, H.M., Ong, C.N. (2000):** Detection of oxidative damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med*, 28, 529-536.
195. **Shen, H.M., Dai, J., Chia, S.E., Lim, A., Ong, C.N. (2002):** Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod*, 17, 1266-1273.
196. **Sheriff, D.S., Legnain, M. (1992):** Evaluation of semen quality in a local Libyan population. *Indian J Physiol Pharmacol*, 36, 83-87.
197. **Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M., Al-Sawaf, H. (2005):** Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*, 6, 495-501.

198. **Sies, H. (1993):** Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215, 213-219.
199. **Sigg, C., Brüngger, A., Rakosi, T. (1994):** Transferrinkonzentration im Seminalplasma bei Varikozele testis, bei unterschiedlichen Spermienkonzentrationen und verschiedenen Formen der Azoospermie. *Hautarzt*, 45, 20-24.
200. **Sikkas, S.C. (2001):** Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*, 8, 851-862.
201. **Sikora, J., Kempisty, B., Jedrzejczak, P., Jagodzinski, P.P. (2006):** Influence of DNA damage on fertilization capacity of spermatozoa. *Przegl Lek*, 63, 800-802.
202. **Singleton, S., Zalensky, A., Doncel, G.F., Morshedi, M., Zalenskaya, I.A. (2006):** Testis/ sperm-specific Histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packing. *Hum Reprod*, 22, 743-750.
203. **Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J., Lissi, E. (1996):** Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod*, 11, 1655-1660.
204. **Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Morales, I., Rios, R., Castro, A. (2007):** Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. *Rev Med Chil*, 135, 279-286.
205. **Spanò, M., Bonde, J.P., Hjøllund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., Leter, G., The Danish First Pregnancy Planner Team (2000):** Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*, 73, 43-50.
206. **Srivastava, A., Chopra, S.K., Dasgupta, P.R. (1984):** Biochemical analysis of human seminal plasma. *Andrologia*, 16, 265-268.
207. **Steptoe, P.C., Edwards, R.G. (1978):** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 12, 366.
208. **Sterzik, K., Rosenbusch, B., Sasse, V., Wild, E., Hütter, W., Wolf, A. (1989):** Der Acridin-Orange-Test. *Zent.bl Gynäkol*, 111, 1361-1367.
209. **Suarez, S.S., Pacey, A.A. (2005):** Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12, 23-37.

210. **Sueldo, C., Marrs, R.P., Berger, T., Kletzky, O.A., O'Brien, T.J. (1984):** Correlation of semen transferrin concentration and sperm fertilizing capacity. *Am J Obstet Gynecol*, 150, 528-531.
211. **Sukcharoen, N. (1995):** Evaluation of sperm nuclear DNA normality by acridine orange staining technique. *J Med Assoc Thai*, 78, 82-88.
212. **Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F. (1997):** Detection of desoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56, 602-607.
213. **Swann, K. (1993):** The soluble sperm oscillogen hypothesis. *Zygote*, 1, 273-276.
214. **Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., Borini, A. (2007):** Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 14, 746-757.
215. **Tavalaee, M., Razavi, S., Nasr-Esfahani, M.H. (2008):** Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*, 24, epub ahead of print.
216. **Taylor, A. (2003):** ABC of subfertility: extend of the problem. *BMJ*, 327, 434-435.
217. **Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J., Friedman, S. (1984):** A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*, 42, 87-91.
218. **Tremellen, K. (2008):** Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, 14, 243-258.
219. **Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (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.
220. **Varum, S., Bento, C., Sousa, A.P., Gomes-Santos, C.S., Henriques, P., Almeida-Santos, T., Teodosio, C., Paiva, A., Ramalho-Santos, J. (2006):** Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic



- markers. *Fertil Steril*, 20, 572-583.
221. **Villegas, J., Kehr, K., Soto, L., Henkel, R., Miska, W., Sanchez, R. (2003):** Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*, 35, 227-232.
222. **Virant-Klun, I., Tomazevic, T., Meden-Vrtovec, H. (2002):** Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet*, 19, 319-328.
223. **Whittington, K., Harrison, S.C., Williams, K.M., Day, J.L., McLaughlin, E.A., Hull, M.G.R., Ford, W.C.L. (1999):** Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic test of sperm function. *Int J Androl*, 22, 236-248.
224. **World Health Organization (1999):** WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Springer-Verlag, 4. Auflage, 37.
225. **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, 91-105.
226. **Zalata, A., Hafez, T., Comhaire, F. (1995):** Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod*, 10, 1444-1451.
227. **Zalata, A., Hafez, T., Schoonjans, F., Comhaire, F. (1996):** The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod*, 11, 761-764.
228. **Zhang, H.B., Lu, S.M., Ma, Y.C., Wang, L., Li, X., Chen, Z.J. (2007):** Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*, 10, 227-235.
229. **Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. (2001):** Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and

DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 75, 674-677.

- 230. Zini, A., Fischer, M.A., Sharir, S., Shayegan, B., Phang, D., Jarvi, K. (2002):** Prevalence of abnormal Sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology*, 60, 1069-1072.
- 231. Zini, A., Libman, J. (2006):** Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol*, 16, 428-434.
- 232. Zorn, B., Vidmar, G., Meden-Vrtovec, 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. Abkürzungsverzeichnis

**Tab. 7-1: verwendete Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
AO positiv	Grün-gelb leuchtende Spermien in Prozent der Acridine Orange-Färbung: vorliegende vollständige Chromatinkondensation
BCG	Bromcresolgrün
CMA3 nicht-leuchtend	Nicht-leuchtende Spermien in Prozent der Chromomycin-Färbung : vollständige Chromatinkondensation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
hCG	Humanes Chorion-Gonadotropin
HOS-Test	Hypoosmotischer Schwellungstest
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Ig	Immunglobulin
IVF	In Vitro Fertilisation
MAR-Test	Mixed-Antiglobulin-Reaktions-Test
Morphologie (gut)	Fehlformen < 16 Prozent
p	Signifikanzkoeffizient
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
r	Korrelationskoeffizient
ROS	reactive oxygen species
SUZI	Subzonale Spermieninsemination
TAS	Totaler Antioxidantienstatus
Tf	Transferrin
TMB	Tetramethylbenzidin
TUNEL	Terminal desoxynucleotidly transferase mediated dUTP nick end labeling
TUNEL grün	grün gefärbte Spermien in Prozent: vorliegender Doppelstrangbruch
WHO	World Health Organization

## 8. Verzeichnis häufig verwendeter Materialien

### 8.1. HAM`S F 10 Medium

#### Inhaltsstoffe

0,308g	Calciumlactat (Merck, Darmstadt)
2,108g	Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
0,075g	Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA)
9,88g	HAM`S F 10 (Seromed, Berlin)
0.03-0,07g	Penicillin (Sigma, St. Louis, USA)

#### Zubereitung

Das Calciumlactat wird in 1 Liter destilliertes Wasser gelöst, anschließend die übrigen Stoffe hinzugefügt und durch Schütteln gut vermengt. Die Osmolarität sollte 270-290 mosm / kg betragen.

## 8.2. PBS-Lösung

### Inhaltsstoffe und Zubereitung

#### **Lösung 1:**

1,32g Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Darmstadt) in 100 ml destilliertes Wasser geben.

#### **Lösung 2:**

1,21g Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Darmstadt)

80g Kochsalz ( $\text{NaCl}$ ) (Merck, Darmstadt)

2g Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ ) (Merck, Darmstadt)

11,5g Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck, Darmstadt)

2g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck, Darmstadt)

10g Glukose (Merck, Darmstadt)

Die Bestandteile der Lösung 2 werden zusammengefügt, in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend auf 900 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung von 1 Liter PBS-Lösung werden 10 ml der Lösung 1 mit 90 ml der Lösung 2 vermischt und dann mit 900 ml destilliertem Wasser aufgefüllt.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Literaturangabe	Abbildungsnummer	Kapitel	Seite
CNY Fertility Center, Embryology pictures	Abb. 3-7	3.9.2.	50
Foto zur TUNEL-Färbung (selbst angefertigt)	Abb. 3-4	3.5.	39
Intergen Company: The complete ApopTag® Manuel. Fig. 1	Abb. 3-3	3.5.	37
Lindeboom, G.A.: Geschiedenis van de medische wetenschap in Nederland. S. 64, Fig. 22.	Abb. 2-1	2.1.	7
Roche Tina-quant Ferritin Anwenderinformation	Abb. 3-5	3.6.1.	40
Roche Tina-quant Transferrin Anwenderinformation	Abb. 3-6	3.6.2.	42
WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim- Interaktion. 4. Auflage, 1999 Springer, Berlin-Heidelberg- New York:			
Abb. IV. 1a-g.	Abb. 3-1	3.3.6.	31
Abb. 2.8.	Abb. 3-2	3.3.7.	34

## 10. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich hiermit bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. M.E. Hammadeh für die Vergabe des Themas bedanken sowie für die geduldige theoretische und praktische ständige Unterstützung während der Ausführung der Dissertation. Für die Benutzung der Gerätschaften und Materialien des IVF-Labors und die unterstützenden Funktionen seitens des Personals gilt mein großer Dank auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Drs. h.c. W. Schmidt (Direktor der Gynäkologischen Klinik, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar).

Zusätzlich bedanke ich mich auch besonders herzlich bei Frau Stefanie Seyfried und Frau Ellen Maurer, geb. Roth, den medizinisch-technischen Assistentinnen des IVF-Labors, für ihre unentwegt freundliche, kompetente und geduldige Unterstützung.

Des Weiteren gebührt mein Dank den Instituten, mit deren Hilfe die praktischen Versuchsdurchführungen durch Bereitstellung von Gerätschaften, Materialien und personelle freundliche Unterstützung erfolgen konnten. Hierzu zählen:

- Klinisch-Chemisches Zentrallabor (der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar), Leiter: Herr Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. W. Herrmann.

Hierbei gilt mein Dank vor allem Frau Diplom-Biologin Dr. H. Schorr, Herrn G. Pape (Leitender MTA) und Frau M. Sand-Hill (Leitende MTA).

- Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung für Virologie (der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar), Leiter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. N. Müller-Lantzsch.
- Medizinische Universität zu Lübeck, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. S. Al-Hasani.

Außerdem möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Resultate und Erstellung von Graphiken bei Herrn Diplom-Mathematiker Dr. rer. nat. T. Georg vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar) bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls meinen Eltern Birgit und Ingo Spengler, meinen Schwestern Dorothee und Constanze Spengler und meinem Freund Torben Emrich für die große mentale Unterstützung, Hilfe bei der Durchsicht und bei der Übersetzung ins Englische.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Kommilitonen und Mitdoktoranden, Dr. Martin Lorenz, für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des praktischen Teils der

Versuche, bei der Literaturrecherche und bei den statistischen Auswertungen und auch für die moralische und sachliche Unterstützung beim Verfassen dieser Dissertation.



## 11. Lebenslauf

### 11.1. Persönliche Daten

Name: Spengler  
Vorname: Karoline  
Anschrift: Dr. Albert-Jung-Str. 6, 66869 Kusel  
Feldmannstr. 158, 66119 Saarbrücken  
Geburtsdatum: 12.09.1977  
Geburtsort: Kusel  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Konfession: evangelisch

### 11.2. Schulausbildung

1984-1988: Grundschule Kusel  
1988-1997: Gymnasium Kusel  
1996: Facharbeit Leitungskurs Biologie zum Thema:  
„Gentechnische Herstellung von Arzneimitteln am Beispiel  
des Insulins“  
1997: Abitur (Leistungskurse Biologie, Mathematik und Deutsch)

### 11.3. Hochschulausbildung

Seit 1997: Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes  
1999: Ärztliche Vorprüfung, Universität des Saarlandes  
2000: 1. Staatsexamen, Universität des Saarlandes  
2003: 2. Staatsexamen, Universität des Saarlandes  
4/2003 bis 3/2004: Praktisches Jahr, Klinikum Saarbrücken  
27.04.2004: 3. Staatsexamen, Universität des Saarlandes

#### **11.4. Beruflicher Werdegang**

01.09.2004: Beginn AiP, Klinikum Saarbrücken, Gynäkologie und Geburtshilfe

Seit 01.10.2004: Tätigkeit als Assistenzärztin im Klinikum Saarbrücken, Gynäkologie und Geburtshilfe