

Aus dem Bereich Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Schmidt)  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Reactive oxygen Species, Total antioxidant Status und Spermienqualität  
fertiler und subfertiler Männer vor und nach Dichtegradientenzentrifugation  
und die Auswirkungen auf die Erfolgsrate nach IVF und ICSI**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von Stephan Gerdemann  
geboren am 04.07.1977 in Kaiserslautern

**für Laila und meine Familie**

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
1.1 Englische Zusammenfassung (Summary).....	8
1.2 Deutsche Zusammenfassung.....	10
<b>2. Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Sterilität und Fertilitätsstörungen.....	12
2.1.1 Fertilitätsstörungen/Sterilität beim Mann.....	12
2.1.2 Fertilitätsstörungen/Sterilität bei der Frau.....	15
2.2 Die historische Entwicklung von IVF und ICSI.....	16
2.3 Bedeutung der gemessenen Parameter für die andrologische Fertilitätsdiagnostik.....	17
2.3.1 Konventionelle Spermaanlyse.....	17
2.3.2 Chromatinkondensation im Spermatozoenkopf.....	18
2.3.3 Apoptose bei Spermatozoen.....	19
2.3.4 Auswirkung von Oxidantien (ROS) auf die männliche Fertilität.....	21
2.3.5 Auswirkung von Antioxidantien auf die männliche Fertilität.....	22
2.3.5.1 Total antioxidant status (TAS).....	22
2.3.5.2 Zink und Selen.....	23
2.3.5.3 Vitamin A und E.....	24
2.4 Eigene Fragestellung.....	25
<b>3. Material und Methodik</b>	<b>26</b>
3.1 Patienten.....	26
3.2 Konventionelle Spermaanlyse.....	26
3.2.1 Volumenbestimmung.....	27
3.2.2 Bestimmung des pH-Wertes.....	27

3.2.3	Cyturtest.....	27
3.2.4	Martest (mixed antiglobulin reaction test).....	27
3.2.5	Vitalitätstests.....	28
3.2.5.1	Eosintest.....	28
3.2.5.2	Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test).....	29
3.2.6	Bestimmung der Spermiendichte.....	29
3.2.7	Bestimmung der Spermienmotilität.....	30
<b>3.3</b>	<b>Spermienmorphologie.....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Modifizierte Färbung nach Papanicolaou.....	31
3.3.2	Beurteilung der Spermienmorphologie.....	32
<b>3.4</b>	<b>Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung.....</b>	<b>33</b>
3.4.1	Vorbereitung.....	33
3.4.2	Durchführung der Chromomycin A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) Färbung.....	33
3.4.3	Auswertung.....	33
<b>3.5</b>	<b>Apoptosebeurteilung.....</b>	<b>34</b>
3.5.1	Allgemeines.....	34
3.5.2	TUNEL-Färbung.....	35
3.5.2.1	Vorbereitung.....	35
3.5.2.2	Durchführung der TUNEL-Färbung.....	36
3.5.2.3	Auswertung.....	36
<b>3.6</b>	<b>Zentrifugation des Spermas für weitere Messungen.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Reactive oxygen species (ROS).....</b>	<b>38</b>
3.7.1	Vorbereitung.....	38
3.7.2	Durchführung der ROS-Messung.....	39
3.7.3	Auswertung.....	39
<b>3.8</b>	<b>Total antioxidant status (TAS).....</b>	<b>40</b>
3.8.1	Vorbereitung.....	41
3.8.2	Durchführung der TAS-Messung.....	41
3.8.3	Auswertung.....	42
<b>3.9</b>	<b>Vitamin A und E.....</b>	<b>42</b>
3.9.1	Vorbereitung und Durchführung der Vitamin A und E Messung.....	42

3.9.2	Auswertung.....	43
<b>3.10</b>	<b>Selen und Zink.....</b>	<b>43</b>
<b>3.11</b>	<b>Spermiaufbereitung mittels PureSperm.....</b>	<b>45</b>
3.11.1	Herstellung der Gradienten.....	45
3.11.2	Durchführung von PureSperm.....	46
<b>3.12</b>	<b>Patientinnen.....</b>	<b>46</b>
<b>3.13</b>	<b>Methoden zur Befruchtung.....</b>	<b>47</b>
3.13.1	In Vitro Fertilisation (IVF).....	47
3.13.1.1	Beurteilung der Eizellen.....	48
3.13.1.2	Fertilisation (IVF).....	48
3.13.1.3	Embryotransfer.....	49
3.13.1.4	Schwangerschaftstest.....	49
3.13.2	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	49
3.13.2.1	Equipment.....	50
3.13.2.2	Fertilisation (ICSI).....	50
<b>3.14</b>	<b>Wichtige Standardlösungen.....</b>	<b>53</b>
3.14.1	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS).....	53
3.14.2	HAM'S F10.....	54
3.14.3	Hyaluronidaselösung.....	54
<b>3.15</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Patienten/-innen.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Parameter der konventionellen Spermaanalyse.....</b>	<b>57</b>
4.2.1	Volumen.....	57
4.2.2	pH-Wert.....	58
4.2.3	Cyturtest.....	58
4.2.4	Martest (mixed antiglobulin reaction test).....	58
4.2.5	Vitalitätstests.....	58

4.2.5.1	Eosintest.....	58
4.2.5.2	Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test).....	59
4.2.6	Spermiendichte.....	60
4.2.7	Spermienmotilität.....	62
4.2.7.1	Spermienmotilität vor Aufbereitung.....	62
4.2.7.2	Spermienmotilität nach Aufbereitung.....	65
<b>4.3</b>	<b>Spermienmorphologie.....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Spermienmorphologie vor Aufbereitung.....	67
4.3.2	Spermienmorphologie nach Aufbereitung.....	69
<b>4.4</b>	<b>Chromatinkondensation mittels Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Apoptosebeurteilung mittels TUNEL-Färbung.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6</b>	<b>Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation.....</b>	<b>75</b>
4.6.1	Reactive oxygen species (ROS).....	75
4.6.2	Total antioxidant status (TAS).....	83
<b>4.7</b>	<b>Vitamin A und E.....</b>	<b>91</b>
<b>4.8</b>	<b>Fertilisation und Schwangerschaft.....</b>	<b>92</b>
<b>5. Diskussion</b>		<b>95</b>
<b>5.1</b>	<b>Allgemeines zu Oxidantien und Antioxidantien.....</b>	<b>95</b>
<b>5.2</b>	<b>Auswirkungen der Reactive oxygen species (ROS).....</b>	<b>96</b>
5.2.1	Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die konventionelle Spermaanalyse.....	96
5.2.2	Auswirkungen der Reactive oxygen species (ROS) auf die Spermienmorphologie.....	100
5.2.3	Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Chromatinkondensation.....	102
5.2.4	Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Apoptoserate bei Spermatozoen.....	103

5.2.5	Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate.....	106
<b>5.3</b>	<b>Auswirkung des Total antioxidant status (TAS).....</b>	<b>110</b>
5.3.1	Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die konventionelle Spermaanlyse.....	110
5.3.2	Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Spermienmorphologie.....	113
5.3.3	Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Chromatinkondensation.....	114
5.3.4	Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Apoptoserate bei Spermatozoen.....	114
5.3.5	Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate.....	116
<b>5.4</b>	<b>Fazit der Diskussion.....</b>	<b>118</b>

## **6. Literaturverzeichnis** **121**

## **7. Danksagung** **137**

## **8. Lebenslauf** **139**

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Englische Zusammenfassung (Summary)

**Reactive oxygen species (ROS), total antioxidant status and sperm quality of fertile and subfertile men, before and after density gradient centrifugation and the effects on IVF and ICSI outcome.**

The aim of this study is to clarify the effects and relations of reactive oxygen species (ROS) and the total antioxidant status (TAS) within the seminal plasma and the ring after density gradient centrifugation of fertile and infertile men. There will be a special interest in the influence of ROS and TAS on the parameters of the conventional sperm analysis, the sperm morphology, the chromatin condensation in the sperm head, the apoptotic index and the fertilisation and pregnancy rate of IVF- (n=36) and ICSI-patients (n=51).

Therefore, as parameters of the conventional sperm analysis, we tested the semen of 87 patients, before sperm preparation (PureSperm), on volume, ph-value, cyturtest and MAR-test. Some parameters were examined before and after sperm preparation (sperm density, motility, morphology, vitality according to the HOS- and the Eosin-test, chromatin condensation according to the CMA<sub>3</sub>-staining, apoptotic index according to the TUNEL-staining).

The central measuring data in this study were the concentrations of oxidants (ROS) and antioxidants (TAS, vitamin A and E, selenium, zinc) in the seminal plasma and the ring after density gradient centrifugation. A colorimetric assay was used for the determination of reactive oxygen species. In the measurement of total antioxidant status an enzyme immunoassay was applied, in which a photometric detected colour reaction was used to calculate the TAS. To determine the amount of single antioxidants in the seminal plasma we utilized high performance liquid chromatography for vitamins A and E and the neutron activation analysis for selenium and zinc.

Finally for all patients the fertilisation and pregnancy rates were documented.

Regarding the question of this study we found following correlations. For conventional sperm analysis and sperm morphology, the results of this study show, in IVF as well as in ICSI, a negative effect with increasing ROS. On the other hand increasing TAS seems to have a positive effect on sperm quality. An example is the



increasing amount of amorphous spermatozoa and spermatozoa with poor motility (WHO-category D) with increasing ROS, as well as the decreasing amount of such spermatozoa with increasing TAS.

This study shows that high ROS-concentrations are positively correlated with insufficient chromatin condensation, although this correlation is only significant, looking at the IVF-group and all the patients, not in the ICSI-group. For TAS we show a positive effect on chromatin condensation. Furthermore a positive correlation between ROS and DNA-strand breaks is shown, whereas TAS has a decreasing effect on the amount of sperm cells with DNA-strand breaks.

For all patients the total antioxidant status measured in the seminal plasma shows a significant, positive correlation with the pregnancy rate.

Based on the negative effect of ROS on semen quality it is surprising that there is no direct correlation between ROS and the fertilisation or pregnancy rate. However, significant correlations are found between ROS and parameters negatively affected by ROS (or positively by TAS) and the pregnancy rate. Looking at all patients this is the case for cyturtest and sperm density. For the IVF group this study shows a negative correlation between the amount of sperm with poor motility (WHO-category D) and the number of fertilised eggs, as well as a negative correlation (only significant after sperm preparation) between the apoptosis index and the fertilisation rate. For the ICSI-group a negative correlation is found between pregnancy rate and insufficient chromatin condensation, as well as a negative correlation between apoptotic index (after sperm preparation) and number of fertilized eggs.

According to the results and correlations, this study supports theories that indicate negative effects of reactive oxygen species on fertility of men or assisted reproduction found by other studies. It also supports studies showing a positive influence of antioxidants on fertility of men or assisted reproduction techniques. Therefore we come to the conclusion that the investigation of oxidants and antioxidants could be used as predictive parameters for IVF and ICSI, and furthermore it might be a possible way to optimize artificial insemination and modern assisted reproduction.

## 1.2 Deutsche Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Studie ist es, die Auswirkungen und Zusammenhänge von Reactive oxygen species (ROS) und des Total antioxidant status (TAS) im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation von fertilen und subfertilen Männern zu klären. Ein spezielles Augenmerk soll hierbei auf den Einfluss von ROS und TAS auf die Parameter der konventionellen Spermienanalyse, die Spermienmorphologie, die Chromatinkondensation im Spermienkopf, die Apoptoserate der Spermien und schließlich auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate bei IVF-Patienten (n=36) und ICSI-Patienten (n=51) gelegt werden.

Hierzu werden an den insgesamt 87 Patienten vor Aufbereitung (PureSperm) Messungen zu Volumen, pH-Wert, Cyturtest, MAR-Test durchgeführt und es werden vor und nach Spermienaufbereitung, Dichte, Motilität, Morphologie, Spermienvitalität mittels Eosin- und HOS-Test als Parameter der konventionellen Spermienanalyse bestimmt. Weiterhin werden der Chromatinkondensationsstatus (CMA<sub>3</sub>-Färbung) und die Apoptoserate (TUNEL-Färbung) vor und nach Aufbereitung beurteilt.

Als zentrale Messung wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Oxidantien- (ROS) und Antioxidantienkonzentration (TAS, Vitamin A und E, Selen, Zink) im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation bestimmt. Hierbei werden Reactive oxygen species mittels eines kolorimetrischen Assays ermittelt. Bei der Messung des Total antioxidant status wird ein Testkit verwendet, in welchem man eine photometrisch bestimmte Farbreaktion nutzt um die TAS-Konzentration zu errechnen. Zur Messung einzelner Antioxidantien werden im Seminalplasma Vitamin A und E durch eine chromatographische Methode, Zink und Selen mittels der Neutronen-Aktivierungsanalyse bestimmt.

Schließlich wird bei allen Patienten eine Analyse der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate durchgeführt und dokumentiert.

Bei der Korrelationsanalyse der untersuchten Parameter stellten sich im Bezug auf die Fragestellung folgende wesentliche Zusammenhänge heraus:

Es kann betreffend die konventionelle Samenanalyse und die Spermienmorphologie, gezeigt werden, dass sich sowohl im Gesamtkollektiv als auch in der IVF- bzw. ICSI-Gruppe steigende ROS-Werte negativ auswirken, mit steigenden TAS-Werten sich hingegen die Spermienqualität verbessert. Es werden zum Beispiel bei den Patienten signifikant mehr amorphe und Spermien mit einer schlechten Motilität (WHO-

Kategorie D) gefunden je mehr ROS gemessen wird. Andererseits nimmt die Zahl der amorphen Spermien und solcher mit schlechter Motilität signifikant ab, je höher der Total antioxidant status ist.

Bei hohen ROS-Konzentrationen werden mehr Spermien mit einer schlechten Chromatinkondensation gefunden, wobei das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) aber nur im Gesamtkollektiv und der IVF-Gruppe erreicht wird. Nach den Daten der vorliegenden Studie hat TAS einen positiven Effekt auf die Chromatinkondensation. Im Bezug auf die Apoptoserate werden mit ROS positive und mit TAS negative Zusammenhänge dargestellt.

Für den Total antioxidant status im Seminalplasma konnte eine signifikante, positive Korrelation mit der Schwangerschaftsrate im Gesamtkollektiv gezeigt werden.

Aufgrund der ermittelten negativen Effekte von ROS auf die Samenqualität ist es verwunderlich, dass kein direkter Zusammenhang zwischen ROS und der Fertilisations- oder Schwangerschaftsrate besteht. Es ergeben sich allerdings signifikante Korrelationen zwischen der Schwangerschaftsrate und den Parametern auf die ROS einen negativen (bzw. TAS einen positiven) Einfluss hat. Im Gesamtkollektiv ist dies beim Cyturtest und der Spermiedichte der Fall. In der IVF-Gruppe zeigt sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie D und der Zahl der befruchteten Eizellen, sowie ein negativer Zusammenhang, der allerdings nur vor Aufbereitung das Signifikanzniveau erreicht, zwischen der Apoptose- und der Fertilisationsrate. In der ICSI-Gruppe ermitteln wir negative Korrelationen zwischen der Schwangerschaftsrate und schlechter Chromatinkondensation sowie zwischen der Apoptoserate (nach Aufbereitung) und der Zahl der befruchteten Eizellen.

Anhand der gefundenen Zusammenhänge, können wir Studien bestätigen, welche einen negativen Effekt von Reactive oxygen species auf die Fertilität des Mannes bzw. auf die Techniken der Reproduktionsmedizin postulieren. Ebenfalls bestätigen können wir Aussagen über einen positiven Effekt von Antioxidantien auf die Fertilität des Mannes und die Erfolgsrate nach assistierter Reproduktion. Wir kommen daher zu dem Schluss, dass in der Erforschung des Zusammenspiels von Oxidantien und Antioxidantien und deren Auswirkungen auf die Prozesse der künstlichen Befruchtung ein großes Potential zur Optimierung der Techniken der modernen Reproduktionsmedizin liegt.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Sterilität und Fertilitätsstörungen**

Eine Definition der WHO zur Sterilität lautet: Sterilität bezeichnet das Ausbleiben einer klinischen Schwangerschaft über zwei Jahre bei einem sexuell aktiven Paar ohne Anwendung von Empfängnisverhütung. In der Bundesrepublik Deutschland bleiben 10-20% der Ehen ungewollt kinderlos (Schmidt-Matthiesen, 1992). PFLEIDERER et al. (2000) fanden in der BRD eine ungewollte Kinderlosigkeit bei 10 bis 15% der Paare. Sicherlich wirken sich Umweltgifte und Schadstoffe nicht nur negativ auf die Fertilität des Mannes aus, sondern auch auf die Fruchtbarkeit der Frau (WONG et al., 1998; HANF, 1998). So wird zum Beispiel die Fertilität beider Geschlechter durch einen steigenden Konsum an Genussmitteln und Drogen verschlechtert.

#### **2.1.1 Fertilitätsstörungen/Sterilität beim Mann**

In etwa der Hälfte der Fälle liegt die Ursache für die Fertilitätsstörungen bzw. Sterilität beim Mann bzw. der männliche Faktor ist mitbeteiligt (BALS-PRATSCH et al., 1998; OEHNINGER, 2001). Es ist allseits bekannt, dass Spermien von infertilen Männern multiple strukturelle und funktionelle Defekte aufweisen. Die Gründe hierfür sind vielfältig, wie zum Beispiel Genmutationen, chromosomale Anomalien, Infektionen, Störungen im Bereich der Samenwege oder des Penis, Varicocele, Bestrahlung oder Chemotherapie und viele andere (PADRON et al., 1997; WANG et al., 1997; CARBONE et al., 1998; HENDIN et al., 1999; MAK et al., 1999). Unter in vitro Bedingungen manifestieren sich diese Störungen in erster Linie in der Unfähigkeit zur Interaktion mit der Eizelle. Genauer gesagt mit der zona pellucida. Diese Störung der Bindungsfähigkeit zwischen Spermium und zona pellucida allein oder in Verbindung mit anderen Defekten führt unweigerlich zu einer Störung der Fertilität bzw. sogar zur Sterilität beim Mann (LIU et al., 1992; OEHNINGER et al., 1992, 1997). Andere Störungen, die mit einer Fertilitätsstörung bzw. Sterilität beim Mann einhergehen, sind z.B. isolierte Störungen der Spermienmotilität (MORTIMER et al., 1986), Störungen der Akrosomreaktion nachdem an die zona pellucida gebunden wurde (LIU et al., 1994) oder Störungen der Verschmelzung von Spermium und

Eizelle (AITKEN et al., 1991). Andererseits kann man laut SHERINS et al. bei nahezu 50% der infertilen Männer keine Ursache der Fertilitätsstörung identifizieren, man spricht in diesen Fällen von einer idiopathischen Infertilität (SHERINS et al., 1995). Auffällig waren bei diesen Fällen von idiopathischer Infertilität beim Mann eine Abnahme der Spermiedichte, der Spermienmotilität und häufig auch morphologische Veränderungen (SIGMAN et al., 1992). Die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen machen für diese Veränderungen eine zu hohe Konzentration an Reactive oxygen species (ROS) verantwortlich (AITKEN, 1994; AITKEN et al., 1994; SHARMA et al., 1996). Entsprechend gibt es auch Ergebnisse, die eine Abnahme des total antioxidant status (TAS) im Seminalplasma für eine Verschlechterung der Spermaqualität verantwortlich machen (PALAN et al., 1996; SMITH et al., 1996; SHARMA et al., 1999).

Es können also zahlreiche Ursachen für eine Fertilitätsstörung bzw. Sterilität beim Mann vorliegen. Eine Übersicht, die die WHO im Jahre 1993 veröffentlichte beinhaltet folgende Punkte (WHO, 1993):

- Sexuelle und/oder ejakulatorische Dysfunktion
- Immunologische Ursachen
- Keine erfassbare Ursache
- Isolierte Abnormalität des Seminalplasmas
- Iatrogene Ursachen
- Systemische Ursachen
- Kongenitale Abnormitäten
- Erworbener testikulärer Schaden
- Varikozele
- Urogenitale Infektionen beim Mann
- Endokrine Ursachen
- Idiopathische Oligozoospermie (reduzierte Spermienkonzentration)
- Idiopathische Asthenozoospermie (reduzierte Motilität)
- Idiopathische Tetrazoospermie (reduzierter Anteil von morphologisch normalen Spermien)
- Obstruktive Azoospermie (keine Spermien im Ejakulat nach Zentrifugation)
- Idiopathische Azoospermie

NIESCHLAG et al. veröffentlichten 1996 eine ähnliche Aufstellung, die er nach der Häufigkeit ordnete, beginnend mit der häufigsten Ursache (NIESCHLAG et al., 1996):

- Idiopatische Infertilität
- Varikozele
- Endokriner Hypogonadismus
- Kryptorchismus oder Gleithoden
- Störungen der Samenwege
- systemische Erkrankungen
- Hodentumoren
- Obstruktion der Samenwege

Im Folgenden einige konkrete Beispiele die zu Fertilitätsstörungen/Sterilität beim Mann führen können. So führt zum Beispiel das Zigarettenrauchen zu einer allgemeinen Reduktion der Samenqualität (KUNZLE et al., 2003). SALEH et al. (2003) konnten zeigen, dass das Rauchen die DNA-Integrität beeinflusst. Auch der Beruf kann unter Umständen ein negativer Einflussfaktor auf die Fertilität des Mannes sein. Bei Männern mit einer beruflichen Radarstrahlenbelastung wurde nachweislich eine verringerte Motilität und Vitalität der Spermien gefunden (LIU et al., 2003). Eine signifikant schlechtere Spermienqualität bei Berufskraftfahrern als bei Männern mit einem anderen Beruf zeigten ZHAO et al. (2003). Auch das Alter des Mannes scheint einen Einfluss auf die Fertilität zu haben, ebenso wie täglicher Kaffeekonsum, wie SCHMID et al. (2007) zeigen.

Abschließend möchte ich noch erwähnen, dass es Diskussionen gibt, ob die mittlere Spermiedichte der Männer insgesamt rückläufig ist. So gibt es Arbeitsgruppen, die eine signifikante Abnahme der mittleren Spermienkonzentration von 113 Mio./ml im Jahr 1940 auf 66 Mio./ml im Jahr 1990 zeigen konnten (CARLSEN et al., 1992). Andere Studien kamen zu dem gleichen Ergebnis (VAN WAELEGHEM et al., 1996; SWAN et al., 1997). Andererseits gibt es auch Studien, die keinen signifikanten Rückgang der Spermiedichte feststellen konnten (OLSEN et al., 1995; FISCH et al., 1996). Nun muss man sagen, dass das Problem der abnehmenden Spermiedichte der Männer möglicherweise kein globales ist (FISCH et al., 1996) und klinische Studien zur Samenqualität oft an stark selektierten Gruppen durchgeführt werden, was hierfür eine Erklärung sein könnte. Oft sind dies zum Beispiel Freiwillige (IRVINE et al., 1996; LEMCKE et al., 1997), Samenspendekandidaten (BUJAN et al., 1996;

VAN WAELEGHEM et al., 1996) oder Infertilitätspatienten (BERLING et al., 1997; ANDOLZ et al., 1999). In unselektierten Studien wird jedoch ein Rückgang der mittleren Spermiedichte bestätigt. So wird zum Beispiel bei der Prüfung der Wehrdiensttauglichkeit in Dänemark auch eine Samenanalyse durchgeführt. ANDERSEN et al. (2000) fassten diese Ergebnisse in einer Studie zusammen und kam zu dem Ergebnis, dass 40% der untersuchten jungen dänischen Männer eine mittlere Spermiedichte von unter 40 Mio./ml haben. Im Vergleich dazu wurde die mittlere Spermiedichte der dänischen Männer, die zwischen 1937 und 1949 geboren waren mit 63 Mio./ml bestimmt. Bei zwischen 1970 und 1974 geborenen nur noch mit 52 Mio./ml. ANDERSEN et al. konnten somit einen Rückgang der Spermiedichte um 1,24% pro Jahr zeigen.

### **2.1.2 Fertilitätsstörungen/Sterilität bei der Frau**

Wie schon in den vorangegangenen Kapitel beschrieben, sind die Ursachen für das Ausbleiben einer Schwangerschaft bei einem Paar zahlreich und vielschichtig. Nach TAUBERT sind Fertilitätsstörungen bzw. Sterilität bei der Frau hauptsächlich durch Zyklusstörungen (Anovulation und Corpus-luteum-Insuffizienz), Hormonstörungen (z.B. Hypothyreose, Hyperprolaktinämie, adrenogenitales Syndrom), zervikale Sterilität, Uterushypoplasien, Eileitersterilität, polyzystische Ovarien, Endometriose und Tumoren begründet (TAUBERT, 1998). Für eine Reihe dieser Erkrankungen, wie zum Beispiel Endometriose, Präeklampsie (ZUSTERZEEL et al., 2001) und Schwangerschaftsdiabetes konnte unter anderem auch eine zu hohe Konzentration an reactive oxygen species (ROS) verantwortlich bzw. ein Ungleichgewicht zwischen reactive oxygen species und dem total antioxidant status (TAS) gemacht werden (SHARMA et al., 2004). Auch andere Studien sehen die Endometriose als Hauptursache für Fertilitätsstörungen/Sterilität bei der Frau (ESKENAZI et al., 1997; PARAZZINI et al., 1999).

Bei Frauen scheint ebenfalls eine Raucheranamnese eine wesentliche Ursache von Fertilitätsstörungen bzw. Sterilität zu sein. So konnten PASZKOWSKI et al. zeigen, dass Zigarettenrauchen zu einem hoch signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation im präovulatorischen Follikel, hervorgerufen durch oxidativen Stress, führt und der total antioxidant status im Follikel signifikant abnimmt (PASZKOWSKI et al., 2002).

Reactive oxygen species in der Follikelflüssigkeit wirken sich negativ auf die Entwicklung des Embryos aus (DAS et al., 2006).

Sicherlich spielt auch die Verlagerung der reproduktiven Phase der Frau ins höhere Alter eine wesentliche Rolle (AGARWAL et al., 2005c).

## **2.2 Die historische Entwicklung von IVF und ICSI**

Was am 25. Juli 1978 durch STEPTOE und EDWARDS (1978) mit der Geburt von Louise Brown begann, nämlich die Geburt des ersten durch in vitro Fertilisation (IVF) gezeugten Kindes, hat sich nach FELDERBAUM et al. (1998) in den letzten Jahren, zusammen mit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) als Techniken der Reproduktionsmedizin immer weiter etabliert und ist wissenschaftlich anerkannt worden. Bis in Deutschland das erste Kind durch IVF geboren wurde dauerte es noch bis 1981. Mit den Jahren konnte die in vitro Fertilisation immer weiter verbessert werden (EDWARDS et al., 1983; STEPTOE et al., 1986), so dass schon in den Jahren von 1982 bis 1993 allein in Deutschland 9871 Paaren mit Kinderwunsch durch eine erfolgreiche in vitro Fertilisation geholfen werden konnte (FELDERBAUM et al., 1998).

Ein weiterer großer Schritt in der Reproduktionsmedizin war 1992 die Geburt des ersten Kindes nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) durch PALERMO et al (1992). Die Einführung dieser Methode hat die Erfolgsaussichten bei Fertilitätsstörungen des Mannes entscheidend verbessert. Bereits ein Jahr später beschreiben VAN STEIRTEGHEM et al. (1993) die intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) als ein Verfahren, mit welchem sich die männliche Subfertilität gut therapieren lässt. Der zunehmende Stellenwert von ICSI zeigt sich auch darin, dass laut den Angaben des Deutschen IVF-Registers im Jahre 2002 schon 37692 von 62306 aller Follikelpunktionen aufgrund einer ICSI-Behandlung gemacht wurden.

Prinzipiell kann man sagen, dass es bei jeder Technik der Reproduktionsmedizin die genaue Anamnese eine große Rolle spielt. Hierbei sollte vor allem auf frühere (evtl. frustrane) Zyklen künstlicher Befruchtung, frühere Schwangerschaften, Aborte und Lebendgeburten sowie das Alter der Patientin eingegangen werden, um eine bessere Planung von weiteren Behandlungszyklen zu ermöglichen und die



Erfolgschancen besser abschätzen zu können und zu optimieren (KUPKA et al., 2003).

## **2.3 Bedeutung der gemessenen Parameter für die andrologische Fertilitätsdiagnostik**

Studien haben gezeigt, dass der Grund für das wiederholte Ausbleiben einer Schwangerschaft in der assistierten Reproduktion oft auf der väterlichen Seite zu finden ist (HAMMADEH et al., 1996; SANCHEZ et al., 1996; SHOUKIR et al., 1998). Allerdings kann man nicht allein durch männliche Parameter den Schwangerschaftserfolg vorhersagen, der weibliche Faktor spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle.

### **2.3.1 Konventionelle Spermaanlyse**

In einem Sonderdruck zum ersten Homburger Workshop zur assistierten Fertilisation durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) empfiehlt HAMMADEH (1997) bei andrologischer Subfertilität, ein klares Vorgehen, welches sich an den Spermioqrammparametern orientiert. Er unterteilt die männliche Subfertilität in drei Gruppen:

#### **Grad I: Leichtstörung:**

Spermioqrammparameter in diesem Stadium:

- Spermindichte: 10-20 Mio./ml
- Spermienmotilität: 30-40%
- Spermienmorphologie: 16-20% normal

Als Therapieschema empfiehlt HAMMADEH in diesem Stadium:

- Zunächst sechsmal intrauterine Insemination
- dann IVF
- falls 2x frustraner Embryotransfer → ICSI

### **Grad II: Mittelstörung:**

Spermiogrammparameter in diesem Stadium:

- Spermiendichte: 5-10 Mio./ml
- Spermienmotilität: 20-30%
- Spermienmorphologie: 10-16% normal

Als Therapieschema empfiehlt HAMMADEH in diesem Stadium:

Zunächst dreimal intrauterine Insemination

→ dann IVF

→ falls kein erfolgreicher Embryotransfer → ICSI

### **Grad III: Schwerstörung:**

Spermiogrammparameter in diesem Stadium:

- Spermiendichte: 0-5 Mio./ml
- Spermienmotilität: 0-20%
- Spermienmorphologie: 0-10% normal

Als Therapieschema empfiehlt HAMMADEH in diesem Stadium:

Direkt ICSI

→ eventuell: MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration)

TESE (testicular sperm extraction)

### **2.3.2 Chromatinkondensation im Spermatozonenkopf**

Auch wenn die Methoden der modernen Reproduktionsmedizin ohne Zweifel ein Segen für ungewollt kinderlose Paare sind, so sollte man doch erwähnen, dass insbesondere bei der ICSI-Methode einige physiologische Selektionsbarrieren umgangen werden, die üblicherweise dafür sorgen, dass nur das beste Spermium die Eizelle befruchten kann. Studien geben zu bedenken, dass durch dieses Umgehen der physiologischen Selektion evtl. defektes väterliches Erbgut in die Oozyte eingebracht und so weitergegeben werden kann (IRVINE et al., 2000; SAKKAS et al., 2000). Spermien von infertilen Männern weisen häufig Kernveränderungen, wie zum Beispiel eine abnormale Chromatinstruktur, Mikrodeletionen, chromosomales crossing-over und DNA-Strangbrüche auf

(GERADO et al., 2000). Nach HAMMADEH et al. (1998) können morphologisch normale Spermien, wenn sie fehlerhaft kondensiertes Chromatin enthalten, zu schlechten Fertilisationsraten führen. Auch andere Forschungsgruppen zeigten, dass eine schlechte Chromatinkondensation eine negative Auswirkung auf die Fertilisationsrate sowohl nach Geschlechtsverkehr (EVENSON et al., 1999; SPANO et al., 2000) als auch nach IVF bzw. ICSI hat (ESTERHUIZEN et al., 2000; LOPES et al., 1998b). Die Abortrate steigt nach EVENSON et al. ebenfalls (EVENSON et al., 1999).

Eine gute Chromatinkondensation schützt den Nucleus vor enzymatischem Abbau, chemischen sowie physikalischen Einflüssen, ist außerdem Grundlage für die Formation des männlichen Pronucleus (HAMMADEH et al., 1997b) und ist Voraussetzung für die Interaktion der Spermien- mit der Eizell-DNA (HAMMADEH, 2000).

Insgesamt kann man somit feststellen, dass die Chromatinkondensation im Spermatozoonkopf ein wesentlicher Faktor auf dem Weg zu einer erfolgreichen Schwangerschaft darstellt, sowohl in der Reproduktionsmedizin (HAMMADEH et al., 1998; GOPALKRISHNAN et al., 1999) als auch generell (EVENSON et al., 1999; HACKER-KLOM et al., 1999; SPANO et al., 2000).

### **2.3.3 Apoptose und DNA-Integrität bei Spermatozoen**

Die Apoptose bzw. der programmierte Zelltod, ist charakterisiert durch eine Serie von morphologischen und chemischen Veränderungen, welche schließlich in einer effizienten Elimination von Zellen resultiert (WYLLIE, 1980).

Studien mit Tieren haben gezeigt, dass die Apoptose der Mechanismus ist um potentiell defekte Spermatozoen zu entfernen (SINHA HIKIM et al., 1998), somit ein physiologischer Vorgang während der Spermatogenese ist (KIERSZENBAUM, 2001; KIM et al., 2002). Hierfür sprechen auch die Ergebnisse einer weiteren Studie, welche besagen, dass von den theoretisch 4096 Spermatiden, die eine Spermatogonie im männlichen Hoden produzieren kann, nur etwa 100 überleben (WOOLVERIDGE et al., 2000). Eine relativ hohe Apoptoserate wurde in Hodenbiopsaten von infertilen Männern mittels der TUNEL-Färbung und morphometrischen Kriterien gemessen (LIN et al., 1997a, b). Die Arbeitsgruppe um SHEN zeigte, dass der Anteil an apoptotischen Spermien bei Männern mit

Azoospermie oder schwerer Oligozoospermie signifikant höher ist als bei normal fertilen Männern, was sie sich dadurch erklärten, dass bei den subfertilen Männern mehr Spermatozoen für einen programmierten Zelltod markiert werden (SHEN et al., 2002). Weiterhin differenzieren SHEN et al. zwischen einer frühen und einer späten Apoptosephase. In der späten Phase kommt es zur DNA-Fragmentation. Als Hauptgründe für DNA-Schäden beim subfertilen Mann nennen SHEN et al. folgende Gründe:

- Apoptose
- Oxidativer Stress
- fehlerhafte Chromatinkondensation

Auch MOUSTAFA et al. (2004) kommen zu dem Ergebnis, dass die Apoptoserate bei Spermaproben von infertilen Patienten signifikant höher ist als bei Kontrollpatienten. HAN-MING und Kollegen konnten zeigen, dass die DNA-Fragmentation in der späten Phase der Apoptose geschieht. Weiterhin fanden sie negative Korrelationen zwischen der Apoptoserate und der Spermienmotilität, der Spermienvitalität sowie der morphologisch normalen Spermien (HAN-MING et al., 2002).

Im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie zur intrauterinen Insemination von DURAN et al. (2002), kam es bei keiner der Spermaproben, die einen Anteil von Spermatozoen mit DNA-Strangbrüchen >12% hatten, zu einer Schwangerschaft. Dies konnte durch eine Studie von BENCHAIIB und Mitarbeitern bestätigt werden. Sie stellten eine signifikante Abnahme der Schwangerschaftsrate bei den ICSI-Patienten fest, sobald der Anteil der Spermien mit fragmentierter DNA >10% war, (BENCHAIIB et al., 2003). Dass sich dieser Zusammenhang nur bei den ICSI-Patienten erheben ließ, wohingegen die Schwangerschaftsrate bei den IVF-Patienten nicht signifikant von der Anzahl der Spermien mit fragmentierter DNA abhing ist wohl damit zu erklären, dass bei der IVF-Therapie die bereits erwähnten physiologischen Selektionsmechanismen nicht umgangen werden.

### **2.3.4 Auswirkung von Oxidantien (ROS) auf die männliche Fertilität**

Unter reactive oxygen species (ROS) versteht man freie Radikale, die eine oder mehrere unpaarige Elektronen besitzen. SANOCKA et al. (2004) nennen einige Beispiele: Hydroxylradikale, Hydrogenperoxid, Superoxidanionen, Peroxide, Peroxidradikale, Stickstoffoxid und Stickstoffdioxid. Hauptquellen für ROS sind unter anderem Leukozyten (ZALATA et al., 1995; LEMKECHER et al., 2005) und unreife Spermatozoen (GARRIDO et al., 2004). Die Möglichkeit, dass Reactive oxygen species einen Einfluss auf die Fertilität haben könnte, wurde wahrscheinlich erstmals 1943 von MACLEOD vermutet (MACLEOD, 1943). Heute weiß man anhand der Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, dass ROS zu einer Schädigung der Plasmamembran von Spermien durch Lipidperoxidation führen (ALVAREZ et al., 1987; AITKEN et al., 1989a, b; IWASAKI et al., 1992; KOKSAL et al., 2003). Die Lipide, aus denen die Plasmamembran von Spermien hauptsächlich aufgebaut ist, sind auch an der Spermatogenese, der Akrosomreaktion und dem Befruchtungsvorgang beteiligt. Wird die Plasmamembran geschädigt, zum Beispiel durch eine zu hohe ROS-Konzentration im Seminalplasma, so kommt es zu einer Peroxidation der Membranlipide und dadurch zu Störungen der o. g. Vorgänge (GARRIDO et al., 2004; SANOCKA et al., 2004). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass ROS in der DNA zu Strangbrüchen führen (HUGHES et al., 1996, 1999; KODOMA et al., 1997; LOPES et al., 1998 a; TWIGG et al., 1998 a, b), welche bei Spermatozoen von infertilen Männern signifikant häufiger vorkommen als bei fertilen Kontrollpatienten (KODAMA et al., 1997; MOUSTAFA et al., 2004). Verschiedene Studien haben die DNA-Struktur und -Integrität im männlichen Sperma untersucht und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass ein hoher Anteil an Spermien mit DNA-Schäden, hervorgerufen zum Beispiel durch eine hohe ROS-Konzentration, einen negativen Effekt auf die Schwangerschaftsrate in der Reproduktionsmedizin hat (LARSON et al., 2000; MORRIS et al., 2002; TOMSU et al., 2002; BENCHAIIB et al., 2003).

### **2.3.5 Auswirkung von Antioxidantien auf die männliche Fertilität**

Wenn man die unter Kapitel 2.3.4 beschriebenen Auswirkungen von ROS auf die männliche Fertilität bedenkt, könnte die Behandlung von infertilen Männern mit Antioxidantien ein therapeutischer Ansatz sein, da diese den durch ROS verursachten Schaden begrenzen. So konnte ALVAREZ et al. (1987) zeigen, dass mit steigendem total antioxidant status, die Schädigung der Membran durch Lipidperoxidation abnimmt. Ascorbinsäure (Vitamin C) ist ein hoch potentes wasserlösliches Antioxidans, das im Seminalplasma in einer etwa zehnfach höheren Konzentration als im Serum vorkommt (JACOB et al. 1992). Die Konzentration von Ascorbinsäure im Plasma lässt sich durch die tägliche Gabe von 1g Vitamin C mehr als verdoppeln (WEN et al., 1997). Weiterhin hat die Vitamin C Konzentration im Seminalplasma einen positiven Einfluss auf die Anzahl der normomorphen Spermien (THIELE et al., 1995). Auch konnte gezeigt werden, dass bei Samenproben mit einer hohen ROS Konzentration, die Ascorbinsäurekonzentration signifikant erniedrigt war (LEWIS et al., 1997).

Andererseits ist zu erwägen, dass durch eine antioxidative Therapie, welche die ROS-Konzentration zu stark senkt, die Spermienfunktion und damit die Fertilität verschlechtert werden kann, da eine gewisse Menge an ROS nach AITKEN et al. (1994) für bestimmte Stoffwechselprozesse, wie zum Beispiel die Signaltransduktion, die antimikrobielle Immunabwehr, die Regulation von Genen, das zelluläre Wachstum und den Vasotonus, von Bedeutung zu sein scheint.

#### **2.3.5.1 Total antioxidant status (TAS)**

Sowohl im Spermium als auch im Seminalplasma sind antioxidativ wirksame Systeme vorhanden, die der schädigenden Wirkung der reactive oxygen species entgegenwirken, und unter dem Begriff total antioxidant status zusammengefasst werden. Ein Ungleichgewicht zwischen reactive oxygen species (ROS) und total antioxidant status (TAS) im Seminalplasma führt zu oxidativem Stress und schließlich durch eine Schädigung der Spermatozoen (SHEWEITA et al., 2005) zu Fertilitätsproblemen beim Mann (SHARMA et al., 1999). Es konnte belegt werden, dass bei infertilen Männern im Vergleich zu fertilen Männern ein signifikant erniedrigter TAS zu finden war (SMITH et al., 1996; LEWIS et al., 1997).

Im Folgenden wird nur auf die im Rahmen dieser Studie untersuchten Antioxidantien näher eingegangen.

### **2.3.5.2 Zink und Selen**

Da das Ejakulat die Körperflüssigkeit mit der höchsten Zinkkonzentration ist, scheint es im männlichen Geschlechtstrakt eine besondere Rolle zu spielen. Seine höchste Konzentration im männlichen Reproduktionstrakt hat Zink in der Prostata (ABOU-SHAKRA et al., 1989). Zink werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. So soll es neben einer antibakteriellen Wirkung (FAIR et al., 1976), die Produktion von ROS unterdrücken (GAVELLA et al., 1998). Zink hat neben anderen Faktoren auch einen wesentlichen Einfluss auf die Chromatinkondensation und damit auf die Fertilisationskapazität der Spermien (KRAMER et al., 1997). Außerdem wird Zink ein positiver Einfluss auf die Spermienmotilität zugeschrieben (SKANDHAN, 1981). OLDEREID und Kollegen konnten zeigen, dass es eine signifikante positive Korrelation zwischen der Zink- und der Selenkonzentration im Ejakulat gibt, woraus er schloss, dass die Prostata eine wesentliche Rolle in der Sekretion von Zink und Selen spielt. Weiterhin fand er einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Selenkonzentration im Seminalplasma und der Spermiedichte (OLDEREID et al., 1998). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Selen sich negativ auf die Spermienmotilität auswirkt, außerdem fand man gehäuft Defekte vor allem des Mittelstücks der Spermien und abnormale Spermienformen insbesondere im Bereich des Spermienkopfes (WATANABE et al., 1991). Selen hat ebenso eine schützende Funktion für das Spermium gegenüber der schädigenden Wirkung von reactive oxygen species (ROS), indem es als Cofaktor der Glutathion-Peroxidase als das Selenoprotein Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase agiert. In dieser Rolle hilft es auch die strukturelle Integrität der Spermien, vor allem des Mittelstücks, zu schützen (STRAUSS, 1999).

### **2.3.5.3 Vitamin A und E**

Vitamin E wurde 1922 von EVANS und BISHOP entdeckt und ist ein Sammelbegriff für alle Tocol- und Tocotrienol-Derivate, die qualitativ die biologische Aktivität von alpha-Tocopherol besitzen. Alpha-Tocopherol (Vitamin E) ist lipidlöslich und hat vor allem eine antioxidative Wirkung an der Zellmembran (FORD und WHITTINGTON, 1998), wo es Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Hydrogenperoxid direkt neutralisiert (AGARWAL et al., 2004; SHARMA et al., 2004).

Im Sperma ist ein Protein-Vitamin E Komplex enthalten, das sogenannte non-specific sperm agglutinin (NSSA). Es existiert in zwei Formen. In seiner oxidierten Form kann es nicht an Spermatozoen binden, in seiner reduzierten Form jedoch bindet es an Spermien und verhindert deren Verklumpen und verbessert so die Spermienmotilität. Vitamin C hat einen antioxidativen Effekt auf NSSA und hält es in seiner reduzierten Form.

Vitamin A, auch ein fettlösliches Vitamin, ist wichtig für den Reifungsprozess der Spermatozoen auf ihrem Weg durch den Nebenhoden. Vitamin A schützt ebenfalls die Spermien vor ROS. Es kann an Spermien binden und wird mit in die Eizelle bei der Befruchtung aufgenommen, wo es für die frühe Entwicklung der Embryonen wichtig ist.



## 2.4 Eigene Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Studie ist es, die Auswirkungen und Zusammenhänge von reactive oxygen species (ROS) und des total antioxidant status (TAS) im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation von fertilen und subfertilen Männern zu klären. Ein spezielles Augenmerk soll hierbei auf den Einfluss von ROS und TAS auf die Parameter der konventionellen Spermienanalyse, die Spermienmorphologie, die Chromatinkondensation im Spermienkopf, die Apoptoserate der Spermien und schließlich auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate bei IVF- und ICSI-Patienten gelegt werden.

Um dies zu erörtern, werden als Parameter der konventionellen Spermienanalyse vor Aufbereitung Messungen zu Volumen, pH-Wert, Cyturtest, MAR-Test durchgeführt, und es werden vor und nach Spermienaufbereitung Dichte, Motilität, Morphologie, Spermiovitalität mittels Eosin- und HOS-Test bestimmt. Weiterhin werden der Chromatinkondensationsstatus (CMA<sub>3</sub>-Färbung) und die Apoptoserate (TUNEL-Färbung) vor und nach Aufbereitung beurteilt. Als zentrale Messungen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Oxidantien- (ROS) und Antioxidantienkonzentration (TAS, Vitamin A und E, Selen, Zink) im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation bestimmt.

Zusammenfassend ergibt sich folgende Fragestellung:

- Welche Auswirkungen haben ROS und TAS auf die konventionelle Spermaanalyse und die Spermienmorphologie?
- Welche Auswirkungen haben ROS und TAS auf die Chromatinkondensation und die Apoptoserate bei Spermatozoen?
- Welche Auswirkungen haben ROS und TAS auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate?
- Wie könnten vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser und anderer Studien die Techniken der modernen Reproduktionsmedizin optimiert werden?

## **3. Material und Methodik**

### **3.1 Patienten**

Für diese Studie werden die Spermaproben von 87 Männern (IVF n=36; ICSI n=51), welche sich in der Kinderwunschsprechstunde der Frauenklinik der Universität des Saarlandes mit ihren Partnerinnen vorstellten, untersucht.

Die Proben wurden über den Zeitraum von April 2004 bis April 2005 gesammelt.

### **3.2 Konventionelle Spermaanalyse**

Als wichtiger Bestandteil der Ursachenforschung bei unerfülltem Kinderwunsch wird routinemäßig bei allen Paaren, die sich in der Kinderwunschsprechstunde der Universitätsfrauenklinik vorstellen, ein konventionelles Spermogramm vom Fachpersonal durchgeführt. Das Ejakulat wird nach dreitägiger sexueller Karez durch Masturbation in einen sterilen Einmal-Kunststoffbecher mit Deckel gewonnen. Die durch die Spermaanalyse ermittelten Werte werden in der Frauenklinik der Universität des Saarlandes in einem standardisierten Datenerhebungsbogen erfaßt und wurden retrospektiv für diese Arbeit erhoben. Ausgeschlossen von dieser Routineanalyse sind die Spermienmorphologie, die Fluoreszenzfärbungen, die ROS- und TAS-Messung, sowie die Bestimmung der Vitamin A, E, Zink- und Selen, die eigens für diese Studie durchgeführt wurden.

Zu diesem Zweck werden sechs zusätzliche Ausstrichpräparate vor der Aufbereitung, sowie sechs nach der Aufbereitung angefertigt, luftgetrocknet und mit Fixationsspray (Merckofix, Merck, Darmstadt) fixiert. Außerdem werden von jedem Patienten, zwei Konustuben Seminalplasma des nativen Ejakulats nach Verflüssigung, sowie zwei Konustuben des Materials eingefroren, welches sich als Ring nach Dichtegradientenzentrifugation des nativen Spermias zwischen der PureSperm-Lösung-A (40%) und der -Lösung-B (80%) ablagert.

### **3.2.1 Volumenbestimmung**

Laut WHO-Bestimmungen liegt der Normwert des Volumens bei mindestens 2 ml (WHO, 1999). Die abgegebene Spermaprobe wird nach 20 minütiger Verflüssigung auf einer Wärmeplatte (37°C), in ein steriles graduiertes Konusröhrchen (PP-Test tubes Cellstar, Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) gefüllt und das Volumen abgelesen.

### **3.2.2 Bestimmung des pH-Wertes**

Der Normwert für den pH-Wert liegt zwischen 7,2 und 7,8 (WHO, 1999). Zur Bestimmung des pH-Wertes wird das Ejakulat auf ein spezielles Indikatorpapier (Testbereich zwischen pH 6,5 und 10,0; Merck, Darmstadt) aufgetragen und kann nach 30 Sekunden mit dem Kalibrationsstreifen verglichen werden.

### **3.2.3 Cyturtest**

Der Cyturtest wird eingesetzt um die Esterasenaktivität von Granulozyten nachzuweisen. Der Indoxylester des Teststreifens (Combur<sup>2</sup>Test LN, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wird durch die Esterasen zu Indoxyl gespalten, welches dann mit einem Diazoniumsalz zu einem violetten Farbstoff reagiert. Zwei Minuten nachdem man den Teststreifen in das Ejakulat eingetaucht hat kann man das Ergebnis ablesen. Es gibt drei Abstufungen der Farbreaktion, die mit einer Referenztafel auf der Packung verglichen werden.

### **3.2.4 Martest (mixed antiglobulin reaction test)**

Der Martest (SpermMar IgG Test, FertiPro, Beernem, Belgien) dient der Detektion von auf der Spermienoberfläche gebundenen IgG-Antikörpern. Die Lagerung des Testkits erfolgt im Kühlschrank bei zwei bis acht Grad Celsius.

Das Testkit besteht aus zwei Teilen:

1. SpermMar Latex Partikel

Eine Suspension von Polystyren-Latex-Teilchen mit einem Durchmesser von ca. zwei Mikrometern, die mit humanem IgG bedeckt sind.

## 2. SpermMar Antiserum

Ein gegen das Fc-Fragment von humanem IgG gerichtetes monospezifisches Antiserum.

Auf einem Objektträger werden zunächst 10µl der Latex-Suspension und 10µl unbehandeltes liquefiziertes Ejakulat vermischt. Dann gibt man 10µl Antiserum hinzu und deckt das Präparat mit einem Deckgläschen ab. Drei Minuten später betrachtet man den Objektträger unter einem Lichtmikroskop (Model CHS, Olympus Optical Co LTD, Japan) mit 400facher Vergrößerung. Wird zu diesem Zeitpunkt noch keine Reaktion festgestellt, wird das Präparat nach weiteren sieben Minuten erneut beurteilt. Es werden 100 bewegliche Spermien ausgezählt. IgG-AK freie Spermien bewegen sich ungehindert zwischen den Latexpartikeln. Spermien, welche auf ihrer Oberfläche mit IgG Antikörper bedeckte Latex Partikel gebunden haben, agglutinieren mit der Zeit durch das gegen das Fc-Fragment gerichtete Antiserum. Es werden 100 Spermien ausgezählt und der Prozentsatz derer errechnet, die an Latexpartikel gebunden sind. Betrifft dies mehr als 50 % der Spermatozoen, gilt die Reaktion als pathologisch (WHO, 1999).

## 3.2.5 Vitalitätstests

### 3.2.5.1 Eosintest

Mit Hilfe des Eosintests werden tote Spermien selektiv angefärbt. Er dient also dazu tote von vitalen Spermien zu unterscheiden. Der Test macht sich zu Nutzen, das der Eosinfarbstoff die Plasmamembran von toten Spermien passieren kann, während dies bei vitalen Spermien nicht möglich ist

Zur Durchführung des Tests benötigt man 10µl frisches Ejakulat, das zusammen mit einem Tropfen einprozentiger Eosinlösung (Klinikapotheke, Uniklinik Homburg) auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt wird. Unter dem Mikroskop (Model CHS, Olympus Optical Co LTD, Japan) werden bei 400facher Vergrößerung im Hellfeld oder mit Phasenkontrast nach ein bis zwei Minuten 100 Spermien ausgezählt. Dabei entsprechen die farblosen Spermien den vitalen und die rot gefärbten den toten Spermien. Nach Angaben der WHO sollte die Zahl der rot gefärbten Spermien nicht mehr als 25% betragen (WHO, 1999). Vitale

aber unbewegliche Spermien lassen sich von toten Spermien durch den Eosintest gut unterscheiden.

### **3.2.5.2 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)**

Mit dem HOS-Test steht neben dem Eosintest ein weiterer Test zur Verfügung die Spermiovitalität zu beurteilen. Er beruht darauf, dass es unter hypoosmotischen Bedingungen aufgrund der Semipermeabilität der intakten Spermienmembran zu einem Hydrops des Spermiums kommt. Zu sehen ist dies an einer Änderung der Schwanzform. Zur Durchführung des HOS-Tests benötigt man eine Schwelllösung, zu deren Herstellung werden 1,47g Trinatriumzitat (Merck, Darmstadt) in 100 ml aqua dest. (Seromed, Berlin) gelöst und mit 2,75g Fructose (Merck, Darmstadt) ebenfalls gelöst in 100 ml aqua dest. gut durchmischt. Indem man jeweils einen Milliliter diese Lösung in Eppendorfgefäße (500 PP-Microzentrifuge tube 1,5 ml, Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen) füllt und bei -20 °C einfriert, kann die Haltbarkeit der Schwelllösung auf drei Monate verlängert werden.

Der HOS-Test wird vor und nach der Spermaaufbereitung folgendermaßen durchgeführt. Es wird ein Milliliter der Schwelllösung auf 37 °C erwärmt und mit 100 µl Sperma durchmischt. Das Eppendorfgefäß mit dem Gemisch wird nun bei 37 °C für mindestens 30 min, jedoch nicht länger als 90 min inkubiert. Zur Beurteilung werden 10µl der Lösung auf einen Objektträger aufgebracht mit einem Deckgläschen bedeckt und anschließend bei 400facher Vergrößerung unter dem Hellfeld- bzw. Phasenkontrast-Mikroskop (Model CHS, Olympus Optical Co LTD, Japan) betrachtet. Spermien mit geschwollenem Schwanzteil sind vital, solche bei denen es zu keiner Schwellung kam, sind abgestorben. Nachdem man zweimal 100 Spermatozoen ausgezählt und den Anteil derer mit geschwollenem Schwanzteil bestimmt wurde, errechnet man daraus den Mittelwert. Wenn 60% oder mehr der Spermienchwänze anschwellen gilt der HOS-Test als normwertig.

### **3.2.6 Bestimmung der Spermatozoendichte**

Die Bestimmung der Spermiedichte erfolgt vor und nach der Spermiaufbereitung mittels einer Maklerkammer (MAKLER, 1980). Es handelt sich dabei um eine Zählkammer, die durch 10 mal 10 Quadrate geteilt ist um das Auszählen der

Spermien zu erleichtern. Hierzu werden 10µl des verflüssigten Spermas in die Vertiefung der Zählkammer pipettiert und anschließend bei 200facher Vergrößerung drei mal jeweils 10 Quadrate ausgezählt. Der aus diesen drei Werten gebildete Mittelwert gibt dann die Spermiendichte in Millionen pro Milliliter an. Die Spermatozoendichte sollte laut WHO (1999) mindestens bei 20 Millionen Spermien pro Milliliter liegen um im Normbereich zu sein.

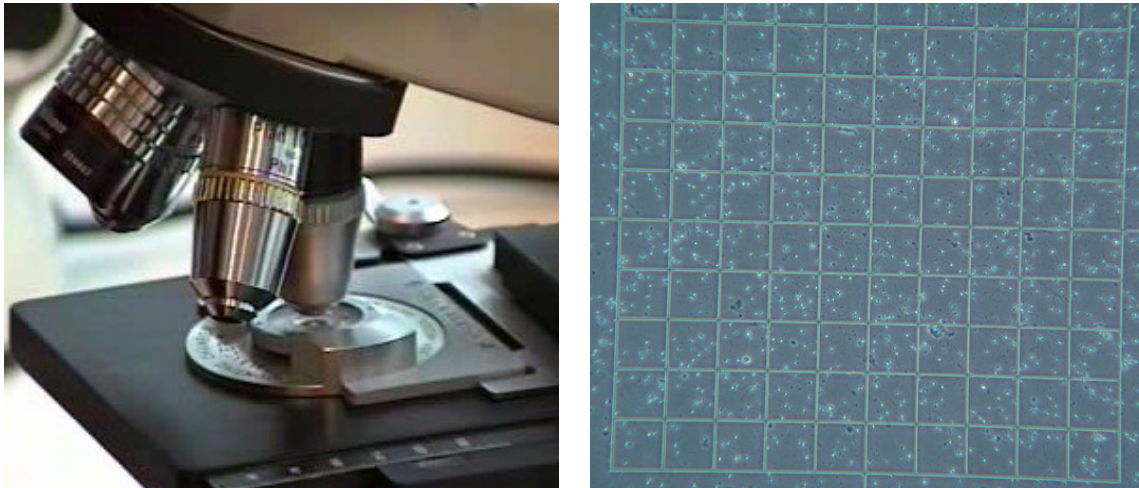


Abb. 3.1, 3.2 Maklerkammer

### 3.2.7 Bestimmung der Spermienmotilität

Die Bestimmung der Spermienmotilität erfolgt ebenfalls vor und nach Aufbereitung des Spermas. Auch hierzu werden die Spermatozoen mit Hilfe einer Maklerkammer betrachtet.

Es werden vier Kategorien der Spermienmotilität unterschieden (WHO, 1999):

- A) schnell und linear progressiv beweglich
- B) langsam und linear oder träge und nicht linear beweglich
- C) nicht progressiv beweglich
- D) nicht beweglich

Globale Beweglichkeit (Kategorie A und B) sollte bei mindestens 50% der Spermien vorliegen, wovon mindestens 30% progressiv beweglich (Kategorie A) sein sollten.

Nachdem 10µl verflüssigtes Sperma in die Vertiefung der Zählkammer gegeben wurden, werden 100 Spermatozoen ausgezählt und entsprechend ihrer Motilität einer Kategorie zugeordnet. Das Auszählen wird noch einmal wiederholt und der Mittelwert aus jeder Kategorie gebildet.

### 3.3 Spermienmorphologie

#### 3.3.1 Modifizierte Färbung nach Papanicolaou

Die modifizierte Färbung nach Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942; WHO, 1999) dient dazu die Spermien hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilen zu können. Im Anschluss an die Färbung werden die Ausstrichpräparate unter Berücksichtigung der Strick-Tygerberg-Kriterien (KRUGER et al., 1986) ausgewertet. Da die Färbung nach Papanicolaou aus vielen Einzelschritten besteht (Tab. 3.1) wird sie nach standardisierten Kriterien maschinell (Varistain 24-4, SHANON, Cheshire, England) durchgeführt. Im Anschluß an die Färbung werden die Ausstrichpräparate mit einer Lösung von Polymeren in Xylol (Entellan neu, Merck, Darmstadt) und einem Deckgläschen abgedeckt und können nun hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt werden.

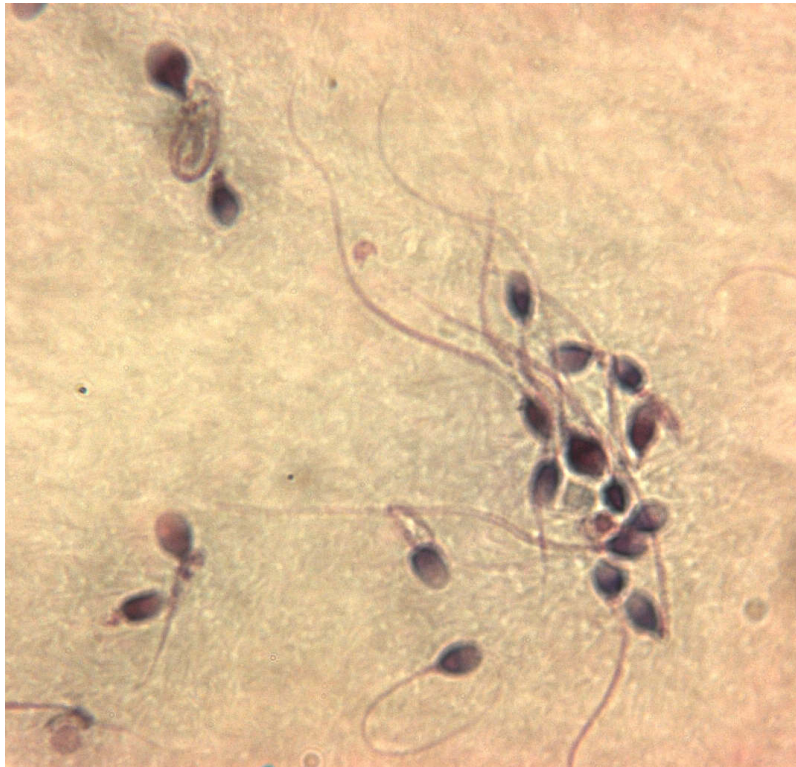
**Tab. 3.1 Standardisierte und modifizierte Färbung nach Papanicolaou**

Reagenz	Zeit
80% Ethanol (Merck, Darmstadt)	2 x 1 min eintauchen
Aqua dest. (Seromed, Berlin)	1 min eintauchen
Hämatoxylin Lösung (Merck, Darmstadt)	3 min eintauchen
Aqua dest. (Seromed, Berlin)	2 x 1 min eintauchen
Fliessend wässern	2 x 3 min
70% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min eintauchen
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	2 x 1 min eintauchen
Orange II Lösung (Merck, Darmstadt)	3 min eintauchen
>99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min eintauchen
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min eintauchen
>99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min eintauchen
Polychromlösung EA 50 (Merck, Darmstadt)	3 min eintauchen
>99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	2 x 1 min eintauchen
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min eintauchen
>99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min eintauchen
Xylol (Merck, Darmstadt)	4 x 1 min eintauchen

### 3.3.2 Beurteilung der Spermienmorphologie

Die Spermienmorphologie wird unter zu Hilfenahme eines standardisierten Auswertungsbogens vor und nach der Aufbereitung beurteilt. Es werden jeweils 100 Spermatozoen unter einem Ölimmersionsobjektiv bei 100facher Vergrößerung ausgezählt. Als normomorph werden solche Spermien erfasst, die folgende Kriterien erfüllen:

- Kopf: 3-5 $\mu$ m lang und 2-3 $\mu$ m breit
- Akrosom: sollte 40-70% des Kopfes einnehmen
- Mittelstück: muss frei von zytoplasmatischen Anhängseln sein, sollte die 1,5fache Länge des Kopfes haben und axial angeheftet sein.
- Schwanz: sollte dünner als das Mittelstück und 45 $\mu$ m lang sein



**Abb. 3.3 Spermien gefärbt nach Papanicolaou**



### **3.4 Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung**

Mit Hilfe der Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung ist es möglich eine Aussage über die Chromatinkondensation im Spermatozoonkopf zu treffen.

#### **3.4.1 Vorbereitung**

Zunächst werden die Ausstriche auf den Objektträgern fixiert. Hierzu wird eine Glasküvette mit 150ml Methanol (Merck, Darmstadt) und 50ml Eisessigsäure (Merck, Darmstadt) gefüllt und die Präparate für 15 Minuten darin eingetaucht. Anschließend werden sie unter dem Abzug getrocknet.

Die Färbelösung wird aus 20mg CMA<sub>3</sub> (C-2659, Sigma, St. Louis, USA) gelöst in 80ml PBS hergestellt und kann im Kühlschrank bei 4 °C für ca. vier Wochen gelagert werden.

#### **3.4.2 Durchführung der Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung**

Die CMA<sub>3</sub> Färbung sowie die spätere Auswertung der Ausstrichpräparate sollte unter Lichtausschluss durchgeführt werden, da der Fluoreszenzfarbstoff unter Belichtung sehr schnell ausbleicht.

Jeder Objektträger wird mit 100µl der CMA<sub>3</sub> Färbelösung beschichtet und in einer feuchten Kammer für 20 Minuten inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wird durch Abspülen der Objektträger mit PBS entfernt. Anschließend werden die Objektträger mit Glycerin (Merck, Darmstadt) und einem Deckgläschen eingedeckt.

#### **3.4.3 Auswertung**

Die Beurteilung der Chromatinkondensation erfolgt vor und nach der Spermienaufbereitung. Hierzu benötigt man ein Fluoreszenzmikroskop mit verschiedenen Exzitationsfiltern (Model CHS mit Aufsatz BH2-RFCA, Olympus Optical Co LTD, Japan). Die Ausstrichpräparate werden bei 100facher Vergrößerung, noch am gleichen Tag, unter einem 490 nm Exzitationsfilter mit Immersionsöl (Merck, Darmstadt) betrachtet. Es werden jeweils 200 Spermatozoen pro Präparat ausgezählt und anhand ihrer Fluoreszenz zwei Gruppen zugeordnet: fluoreszierende

und nicht fluoreszierende Spermien. Spermien mit starker Fluoreszenz haben schlecht kondensiertes Chromatin.

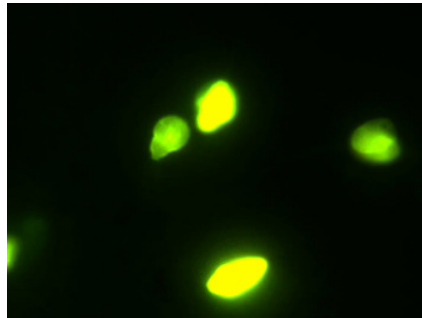


Abb. 3.4 Spermien gefärbt mit CMA<sub>3</sub>

## 3.5 Beurteilung von Apoptose und DNA-Integrität

### 3.5.1 Allgemeines

Grundsätzlich kann man zwei Arten von Zelltod unterscheiden: Nekrose und Apoptose. Unter Nekrose versteht man einen pathologischen, passiv ablaufenden Prozess, welcher sich ereignet, wenn die Zelle einer physikalischen, mechanischen oder chemischen Noxe ausgesetzt ist. Dadurch kommt es zu einer Verletzung der Zellmembran und durch das entstehende osmotische Ungleichgewicht zu einer Zerstörung der Zelle. Apoptose dagegen bezeichnet den programmierten Zelltod, einen physiologischen Vorgang, der eine wichtige Rolle bei der Homöostase von Geweben und der Eliminierung alter oder defekter Zellen spielt. Der Begriff wurde erstmals 1972 von den Wissenschaftlern KERR, WYLLIE und CURRIE verwendet. Er setzt sich aus den griechischen Wörtern apo (ab, weg, los) und ptosis (Fall) zusammen und bezeichnet im Griechischen das Abfallen der Blätter von den Bäumen.

Zellen, welche die Apoptose durchlaufen, zeigen typische morphologische Veränderungen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980):

1. Normale Zelle
2. Mit Beginn der Apoptose löst sich die Zelle aus dem Zellverband und startet mit der Kondensierung des Cytoplasmas wodurch sie zu schrumpfen beginnt
3. Das Chromatin verdichtet sich und die Zellmembran bildet Blasen

4. Es werden membranumgebende Vesikel, sog. „apoptotic bodies“ abgeschnürt
5. Zellen des Immunsystems eliminieren diese, ohne das Hervorrufen einer Entzündungsreaktion (im Gegensatz zur Nekrose)

Außerdem ist für die Apoptose die Fragmentierung der DNA durch eine Endonuklease (Enzym CAD (Caspase Activated DNase) auf biochemischer Ebene charakteristisch, welche die DNA zwischen den Nukleosomen, in den sog. Linker-Regionen spaltet. Hieraus entstehen DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 180 bp bzw. einem Vielfachen davon, da jedes Nukleosom von einem DNA-Strang von ca. 180 bp umgeben ist. Bei der elektrophoretischen Trennung würde man das typische „Strickleitermuster“ erhalten (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990; COMPTON, 1992). Hiermit kann man aber im Gegensatz zur TUNEL-Färbung keine Aussage über die Apoptose in einzelnen Zellen getroffen werden.

### **3.5.2 TUNEL-Färbung**

Die TUNEL-Färbung (Terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT] mediated dUTP nick end labeling) ermöglicht es durch Apoptose entstandene DNA-Strangbrüche in den Spermatozoen präzise und schnell zu markieren. Der TUNEL-assay wurde erstmals von GAVRIELI und Mitarbeitern (1992) durchgeführt. An die durch die DNA-Fragmentierung entstandenen freien 3'OH Enden von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen werden mittels des Enzyms Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) mit Digoxigenin gekoppelte Nucleotide dUTP (desoxyUridintriphosphat) gebunden. Anschließend wird in einer Antigen-Antikörper-Reaktion, Anti-Digoxigenin, welches an Fluorescein gebunden ist, an das Digoxigenin gebunden. Nach Koppelung von Fluorescein sind die markierten Strangbrüche direkt im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen.

#### **3.5.2.1 Vorbereitung**

Um die zügige Durchführung des TUNEL-assays zu garantieren, ist es sinnvoll einige Reagenzien vorzubereiten:

- Fixation solution: 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
- Permeabilisation solution: 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natrium Citrate

- TUNEL reaction mixture: Um 500 µl TUNEL reaction mixture zu erhalten, werden 50 µl Enzyme solution mit 450 µl Label Solution gut gemischt.

Für alle Lösungen gilt, dass sie unmittelbar vor Gebrauch zubereitet und nicht gelagert werden sollten. Außerdem sollte der TUNEL reaction mixture bis zum Aufbringen auf die Präparate in Eis aufbewahrt werden.

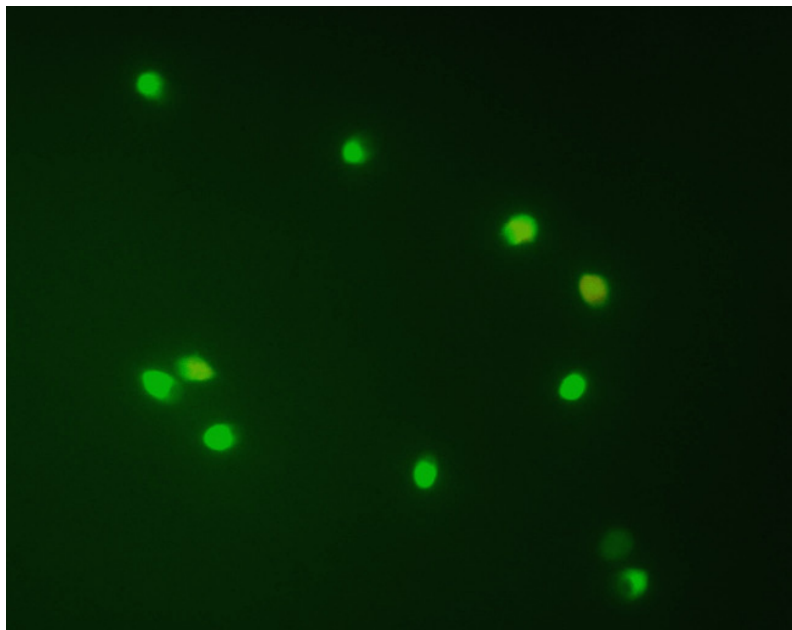
### **3.5.2.2 Durchführung der TUNEL-Färbung**

Die TUNEL-Färbung wurde mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein durchgeführt (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Die Arbeitsanleitung dieses Kit's richtet sich nach der Publikation von SGONC und Mitarbeitern (1994). Zunächst werden die luftgetrockneten Ausstrichpräparate für eine Stunde in der Fixation Solution bei 15-25 °C fixiert. Die Fixationslösung wird durch Abspülen der Präparate mit PBS entfernt. Anschließend wird auf die Objektträger die Permeabilisation solution gegeben und für 2 Minuten bei 2-8 °C inkubiert. Dann werden die Ausstriche zweimal in PBS getaucht und so von jeglichen Resten der Permeabilisations- bzw. Fixationslösung befreit. Jetzt kann man die Ausstrichpräparate kurz abtropfen lassen bzw. kurz mit einer Kante auf Zellstoff halten, so dass überschüssiges PBS entfernt wird bevor man auf jeden Objektträger 50 µl des vorbereiteten TUNEL reaction mixture gibt. Um eine homogene Verteilung der TUNEL reaction mixture zu gewährleisten und eine Austrocknung der Präparate zu vermeiden, werden die Objektträger mit einem Deckgläschen während der Inkubation abgedeckt. Die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss. Nachdem man die Spermienausstriche dreimal in PBS getaucht hat um die TUNEL reaction mixture zu entfernen, werden die Objektträger mit Glycerin (Merck, Darmstadt) und einem Deckgläschen eingedeckt und können nun direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Wellenlänge von 450-500 nm betrachtet werden.

### **3.5.2.3 Auswertung**

Zur Beurteilung der Apoptose der einzelnen Spermienzellen werden jeweils 200 Spermien pro Ausstrich vor und nach Aufbereitung unter einem Fluoreszenzmikroskop (AX-70, Olympus Optical Co., LTD, Japan) mit verschiedenen

Exzitationsfiltern im Wellenlängenbereich von 450-500 nm ausgezählt. Sie werden dabei mit 100facher Vergrößerung unter zu Hilfenahme von Immersionsöl (Merck, Darmstadt) betrachtet. Die Spermatozoen werden anhand ihrer Fluoreszenz in zwei Gruppen eingeteilt, wobei fluoreszierende Spermien apoptotisch sind und nicht fluoreszierende keine DNA-Strangbrüche aufgrund von Apoptose aufweisen. Wie auch schon bei der CMA<sub>3</sub> Färbung sollten auch hier die einzelnen Areale auf dem Objektträger nicht zu lange belichtet werden um ein Ausbleichen des Präparates zu vermeiden.



**Abb. 3.5 Spermien in der TUNEL-Färbung**

### **3.6 Zentrifugation des Spermas für weitere Messungen**

Für die weiteren Messungen wurde das liquefizierte Ejakulat für 20 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Hierbei bilden sich 3 Fraktionen.

### **3.7 Reactive oxygen species (ROS)**

Spermatozoen sind, wie auch andere Zellen und Gewebe, gegenüber oxidativem Stress verursacht durch freie Sauerstoff Radikale empfindlich. Es entstehen Peroxide und Hydroperoxide, die mit Zellbestandteilen reagieren und diese schädigen können, sofern die freien Radikale nicht durch z.B. Antioxidantien (Vitamin-A und -E, Zink, Selen) deaktiviert werden. Der OxyStat Testkit (OxyStat, Kat. Nr. BI-5007, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, Deutschland), der für diese Studie benutzt wurde, misst die gesamte Peroxidkonzentration einer Probe. Hierzu bedient er sich einer kolorimetrischen Methode, wobei die Ergebnisse in direktem Zusammenhang mit den freien Radikalen und den Peroxiden stehen. Das Testprinzip beruht darauf, dass die biologischen Peroxide mit der Peroxidase bei gleichzeitiger Farbreaktion mit TMB (Tetramethylbenzidin) als Substrat reagieren und anhand der Farbreaktion nach Zugabe der Stopplösung die Peroxidasekonzentration in einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Multiscan plus MK II) bei 450 nm bestimmt wird. Die Konzentration der Peroxide kann, unter zu Hilfenahme eines Kalibrators, für die gemessenen Proben (pro Patient jeweils eine Probe aus dem Seminalplasma und eine aus dem Ring nach Zentrifugation des Spermas) berechnet werden, wobei die Nachweisgrenze für Peroxide bei 7  $\mu\text{mol/l}$  liegt und ein Probenvolumen von 10  $\mu\text{l}$  benötigt wird.

#### **3.7.1 Vorbereitung**

Alle Reagenzien sind lichtempfindlich und deshalb vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen. Zur Durchführung des Tests werden folgende Kit-Komponenten benötigt:

- Mikrotiterstreifen im Streifenhalter
- Probenpuffer, Lösung A, gebrauchsfertig
- Reaktionspuffer, Lösung B, gebrauchsfertig
- Enzymlösung, Lösung C, gebrauchsfertig
- Reaktionslösung, Lösung D, gebrauchsfertig
- Kontrollen (CTRL)
- Kalibratoren (CAL)
- Stopplösung H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gebrauchsfertig

Zusätzlich werden kalibrierte Präzisionspipetten für 5-5000 µl, ein Inkubator für 37 °C und zur Messung selbst ein Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter benötigt. Außerdem werden folgende Reagenzien vorbereitet:

- CTRL: man pipettiert 250 µl Lösung D je Röhrchen CTRL, mischt es gut durch und lässt es bei Raumtemperatur (18-26 °C) 45 Minuten vollständig lösen.
- CAL: man pipettiert 250 µl Lösung D in das Röhrchen CAL, mischt es gut durch und lässt es ebenfalls bei Raumtemperatur (18-26 °C) 45 Minuten vollständig lösen.
- ABC-Reaktionsmischung: zur Herstellung werden 5 ml Lösung A, 100 µl Lösung B und 5 µl Lösung C gut vermischt. Diese Menge an ABC-Reaktionsmischung reicht zur Bestimmung von 40 Proben (Wells). Sie sollte unmittelbar vor der Verwendung hergestellt werden.

Die Proben sollten vor der Verwendung im Test gut gemischt werden und trübe Proben mindestens 5 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert werden.

### **3.7.2 Durchführung der ROS-Messung**

Die zu messenden Proben werden zunächst auf Raumtemperatur (18-26 °C) gebracht. Währenddessen werden die Positionen für CTRL/CAL/PROBE am Protokollblatt markiert und die benötigten Mikrotiterstreifen entsprechend beschriftet. Jetzt werden jeweils 10 µl CTRL, CAL und 10 µl der zu messendem Probe in die Mikrotiterstreifen pipettiert. Dann gibt man 100 µl der Lösung A in alle Wells. Nun erfolgt die erste Messung bei 450 nm im Mikrotiterplattenphotometer. Im Anschluss werden 100 µl der ABC-Reaktionslösung in alle Wells pipettiert und alles für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 50 µl der Stopplösung in alle Wells gegeben und es folgt die zweite Messung im Mikrotiterplattenphotometer.

### **3.7.3 Auswertung**

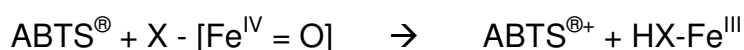
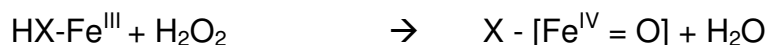
Die Peroxidkonzentration einer Probe ist proportional der Differenz der OD (Optischen Dichte) des Mikrotiterplattenphotometers der ersten und zweiten Messung. Um die Konzentrationen der einzelnen Proben zu berechnen, müssen

zunächst die OD-Werte der ersten Messung von denen der zweiten Messung subtrahiert werden um die  $\Delta OD$ -Werte zu erhalten. Die  $\Delta OD$ -Werte werden sowohl bei allen Proben als auch bei der Kontrolle und dem Kalibrator errechnet. Außerdem wird unter Verwendung des Kalibrators eine Ein-Punkt-Kalibrierung gemacht, wobei die erhaltenen Werte proportional zur Konzentration sind. Die Konzentration des Kalibrators ist am Etikett in  $H_2O_2$  Äquivalenten  $\mu mol/l$  angegeben. Die Peroxidkonzentration der einzelnen Proben wird nach folgender Formel berechnet:

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

### 3.8 Total antioxidant status (TAS)

Die Messung des Gesamt-Antioxidantien-Status (total-antioxidant-status, TAS) erfolgt wie auch die Bestimmung der Reactive-Oxygen-Species pro Patient an jeweils einer Probe Seminalplasma und einer Probe aus dem Ring nach Zentrifugation. Für diese Studie wurde der total-antioxidant-status-Kit der Firma RANDOX (Kat. Nr. NX 2332, RANDOX Laboratories Ltd., Crumlin, United Kingdom) benutzt. Das Testprinzip beruht darauf, dass sich 2,2'-Azino-di-[3-Äthylbenzothiazolin-Sulfonat] (ABTS<sup>®</sup>, BOEHRINGER, Mannheim, Deutschland) bei Inkubation mit Metmyoglobin (HX-Fe<sup>III</sup>, eine Protease) und  $H_2O_2$  das Radikal ABTS<sup>®+</sup> bildet, entsprechend der folgenden Reaktionsgleichung:



(Legende: HX-Fe<sup>III</sup> = Metmyoglobin; X - [Fe<sup>IV</sup> = O] = Ferrylmyoglobin)

ABTS<sup>®+</sup> hat eine relativ stabile blau-grüne Färbung, welche mit einem Photometer bei 600 nm gut gemessen werden kann. Gibt man nun eine Probe dazu mit der Fragestellung, ob sich darin Antioxidantien befinden, wird diese Farbreaktion durch evtl. vorhandenen Antioxidantien vermindert, wobei das Maß der Hemmung proportional der Antioxidantienkonzentration der Probe ist.



### 3.8.1 Vorbereitung

Der RANDOX total-antioxidant-status-Kit besteht aus folgenden Komponenten, wovon einige vor Durchführung des Tests noch einer Vorbereitung bedürfen.

- Buffer: eine phosphatgepufferte Saline, 80 mmol/l, pH 7,4, gebrauchsfertig
- Chromogen: bestehend aus:
  - Metmyoglobin, 6,1 µmol/l
  - ABTS<sup>®</sup>, 610 µmol/l

Es wird ein Fläschchen Chromogen<sub>2</sub> in 10 ml Buffer<sub>1</sub> gelöst. Dies kann bei 2-8 °C für 2 Tage und bei 15-25 °C für 8 Stunden aufbewahrt werden.

- Substrate: stabilisiertes Wasserstoffsuperoxid, 250 µmol/l

Es wird 1 ml Substrat<sub>3</sub> mit 1,5 ml Buffer<sub>1</sub> verdünnt. Die Lösung kann bei 2-8 °C für 24 Stunden gelagert werden.

- Standard: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,

Konzentration im Test ist chargenspezifisch,

Es wird ein Fläschchen Standard mit 1 ml Aqua bidest. (Seromed, Berlin) gelöst. Die Lösung kann bei 2-8 °C für 2 Tage oder bei -20 °C für einen Monat gelagert werden.

### 3.8.2 Durchführung der TAS-Messung

Die Bestimmung des TAS-Wertes erfolgt in einem Photometer (Pharmacia Biotec, Ultrospec 1000, UV/visible Spectro-Photometer), bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Luft. Die Küvetten werden wie im Folgenden beschrieben befüllt. Für den Nullwert werden 20 µl aqua bidest. (Seromed, Berlin), für das Eichmaß 20 µl Standard und für die Proben werden jeweils 20 µl der zu messenden Probe in eine Küvette pipettiert. Anschließend wird in jede Küvette 1 ml Chromogen gegeben und gut durchmischt. Die Messtemperatur der Proben sollte bei 37 °C liegen, hierzu werden die Küvetten im Inkubator erwärmt und nach Erreichen der Temperatur wird in der ersten Messung die Absorption (A<sub>1</sub>) gemessen. Jetzt wird in jede Küvette 200 µl Substrat pipettiert, gut vermischt und gleichzeitig eine Stoppuhr gestartet. Die zweite Absorptionsmessung (A<sub>2</sub>) sollte nach exakt drei Minuten erfolgen um eine präzise Messung zu garantieren.

### 3.8.3 Auswertung

Zur Bestimmung des TAS werden zunächst das Absorptionsverhalten ( $\Delta A$ ) der Nullprobe, des Eichmaßes und der zu messenden Proben anhand folgender Formel ermittelt:

$$A_2 - A_1 = \Delta A_{\text{Nullprobe/Eichmaß/Proben}}$$

Nun kann der TAS mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{TAS-Konzentration (mmol/l)} = \text{Faktor} \times (\Delta A_{\text{Nullprobe}} - \Delta A_{\text{Probe}})$$

Wobei der Faktor wie folgt errechnet wird:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Konzentration Eichmaß (hier 1,7 mmol/l)}}{\Delta A_{\text{Nullprobe}} - \Delta A_{\text{Eichmaß}}}$$

## 3.9 Vitamin A und E

Die Bestimmung der Vitamin A (Retinol) und der Vitamin E (Tocopherol) Konzentrationen erfolgt im Seminalplasma nach Dichtegradientenzentrifugation. Es wurde der ClinRep<sup>®</sup> Komplettkit (RECIPE CHEMICALS + INSTRUMENTS GmbH, München, Deutschland) zur Messung in einem isokratischen HPLC-System (high performance liquid chromatography) mit UV-Detektor (Agilent 1100, AGILENT TECHNOLOGIES GmbH, Böblingen, Deutschland) benutzt. Bei dieser Methode wird Licht einer bestimmten Wellenlänge (hier 325 nm bzw. 295 nm) ausgesandt, von einer Photozelle erfasst, elektronisch verstärkt und aufgezeichnet.

### 3.9.1 Vorbereitung und Durchführung der Vitamin A und E Messung

Vor der eigentlichen Messung wird ein Testlauf, zur qualitativen Überprüfung des HPLC-Systems, mit einer Standardlösung durchgeführt. Diese Standardlösung wird ohne Probenvorbereitung direkt injiziert. Außerdem wird noch ein Kalibrierlauf mit 20  $\mu\text{l}$  des aufgearbeiteten Serumkalibrators durchgeführt. Zur Herstellung des lyophilisierten Serumkalibrators wird zum Inhalt eines Fläschchens Kalibrator exakt 3.0 ml HPLC-Wasser gegeben und die Lösung unter gelegentlichem Schwenken für ca. 15 Minuten stehen gelassen. Nach erneuter Durchmischung wird die Lösung wie

eine normale Patientenprobe aufgearbeitet (siehe unten) und kann dann für den Kalibrierlauf in das HPLC-System injiziert werden.

Zur Durchführung der eigentlichen Messung ist es notwendig die Vitamine A und E in einer kurzen Probenvorbereitung zu extrahieren. Hierzu werden 100 µl der Seminalplasmaprobe in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß, das mit einer trockenen Salzmischung gefüllt ist, gegeben und mit 100 µl organischem Lösungsmittel, welches 2 µg gelösten Standard enthält, gefällt. Durch das Ausfällen und Aussalzen werden sehr saubere und weitgehend störpeakfreie Extrakte erhalten, wodurch eine störungsfreie Messung ermöglicht wird. Anschließend wird alles gut geschüttelt (ca. 30 Sekunden) und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 10000 x g wird die wässrige von der organischen Phase getrennt. Jetzt werden 20 µl der oberen Phase abpipettiert, in das HPLC-System injiziert und mithilfe des UV-Detektors werden die Vitamin A und E Konzentrationen bestimmt.

### **3.9.2 Auswertung**

Die zu messenden Substanzen, für diese Studie Vitamin A und E, absorbieren das ausgesandte Licht ganz oder teilweise, was von einer Photozelle registriert und in der Auswerteeinheit als Peak dargestellt wird. Die Peakfläche verhält sich dabei proportional zur Konzentration der Substanz. Die Konzentrationen von Retinol und Tocopherol werden, unter Verwendung der internen-Standard-Methode, von der Auswerteeinheit des HPLC-Systems automatisch ermittelt und in µg/dl angegeben.

### **3.10 Selen und Zink**

Die Messung der Selen- und Zinkkonzentration erfolgte, nach Dichtegradientenzentrifugation und Aufbereitung mit PureSperm, im Überstand (dritte Phase). Zur Bestimmung dieser Spurenelemente sind Verfahren mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen nötig. Hierzu wurden die Proben ans Hahn-Meitner-Institut nach Berlin geschickt, denen es mithilfe der Neutronen-Aktivierungsanalyse (BEHNE et al., 1978) möglich ist, Stoffe in sehr niedrigen Konzentrationen zu messen, wobei kernchemische Reaktionen mit Neutronen ausgenutzt werden. Auf eine genaue Beschreibung wird aufgrund der Komplexität des Verfahrens im Rahmen dieser Dissertation verzichtet. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Schritte erläutert.

Nachdem die zu messenden Proben mit PureSperm aufbereitet wurden und so die vitalen von den toten Spermatozoen getrennt wurden werden nun die vitalen Spermien in 3 ml Puffer (10nM Tris, pH 7,4) aufgenommen und darin gewaschen. Hierzu werden die Spermien bei 4 °C für jeweils 10 Minuten mit 1000 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wird zweimal durchgeführt. Diese Schritte sind essentiell, um Puffersubstanzen die während der Isolierung verwendet wurden zu entfernen und so eine Gewichtsverfälschung zu vermeiden. Aus diesem Grund wird das letzte Pellet in sehr wenig Puffer (100-200 µl) aufgenommen. Diese Suspension wird dann in die Bestrahlungsampulle überführt. Es handelt sich hierbei um eine geschlossene Hülle aus einem hochreinen Werkstoff. Für diese Studie wurden abgeschmolzene Ampullen aus Quarzglas spezieller Chargen verwendet. Da biologische Proben einen großen Anteil Wasser enthalten und durch die Erwärmung des Wassers und seine Radiolyse bei der Bestrahlung große Drücke in der geschlossenen Messampulle entstehen würden, ist eine Trocknung der Proben vor der weiteren Untersuchung unumgänglich. Die Trocknung erfolgt durch Inkubation der Proben bei 50 °C für vier Tage.

Die so vorbereiteten Proben werden nun nach Gewichtsbestimmung mithilfe der Neutronen-Aktivierungsanalyse auf ihre Zink- und Selenkonzentration untersucht. Grundsätzlich werden bei dieser Methode drei zeitlich aufeinander folgende Prozesse unterschieden:

1. Aktivierung
2. Zwischenbehandlung
3. Messung

Zur Aktivierung werden die Proben im Kern des Reaktors BER II bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgt, in Abhängigkeit von der Probenmasse, für 5 bis 10 Tage bei maximalem Neutronenfluss von  $1,6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  um möglichst niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Die Zwischenbehandlung der Proben ist notwendig, um nicht erwünschte Elemente (den sog. spektralen Untergrund), die das Messergebnis verfälschen könnten zu beseitigen. Hierzu werden die Proben erst nach einer Wartezeit von vier Wochen gemessen. Dies führt dazu, dass die Aktivität der störenden kurzlebigen Mengenelemente Phosphor und Natrium weitgehend abgeklungen ist. Die Messung von Zink und Selen (beide langlebig) wird mit einem

Detektor aus Reinstgermanium (Highly Pure Germanium [HPGe], Canberra, USA) durchgeführt. Selen ( $^{75}\text{Se}$ ) wird hierbei durch Messung der Gamma-Emissionslinien bei 136 Kiloelektronenvolt (keV) und 265 keV bestimmt. Die Messung von Zink ( $^{65}\text{Zn}$ ) erfolgt bei 1116 keV. Die Angabe der Konzentrationen erfolgt in mg/kg.

### **3.11 Spermienaufbereitung mittels PureSperm**

Diese Spermienaufbereitungsmethode basiert auf Silan-beschichteten kolloidalen Silica. Die 100prozentige PureSperm-Gebrauchslösung (Nidacon International AB, Göteborg, Schweden) setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Silan-beschichtete kolloidale Silica
- Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Kalziumchlorid
- Glucose
- HEPES-Puffer
- EDTA

Die Osmolalität der Lösung beträgt 300 – 310 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ , der pH-Wert liegt bei 7,4 bis 7,8. Bei 2 bis 40 °C können die ungeöffneten PureSperm-Flaschen für zwei Jahre gelagert werden. Nachdem die Flaschen geöffnet wurden, hat die Lagerung bei 2 bis 8 °C zu erfolgen, wobei das Öffnen und Schließen unter aseptischen Bedingungen zu erfolgen hat. Vor der Verwendung ist es notwendig die Lösungen auf 37 °C zu erwärmen, wobei auch hier auf einen sterilen Umgang mit den Flüssigkeiten zu achten ist.

#### **3.11.1 Herstellung der Gradienten**

Zur Durchführung der Spermienaufbereitung mit PureSperm ist es notwendig aus der 100 prozentigen Grundlösung zwei Dichtegradienten, Lösung A (80%) und Lösung B (40%), wie im Folgenden beschrieben herzustellen. Die dabei verwendeten Mengen reichen aus um fünf Spermienpräparationen mit PureSperm durchzuführen.

### **PureSperm-Lösung A (80%)**

8 ml PureSperm-Grundlösung (100%) werden auf 80% verdünnt, indem man 2 ml HAM'S F10 mit Humanalbumin (20% Immuno, Baxter, Unterschleißheim) hinzugibt.

### **PureSperm-Lösung B (40%)**

Entsprechend werden zur Herstellung der PureSperm-Lösung B vier Milliliter PureSperm-Grundlösung (100%) mit sechs Milliliter HAM'S F10 mit Humanalbumin auf 40% verdünnt.

## **3.11.2 Durchführung von PureSperm**

Zunächst werden 2 ml der PureSperm-Lösung B (40%) in ein steriles Konusröhrchen (PP-Test tubes, CELLSTAR, Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen) pipettiert. Dann platziert man unter zu Hilfenahme einer langen Kanüle ebenfalls 2 ml der PureSperm-Lösung A (80%) auf dem Boden des Konusröhrchens, wobei unbedingt darauf zu achten ist, dass sich die Gradienten nicht vermischen. Jetzt wird diese PureSperm-Säule mit 1 ml des Ejakulates überschichtet und dann für 20 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, wobei sich am Boden des Konusröhrchens ein Pellet bildet. Dieses Pellet wird dann, nachdem man den Überstand abpipetiert hat, mit 1 ml HAM'S F10 mit Humanalbumin resuspendiert. Um Sicherzustellen dass keine Reste der PureSperm-Lösung mehr vorhanden sind werden die Spermien noch mal für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand wieder entfernt wurde, wird diese Waschprozedur noch einmal durchgeführt. Das gewaschene Pellet wird nun mit einigen Tropfen HAM'S F10 bedeckt. Jetzt wird den vitalen Spermien zwei Stunden Zeit gegeben um nach oben zu schwimmen.

## **3.12 Patientinnen**

Die Erhebung der Daten der Patientinnen, welche an dieser Studie teilnehmen erfolgt retrospektiv aus den Krankenakten.

Zunächst werden die Patientinnen down reguliert. Anschließend kontrolliert ovariell überstimuliert, wodurch es möglich wird mehrere Eizellen, transvaginal unter sonographischer Kontrolle, zu gewinnen.

Die kontrollierte ovarielle Hyperstimulation erfolgt bei den Patientinnen nach dem Long-Protokoll. Hierbei erfolgt die down-Regulation zwischen dem 17. und 20. Tag des Vorzyklus durch GnRH-Analoga (Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga). Die anschließende Stimulation wird mit HMG (humanes Menopausengonadotropin) oder rec-FSH (recombinantes humanes follikelstimulierendes Hormon) oder mit beiden durchgeführt. Eine sonographische Kontrolle erfolgt am 1., 6. sowie 10. Stimulationstag. Sind ausreichend Follikel gebildet und der Leitfollikel hat eine Mindestgröße von 19-20mm erreicht, löst man die Ovulation durch i.m. Injektion von 10.000 Injektionseinheiten HCG (humanes Choriongonadotropin) aus. Die Follikel werden weitere 36 Stunden später, unter sonographischer Kontrolle, transvaginal abpunktiert. Abschließend erhalten die Patientinnen zweimal täglich 150 mg Progesteron in Form von Vaginal-Gel oder -Kapseln.

### **3.13 Methoden zur Befruchtung**

Die Paare mit Kinderwunsch dieser Studie wurden entweder mit der In-Vitro-Fertilisation (IVF) oder der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) behandelt.

#### **3.13.1 In Vitro Fertilisation (IVF)**

Die Eizellen werden sonographisch gesteuert durch transvaginale Punktion gewonnen. Anschließend werden sie in HAM'S F10, das vorher mit 10% inaktiviertem Serum der Frau angereichert wurde, kultiviert. Die Eizellen werden dann im Inkubator für drei Stunden bei 37 °C und fünf Prozent CO<sub>2</sub> gelagert. Das Milieu im Inkubator ähnelt dabei den Bedingungen in den Tuben im Bezug auf Temperatur, Feuchtigkeit, Begasung, Druck und pH wie es von DIETRICH et al. (1998) gefordert wird. Nach der Inkubation wird der Reifegrad der Eizellen beurteilt.

### **3.13.1.1 Beurteilung der Eizellen**

#### **Germinalstadium:**

Befindet sich die Eizelle in diesem Reifungsstadium, muss sie noch für weitere 24 Stunden unter den oben beschriebenen Bedingungen im Inkubator nachreifen. In diesem Stadium hat die Eizelle noch einen großen Zellkern, den sog. germinal vesicle. Sie befindet sich in der Prophase. Das erste Polkörperchen ist noch nicht ausgestoßen und die Kumuluszellen liegen der Oozyte noch sehr dicht an.

#### **Metaphase I:**

Befindet sich die Oozyte nach drei Stunden Inkubationszeit in diesem Stadium, muss sie vor der Befruchtung noch für weitere vier bis sechs Stunden im Inkubator reifen. In diesem Stadium ist das erste Polkörperchen noch nicht sichtbar, das Germinalvesikel ist jedoch schon verschwunden.

#### **Metaphase II:**

In diesem Stadium ist die Eizelle reif. Das erste Polkörperchen ist ausgestoßen und das Zytoplasma ist homogen, d.h. ohne Einschlüsse. Außerdem liegt die Corona radiata eng an und die Kumuluszellen lassen sich leicht abstreifen.

### **3.13.1.2 Fertilisation (IVF)**

Die reifen Eizellen werden in eine Vier-Loch-Platte (Nunclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) zusammen mit einem Medium bestehend aus HAM'S F10 mit 10% Patientenserum gebracht. In jeder Vertiefung werden zu jeder Eizelle ca. 120.000 aufbereitete Spermien hinzugegeben. Es folgt eine weitere Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C und fünf Prozent CO<sub>2</sub> wonach die Eizellen auf Zeichen einer erfolgten Fertilisation kontrolliert werden. Hierzu ist es notwendig die Kumuluszellen mit einer Glaskapillare durch wiederholte Aspiration von der Eizelle zu entfernen. Bei einer korrekt befruchteten Eizelle sind zwei Vorkerne (Pronuklei) und zwei Polkörperchen zu erkennen. Stehen mehr als drei für diesen Transferationszyklus benötigte befruchtete Eizellen zur Verfügung, können die überschüssigen nach Absprache mit den Patienten, kryokonserviert werden. In Deutschland dürfen nur befruchtete Eizellen, nicht aber Embryonen kryokonserviert



werden. Außerdem dürfen, aufgrund des deutlich erhöhten Risikos von Mehrlingsschwangerschaften (EDWARDS, 1981), maximal drei Embryonen transferiert werden. Bevor die befruchteten Eizellen transferiert werden, lässt man sie noch mal für weitere 24 Stunden im Inkubator reifen. Nach dieser Zeit befinden sich die Embryonen im Zwei- bis Achtzellstadium und können transferiert werden.

### **3.13.1.3 Embryotransfer**

Die Embryonen werden mit Hilfe eines atraumatischen Einmalkatheters (Embryo Transfer Katheter Set, Labotect GmbH, Göttingen) transferiert. Er besteht aus einer Katheterführung aus starrem Kunststoff und einem inneren weichen Katheter. Zunächst wird die Katheterführung bis vor den Muttermund geschoben. Die Embryonen werden dann mit Hilfe des weichen Katheters in der Gebärmutter deponiert. Hierzu wird der weiche Katheter etwa zwei Zentimeter unterhalb des Fundus platziert.

### **3.13.1.4 Schwangerschaftstest**

Zwei Wochen (14 Tage) nachdem die Embryonen transferiert wurden, wird ein Schwangerschaftstest durchgeführt. Hierzu wird eine quantitative Messung des  $\beta$ -HCG (humanes Choriongonadotropin) im Serum durchgeführt. Der weitere Verlauf der Schwangerschaft wird sonographisch überwacht.

### **3.13.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)**

Auch bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion werden die Oozyten mit Hilfe einer sonographisch gesteuerten transvaginalen Punktion gewonnen. Zwei Stunden nach der Punktion werden der Cumulus oophorus und die Corona radiata entfernt. Hierzu werden die Eizellen in ein Hyaluronidasemedium (80IU/ml) überführt. Dies ist notwendig, damit keine maternale DNA in die Eizelle gelangen kann. Hyaluronidase ist ein Enzym, welches die Kumuluszellen innerhalb von 30 Sekunden andaut, so dass sie mit einer Glaskapillare leicht entfernt werden können. Zur Denudation werden die Eizellen auf eine mit 37 °C vorgewärmte Heizplatte gestellt und unter dem Inversionsmikroskop (Wild M8, Heerbrugg, Schweiz) betrachtet. Dann werden

die Eizellen noch in Kulturmedium (10% Humanalbumin und HAM'S F10) gewaschen und der Reifegrad analog zur IVF-Behandlung beurteilt. Zur Injektion werden nur Eizellen verwendet, die sich in der Metaphase II befinden (KÜPKER et al., 1998).

### **3.13.2.1 Equipment**

Zur Durchführung einer ICSI-Behandlung wird folgendes Instrumentarium benötigt (HAMMADEH, 1997):

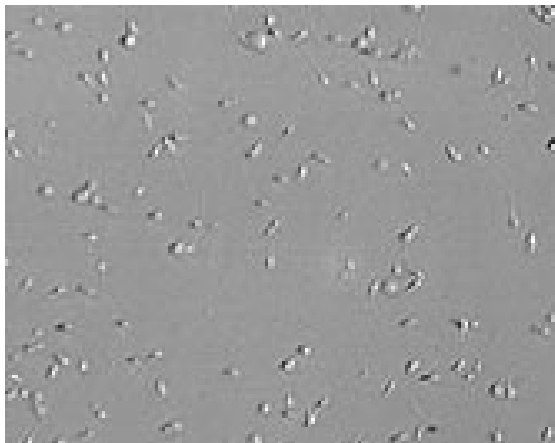
- Interphase Differentialmikroskop (Nikon/Narishige, Modell IM-69, Japan) mit Wärmeplatte
- Zwei Mikromanipulator-Sets (Nikon/Narishige, Modell MM 188, Japan) (elektrisch und hydraulisch) mit Injektor
- Haltepipette (10 MPH-120, 35 °Angel, Micro-Pipets, Humagen, Charlottesville, USA)
- Injektionspipette (10 MIC, 35 °Angel, Micro-Pipets, Humagen, Charlottesville, USA)

### **3.13.2.2 Fertilisation (ICSI)**

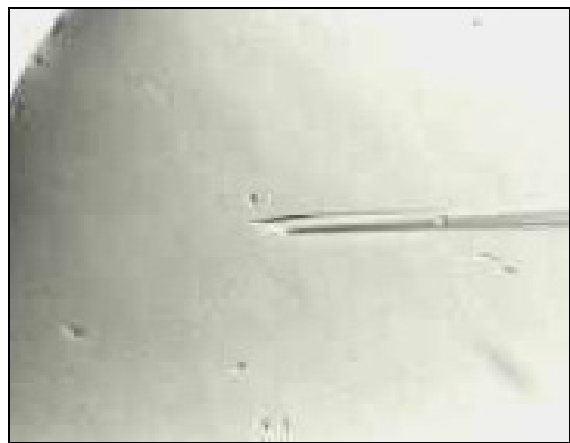
Zunächst werden mit Hilfe einer Pipette eine Reihe von drei Tropfen Polyvinylpyrrolidon 10% (PVP-Medium, MediCult, Jylinge, Dänemark) zu je 3 µl zentral in eine Petrischale (FALCON, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) aufgebracht. Dann gibt man in jeden dieser Tropfen ein Mikroliter aufgebereitetes Ejakulat. Durch das Polyvinylpyrrolidon wird die Eigenmotilität der Spermien verlangsamt und es ist leichter sie aufzusuchen und zu immobilisieren. Außerdem wird durch das PVP verhindert, dass das Spermium an der Injektionskapillare anhaftet.

Jetzt werden Tropfen zu je 5 µl IVF-Medium (MediCult, Jylinge, Dänemark), entsprechend der Anzahl der zur Verfügung stehenden Eizellen, rechts und links der zentralen PVP-Tropfen aufgetragen. Pro Tropfen IVF-Medium wird jeweils eine Eizelle platziert. Dann wird die Petrischale mit Mineralöl (Ovoil - 100, Vitrolife, Göteborg, Schweden) überschichtet. Anschließend wird ein Spermium, anhand der Kriterien Vitalität, Motilität und Morphologie, ausgewählt und mittels der Injektionskapillare immobilisiert. Zur Injektion wird das Spermium in die mit PVP

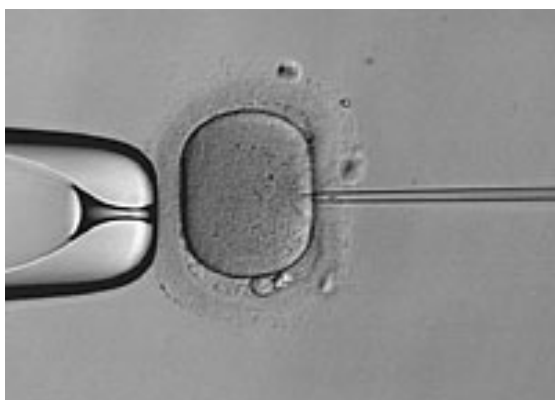
gefüllte Injektionskapillare aspiriert, wobei darauf zu achten ist, dass sich das Spermium nahe der Öffnung der Kapillare befindet (HAMMADEH, 1997) um möglichst wenig PVP bzw. Medium in die Eizelle zu überführen. Die Eizelle sollte durch den Sog der Haltekapillare nicht verletzt werden und so fixiert werden, dass sich die Polkörperchen bei sechs oder zwölf Uhr befinden. Diese Stellung wird gewählt um eine Verletzung des Spindelapparates zu vermeiden (KÜPKER et al., 1998). Nachdem man die Zytoplasmamembran der Eizelle mit der Injektionskapillare bei drei Uhr durchstochen hat, wird zunächst etwas Ooplasma angesaugt, dann das Spermium zusammen mit diesem Zytoplasma injiziert und die Injektionskapillare vorsichtig zurückgezogen.



**Abb. 3.6 Auswahl eines Spermiums**



**Abb. 3.7 Immobilisation und Aspiration**



**Abb. 3.8 Positionierung des Spermiums**



**Abb. 3.9 Aspiration und Injektion**



**Abb. 3.10 Zurückziehen der Injektionskapillare**

Jetzt folgen die Kultivierung der befruchteten Eizellen und der Embryotransfer. In diesen Punkten unterscheidet sich das Verfahren bei IVF bzw. ICSI nicht, weshalb hier auf eine erneute Beschreibung verzichtet wird.

## 3.14 Wichtige Standardlösungen

### 3.14.1 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Zur Herstellung von 5 Litern PBS-Lösung benötigt man:

**Tab. 3.2 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)**

Reagenz	Menge	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck, Darmstadt)	0,76 g	<b>Lösung A</b>
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck, Darmstadt)	0,625 g	<b>Lösung B</b>
NaCl (Merck, Darmstadt)	40 g	
KCl (Merck, Darmstadt)	1 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)	5,75 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)	1 g	
Glucose (Sigma, St. Louis, USA)	5 g	
Streptomycinsulfat (Sigma, St. Louis, USA)	0,25 g	
Natriumpyruvat (Merck, Darmstadt)	0,18 g	
Natriumpenicillin G (Sigma, St. Louis, USA)	500000 units	

Zur Herstellung der Lösung A wird das Kalziumchlorid in einem Liter deionisiertem und destilliertem Wasser (Seromed, Berlin) gelöst. Die fertige Lösung A kann für vier Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Um Lösung B herzustellen werden in vier Litern deionisiertem und destilliertem Wasser alle Chemikalien aus Tab. 3.2 gelöst. Genau wie Lösung A kann auch Lösung B für vier Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Beide Lösungen werden, da sich sonst Präzipitate bilden, erst unmittelbar vor Gebrauch gemischt. Das Mischen hat unter ständigem Rühren zu erfolgen.

### 3.14.2 HAM'S F10

Folgende Chemikalien werden zur Herstellung von einem Liter HAM'S F10 benötigt:

**Tab. 3.3 HAM'S F10 Lösung**

Reagenz	Menge
Kalziumlactat (Merck, Darmstadt)	0,308 g
Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)	2,108 g
Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA)	0,075 g
HAM'S F10 (Seromed, Berlin)	9,88 g

Es werden alle Chemikalien in einem Liter aqua dest. (Seromed, Berlin) unter ständigem Rühren gelöst. Die fertige Lösung sollte eine Osmolarität von 270 bis 290 Osmol/kg haben. Zur Spermienaufbereitung werden zu 45 ml der fertigen HAM'S F10 Gebrauchslösung 5 ml Humanalbumin (20% Immuno, Baxter, Unterschleißheim) gegeben und gut gemischt.

### 3.14.3 Hyaluronidaselösung

In 10 ml HAM'S F10 Lösung werden 30 mg Hyaluronidase (H-4272, Sigma, St. Louis, USA) gelöst. Die so hergestellte Stammlösung wird bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung werden 135 mg Humanalbumin (20% Immuno, Baxter, Unterschleißheim) und 38,7 mg HEPES (H-6147, Sigma, St. Louis, USA) mit 42,2 ml HAM'S F10 gemischt. Dann wird ein Milliliter Hyaluronidase-Stammlösung hinzugegeben.

### 3.15 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen und Berechnungen im Rahmen dieser Studie wurden mit Hilfe von SPSS 12.0 für Windows angefertigt. Zur Erstellung der Grafiken wurde ebenfalls SPSS bzw. Microsoft Excel verwendet.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde bei allen gemessenen oder errechneten Parametern eine Analyse der Häufigkeitsverteilungen mit Minimum, Maximum, Median, Mittelwert und Standardabweichung durchgeführt. Es wurden eindimensionale Häufigkeitstabellen und zweidimensionale Kreuztabellen erstellt.

Im Rahmen der analytischen Statistik wurde zum Mittelwertvergleich eine Varianzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA (**A**nalysis **O**f **V**ariance) durchgeführt.

Das Signifikanzniveau  $p$  wurde wie folgt festgelegt:

- $p \geq 0,05$  → nicht signifikant
- $p < 0,05$  → signifikant
- $p < 0,01$  → sehr signifikant
- $p < 0,001$  → hoch signifikant

Da das SPSS-Programm auf drei Stellen nach dem Komma rundet und eine 100prozentige Sicherheit des Ergebnisses nicht zu erreichen ist wird das Signifikanzniveau, wenn es in der Tabelle mit 0,000 ausgewiesen ist, auf 0,001 geändert.

Um Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen darzustellen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Der Korrelationskoeffizient  $r$  wurde wie folgt interpretiert:

- $r \leq 0,2$  → sehr geringe Korrelation
- $r \leq 0,5$  → geringe Korrelation
- $r \leq 0,7$  → mittlere Korrelation
- $r \leq 0,9$  → hohe Korrelation
- $r > 0,9$  → sehr hohe Korrelation

Da einige Variablen nicht direkt gemessen werden können, müssen diese wie im Folgenden beschrieben berechnet werden.

Zur Bestimmung des Alters der Männer und Frauen zum Untersuchungszeitpunkt wird die Differenz aus Geburtsdatum und Untersuchungszeitpunkt gebildet.

Die Differenzwerte der Spermienparameter werden aus der Differenz vor und nach Aufbereitung bestimmt.

Die Fertilisationsrate gibt an, wie viel Prozent der gewonnenen Eizellen befruchtet werden konnten. Die Schwangerschaftsrate errechnet sich aus dem Quotienten gebildet aus der Anzahl der an der Studie teilnehmenden schwangeren Frauen und aller an der Studie teilnehmenden Frauen.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patienten/-innen

Das Durchschnittsalter der Männer lag im Gesamtkollektiv (n=87) bei  $35,99 \pm 6,93$  Jahren. Das Durchschnittsalter unterscheidet sich bei getrennter Betrachtung (IVF n=36; ICSI n=51) des IVF- ( $36,3 \pm 6,17$ ) und des ICSI-Kollektivs ( $35,89 \pm 7,28$ ) nicht signifikant ( $p=0,87$ ) voneinander.

Das Durchschnittsalter der Frauen lag im Gesamtkollektiv bei  $33,99 \pm 4,23$  Jahren. Auch hier unterscheidet sich bei getrennter Betrachtung des IVF- ( $35,19 \pm 5,15$ ) und des ICSI-Kollektivs ( $33,58 \pm 3,88$ ) das Durchschnittsalter nicht signifikant ( $p=0,306$ ) voneinander.

Bei der Korrelationsuntersuchung zeigt sich ein geringer ( $r=0,394$ ), signifikanter Zusammenhang ( $p=0,013$ ) zwischen dem Alter der Männer und ROS II (Reactive oxygen species, gemessen im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation).

Außerdem findet sich eine sehr signifikante ( $p=0,009$ ), geringe Korrelation ( $r=0,415$ ) zwischen dem Alter der Männer und Schwanzfehlbildungen der Spermatozoen nach Spermienaufbereitung.

Bei den Frauen kann eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ), mittlere Korrelation ( $r=-0,55$ ) des Alters mit der Zahl der gewonnenen Eizellen nachgewiesen werden. Außerdem korreliert das Alter der Frauen signifikant ( $p=0,023$ ) und gering ( $r=-0,363$ ) mit der Zahl der befruchteten Eizellen.

### 4.2 Parameter der konventionellen Spermaanalyse

#### 4.2.1 Volumen

Das Volumen lag beim Gesamtkollektiv (n=87) im Mittel bei  $3,64 \pm 1,59$  ml. Bei getrennter Betrachtung des IVF-Kollektivs (n=36) und des ICSI-Kollektivs (n=51) zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,667$ ) bezüglich des Volumens.

## 4.2.2 pH-Wert

Hinsichtlich des pH-Wertes zeigt sich zwischen der IVF-Gruppe und der ICSI-Gruppe kein signifikanter Unterschied ( $p=0,139$ ). Beim Gesamtkollektiv lag der pH-Wert bei  $8,63 \pm 0,33$ .

## 4.2.3 Cyturtest

Vergleicht man die Cyturtests des IVF-Kollektivs mit dem ICSI-Kollektiv zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,011$ ). Der Mittelwert der IVF-Gruppe liegt bei  $1,39 \pm 0,69$ . Der Mittelwert der ICSI-Gruppe liegt bei  $1,84 \pm 0,88$ . Betrachtet man das Gesamtkollektiv so liegt der Mittelwert für den Cyturtest bei  $1,66 \pm 0,83$ .

Es findet sich ein signifikanter ( $p=0,014$ ), geringer Zusammenhang ( $r=-0,275$ ) zwischen der Esterasenaktivität von Granulozyten (Cyturtest) und dem Eintreten einer Schwangerschaft im Gesamtkollektiv.

## 4.2.4 Martest (mixed antiglobulin reaction test)

Beim Martest liegt der Mittelwert des Gesamtkollektivs bei  $0,6 \pm 0,23$ . Bei Betrachtung der IVF-Gruppe liegt der Mittelwert bei  $0,8 \pm 0,28$  in der ICSI-Gruppe bei  $0,4 \pm 0,2$ . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Martests ( $p=0,39$ ).

## 4.2.5 Vitalitätstests

### 4.2.5.1 Eosintest

Tab. 4.1 Spermiovitalität (Eosintest) vor und nach Aufbereitung

vitale Spermien in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
vor Aufbereitung	$48,89 \pm 23,36$	$36,96 \pm 23,69$	$41,9 \pm 24,15$	0,022
nach Aufbereitung	$58,06 \pm 19,5$	$50,88 \pm 21,95$	$53,85 \pm 21,15$	0,12

Der Eosintest wurde sowohl vor als auch nach Spermienaufbereitung durchgeführt. Für das Gesamtkollektiv ergeben sich folgende Mittelwerte und Standardabweichungen. Vor Aufbereitung lag die Zahl der vitalen Spermien im

Gesamtkollektiv bei 41,9%±24,15% nach Aufbereitung waren es 53,85%±21,15%. Bei getrennter Betrachtung des IVF-Kollektivs (48,89%±23,36%) und des ICSI-Kollektivs (36,96%±23,69%) zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,022$ ) in der Anzahl der vitalen Spermatozoen vor Aufbereitung. Nach Aufbereitung ist der Unterschied mit einem p-Wert von  $p=0,12$  jedoch nicht mehr signifikant. Die Zahl der vitalen Spermien liegt in der IVF-Gruppe bei 58,06%±19,5%, in der ICSI-Gruppe bei 50,88%±21,95%.

#### 4.2.5.2 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)

**Tab. 4.2 Spermienmembranintegrität (HOS-Test) vor und nach Aufbereitung**

vitale Spermien in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
<b>vor Aufbereitung</b>	60 ± 20,35	55,88 ± 22,35	57,59 ± 21,52	0,383
<b>nach Aufbereitung</b>	74,17 ± 10,92	66,76 ± 22,31	69,83 ± 18,75	0,069

Für die Zahl der vitalen Spermien (HOS-Test) ergibt sich vor Aufbereitung kein signifikanter Unterschied ( $p=0,383$ ) zwischen den beiden Kollektiven. Im IVF-Kollektiv liegen die Werte bei 60,00%±20,35%, für das ICSI-Kollektiv bei 55,88%±22,35%. Im Gesamtkollektiv ergibt sich 57,59%±21,52%. Nach Aufbereitung findet sich erwartungsgemäß eine Zunahme der vitalen Spermatozoen. Im IVF-Kollektiv findet sich ein Zuwachs von 14,17% (74,17%±10,92%), im ICSI-Kollektiv ein Zuwachs von 10,88% (66,76%±22,31%). Dieser Unterschied ist mit  $p=0,069$  nicht signifikant. Im Gesamtkollektiv liegt die Anzahl der vitalen Spermien nach Aufbereitung bei 69,83%±18,75% (Zuwachs von 12,24%).

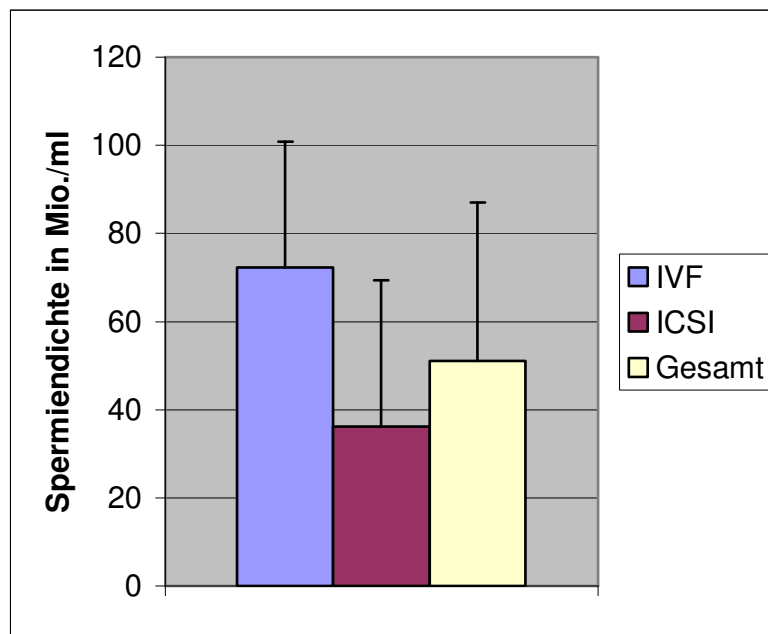
Es zeigt sich eine geringe Korrelation zwischen den beiden Vitalitätstests vor Aufbereitung ( $r=0,45$ ). Auch nach Aufbereitung bestätigt sich diese Korrelation ( $r=0,35$ ). Beide Zusammenhänge sind hoch signifikant ( $p<0,001$ ). Betrachtet man die Tests getrennt voneinander so korrelieren die Ergebnisse vor und nach Aufbereitung ebenfalls miteinander. Für den Eosin-Test ist der Zusammenhang mittelstark ausgeprägt ( $r=0,698$ ), ebenso beim HOS-Test ( $r=0,64$ ). Auch hier sind beide Korrelationen hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

## 4.2.6 Spermiendichte

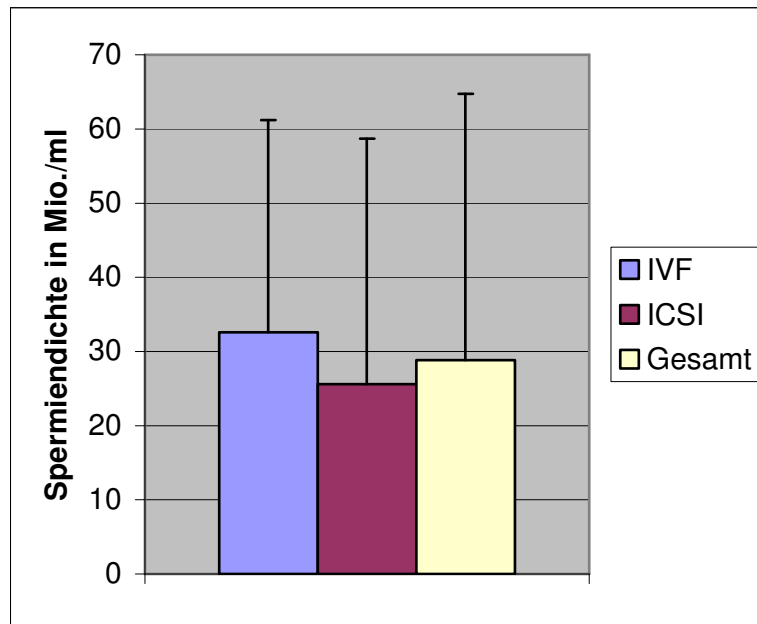
Die Spermiendichte wurde vor und nach Aufbereitung untersucht. Im Gesamtkollektiv beträgt sie vor Aufbereitung 51,16±35,9 Mio./ml. Bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe zeigt sich im IVF-Kollektiv eine höhere (72,28±28,6 Mio./ml) Spermatozoendichte als im ICSI-Kollektiv (36,25±33,14 Mio./ml) vor Aufbereitung. Dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Durch die Aufbereitungsmethode wird die Spermiendichte verringert, so dass sie nach Aufbereitung im Gesamtkollektiv noch 28,88±25,76 Mio./ml beträgt. In der IVF-Gruppe zeigt sich nach Aufbereitung eine Spermiendichte von 32,61±25,6 Mio./ml, in der ICSI-Gruppe von 25,88±25,76 Mio./ml. Der Unterschied ist mit  $p = 0,233$  nicht signifikant.

**Tab. 4.3 Spermiendichte vor und nach Aufbereitung**

Spermiendichte in Mio./ml	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
vor Aufbereitung	72,28 ± 28,60	36,25 ± 33,14	51,16 ± 35,90	<0,001
nach Aufbereitung	32,61 ± 25,60	25,88 ± 25,75	28,88 ± 25,76	0,233



**Abb. 4.1 Spermiendichte in Mio./ml vor Aufbereitung**



**Abb. 4.2 Spermiendichte in Mio./ml nach Aufbereitung**

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Spermiendichte und dem HOS-Test. Die Spermiendichte vor Aufbereitung korreliert gering ( $r=0,26$ ) und signifikant ( $p=0,015$ ) mit dem HOS-Test vor Aufbereitung, außerdem gering ( $r=0,309$ ) und hoch signifikant ( $p<0,001$ ) mit dem HOS-Test nach Aufbereitung. Die Korrelation der Spermiendichte nach Aufbereitung mit dem HOS-Test nach Aufbereitung ist etwas stärker ausgeprägt ( $r=0,288$ ) und mit  $p=0,007$  sehr signifikant.

Wie zu erwarten zeigt sich dieser Zusammenhang auch mit dem anderen durchgeführten Vitalitätstest, dem Eosintest. Es wurde eine geringe ( $r=0,368$ ) hoch signifikante Korrelation ( $p<0,001$ ) der Spermiendichte vor Aufbereitung mit dem Eosintest vor Aufbereitung und eine etwas geringere ( $r=0,281$ ) sehr signifikante ( $p=0,007$ ) Korrelation mit dem Eosintest nach Aufbereitung ermittelt. Die Spermiendichte nach Aufbereitung korreliert gering ( $r=0,336$ ) und hoch signifikant ( $p<0,001$ ) mit dem Eosintest nach Aufbereitung.

Des Weiteren zeigt sich eine geringe Korrelation ( $r=0,451$ ) zwischen der Spermiendichte vor und nach Aufbereitung. Dieser Zusammenhang ist hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

## 4.2.7 Spermienmotilität

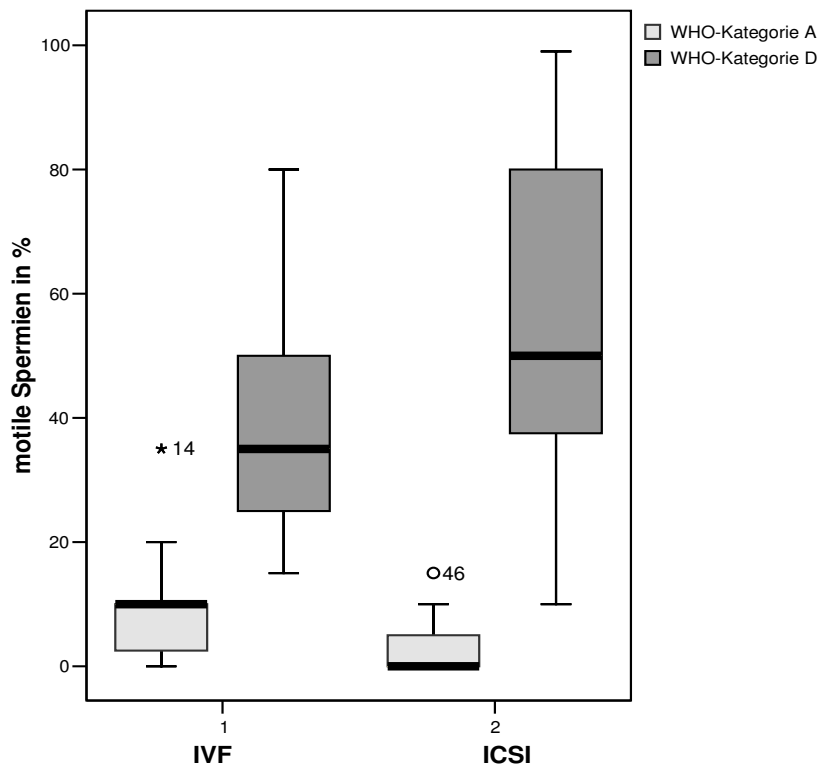
Die Spermienmotilität wurde vor und nach Aufbereitung untersucht, und anhand der unter Kapitel 3.2.7 beschriebenen Kriterien eingeteilt.

### 4.2.7.1 Spermienmotilität vor Aufbereitung

Wie aufgrund der besseren Spermiovitalität der IVF-Gruppe zu erwarten zeigen sich auch bei der Untersuchung der Spermienmotilität bessere Ergebnisse in der IVF-Gruppe. So beträgt die Anzahl der Spermien der WHO-Kategorie A (schnell und linear progressiv beweglich) im IVF-Kollektiv  $8,75\% \pm 8,57\%$ , im ICSI-Kollektiv dagegen  $3,27\% \pm 4,2\%$ . Dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Für die weiteren Untersuchungsergebnisse der Spermienmotilität vor Aufbereitung siehe Tab. 4.4.

**Tab. 4.4 Spermienmotilität vor Aufbereitung**

Spermienmotilität in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
WHO-Kategorie A	$8,75 \pm 8,57$	$3,27 \pm 4,2$	$5,54 \pm 6,89$	$<0,001$
WHO-Kategorie B	$30,83 \pm 14,02$	$21,04 \pm 16,43$	$25,09 \pm 16,14$	0,005
WHO-Kategorie C	$20,83 \pm 11,43$	$19,73 \pm 16,13$	$20,18 \pm 14,37$	0,724
WHO-Kategorie D	$39,58 \pm 18,22$	$55,67 \pm 25,01$	$49,04 \pm 23,71$	0,001



**Abb. 4.3 Spermienmotilität vor Aufbereitung**

Zwischen den Spermatozoen der **WHO-Kategorie A** vor Aufbereitung besteht ein geringer ( $r=0,341$ ), aber sehr signifikanter ( $p=0,001$ ) Zusammenhang mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Außerdem zeigt sich in dieser Kategorie eine signifikante ( $p=0,04$ ) geringe Korrelation ( $r=0,331$ ) mit der Vitamin A Konzentration. Es findet sich eine signifikante ( $p=0,022$ ) geringe Korrelation ( $r=0,246$ ) mit dem HOS-Wert vor Aufbereitung, ebenso mit dem Eosin-Wert vor Aufbereitung ( $r=0,452$ ). Hier ist der Zusammenhang allerdings hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

Die Spermatozoen der **WHO-Kategorie B** vor Aufbereitung korrelieren gering ( $r=0,287$ ) aber sehr signifikant ( $p=0,007$ ) mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Auch hier zeigt sich eine geringe Korrelation mit dem HOS-Wert ( $r=0,385$ ) und eine mittlere Korrelation mit dem Eosin-Wert ( $r=0,522$ ). Beide Korrelationen sind mit  $p<0,001$  hoch signifikant.

Bei den Spermatozoen der **WHO-Kategorie C** zeigt sich wie auch schon in den vorangegangenen Kategorien eine signifikante ( $p=0,022$ ) geringe Korrelation ( $r=0,245$ ) mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Ein mittlerer ( $r=-0,502$ ) hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) Zusammenhang besteht mit dem Ergebnis des Cytur-Tests. Es zeigte sich außerdem eine geringe ( $r=0,24$ ) signifikante ( $p=0,025$ ) Korrelation mit

der Vitamin E Konzentration vor Aufbereitung. Es findet sich im Gesamtkollektiv ein geringer ( $r=0,434$ ) hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) Zusammenhang mit der Anzahl der apoptotischen Spermien in der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung und ein geringer Zusammenhang ( $r=-0,394$ ) mit dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung. Beide Zusammenhänge sind hoch signifikant ( $p<0,001$ ). Bei getrennter Betrachtung findet man in der IVF-Gruppe einen sehr signifikanten, geringen Zusammenhang mit der Anzahl der apoptotischen Spermien in der TUNEL-Färbung ( $r=-0,441$ ;  $p=0,007$ ) nach Aufbereitung. Vor Aufbereitung zeigt sich dieser Zusammenhang ebenfalls ( $r=-0,257$ ;  $p=0,13$ ), aber nicht signifikant. Es findet sich in der IVF-Gruppe auch eine Korrelation mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung sowohl vor ( $r=-0,304$ ;  $p=0,072$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=-0,325$ ;  $p=0,053$ ), beide jedoch nicht signifikant. In der ICSI-Gruppe zeigen sich eine geringe Korrelation mit der Anzahl der apoptotischen Spermien in der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung ( $r=-0,49$ ) sowie eine mittlere Korrelation ( $r=-0,56$ ) nach Aufbereitung. Beide Zusammenhänge sind hoch signifikant ( $p<0,001$ ). In der ICSI-Gruppe finden sich zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung und dieser Motilitätskategorie folgende Korrelationen. Vor Aufbereitung gering und sehr signifikant ( $r=-0,448$ ;  $p=0,001$ ), nach Aufbereitung gering und signifikant ( $r=-0,299$ ;  $p=0,033$ ).

Spermien der **WHO-Kategorie D** korrelieren im Gesamtkollektiv gering ( $r=-0,409$ ) aber hoch signifikant ( $p<0,001$ ) mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Ein geringer ( $r=0,362$ ) sehr signifikanter Zusammenhang ( $p=0,001$ ) besteht mit dem Ergebnis des Cytur-Tests im Gesamtkollektiv. Wie auch in Kategorie C finden sich im Gesamtkollektiv hoch signifikante ( $p<0,001$ ) geringe Korrelationen mit dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung ( $r=0,368$ ) und der Zahl der apoptotischen Spermien in der TUNEL-Färbung ( $r=0,384$ ) vor Aufbereitung. In der IVF-Gruppe finden sich geringe, signifikante Korrelationen sowohl mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung ( $r=0,341$ ;  $p=0,042$ ) als auch mit der TUNEL-Färbung ( $r=0,335$ ;  $p=0,046$ ) vor Aufbereitung. In der ICSI-Gruppe zeigen sich mit der TUNEL-Färbung signifikante geringe Korrelationen sowohl vor ( $r=0,319$ ;  $p=0,022$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,352$ ;  $p=0,011$ ).

Außerdem zeigt sich im Gesamtkollektiv eine sehr signifikante ( $p=0,001$ ) geringe Korrelation ( $r=-0,364$ ) mit dem HOS-Test vor Aufbereitung. Der Eosin-Test im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung besteht ebenfalls eine geringe Korrelation ( $r=-0,474$ ) mit den Spermien dieser Kategorie, allerdings hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

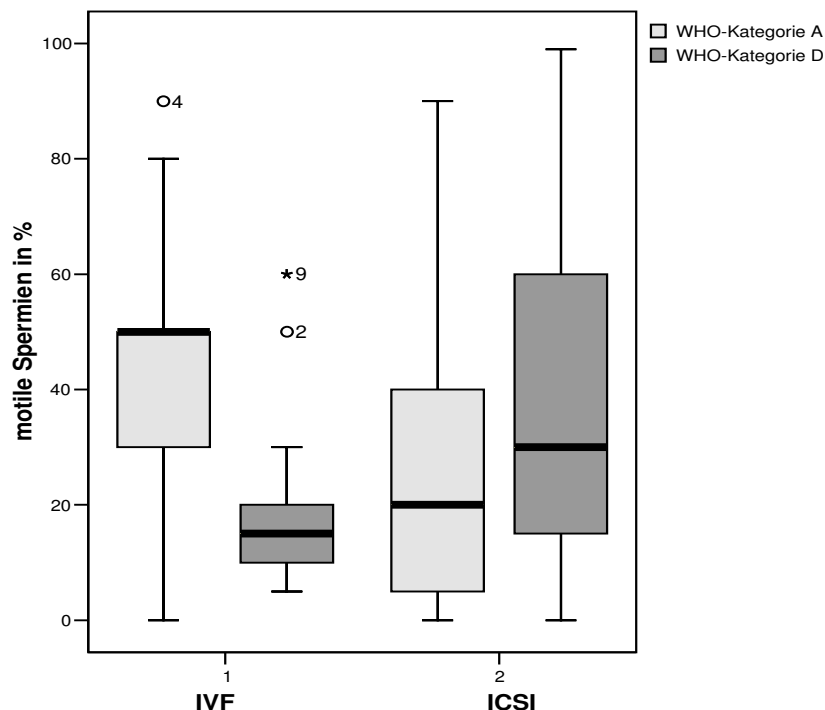


### 4.2.7.2 Spermienmotilität nach Aufbereitung

Durch die Aufbereitung des Ejakulates wird die Motilität der Spermatozoen in beiden Gruppen deutlich verbessert. Es bleibt jedoch dabei, dass die Ergebnisse im IVF-Kollektiv besser sind. Der Unterschied zum ICSI-Kollektiv bezüglich der Spermien der WHO-Kategorie A ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). In der IVF-Gruppe sind es nach Spermienaufbereitung  $45,00\% \pm 18,17\%$ , in der ICSI-Gruppe  $25,59 \pm 24,32\%$  Spermien der Kategorie A. Für die weiteren Untersuchungsergebnisse der Spermienmotilität nach Aufbereitung möchte ich auf Tab. 4.5 verweisen.

**Tab. 4.5 Spermienmotilität nach Aufbereitung**

Spermienmotilität in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
WHO-Kategorie A	$45,00 \pm 18,17$	$25,59 \pm 24,32$	$33,62 \pm 23,89$	$<0,001$
WHO-Kategorie B	$25,14 \pm 11,86$	$20,31 \pm 14,43$	$22,31 \pm 13,38$	0,098
WHO-Kategorie C	$12,22 \pm 7,70$	$14,02 \pm 14,42$	$13,28 \pm 12,08$	0,497
WHO-Kategorie D	$17,64 \pm 13,86$	$40,08 \pm 28,92$	$30,79 \pm 26,23$	$<0,001$



**Abb. 4.4 Spermienmotilität nach Aufbereitung**

Zwischen den Spermatozoen der **WHO-Kategorie A** nach Aufbereitung besteht ein geringer ( $r=0,322$ ), aber sehr signifikanter ( $p=0,002$ ) Zusammenhang mit der Spermiedichte nach Aufbereitung. Außerdem besteht ein geringer ( $r=0,363$ ) sehr signifikanter ( $p=0,001$ ) Zusammenhang mit dem Ergebnis des Eosin-Tests nach Aufbereitung.

Bei den Spermatozoen der **WHO-Kategorie B** nach Aufbereitung besteht eine geringe ( $r=-0,36$ ) sehr signifikante ( $p=0,001$ ) Korrelation mit dem Cytur-Test im Gesamtkollektiv. Es zeigt sich im Gesamtkollektiv eine geringe ( $r=-0,309$ ) sehr signifikante ( $p=0,004$ ) Korrelation mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und eine sehr signifikante ( $p=0,001$ ) geringe ( $r=-0,361$ ) Korrelation mit der Anzahl der apoptotischen Spermien in der TUNEL-Färbung. In der IVF-Gruppe finden sich nach Aufbereitung sowohl mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung ( $r=-0,517$ ) als auch mit der TUNEL-Färbung ( $r=-0,647$ ) hoch signifikante ( $p<0,001$ ), mittlere Korrelationen.

Es findet sich im Gesamtkollektiv ein geringer ( $r=0,336$ ) signifikanter ( $p=0,036$ ) Zusammenhang mit der Vitamin A Konzentration. Mit der Eosin-Konzentration nach Aufbereitung kann ein geringer ( $r=0,236$ ) signifikanter ( $p=0,028$ ) Zusammenhang gezeigt werden.

Die Spermatozoen der **WHO-Kategorie C** nach Aufbereitung zeigen eine geringe ( $r=-0,314$ ) sehr signifikante ( $p=0,003$ ) Korrelation mit dem Cytur-Test. Außerdem findet sich im Gesamtkollektiv eine sehr signifikante ( $p=0,009$ ) geringe Korrelation ( $r=-0,279$ ) mit der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung. In der ICSI-Gruppe zeigt sich dieser Zusammenhang hoch signifikant ( $r=-0,485$ ;  $p<0,001$ ). In der IVF-Gruppe erreicht er nicht das Signifikanzniveau.

Bei den Spermatozoen der **WHO-Kategorie D** nach Aufbereitung findet sich eine geringe ( $r=0,238$ ) signifikante ( $p=0,026$ ) Korrelation mit dem Cytur-Test. Eine sehr signifikante ( $p=0,007$ ) geringe Korrelation ( $r=0,287$ ) zeigt sich im Gesamtkollektiv mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung. Mit der TUNEL-Färbung wird im Gesamtkollektiv eine signifikante geringe Korrelation ( $r=0,243$ ;  $p=0,024$ ) nach Aufbereitung ermittelt. In der IVF-Gruppe zeigt sich ein geringer, signifikanter Zusammenhang mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung ( $r=0,402$ ;  $p=0,015$ ).

Des Weiteren findet sich eine sehr signifikante ( $p=0,01$ ) geringe Korrelation ( $r=-0,409$ ) mit der Konzentration von Vitamin A. Eine sehr signifikante ( $p=0,02$ ) geringe ( $r=-0,249$ ) Korrelation besteht mit dem HOS-Test nach Aufbereitung sowie

mit dem Eosin-Test ( $r=-0,402$ ) nach Aufbereitung. Hier jedoch hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

Erwartungsgemäß korrelieren die einzelnen WHO-Kategorien sowohl vor als auch nach Aufbereitung sehr signifikant bzw. hoch signifikant untereinander. Gleiches gilt für Korrelationen zwischen der Spermienmotilität und der Spermienmorphologie.

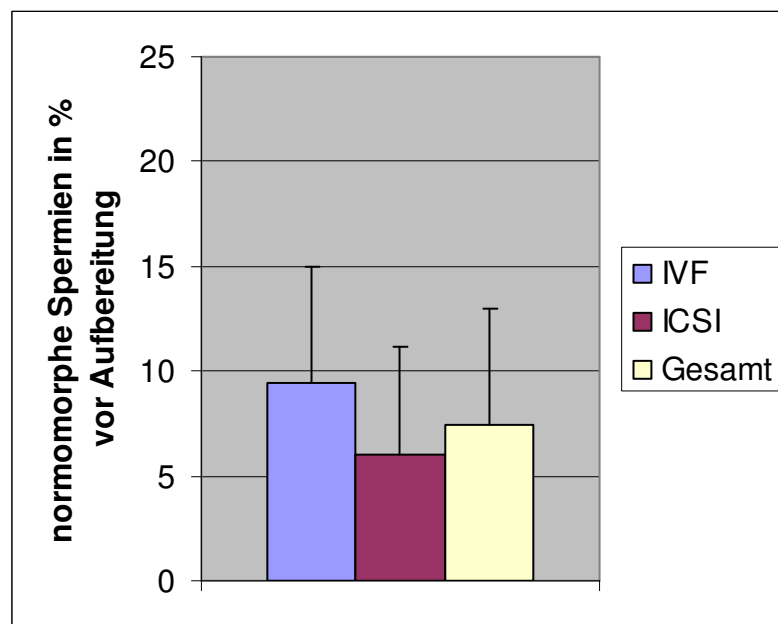
### 4.3 Spermienmorphologie

Die Beurteilung der Spermienmorphologie erfolgt, anhand der unter Kapitel 3.3.2 beschriebenen Kriterien, vor und nach der Spermienaufbereitung.

**Tab. 4.6 Morphologisch normale Spermien in % vor und nach Aufbereitung**

normomorphe Spermien in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
vor Aufbereitung	9,44 ± 5,55	6,04 ± 5,12	7,45 ± 5,54	0,004
nach Aufbereitung	16,06 ± 7,54	8,51 ± 6,97	11,63 ± 8,09	<0,001

#### 4.3.1 Spermienmorphologie vor Aufbereitung



**Abb. 4.5 normomorphe Spermien in % vor Aufbereitung**

Die Anzahl der morphologisch normalen Spermatozoen liegt im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung bei  $7,45\% \pm 5,54\%$ . Betrachtet man das IVF-Kollektiv, so liegt der Anteil

an normomorphen Spermien vor Aufbereitung bei  $9,44\% \pm 5,55\%$ . Es findet sich ein sehr signifikanter ( $p=0,004$ ) Unterschied zum ICSI-Kollektiv, bei dem der Anteil an morphologisch normalen Spermien vor Aufbereitung bei  $6,04\% \pm 5,12\%$  liegt.

Berücksichtigt man nun aber die Ergebnisse, die sich bei der Untersuchung der Spermiovitalität und der Spermienmotilität zwischen den beiden Gruppen finden, so erklärt sich wohl auch dieses Ergebnis zugunsten der IVF-Gruppe.

Es findet sich ein signifikanter ( $p=0,027$ ) geringer Zusammenhang ( $r=-0,237$ ) zwischen dem Anteil an morphologisch normalen Spermien vor Aufbereitung und dem Ergebnis des Cyturtests. Außerdem findet sich eine geringe ( $r=0,217$ ) signifikante Korrelation ( $p=0,043$ ) der Anzahl der normomorphen Spermien vor Aufbereitung mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Des Weiteren zeigen sich signifikante, geringe Korrelationen des Anteils an morphologisch normalen Spermien vor Aufbereitung mit Spermien der Motilitätskategorie A ( $r=0,255$ ;  $p=0,017$ ) und entsprechend mit Spermien der Motilitätskategorie D ( $r=-0,263$ ;  $p=0,014$ ). Eine hoch signifikante ( $p<0,001$ ) hohe Korrelation ( $r=0,826$ ) findet sich zwischen dem Anteil an morphologisch normalen Spermien vor und nach Aufbereitung. Natürlich zeigt sich auch eine Korrelation der normomorphen Spermien vor Aufbereitung mit den amorphen Spermien vor Aufbereitung. Dieser Zusammenhang ist mittel ausgeprägt ( $r=-0,564$ ) aber mit  $p<0,001$  hoch signifikant.

### 4.3.2 Spermienmorphologie nach Aufbereitung

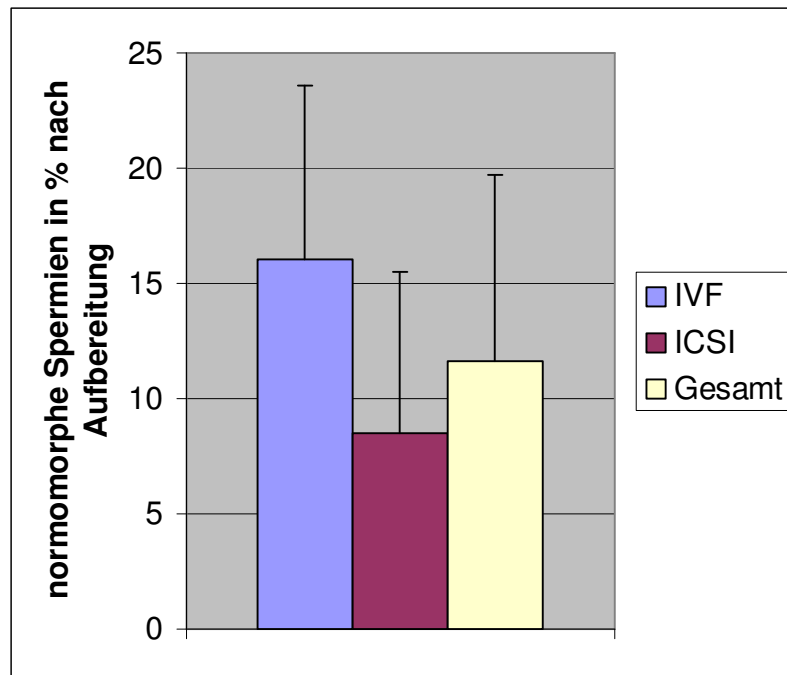


Abb. 4.6 normomorphe Spermien in % nach Aufbereitung

Der Anteil an morphologisch normalen Spermien liegt im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung mit PureSperm bei 11,63%±8,09%. Er konnte somit zum Wert vor Aufbereitung nahezu verdoppelt werden (siehe Tab. 4.6). Bei getrennter Betrachtung beider Kollektive zeigt sich ein hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied. Im IVF-Kollektiv liegt der Anteil an morphologisch normalen Spermien nach Aufbereitung bei 16,06%±7,54% im ICSI-Kollektiv dagegen bei 8,51%±6,97%.

Auch nach Aufbereitung findet sich eine geringe Korrelation ( $r = -0,367$ ) mit dem Ergebnis des Cyturtests. Nach Aufbereitung ist diese Korrelation allerdings hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Eine sehr signifikante ( $p = 0,002$ ) geringe Korrelation ( $r = 0,329$ ) zeigt sich mit der Spermiedichte vor Aufbereitung. Weiterhin zeigen sich folgende Zusammenhänge. Der Anteil der morphologisch normalen Spermatozoen nach Aufbereitung korreliert gering und signifikant mit der Anzahl an Spermien der Motilitätskategorie A ( $r = 0,216$ ;  $p = 0,045$ ), der Motilitätskategorie B ( $r = 0,245$ ;  $p = 0,022$ ) sowie sehr signifikant ( $p = 0,004$ ) mit der Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie D ( $r = -0,303$ ) vor Aufbereitung. Hinsichtlich des Anteils der normomorphen Spermien nach Aufbereitung besteht mit der Spermienmotilität nach Aufbereitung geringe

signifikante Korrelationen in der Motilitätskategorie C ( $r=0,216$ ;  $p=0,044$ ) und der Motilitätskategorie D ( $r=-0,226$ ;  $p=0,036$ ). Auch hier zeigt sich eine hoch signifikante ( $p<0,001$ ) mittlere Korrelation ( $r=-0,602$ ) zwischen dem Anteil an morphologisch normalen Spermien nach Aufbereitung und dem Anteil an amorphen Spermien nach Aufbereitung.

Es findet sich eine sehr signifikanter ( $p=0,009$ ), geringer ( $r=0,415$ ) Zusammenhang zwischen Spermien mit Schwanzdeformitäten und dem Alter der Männer.

#### 4.4 Chromatinkondensation mittels Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>)

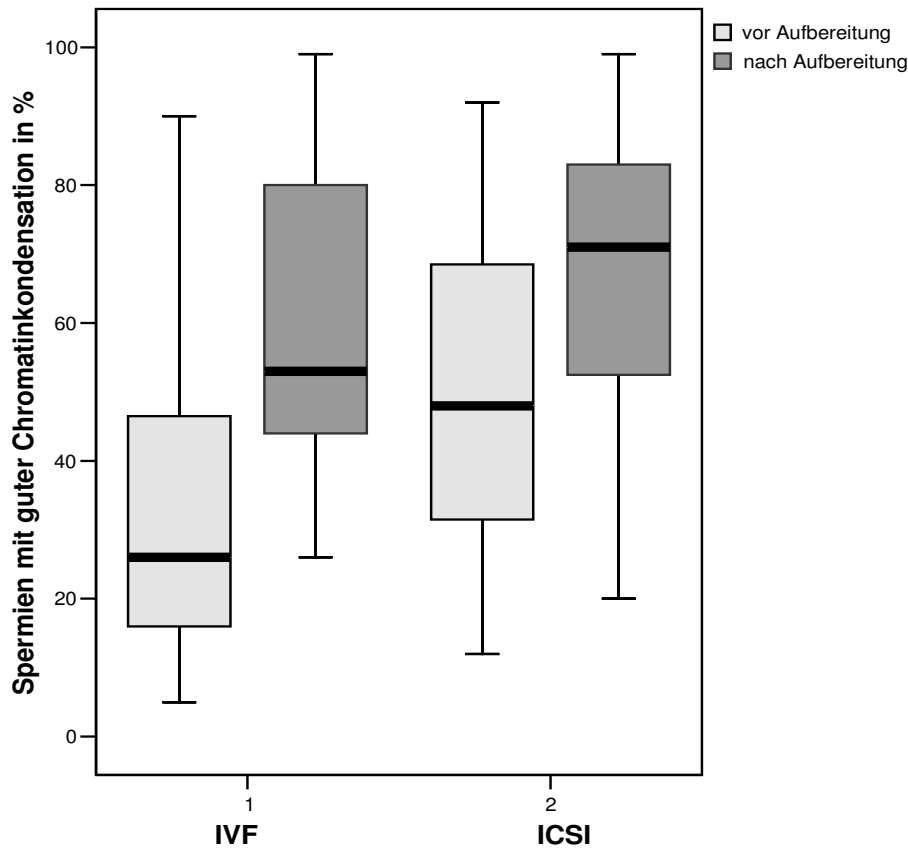
##### Färbung

Die Untersuchung der Chromatinkondensation mittels der Chromomycin A<sub>3</sub> Färbung wird vor und nach Aufbereitung wie unter Kapitel 3.4 beschrieben durchgeführt. Der Anteil der Spermien mit gut kondensiertem Chromatin im Spermienkopf liegt im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung bei  $44,41\% \pm 24,3\%$ . Durch die Spermienaufbereitung kann dieser Anteil im Gesamtkollektiv auf  $64,46\% \pm 20,82\%$  gesteigert werden. Betrachtet man das IVF- und das ICSI-Kollektiv getrennt voneinander so zeigt sich vor Aufbereitung in der IVF-Gruppe ein Anteil von gut kondensierten Spermien von  $36,11\% \pm 26,32\%$ , in der ICSI-Gruppe von  $50,27\% \pm 21,13\%$ . Dieser Unterschied ist mit  $p=0,007$  sehr signifikant.

Nach Aufbereitung ist der Anteil an gut kondensierten Spermien in der IVF-Gruppe auf  $59,47\% \pm 21,49\%$ , in der ICSI-Gruppe auf  $67,98\% \pm 19,8\%$  gestiegen. Mit  $p=0,06$  ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

**Tab. 4.7 Chromatinkondensation vor und nach Aufbereitung**

gut kondensierte Spermien mittels CMA <sub>3</sub> Färbung in %	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
vor Aufbereitung	36,11±26,32	50,27±21,13	44,41±24,3	0,007
nach Aufbereitung	59,47±21,49	67,98±19,8	64,46±20,82	0,06



**Abb. 4.7 Chromatinkondensation mittels CMA<sub>3</sub>-Färbung**

Es zeigt sich im Gesamtkollektiv eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) mittlere Korrelation ( $r = 0,547$ ) zwischen der Chromatinkondensation vor Aufbereitung und dem Cyturtest. Nach Aufbereitung ist diese Korrelation nur noch gering ( $r = 0,432$ ), aber immer noch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) ausgeprägt. In der IVF-Gruppe besteht sowohl vor ( $r = 0,746$ ) als auch nach ( $r = 0,748$ ) Aufbereitung eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ), hohe Korrelation zwischen der Chromatinkondensation und dem Cyturtest. In der ICSI-Gruppe findet sich ebenfalls eine positive Korrelation. Sie erreicht aber weder vor noch nach Aufbereitung das Signifikanzniveau.

Weiterhin finden sich geringe, signifikante Korrelationen zwischen der Chromatinkondensation vor Aufbereitung und dem MAR-Test ( $r = -0,249$ ;  $p = 0,02$ ) sowie der Spermiedichte vor Aufbereitung ( $r = -0,243$ ;  $p = 0,023$ ).

Für die Korrelationen zwischen der Chromatinkondensation und den Ergebnissen der Spermienmotilitätsuntersuchung, jeweils vor und nach Spermiaufbereitung, möchte ich auf das Kapitel 4.2.7 verweisen.

Zwischen der Chromatinkondensation vor Aufbereitung und dem Ergebnis der TUNEL-Färbung sowohl vor ( $r=0,604$ ;  $p<0,001$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,566$ ;  $p<0,001$ ) zeigte sich im Gesamtkollektiv eine hoch signifikante mittlere Korrelation. Das Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung korreliert mit dem Ergebnis der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung im Gesamtkollektiv immer noch hoch signifikant ( $p<0,001$ ) aber mit  $r=0,447$  ist die Korrelation nur noch gering ausgeprägt. In der IVF-Gruppe besteht ein hoch signifikanter ( $p<0,001$ ), mittlerer Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und dem der TUNEL-Färbung sowohl vor ( $r=0,686$ ) als auch ( $r=0,625$ ) nach Aufbereitung. In der ICSI-Gruppe findet sich eine hoch signifikante ( $p<0,001$ ) geringe Korrelation zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und dem Ergebnis der TUNEL-Färbung sowohl vor ( $r=0,473$ ) als auch nach ( $r=0,475$ ) Aufbereitung. Eine Korrelation besteht auch noch nach Aufbereitung zwischen den beiden Färbungen, in der IVF-Gruppe sehr signifikant und mittelstark ( $r=0,526$ ;  $p=0,001$ ), in der ICSI-Gruppe signifikant und gering ( $r=0,351$ ;  $p=0,012$ ).

Weiterhin findet sich zwischen der Chromatinkondensation vor Aufbereitung und der Anzahl der morphologisch normalen Spermien nach Aufbereitung eine sehr signifikante ( $p=0,002$ ) geringe Korrelation ( $r=-0,322$ ). Das Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung zeigt einen gerade noch signifikanten ( $p=0,049$ ), geringen ( $r=-0,211$ ) Zusammenhang mit dem Anteil der normomorphen Spermien nach Aufbereitung.

Außerdem zeigen sich sehr signifikante, geringe Korrelationen zwischen dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und dem HOS-Test sowohl vor ( $r=-0,211$ ;  $p=0,049$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=-0,22$ ;  $p=0,04$ ). Die Korrelation bleibt zwischen dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und dem HOS-Test nach Aufbereitung erhalten ( $r=-0,216$ ;  $p=0,044$ ).

Natürlich findet sich zwischen dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor und nach Aufbereitung eine hohe Korrelation ( $r=0,864$ ). Erwartungsgemäß ist dieser Zusammenhang hoch signifikant ( $p<0,001$ ).



## 4.5 Beurteilung von Apoptose und DNA-Integrität mittels TUNEL-Färbung

Wenn im Folgenden vom Ergebnis der TUNEL-Färbung gesprochen wird so bezieht sich dies auf Spermien mit intakter DNA ohne Strangbrüche.

Die Untersuchung auf DNA-Strangbrüche in den Spermatozoen, mittels der TUNEL-Färbung wurde vor und nach Aufbereitung, wie unter Kapitel 3.5.2 beschrieben, durchgeführt. Im Gesamtkollektiv liegt der Anteil der Spermien ohne DNA-Strangbrüche vor Spermienaufbereitung bei  $51,37\% \pm 22,96\%$ . Bei getrennter Betrachtung beider Gruppen zeigt sich dieser Anteil im IVF-Kollektiv mit  $46,11\% \pm 23,32\%$  etwas niedriger als im ICSI-Kollektiv mit  $55,08\% \pm 22,18\%$ . Dieser Unterschied ist mit  $p=0,073$  nicht signifikant.

Nach Spermienaufbereitung liegt der Anteil der Spermien mit intakter DNA im Gesamtkollektiv bei  $70,51\% \pm 18,96\%$ . Auch nach Spermienaufbereitung findet sich kein signifikanter ( $p=0,199$ ) Unterschied zwischen der IVF-Gruppe ( $67,39\% \pm 19,74\%$ ) und der ICSI-Gruppe ( $72,71\% \pm 18,25\%$ ).

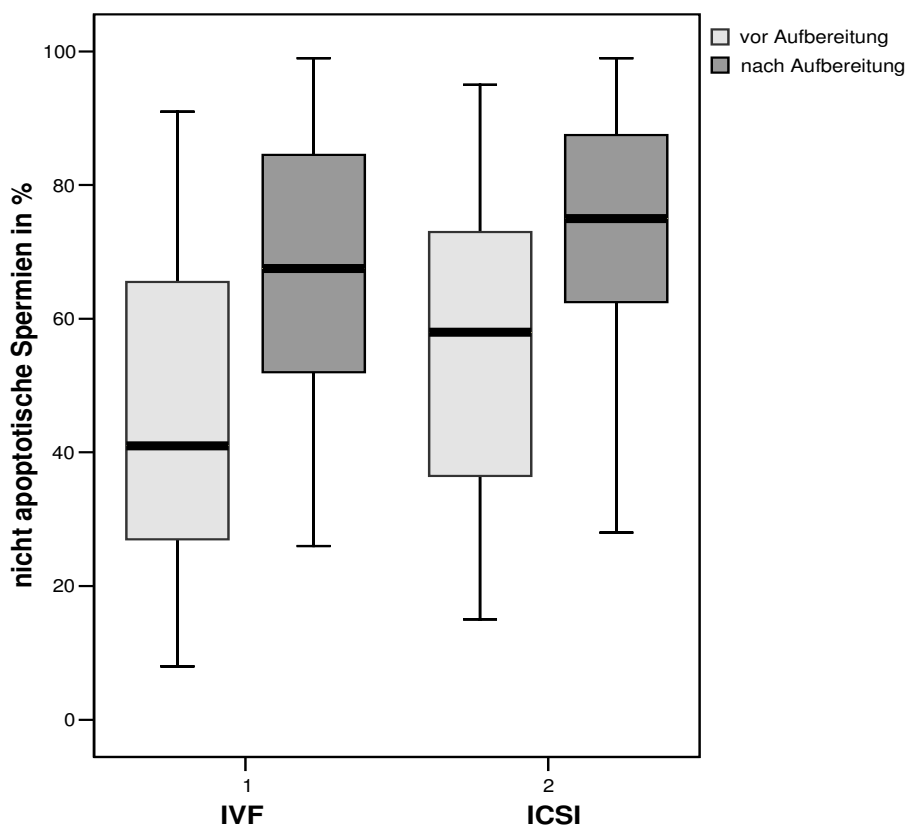


Abb. 4.8 Apoptosebeurteilung mittels TUNEL-Färbung

Es zeigte sich im Gesamtkollektiv eine geringe ( $r=0,221$ ) signifikante ( $p=0,04$ ) Korrelation zwischen dem Ergebnis der TUNEL-Färbung vor Spermienaufbereitung und dem pH-Wert. Es findet sich im Gesamtkollektiv vor ( $r=0,637$ ;  $p<0,001$ ) als auch nach Spermienaufbereitung ( $r=0,686$ ;  $p<0,001$ ) eine hoch signifikante, mittlere Korrelation mit dem Ergebnis des Cytur-Tests. In der IVF-Gruppe findet sich ein hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) hoher Zusammenhang zwischen Cyturtest und TUNEL-Färbung sowohl vor ( $r=0,733$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,718$ ). In der ICSI-Gruppe findet sich eine hoch signifikante ( $p<0,001$ ), mittlere Korrelation zwischen Cyturtest und TUNEL-Färbung sowohl vor ( $r=0,529$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,644$ ).

Zur genaueren Erläuterung der Zusammenhänge zwischen dem Ergebnis der TUNEL-Färbung und der Spermienmotilität möchte ich auf 4.2.7 verweisen.

Außerdem finden sich im Gesamtkollektiv zwischen dem Ergebnis der TUNEL-Färbung vor Spermienaufbereitung und dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Spermienaufbereitung eine hoch signifikante mittlere Korrelation ( $r=0,604$ ;  $p<0,001$ ), nach Aufbereitung eine geringe ( $r=0,48$ ), aber immer noch hoch signifikante ( $p<0,001$ ) Korrelation. Zwischen dem Ergebnis der TUNEL-Färbung nach Spermienaufbereitung findet sich im Gesamtkollektiv mit dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Spermienaufbereitung eine mittlere Korrelation ( $r=0,566$ ), mit dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Spermienaufbereitung eine geringe Korrelation ( $r=0,447$ ). Beide Zusammenhänge sind mit  $p<0,001$  hoch signifikant. In der IVF-Gruppe zeigt sich eine Korrelation zwischen der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung und der CMA<sub>3</sub>-Färbung sowohl vor ( $r=0,686$ ;  $p<0,001$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,514$ ;  $p=0,001$ ). Zwischen TUNEL- und CMA<sub>3</sub>-Färbung, beides nach Aufbereitung, besteht hier ein sehr signifikanter ( $p=0,001$ ) mittlerer ( $r=0,526$ ) Zusammenhang. In der ICSI-Gruppe findet sich eine Korrelation zwischen der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung und der CMA<sub>3</sub>-Färbung sowohl vor ( $r=0,473$ ;  $p<0,001$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,354$ ;  $p=0,011$ ). Zwischen TUNEL- und CMA<sub>3</sub>-Färbung, jeweils nach Aufbereitung, zeigt sich hier ein signifikanter ( $p=0,012$ ) geringer ( $r=0,351$ ) Zusammenhang.

Es findet sich außerdem eine geringe ( $r=-0,216$ ) signifikante ( $p=0,044$ ) Korrelation des Ergebnisses der TUNEL-Färbung vor Spermienaufbereitung mit dem HOS-Test vor Spermienaufbereitung. Nach Aufbereitung zeigt sich eine ähnliche Korrelation ( $r=-0,17$ ), sie ist jedoch nicht mehr signifikant ausgeprägt ( $p=0,115$ ).

Erwartungsgemäß findet sich eine hohe Korrelation ( $r=0,864$ ) zwischen dem Ergebnis der TUNEL-Färbung vor und nach Spermienaufbereitung. Dieser Zusammenhang ist hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

## 4.6 Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration im Seminalplasma und im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation

Wenn im Folgenden von ROS- oder TAS-Werten mit dem Zusatz I bzw. II gesprochen wird, so bedeutet:

**I** = Messung im Seminalplasma des nativen Ejakulats nach Verflüssigung

**II** = Messung im Ring, der sich nach Dichtegradientenzentrifugation zwischen der PureSperm-Lösung A (40%) und -Lösung B (80%) bildet.

### 4.6.1 Reactive oxygen species (ROS)

Tab. 4.8 Reactive oxygen species (ROS)

ROS in $\mu\text{mol/l}$	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
ROS I	39,24 $\pm$ 22,2	51,4 $\pm$ 86,64	46,37 $\pm$ 67,83	0,414
ROS II	81,86 $\pm$ 50,05	40,43 $\pm$ 33,04	57,57 $\pm$ 45,55	<0,001

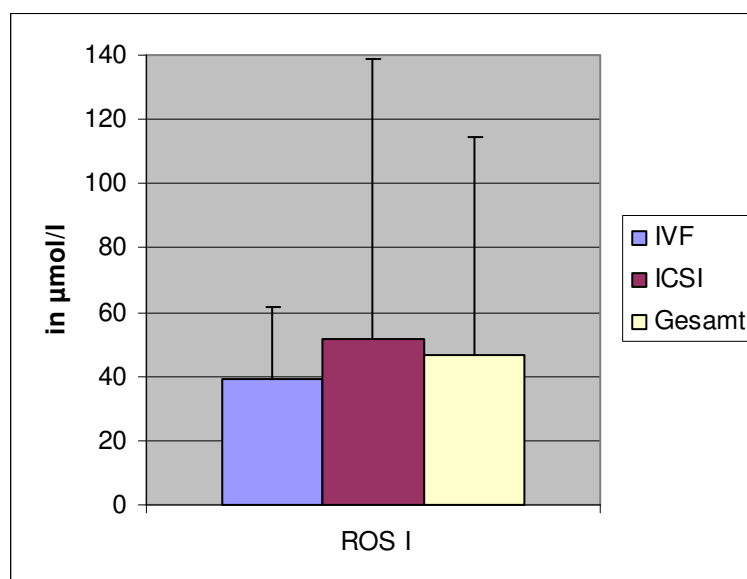
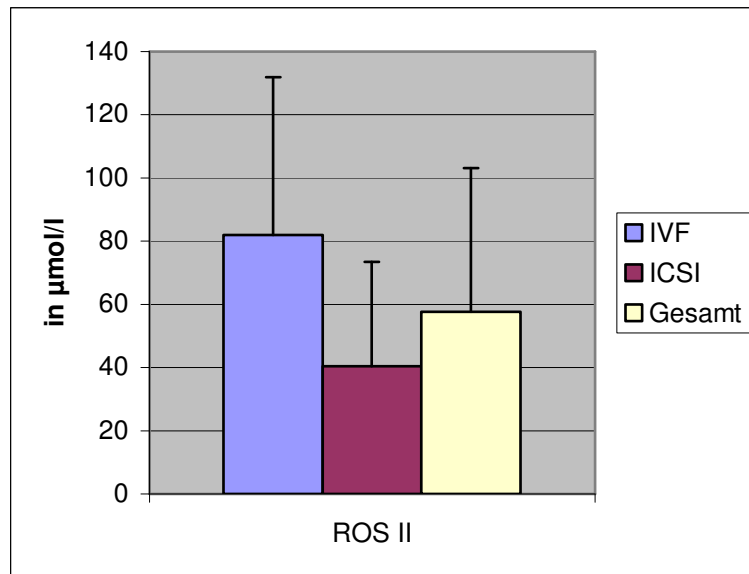


Abb. 4.9 ROS im Seminalplasma



**Abb. 4.10 ROS im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation**

Wie in Tab. 4.6 aufgeführt zeigt sich ein hoch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zwischen dem IVF- ( $81,86 \pm 50,05$ ) und dem ICSI-Kollektiv ( $40,43 \pm 33,04$ ) bezüglich der ROS II-Konzentration. Im Seminalplasma (ROS I) besteht ebenfalls ein Unterschied ( $39,24 \pm 22,2$  vs.  $51,4 \pm 86,64$ ), dieser ist jedoch mit  $p = 0,414$  nicht signifikant.

Im Gesamtkollektiv zeigen sich für ROS I ( $46,37 \pm 67,83$ ) etwas niedrigere Werte als für ROS II ( $57,57 \pm 45,55$ ).

**Tab. 4.9 Korrelationen zwischen der ROS-Konzentrationen (ROS I und ROS II) und den gemessenen Spermienparametern im Gesamtkollektiv**

Gesamtkollektiv	ROS I	ROS II
Cytur	r=0,141; p=0,193	r=0,471; p<0,001
Spermiendichte (vor Spermien-Aufb.)	r=-0,007; p=0,946	r=0,107; p=0,326
Spermiendichte (nach Spermien-Aufb.)	r=-0,005; p=0,966	r=-0,129; p=0,235
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,027; p=0,806	r=0,156; p=0,15
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=0,104; p=0,34	r=0,145; p=0,18
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,027; p=0,805	r=0,186; p=0,085
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,036; p=0,743	r=-0,210; p=0,051
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=0,196; p=0,07	r=-0,247; p=0,021
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=0,126; p=0,244	r=-0,233; p=0,03
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,068; p=0,534	r=0,097; p=0,371
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,153; p=0,156	r=0,302; p=0,004
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=0,106; p=0,327	r=-0,269; p=0,012
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,072; p=0,509	r=-0,067; p=0,539
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,266; p=0,013	r=-0,486; p<0,001
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=0,232; p=0,031	r=0,233; p=0,03
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,295; p=0,006	r=-0,504; p<0,001
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,283; p=0,008	r=-0,411; p<0,001
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,253; p=0,018	r=-0,44; p<0,001
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,213; p=0,047	r=-0,451; p<0,001
Vitamin A	r=0,022; p=0,894	r=-0,15; p=0,363
Vitamin E	r=-0,005; p=0,966	r=0,027; p=0,804
ROS I	%	r=0,678; p<0,001
ROS II	r=0,678; p<0,001	%
TAS I	r=0,219; p=0,041	r=0,612; p<0,001
TAS II	r=-0,024; p=0,827	r=0,321; p=0,002
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,155; p=0,152	r=-0,014; p=0,901
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,128; p=0,236	r=-0,081; p=0,456
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,104; p=0,336	r=-0,018; p=0,866
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,031; p=0,777	r=-0,101; p=0,35
Alter des Mannes	r=0,208; p=0,203	r=0,394; p=0,013
Fertilisation	r=-0,095; p=0,382	r=-0,2; p=0,063
Schwangerschaft	r=0,125; p=0,267	r=0,187; p=0,097

**Tab. 4.10 Korrelationen zwischen der ROS-Konzentrationen (ROS I und ROS II) und den gemessenen Spermienparametern im IVF-Kollektiv**

IVF-Kollektiv	ROS I	ROS II
Cytur	r=0,575; p<0,001	r=0,510; p=0,001
Spermiendichte (vor Spermien-Aufb.)	r=0,067; p=0,698	r=-0,184; p=0,283
Spermiendichte (nach Spermien-Aufb.)	r=-0,043; p=0,805	r=-0,217; p=0,203
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,114; p=0,507	r=-0,056; p=0,748
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=0,163; p=0,342	r=0,075; p=0,665
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=0,177; p=0,302	r=0,169; p=0,323
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,174; p=0,31	r=-0,137; p=0,424
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,246; p=0,148	r=-0,106; p=0,538
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,427; p=0,009	r=-0,431; p=0,009
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,010; p=0,955	r=0,003; p=0,986
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=0,014; p=0,933	r=0,187; p=0,274
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=0,196; p=0,251	r=0,233; p=0,171
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,212; p=0,215	r=0,108; p=0,531
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,333; p=0,047	r=-0,429; p=0,009
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=0,294; p=0,081	r=0,351; p=0,036
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,441; p=0,007	r=-0,468; p=0,004
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,418; p=0,011	r=-0,464; p=0,004
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,391; p=0,018	r=-0,471; p=0,004
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,483; p=0,003	r=-0,512; p=0,001
Vitamin A	r=0,061; p=0,868	r=-0,276; p=0,44
Vitamin E	r=0,084; p=0,628	r=0,104; p=0,544
ROS I	%	r=0,575; p<0,001
ROS II	r=0,575; p<0,001	%
TAS I	r=0,495; p=0,002	r=0,566; p<0,001
TAS II	r=0,57; p<0,001	r=0,599; p<0,001
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,129; p=0,452	r=-0,141; p=0,413
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,13; p=0,451	r=-0,202; p=0,238
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=0,005; p=0,977	r=-0,013; p=0,938
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,015; p=0,93	r=-0,007; p=0,969
Alter des Mannes	r=-0,467; p=0,173	r=0,395; p=0,258
Fertilisation	r=-0,04; p=0,818	r=-0,021; p=0,902
Schwangerschaft	r=0,17; p=0,336	r=0,045; p=0,802

**Tab. 4.11 Korrelationen zwischen der ROS-Konzentrationen (ROS I und ROS II) und den gemessenen Spermienparametern im ICSI-Kollektiv**

ICSI-Kollektiv	ROS I	ROS II
Cytur	r=0,065; p=0,653	r=0,354; p=0,011
Spermiendichte (vor Spermien-Aufb.)	r=-0,179; p=0,21	r=-0,122; p=0,393
Spermiendichte (nach Spermien-Aufb.)	r=-0,064; p=0,655	r=-0,254; p=0,073
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,197; p=0,166	r=-0,013; p=0,926
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,090; p=0,528	r=-0,125; p=0,383
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,088; p=0,537	r=0,2; p=0,159
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=0,141; p=0,325	r=0,003; p=0,986
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=0,146; p=0,307	r=0,02; p=0,888
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,095; p=0,506	r=-0,065; p=0,651
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,03; p=0,837	r=0,186; p=0,192
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,079; p=0,58	r=0,064; p=0,654
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,068; p=0,634	r=0,066; p=0,644
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=0,050; p=0,729	r=0,098; p=0,493
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=0,16; p=0,264	r=-0,34; p=0,015
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,133; p=0,353	r=-0,004; p=0,979
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,041; p=0,776	r=-0,185; p=0,194
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,134; p=0,349	r=-0,147; p=0,305
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,166; p=0,244	r=-0,259; p=0,066
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,084; p=0,557	r=-0,324; p=0,02
Vitamin A	r=0,009; p=0,962	r=-0,154; p=0,425
Vitamin E	r=-0,05; p=0,729	r=0,01; p=0,943
ROS I	%	r=0,656; p<0,001
ROS II	r=0,656; p<0,001	%
TAS I	r=-0,167; p=0,242	r=0,304; p=0,03
TAS II	r=-0,067; p=0,64	r=0,301; p=0,032
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,211; p=0,137	r=-0,037; p=0,798
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,121; p=0,398	r=-0,111; p=0,438
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,287; p=0,041	r=-0,288; p=0,04
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,155; p=0,277	r=-0,357; p=0,01
Alter des Mannes	r=0,419; p=0,024	r=0,389; p=0,037
Fertilisation	r=0,044; p=0,764	r=-0,035; p=0,809
Schwangerschaft	r=-0,108; p=0,475	r=-0,109; p=0,47

Es zeigt sich eine geringe ( $r=0,471$ ) aber hoch signifikante ( $p<0,001$ ) Korrelation von ROS II mit dem Ergebnis des Cyturtests im Gesamtkollektiv. Auch bei getrennter Betrachtung findet sich im ICSI-Kollektiv dieser signifikante ( $p=0,011$ ), geringe ( $r=0,354$ ) Zusammenhang zwischen ROS II und dem Cyturtest. Im IVF-Kollektiv findet sich sowohl mit der ROS-I-Messung hoch signifikante ( $r=0,575$ ;  $p<0,001$ ) als mit der ROS-II-Messung sehr signifikante ( $r=0,51$ ;  $p=0,001$ ) mittlere Korrelationen mit der Esterasenaktivität von Granulozyten im Ejakulat.

In der ICSI-Gruppe bestehen signifikante geringe Zusammenhänge von ROS I ( $r=-0,287$ ;  $p=0,041$ ) und ROS II ( $r=-0,288$ ;  $p=0,04$ ) mit der Spermivitalität im Eosintest vor Aufbereitung sowie ein geringer signifikanter Zusammenhang der Spermivitalität im Eosintest nach Aufbereitung mit ROS II ( $r=-0,357$ ;  $p=0,01$ ). Die gefundenen negativen Korrelationen in der ICSI-Gruppe zwischen HOS-Test vor und nach Aufbereitung, und den ROS-Messungen erreichen nicht das Signifikanzniveau. Auch in der IVF-Gruppe und im Gesamtkollektiv finden sich negative Zusammenhänge von ROS I als auch von ROS II mit der Spermivitalität und der Membranintegrität (Eosin- und HOS-Test), sowohl vor als auch nach Aufbereitung, sie erreichen aber nicht das Signifikanzniveau.

Weiterhin besteht eine sehr signifikante Korrelationen zwischen ROS II und Spermien der Motilitätskategorie D ( $r=0,302$ ;  $p=0,004$ ) im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung. Zwischen Spermien der Motilitätskategorie A ( $r=-2,47$ ;  $p=0,021$ ) und B ( $r=-0,233$ ;  $p=0,03$ ) nach Aufbereitung und ROS II zeigen sich im Gesamtkollektiv signifikante geringe Korrelationen. Bei alleiniger Betrachtung der IVF-Gruppe zeigt sich eine sehr signifikante geringe Korrelation sowohl zwischen ROS I ( $r=-0,427$ ;  $p=0,009$ ) als auch zwischen ROS II ( $r=-0,431$ ;  $p=0,009$ ) und Spermien der Motilitätskategorie B nach Spermienaufbereitung. In der ICSI-Gruppe finden sich weder vor noch nach Aufbereitung signifikante Korrelationen der Spermienmotilität mit der ROS-I- bzw. ROS-II-Messung.

Es bestehen im Gesamtkollektiv sehr signifikante, geringe Korrelationen zwischen ROS-Konzentration im Seminalplasma (ROS I) und der Chromatinkondensation im Spermatozonenkopf (CMA<sub>3</sub>-Färbung) vor ( $r=-0,295$ ;  $p=0,006$ ) und nach Aufbereitung ( $r=-0,283$ ;  $p=0,008$ ). Dieser Zusammenhang zeigt sich in der IVF-Gruppe vor Aufbereitung sehr signifikant und gering ( $r=-0,441$ ;  $p=0,007$ ), nach Aufbereitung signifikant und gering ( $r=-0,418$ ;  $p=0,011$ ) ausgeprägt.



Auch zwischen der ROS-Konzentration im Ring (ROS II) und dem Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung im Gesamtkollektiv findet sich ein Zusammenhang. Diese Korrelation ist vor Aufbereitung mittelstark ausgeprägt ( $r=-0,504$ ;  $p=0,004$ ) und nach Spermienaufbereitung ( $r=-0,411$ ;  $p<0,001$ ) gering ausgeprägt. In der IVF-Gruppe findet sich sowohl vor ( $r=-0,468$ ;  $p=0,004$ ) als auch nach ( $r=-0,464$ ;  $p=0,004$ ) Aufbereitung eine sehr signifikante, geringe Korrelation zwischen der Chromatinkondensation und der ROS-II-Messung. Die in der ICSI-Gruppe gefundenen Korrelationen zwischen den ROS-Messungen und der Chromatinkondensation (vor und nach Aufbereitung) sind ebenfalls alle negativ ausgeprägt, erreichen aber nicht das Signifikanzniveau.

Außerdem findet sich im Gesamtkollektiv ein signifikanter, geringer Zusammenhang zwischen ROS I und dem Ergebnis der TUNEL-Färbung vor ( $r=-0,253$ ;  $p=0,018$ ) und nach Aufbereitung ( $r=-0,213$ ;  $p=0,047$ ). In der IVF-Gruppe zeigt sich eine geringe, signifikante Korrelation der Apoptoserate sowohl vor Aufbereitung ( $r=0,391$ ;  $p=0,018$ ) als auch eine sehr signifikante geringe Korrelation nach Aufbereitung ( $r=0,483$ ;  $p=0,003$ ) mit ROS I. Die in der ICSI-Gruppe gefundenen positiven Korrelationen von Apoptoserate (vor und nach Aufbereitung) und ROS I erreichen nicht das Signifikanzniveau.

ROS II zeigt im Gesamtkollektiv mit dem Ergebnis der TUNEL-Färbung vor ( $r=-0,44$ ) und auch nach ( $r=-0,451$ ) Aufbereitung eine geringe Korrelation. Die im Gesamtkollektiv etwa doppelt so stark ausgeprägt ist als die Korrelation zwischen ROS I und TUNEL und mit  $p<0,001$  hoch signifikant ist. In der IVF-Gruppe finden sich bei ROS II sehr signifikante Zusammenhänge mit der Apoptoserate sowohl vor ( $r=0,471$ ;  $p=0,004$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,512$ ;  $p=0,001$ ). Der in der ICSI-Gruppe gefundene Zusammenhang zwischen ROS II und Apoptoserate ist nur nach Aufbereitung signifikant ( $r=0,324$ ;  $p=0,02$ ). Vor Aufbereitung erreicht er nicht das Signifikanzniveau ( $r=0,259$ ;  $p=0,066$ ).

Zwischen der ROS-Konzentration und der Spermienmorphologie bestehen folgende Zusammenhänge. Es zeigt sich eine geringe, signifikante Korrelation ( $r=-0,269$ ;  $p=0,012$ ) zwischen ROS II und der Anzahl an morphologisch normalen Spermatozoen im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung. Mit der Anzahl an elongierten Spermien im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung besteht eine sehr signifikante, geringe Korrelation mit ROS I ( $r=0,329$ ;  $p=0,002$ ) und mit ROS II ( $r=0,307$ ;  $p=0,004$ ). Die Zahl der morphologisch normalen Spermien im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung

korreliert gering ( $r=-0,266$ ) und signifikant ( $p=0,013$ ) mit ROS I. Die morphologisch normalen Spermien im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung zeigen eine hoch signifikante ( $p<0,001$ ), geringe ( $r=-0,486$ ) Korrelation mit ROS II. Ein entsprechender Zusammenhang findet sich in der IVF-Gruppe sowohl mit ROS I ( $r=-0,333$ ;  $p=0,047$ ) als auch mit ROS II ( $r=-0,429$ ;  $p=0,009$ ), im ICSI-Kollektiv nur mit ROS II ( $r=-0,34$ ;  $p=0,015$ ).

Betrachtet man die Zahl der amorphen Spermien im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung, so findet man eine geringe, signifikante Korrelation mit ROS I ( $r=0,232$ ;  $p=0,031$ ) und mit ROS II ( $r=0,233$ ;  $p=0,03$ ). Bei getrennter Betrachtung findet sich nur in der IVF-Gruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen ROS II und der Anzahl von amorphen Spermien ( $r=0,351$ ;  $p=0,036$ ).

Auch besteht im Gesamtkollektiv ein geringer, sehr signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Zytoplasmaabnormitäten und ROS I ( $r=0,317$ ;  $p=0,003$ ). Mit ROS II findet sich hier auch eine geringe Korrelation ( $r=0,217$ ), welche mit  $p=0,043$  noch signifikant ist.

Zwischen ROS II und dem Alter der Männer besteht eine geringe ( $r=0,394$ ) signifikante ( $p=0,013$ ) Korrelation im Gesamtkollektiv. Es besteht auch ein positiver Zusammenhang zwischen ROS I und dem Alter der Männer, dieser erreicht aber nicht das Signifikanzniveau. In der ICSI-Gruppe findet sich ebenfalls eine signifikante geringe Korrelation zwischen Alter des Mannes und ROS I ( $r=0,419$ ;  $p=0,024$ ) sowie mit ROS II ( $r=0,389$ ,  $p=0,037$ ).

Es zeigt sich auch eine mittlere Korrelation ( $r=0,678$ ) zwischen ROS I und ROS II im Gesamtkollektiv. Dieser Zusammenhang ist mit  $p<0,001$  hoch signifikant.

Es fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den ROS-Messungen und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate weder im Gesamtkollektiv noch bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe. Hierzu möchte ich auch auf Kapitel 4.8 und 5.2.5 verweisen.

## 4.6.2 Total antioxidant status (TAS)

Tab. 4.12 Total antioxidant status (TAS)

TAS in mmol/l	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
TAS I	1,58±0,43	1,29±0,5	1,41±0,5	0,008
TAS II	1,21±0,39	0,94±0,57	1,05±0,52	0,015

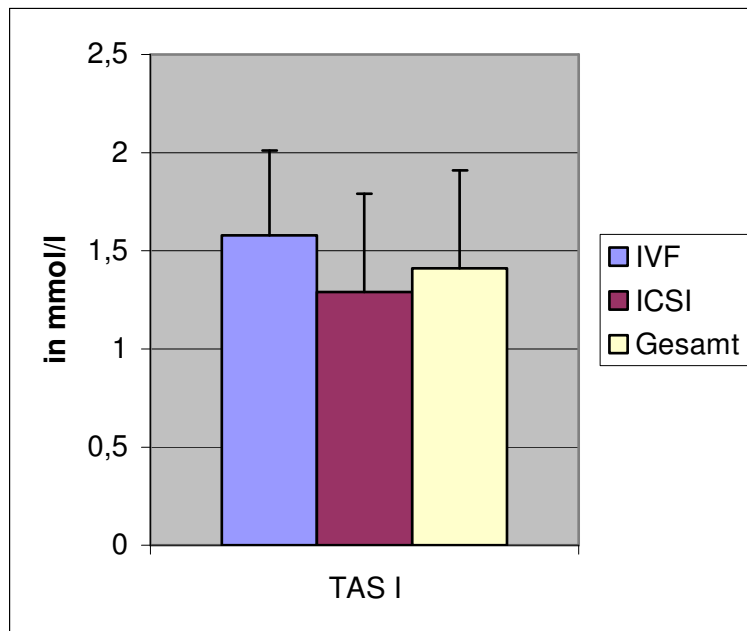


Abb. 4.11 TAS im Seminalplasma

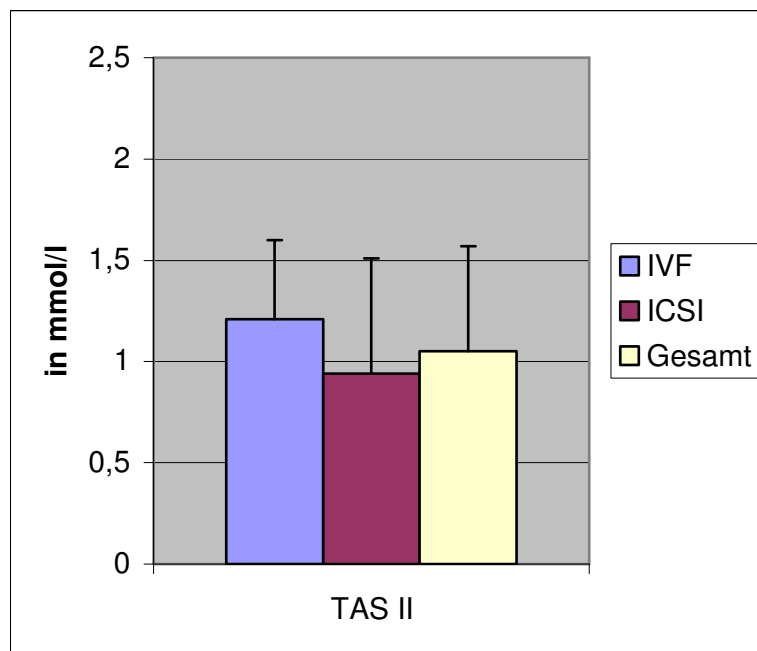


Abb. 4.12 TAS im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation

Wie in Tab. 4.12 gezeigt findet sich ein sehr signifikanter ( $p=0,008$ ) Unterschied zwischen dem total antioxidant status im Seminalplasma (TAS I) des IVF- ( $1,58\pm 0,43$ ) und des ICSI-Kollektivs ( $1,29\pm 0,5$ ). Auch der total antioxidant status im Ring (TAS II) zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p=0,015$ ) zwischen IVF- ( $1,21\pm 0,39$ ) und ICSI-Gruppe ( $0,94\pm 0,57$ ). Im Gesamtkollektiv liegt der TAS im Seminalplasma ( $1,41\pm 0,5$ ) etwas höher als im Ring ( $1,05\pm 0,52$ ).

**Tab. 4.13 Korrelationen zwischen der TAS-Konzentrationen (TAS I und TAS II) und den gemessenen Spermienparametern im Gesamtkollektiv**

Gesamt-Kollektiv	TAS I	TAS II
Cytur	r=-0,796; p<0,001	r=-0,787; p<0,001
Spermiendichte (vor Spermien-Aufb.)	r=0,294; p=0,006	r=0,094; p=0,384
Spermiendichte (nach Spermien-Aufb.)	r=0,074; p=0,495	r=0,239; p=0,025
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=0,154; p=0,155	r=-0,075; p=0,491
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=0,261; p=0,015	r=0,005; p=0,961
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=0,508; p<0,001	r=0,591; p<0,001
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,488; p<0,001	r=-0,317; p=0,003
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=0,231; p=0,032	r=-0,051; p=0,639
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=0,471; p<0,001	r=0,3; p=0,005
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=0,24; p=0,025	r=0,358; p<0,001
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,432; p<0,001	r=-0,193; p=0,074
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=0,26; p=0,015	r=0,129; p=0,234
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,064; p=0,554	r=0,031; p=0,774
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=0,417; p<0,001	r=0,285; p=0,007
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,125; p=0,247	r=0,094; p=0,388
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,66; p<0,001	r=0,461; p<0,001
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,51; p<0,001	r=0,385; p<0,001
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,61; p<0,001	r=0,548; p<0,001
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,609; p<0,001	r=0,615; p<0,001
Vitamin A	r=-0,001; p=0,993	r=-0,053; p=0,750
Vitamin E	r=0,195; p=0,07	r=0,306; p=0,004
ROS I	r=0,219; p=0,041	r=-0,024; p=0,827
ROS II	r=0,612; p<0,001	r=0,321; p=0,002
TAS I	%	r=0,673; p<0,001
TAS II	r=0,673; p<0,001	%
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=0,193; p=0,074	r=0,095; p=0,379
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=0,201; p=0,062	r=0,12; p=0,267
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=0,136; p=0,208	r=-0,146; p=0,177
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=0,02; p=0,856	r=-0,18; p=0,096
Alter des Mannes	r=0,02; p=0,902	r=-0,049; p=0,766
Fertilisation	r=-0,129; p=0,233	r=0,026; p=0,813
Schwangerschaft	r=0,296; p=0,008	r=0,016; p=0,888

**Tab. 4.14 Korrelationen zwischen der TAS-Konzentrationen (TAS I und TAS II) und den gemessenen Spermienparametern im IVF-Kollektiv**

IVF-Kollektiv	TAS I	TAS II
Cytur	r=-0,966; p<0,001	r=-0,97; p<0,001
Spermiedichte (vor Spermien-Aufb.)	r=-0,237; p=0,164	r=-0,221; p=0,196
Spermiedichte (nach Spermien-Aufb.)	r=0,181; p=0,292	r=0,257; p=0,13
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,215; p=0,208	r=-0,294; p=0,081
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=0,342; p=0,041	r=0,301; p=0,075
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=0,477; p=0,003	r=0,404; p=0,015
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,463; p=0,004	r=-0,377; p=0,023
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=0,024; p=0,89	r=0,05; p=0,771
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=0,704; p<0,001	r=0,654; p<0,001
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,143; p=0,406	r=-0,262; p=0,123
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,345; p=0,039	r=-0,309; p=0,066
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=0,006; p=0,872	r=-0,055; p=0,751
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,045; p=0,795	r=-0,002; p=0,989
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=0,107; p=0,536	r=0,096; p=0,576
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,059; p=0,734	r=-0,012; p=0,944
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,722; p<0,001	r=0,765; p<0,001
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,734; p<0,001	r=0,768; p<0,001
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,737; p<0,001	r=0,723; p<0,001
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,714; p<0,001	r=0,709; p<0,001
Vitamin A	r=0,309; p=0,385	r=0,745; p=0,013
Vitamin E	r=0,241; p=0,156	r=0,295; p=0,081
ROS I	r=0,495; p=0,002	r=0,57; p<0,001
ROS II	r=0,566; p<0,001	r=0,599; p<0,001
TAS I	%	r=0,955; p<0,001
TAS II	r=0,955; p<0,001	%
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=0,126; p=0,464	r=0,04; p=0,816
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=0,068; p=0,695	r=0,006; p=0,971
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=0,023; p=0,893	r=-0,08; p=0,642
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,018; p=0,915	r=-0,141; p=0,412
Alter des Mannes	r=0,685; p=0,029	r=-0,248; p=0,489
Fertilisation	r=-0,305; p=0,071	r=-0,297; p=0,079
Schwangerschaft	r=0,273; p=0,118	r=0,328; p=0,059

**Tab. 4.15 Korrelationen zwischen der TAS-Konzentrationen (TAS I und TAS II) und den gemessenen Spermienparametern im ICSI-Kollektiv**

ICSI-Kollektiv	TAS I	TAS II
Cytur	r=-0,751; p<0,001	r=-0,721; p<0,001
Spermiendichte (vor Spermien-Aufb.)	r=0,266; p=0,06	r=0,191; p=0,179
Spermiendichte (nach Spermien-Aufb.)	r=0,209; p=0,142	r=0,211; p=0,137
Motilität WHO-Kategorie A (vor Sp.-Aufb.)	r=0,104; p=0,466	r=0,008; p=0,956
Motilität WHO-Kategorie B (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,077; p=0,592	r=-0,027; p=0,851
Motilität WHO-Kategorie C (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,639; p<0,001	r=-0,618; p<0,001
Motilität WHO-Kategorie D (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,324; p=0,02	r=-0,327; p=0,019
Motilität WHO-Kategorie A (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,025; p=0,863	r=-0,084; p=0,558
Motilität WHO-Kategorie B (nach Sp.-Aufb.)	r=0,241; p=0,088	r=0,282; p=0,045
Motilität WHO-Kategorie C (nach Sp.-Aufb.)	r=0,504; p<0,001	r=0,494; p<0,001
Motilität WHO-Kategorie D (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,231; p=0,103	r=-0,222; p=0,118
Morphologie normal (vor Sp.-Aufb.)	r=0,195; p=0,17	r=0,199; p=0,163
Morphologie amorph (vor Sp.-Aufb.)	r=0,039; p=0,784	r=0,017; p=0,905
Morphologie normal (nach Sp.-Aufb.)	r=0,354; p=0,011	r=0,388; p=0,005
Morphologie amorph (nach Sp.-Aufb.)	r=0,083; p=0,563	r=0,09; p=0,53
CMA <sub>3</sub> -Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,394; p=0,004	r=0,405; p=0,003
CMA <sub>3</sub> -Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,205; p=0,15	r=0,3; p=0,032
TUNEL-Färbung (vor Sp.-Aufb.)	r=0,452; p=0,001	r=0,487; p<0,001
TUNEL-Färbung (nach Sp.-Aufb.)	r=0,574; p<0,001	r=0,585; p<0,001
Vitamin A	r=-0,08; p=0,682	r=0,106; p=0,585
Vitamin E	r=0,272; p=0,054	r=0,364; p=0,009
ROS I	r=-0,167; p=0,242	r=-0,067; p=0,64
ROS II	r=0,304; p=0,03	r=0,301; p=0,032
TAS I	%	r=0,887; p<0,001
TAS II	r=0,887; p<0,001	%
HOS (vor Sp.-Aufb.)	r=0,216; p=0,128	r=0,143; p=0,318
HOS (nach Sp.-Aufb.)	r=0,248; p=0,08	r=0,144; p=0,312
Eosin (vor Sp.-Aufb.)	r=-0,051; p=0,72	r=-0,17; p=0,233
Eosin (nach Sp.-Aufb.)	r=-0,18; p=0,205	r=-0,147; p=0,304
Alter des Mannes	r=-0,215; p=0,262	r=-0,054; p=0,78
Fertilisation	r=0,032; p=0,825	r=0,024; p=0,868
Schwangerschaft	r=-0,072; p=0,634	r=-0,133; p=0,377

Es findet sich eine geringe ( $r=-0,228$ ) signifikante ( $p=0,034$ ) Korrelation von TAS I mit dem pH-Wert.

Das Ergebnis des Cyturtests zeigt im Gesamtkollektiv eine hoch signifikante Korrelation ( $p<0,001$ ) sowohl mit TAS I ( $r=-0,796$ ) als auch mit TAS II ( $r=-0,787$ ). Der Cyturtest zeigt in der ICSI-Gruppe eine hoch signifikante hohe Korrelation sowohl mit TAS I ( $r=-0,751$ ;  $p<0,001$ ) als auch mit TAS II ( $r=-0,721$ ;  $p<0,001$ ). In der IVF-Gruppe zeigt sich hier eine sehr hohe und hoch signifikante Korrelation sowohl mit TAS I ( $r=-0,966$ ;  $p<0,001$ ) als auch mit TAS II ( $r=-0,970$ ;  $p<0,001$ ).

Zwischen der Spermiedichte vor Aufbereitung und TAS I findet sich eine geringe sehr signifikante Korrelation ( $r=0,294$ ;  $p=0,006$ ) im Gesamtkollektiv. Eine geringe signifikante Korrelation ( $r=0,239$ ;  $p=0,025$ ) zwischen der Spermiedichte nach Aufbereitung zeigt sich mit TAS II im Gesamtkollektiv. Bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe finden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen TAS und der Spermiedichte.

Die Zusammenhänge des Total antioxidant status im Seminalplasma (TAS I) mit der Spermienmotilität werden im Folgenden beschrieben. Vor Aufbereitung besteht eine geringe ( $r=0,261$ ) signifikante ( $p=0,015$ ) Korrelation von TAS I mit der Anzahl an Spermien der Motilitätskategorie B im Gesamtkollektiv. Vor Aufbereitung zeigen Spermien der Motilitätskategorie C eine mittlere Korrelation ( $r=0,508$ ) mit TAS I, Spermien der Motilitätskategorie D eine geringe Korrelation ( $r=-0,488$ ). Beide Korrelationen sind mit  $p<0,001$  hoch signifikant. Vor Aufbereitung findet sich in der IVF-Gruppe zwischen TAS I sowohl mit Spermien der Motilitätskategorie C ( $r=0,477$ ;  $p=0,003$ ) als auch mit Spermien der Motilitätskategorie D ( $r=-0,463$ ;  $p=0,004$ ) sehr signifikante geringe Korrelationen. In der ICSI-Gruppe zeigt TAS I vor Aufbereitung mit der Motilitätskategorie C eine hoch signifikante, mittlere Korrelation ( $r=-0,639$ ;  $p<0,001$ ), mit der Motilitätskategorie D eine signifikante, geringe Korrelation ( $r=-0,324$ ;  $p=0,02$ ).

TAS II zeigt im Gesamtkollektiv mit Spermien der Motilitätskategorie C vor Aufbereitung ebenfalls eine mittlere ( $r=0,591$ ) hoch signifikante ( $p<0,001$ ) Korrelation, mit Spermien der Motilitätskategorie D vor Aufbereitung einen geringen ( $r=-0,317$ ) sehr signifikanten ( $p=0,003$ ) Zusammenhang. Vor Aufbereitung findet sich in der IVF-Gruppe zwischen TAS II sowohl mit Spermien der Motilitätskategorie C ( $r=0,404$ ;  $p=0,015$ ) als auch mit Spermien der Motilitätskategorie D ( $r=-0,377$ ;  $p=0,023$ ) signifikante, geringe Korrelationen. In der ICSI-Gruppe zeigt TAS II vor Aufbereitung



mit Spermien der Motilitätskategorie C eine hoch signifikante mittlere Korrelation ( $r=-0,618$ ;  $p<0,001$ ), mit der Motilitätskategorie D eine signifikante geringe Korrelation ( $r=-0,327$ ;  $p=0,019$ ).

Bezüglich der Spermienmotilität nach Aufbereitung bestehen im Gesamtkollektiv folgende Korrelationen mit TAS I. Eine signifikante geringe Korrelation findet sich mit Spermien der Motilitätskategorie A ( $r=0,231$ ;  $p=0,032$ ) und der Motilitätskategorie C ( $r=0,24$ ;  $p=0,025$ ). Ein hoch signifikanter geringer Zusammenhang ( $p<0,001$ ) mit dem total antioxidant status im Seminalplasma zeigt sich bei der Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie B ( $r=0,471$ ;  $p<0,001$ ) und der Motilitätskategorie D ( $r=-0,432$ ;  $p<0,001$ ) nach Aufbereitung. In der IVF-Gruppe findet sich zwischen TAS I und Spermien der Motilitätskategorie B ( $r=0,704$ ;  $p<0,001$ ) eine hoch signifikante hohe Korrelation, mit der Motilitätskategorie D ( $r=-0,345$ ;  $p=0,039$ ) eine signifikante geringe Korrelation. In der ICSI-Gruppe zeigt sich zwischen TAS I und Spermien der Motilitätskategorie C ( $r=0,504$ ;  $p<0,001$ ) eine hoch signifikante mittlere Korrelation.

Mit TAS II zeigt die Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie B im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung eine sehr signifikante ( $p=0,005$ ) geringe ( $r=0,3$ ) Korrelation. Gering ( $r=0,385$ ), aber hoch signifikant ( $p<0,001$ ) korreliert die Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie C im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung mit TAS II. In der IVF-Gruppe findet sich zwischen TAS II und Spermien der Motilitätskategorie B ( $r=0,654$ ;  $p<0,001$ ) eine hoch signifikante mittlere Korrelation, mit Spermien der Motilitätskategorie D ( $r=-0,309$ ;  $p=0,066$ ) eine geringe, aber nicht mehr signifikante Korrelation nach Aufbereitung. In der ICSI-Gruppe besteht zwischen TAS II und Spermien der Motilitätskategorie B ( $r=0,282$ ;  $p=0,045$ ) eine geringe signifikante Korrelation, mit der Motilitätskategorie C ( $r=0,494$ ;  $p<0,001$ ) ein geringer hoch signifikanter Zusammenhang nach Aufbereitung.

Das Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung zeigt im Gesamtkollektiv mit TAS I eine mittlere Korrelation ( $r=0,66$ ) und mit TAS II eine geringe Korrelation ( $r=0,461$ ). Beide Zusammenhänge sind mit  $p<0,001$  hoch signifikant. Das Ergebnis der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Spermienaufbereitung zeigt im Gesamtkollektiv ebenfalls hoch signifikante Korrelationen ( $p<0,001$ ) mit TAS I und TAS II. Auch nach Aufbereitung ist der Zusammenhang mit TAS I mittelstark ( $r=0,51$ ), der mit TAS II gering ( $r=0,385$ ) ausgeprägt. In der IVF-Gruppe bestehen hoch signifikante ( $p<0,001$ ) hohe Korrelationen der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung mit TAS I ( $r=0,722$ ) sowie TAS II ( $r=0,765$ ). Auch nach Aufbereitung zeigt die CMA<sub>3</sub>-Färbung mit TAS I ( $r=0,734$ ) und

TAS II ( $r=0,768$ ) hoch signifikante ( $p<0,001$ ) hohe Korrelationen. In der ICSI-Gruppe besteht mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und TAS I ( $r=0,394$ ;  $p=0,004$ ), sowie TAS II ( $r=0,405$ ;  $p=0,003$ ) eine sehr signifikante geringe Korrelation. Nach Aufbereitung besteht bzgl. der CMA<sub>3</sub>-Färbung in dieser Gruppe nur noch mit TAS II ( $r=0,3$ ;  $p=0,032$ ) ein signifikanter geringer Zusammenhang, mit TAS I wird das Signifikanzniveau hier nicht erreicht ( $r=0,205$ ;  $p=0,15$ ).

Es findet sich im Gesamtkollektiv eine geringe sehr signifikante Korrelation ( $r=0,306$ ;  $p=0,004$ ) zwischen der Vitamin E Konzentration und TAS II.

Bezüglich der Korrelationen zwischen der Untersuchung des total antioxidant status und dem Ergebnis der TUNEL-Färbung möchte ich auf Tab. 4.13, Tab 4.14 und Tab 4.15 verweisen, wo alle Zusammenhänge für das Gesamtkollektiv, die IVF- und die ICSI-Gruppe, bezüglich TAS und der Anzahl an Spermien, die keine Zeichen der Apoptose bzw. einer gestörten DNA-Integrität in der TUNEL-Färbung dargestellt sind. Bezüglich dem total antioxidant status und der Spermienmorphologie (siehe hierzu auch Tab. 4.13, Tab 4.14 und Tab 4.15) findet sich im Gesamtkollektiv eine geringe, signifikante Korrelation ( $r=0,26$ ;  $p=0,015$ ) zwischen morphologisch normalen Spermien vor Aufbereitung und TAS I. Weiterhin zeigen sich eine hoch signifikante geringe Korrelation zwischen morphologisch normalen Spermien nach Aufbereitung und TAS I ( $r=0,417$ ;  $p<0,001$ ), sowie eine geringe sehr signifikante Korrelation mit TAS II ( $r=0,285$ ;  $p=0,007$ ). Bei getrennter Betrachtung findet sich im ICSI-Kollektiv eine geringe signifikante Korrelation zwischen morphologisch normalen Spermien nach Aufbereitung und TAS I ( $r=0,354$ ;  $p=0,011$ ). Mit TAS II ist dieser Zusammenhang gering und sehr signifikant ( $r=0,388$ ;  $p=0,005$ ) ausgeprägt. Im IVF-Kollektiv finden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen TAS und der Spermienmorphologie.

Es findet sich im Gesamtkollektiv außerdem eine sehr signifikanter geringer Zusammenhang zwischen TAS I und einer erfolgreichen Schwangerschaft ( $r=0,296$ ;  $p=0,008$ ). Bezüglich der Zusammenhänge zwischen den TAS-Messungen und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate möchte ich auch auf Kapitel 4.8 und 5.3.5 verweisen.

Zwischen TAS I und TAS II besteht im Gesamtkollektiv eine mittelstark ausgeprägte Korrelation ( $r=0,673$ ), die mit  $p<0,001$  als hoch signifikant zu werten ist.

## 4.7 Vitamin A und E

Im Gesamtkollektiv liegt die Vitamin-A-Menge bei  $4,54 \pm 1,51 \mu\text{g/dl}$ . Betrachtet man die IVF- und die ICSI-Gruppe getrennt voneinander, so findet sich kein signifikanter ( $p=0,972$ ) Unterschied ( $4,55 \pm 1,33 \mu\text{g/dl}$  vs.  $4,53 \pm 1,63 \mu\text{g/dl}$ ).

Es zeigen sich im Gesamtkollektiv keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Vitamin-A-Konzentration und den untersuchten Spermienparametern. Bei getrennter Betrachtung findet sich in der IVF-Gruppe eine signifikante Korrelation mit der CMA<sub>3</sub>-Färbung sowohl vor ( $r=0,707$ ;  $p=0,022$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,663$ ;  $p=0,037$ ). Weiterhin finden sich in der IVF-Gruppe signifikante hohe Korrelationen mit dem HOS-Test sowohl vor ( $r=0,741$ ;  $p=0,014$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,722$ ;  $p=0,018$ ). Es ergibt sich außerdem eine signifikante mittlere Korrelation mit dem Eosintest nach Aufbereitung ( $r=0,671$ ;  $p=0,034$ ), welche vor Aufbereitung nicht das Signifikanzniveau erreicht ( $r=0,626$ ;  $p=0,053$ ). In der ICSI-Gruppe finden sich eine signifikante geringe Korrelation von Vitamin A mit der Anzahl von Spermien der Motilitätskategorie A nach Aufbereitung ( $r=0,422$ ;  $p=0,022$ ) und mit der Anzahl von elongierten Spermien in der Morphologiebeurteilung vor Aufbereitung ( $r=-0,386$ ;  $p=0,039$ ). Zwischen Vitamin A und Spermien der Motilitätskategorie D zeigt sich in der ICSI-Gruppe eine sehr signifikante geringe Korrelation ( $r=-0,479$ ;  $p=0,009$ ).

Im Gesamtkollektiv liegt die Vitamin-E-Menge bei  $37,74 \pm 15,47 \mu\text{g/dl}$ . Betrachtet man die IVF- und die ICSI-Gruppe getrennt voneinander, so findet sich kein signifikanter ( $p=0,504$ ) Unterschied ( $36,41 \pm 15,18 \mu\text{g/dl}$  vs.  $38,68 \pm 15,75 \mu\text{g/dl}$ ).

Es zeigen sich im Gesamtkollektiv eine geringe signifikante negative Korrelation der Vitamin E-Konzentration mit der Esterasenaktivität von Granulozyten im Cyturtest ( $r=-0,215$ ;  $p=0,045$ ), sowie eine signifikante geringe Korrelation mit Spermien der Motilitätskategorie B vor Aufbereitung ( $r=0,24$ ;  $p=0,025$ ). In der IVF-Gruppe ergibt sich ein signifikanter geringer Zusammenhang zwischen der Vitamin E-Konzentration und der Schwangerschaftsrate ( $r=0,355$ ;  $p=0,039$ ). In der ICSI-Gruppe finden sich signifikante geringe Korrelationen zwischen Vitamin E und der Spermiedichte vor Aufbereitung ( $r=0,28$ ;  $p=0,047$ ), sowie mit der Anzahl von Spermien der Motilitätskategorie D nach Aufbereitung ( $r=-0,282$ ;  $p=0,045$ ) und der Anzahl von Spermien mit Zytoplasmaabnormitäten vor Aufbereitung ( $r=-0,32$ ;  $p=0,022$ ).

## 4.8 Fertilisation und Schwangerschaft

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 796 Eizellen gewonnen. Diese verteilen sich auf das IVF-Kollektiv mit 372 und auf das ICSI-Kollektiv mit 424 gewonnenen Eizellen. Im Gesamtkollektiv liegt die mittlere Anzahl der gewonnenen Oozyten bei  $9,15 \pm 5,68$ . Betrachtet man das IVF- und das ICSI-Kollektiv getrennt voneinander, so findet sich kein signifikanter ( $p=0,102$ ) Unterschied in der mittleren Anzahl der gewonnenen Eizellen ( $10,33 \pm 7,36$  vs.  $8,31 \pm 3,98$ ).

Für diese Studie konnten 456 Eizellen befruchtet werden. In der IVF-Gruppe 211, in der ICSI-Gruppe 245. Die mittlere Anzahl der fertilisierten Eizellen unterscheidet sich nicht signifikant ( $p=0,314$ ) zwischen den beiden Gruppen. Im IVF-Kollektiv liegt sie bei  $5,86 \pm 6,55$ , in der ICSI-Gruppe bei  $4,8 \pm 3$ . Im Gesamtkollektiv liegt die mittlere Anzahl der fertilisierten Oozyten bei  $5,24 \pm 4,79$ . Für das Gesamtkollektiv liegt die Fertilisationsrate bei  $56,74\% \pm 28,71\%$ . In der IVF-Gruppe liegt sie bei  $52,98\% \pm 34,34\%$ , in der ICSI-Gruppe bei  $59,46\% \pm 23,87\%$ .

Es wurden insgesamt 192 Eizellen transferiert. 81 Eizellen in der IVF-Gruppe, 111 in der ICSI-Gruppe. Die mittlere Anzahl der transferierten Oozyten liegt im Gesamtkollektiv bei  $2,21 \pm 2,13$ . Bei getrennter Betrachtung des IVF- ( $2,25 \pm 3,2$ ) und des ICSI-Kollektivs ( $2,18 \pm 0,79$ ) zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,875$ ) zwischen den Gruppen.

Die Schwangerschaftsrate liegt in der IVF-Gruppe (21 Schwangerschaften) mit  $62\% \pm 69,7\%$  signifikant ( $p=0,001$ ) höher als in der ICSI-Gruppe (9 Schwangerschaften) mit  $20\% \pm 40,1\%$ . Für das Gesamtkollektiv (30 Schwangerschaften) findet sich eine Schwangerschaftsrate von  $38\% \pm 58,2\%$ .

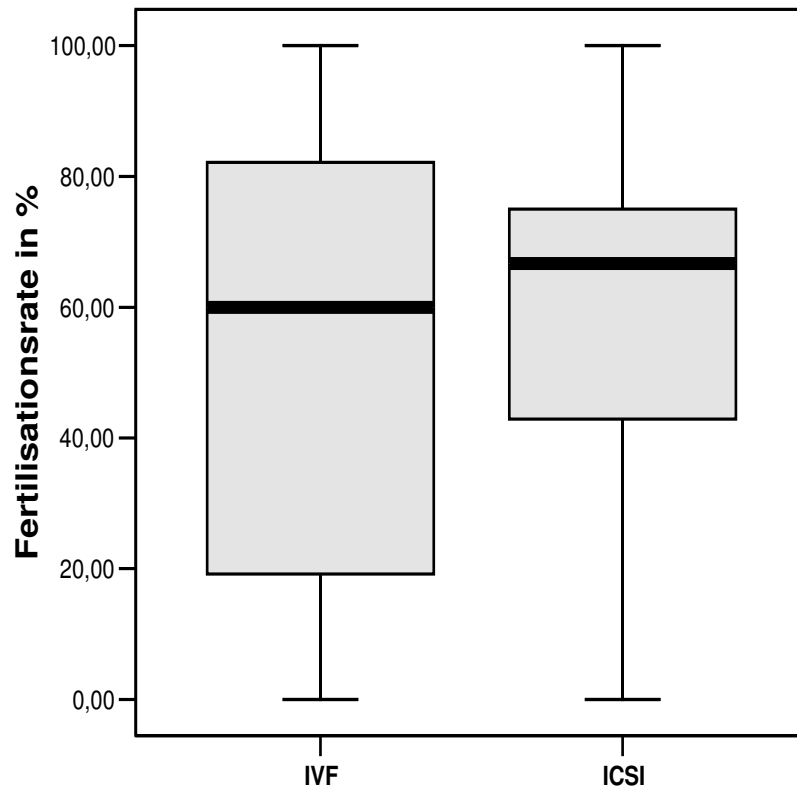


Abb. 4.13 Fertilisationsrate in %

Tab. 4.16 Fertilisation und Schwangerschaft

	IVF	ICSI	Gesamtkollektiv	Signifikanz
gewonnene Eizellen	372	424	796	%
Mittlere Anzahl der gewonnenen Eizellen	10,33±7,36	8,31±3,98	9,15±5,68	p=0,102
befruchtete Eizellen	211	245	456	%
Mittlere Anzahl der fertilisierten Eizellen	5,86±6,55	4,8±3	5,24±4,79	p=0,314
Fertilisationsrate in %	52,98±34,34	59,46±23,87	56,74±28,71	p=0,305
transferierte Eizellen	81	111	192	%
Mittlere Anzahl der transferierten Eizellen	2,25±3,2	2,18±0,79	2,21±2,13	p=0,875
Schwangerschaften	21	9	30	%
Schwangerschafts-rate in %	62±69,7	20±40,1	38±58,2	p=0,001

Eine mittlere Korrelation ( $r=0,55$ ) besteht zwischen der Anzahl der gewonnenen Oozyten und dem Alter der Frauen im Gesamtkollektiv. In der Signifikanzanalyse erweist sich dieser Zusammenhang mit  $p<0,001$  als hoch signifikant.

Die Anzahl der befruchteten Eizellen zeigt im Gesamtkollektiv eine mittlere ( $r=0,606$ ) hoch signifikante ( $p<0,001$ ) Korrelation mit der Anzahl der gewonnenen Eizellen. Außerdem findet sich im Gesamtkollektiv eine geringe ( $r=-0,363$ ) signifikante ( $p=0,023$ ) Korrelation zwischen der Anzahl der fertilisierten Eizellen und dem Alter der Frauen.

Es ergibt sich eine geringe ( $r=-0,275$ ) signifikante Korrelation ( $p=0,014$ ) zwischen dem Ergebnis des Cytur-Tests und der Schwangerschaftsrate. Eine ebenfalls geringe ( $r=0,255$ ) signifikante Korrelation ( $p=0,022$ ) zeigt sich zwischen der Spermiedichte vor Aufbereitung und der Schwangerschaftsrate. Ein geringer ( $r=0,296$ ) sehr signifikanter ( $p=0,008$ ) Zusammenhang findet sich im Gesamtkollektiv zwischen der Schwangerschaftsrate und dem total antioxidant status im Seminalplasma.

In der IVF-Gruppe zeigen sich signifikante geringe Korrelationen zwischen der Anzahl der Spermien der Motilitätskategorie D und der Zahl der befruchteten Eizellen ( $r=-0,332$ ;  $p=0,048$ ) sowie zwischen der Schwangerschaftsrate und der Vitamin E-Konzentration im Sperma ( $r=0,355$ ;  $p=0,039$ ). Außerdem ergibt sich zwischen der Fertilisationsrate und der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung ein signifikanter geringer Zusammenhang ( $r=0,364$ ;  $p=0,029$ ), welcher nach Aufbereitung aber nicht mehr das Signifikanzniveau erreicht.

In der ICSI-Gruppe besteht ein signifikanter geringer Zusammenhang zwischen der Schwangerschaftsrate und der Chromatinkondensation sowohl vor ( $r=0,297$ ;  $p=0,045$ ) als auch nach Aufbereitung ( $r=0,351$ ;  $p=0,017$ ). Außerdem finden sich hier signifikante geringe Korrelationen zwischen der Zahl der befruchteten Eizellen und der Zahl der apoptotischen Spermien nach Aufbereitung ( $r=-0,284$ ;  $p=0,043$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1 Allgemeines zu Oxidantien und Antioxidantien

Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, auf den im Rahmen dieser Studie nicht näher eingegangen wird. Es sei nur erwähnt, dass Störungen in diesem Prozess in einem steigenden Anteil von unreifen und abnormalen Spermatozoen resultiert. Ergebnisse verschiedener Studien haben gezeigt, dass unreife Spermien einen hohen Anteil an DNA-Schäden, Störungen in der Chromatinkondensation und eine gesteigerte Produktion von ROS aufweisen (SAILER et al., 1995; BIANCHI et al., 1996; DE YEBRA et al., 1998; MANICARDI et al., 1998; EVENSON et al., 2000). GHISELLI et al. konnten zeigen, dass die total antioxidant capacity im Plasma von Rauchern deutlich niedriger ist als bei Nichtrauchern. Stoppt man das Rauchen, so verliert sich dieser Effekt wieder (GHISELLI et al., 2000). KUNZLE und Kollegen machen das Rauchen anhand ihrer Ergebnisse für eine signifikante Reduktion der Samenqualität verantwortlich (KUNZLE et al., 2003). Eine Studie von AGARWAL Mitarbeitern zeigt, dass es durch Rauchen und Alkohol zu einem signifikanten Anstieg von ROS kommt (AGARWAL et al., 2005b).

SHARMA und Kollegen sehen die Ursache von oxidativem Stress in einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von reactive oxygen species (ROS) und dem total antioxidant status (TAS). Weiterhin sprechen sie einer kontrollierten ROS-Produktion eine physiologische Funktion als Signalmoleküle (second messenger) in einer Vielzahl von Zelltypen zu. Die unkontrollierte ROS-Produktion sehen sie als einen wesentlichen negativen Faktor in der Reproduktionsmedizin (SHARMA et al., 2004). Auch GARRIDO et al. (2004) sprechen dem Gleichgewicht zwischen ROS und TAS eine große Bedeutung für eine erfolgreiche Fertilisation und Schwangerschaft zu.

## **5.2 Auswirkungen der Reactive oxygen species (ROS)**

Normalerweise haben die ROS keinen wesentlichen schädlichen Einfluss auf die Spermatozoen, da sie durch im Seminalplasma vorhandene antioxidative Mechanismen abgefangen werden. Kommt es aber zum Beispiel im Rahmen einer Infektion des Urogenitaltrakts zu einer Abnahme des total antioxidant status, folgt daraus oxidativer Stress (SHEWEITA et al., 2005) mit allen resultierenden Folgen für die Fertilität des Mannes (siehe auch 2.3.4). Gleiches gilt für Patienten mit einer Varikozele. AGARWAL et al. (2006a) konnten bei diesen Männern im Vergleich zur Kontrollgruppe eine hoch signifikant erhöhte Menge an ROS messen. Außerdem war der TAS bei den Patienten hoch signifikant reduziert.

Im Folgenden wird auf Auswirkungen der reactive oxygen species (ROS) auf die Reproduktionsmedizin näher eingegangen und mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie (siehe hierzu auch Tab. 4.7; 4.8; 4.9) verglichen.

### **5.2.1 Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die konventionelle Spermaanalyse**

Die heute gültigen Richtlinien zur konventionellen Samenanalyse stammen aus den Empfehlungen der WHO aus dem Jahre 1999. Bereits 1951 wird eine Standardisierung zur Samenanalyse, die auch gewisse Mindestanforderungen enthält, von der American Fertility Association formuliert (ABARBANEL et al., 1951), welche dann 1966 von FREUND und 1971 von ELIASSON weiterentwickelt wurden. Zur Beurteilung der Spermaqualität werden das Ejakulatvolumen, der pH-Wert, die Viskosität nach Liquefizierung, die Spermiedichte und die Spermienmotilität bestimmt. Außerdem wird die Spermienvitalität, entsprechend den Empfehlungen der WHO, mit Hilfe des Eosin- und des HOS-Tests beurteilt.

Die konventionelle Spermienanalyse ist laut World Health Organization (WHO) die wichtigste klinische Laboruntersuchung zur Diagnose einer männlichen Infertilität (WHO, 1999). NALLELLA und Mitarbeiter stellten sich die Frage, ob man bei infertilen Paaren diejenigen mit einer paternalen Ursache anhand eines Sperma-Qualitäts-Scores und der Reactive oxygen species-Konzentration identifizieren kann. Sie zeigten, dass die Spermaqualität und die ROS-Konzentration signifikant negativ miteinander korrelieren, sowohl bei den infertilen Patienten als auch bei den fertilen Kontrollspendern. Außerdem kommen sie zu dem Schluss, dass beides sensitiver ist



als die konventionelle Spermaanlyse um eine Infertilität beim Mann zu identifizieren und deshalb in die Routineuntersuchung miteinbezogen werden sollte (NALLELLA et al., 2005). AGARWAL und Kollegen zeigen dass ROS ein guter Marker für eine so genannte „male factor infertility“ unabhängig von den anderen Spermienparametern ist und halten die Bestimmung der reactive oxygen species im Rahmen der Routineuntersuchung deshalb vor allem bei idiopathischer Infertilität des Mannes für sinnvoll (AGARWAL et al., 2006b). Andererseits konnten AZIZ und Kollegen mit den Spermienparametern: Motilität, Morphologie und dem „sperm deformity index“ 85% der Männer mit einer hohen ROS-Konzentration identifizieren (AZIZ et al., 2004).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der konventionellen Spermienanalyse in der vorliegenden Studie (siehe hierzu auch Tab. 4.7; 4.8; 4.9) findet man im Gesamtkollektiv eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) Korrelation zwischen der ROS-Konzentration im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (ROS II) und der Esterasenaktivität von Granulozyten im Ejakulat. Auch bei getrennter Betrachtung findet sich im ICSI-Kollektiv dieser signifikante ( $p = 0,011$ ) positive Zusammenhang zwischen ROS II und dem Cyturtest. Im IVF-Kollektiv finden sich sowohl mit der Messung im Seminalplasma (ROS I) als mit der ROS-II-Messung hoch signifikante Zusammenhänge mit der Esterasenaktivität von Granulozyten im Ejakulat. Dies ist dadurch zu erklären, dass eine Hauptquelle in der ROS-Produktion die Leukozyten darstellen (ZALATA et al., 1995; LEMKECHER et al., 2005). Auch die Arbeitsgruppe von PLANTE zeigte in einer ihrer Studien, die sie an abnormalen Spermien durchführten, dass neutrophile Granulozyten einen Hauptproduktionsort für Reactive oxygen species darstellen. Weiterhin demonstrieren sie, dass hohe ROS-Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Spermienmotilität haben (PLANTE et al., 1994). Gleiches zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie (siehe auch Tab. 4.7; 4.8; 4.9) wie im Folgenden dargelegt wird.

Es finden sich Korrelationen von ROS II mit der Spermienmotilität nach Aufbereitung. Es zeigen sich im Gesamtkollektiv sehr signifikante positive Korrelationen der reactive oxygen species (ROS II) mit Spermien der Motilitätskategorie D ( $r = 0,302$ ;  $p = 0,004$ ) und signifikant negative Korrelationen von ROS II mit der Anzahl an Spermien der Motilitätskategorie A ( $r = -0,247$ ;  $p = 0,021$ ) und B ( $r = -0,233$ ;  $p = 0,03$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von DANDEKAR und Kollegen überein, die hohe Konzentrationen von ROS vor allem bei Männern mit Asthenozoospermie zeigen (DANDEKAR et al., 2002). Gleiches fand die Arbeitsgruppe um WANG, die in

ihrer Studie einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen den Spermienparametern Motilität und Dichte mit der Konzentration von ROS im Sperma von infertilen Männern belegen (WANG et al., 2003). Auch HENKEL und Mitarbeiter zeigten eine signifikante negative Korrelation der Spermiedichte und der Spermienmotilität mit der Konzentration an ROS im Sperma von Patienten, welche für eine IVF-Behandlung vorgesehen waren (HENKEL et al., 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit fand sich in der IVF-Gruppe ein sehr signifikanter negativer Zusammenhang der Spermienmotilität (WHO-Kategorie B) nach Aufbereitung sowohl mit der ROS I- als auch mit der ROS II-Messung. In der ICSI-Gruppe finden sich weder vor noch nach Aufbereitung signifikante Korrelationen der Spermienmotilität mit der ROS I- bzw. ROS II-Messung.

Einen signifikanten Zusammenhang der ROS-Konzentration mit der Spermiedichte konnte in der vorliegenden Studie weder im Gesamtkollektiv noch bei getrennter Betrachtung (IVF- und ICSI-Gruppe) nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich im Gesamtkollektiv keine signifikante Korrelation der ROS-Konzentration im Seminalplasma (ROS I) mit der Spermienmotilität vor und nach Aufbereitung. Eine Erklärung dafür, dass sich im Gesamtkollektiv sowohl bei ROS I als auch bei ROS II keine signifikante Korrelation mit der Spermienmotilität vor Aufbereitung findet, wohl aber nach Aufbereitung könnte sein, dass durch den Aufbereitungsprozess oxidativer Stress induziert wird. Hierfür sprechen die Ergebnisse einer Studie von GRIZARD und Kollegen, in welcher sie Sperma einem erhöhten oxidativem Stress aussetzen. Sie zeigen, dass der sensitivste Parameter die progressive Motilität ist, die sich durch ROS zeit- und konzentrationsabhängig verschlechtert (GRIZARD et al., 2007). Dass sich oxidativer Stress negativ auf die Spermaqualität auswirkt, belegt auch eine Arbeit von RAMOS und Kollegen, in deren Rahmen sie Sperma von normal fertilen Männern direkt nach der Ejakulation mit Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) zusammengeben. Bereits nach einer Stunde hatten nahezu alle Spermien deutliche Membranveränderungen. Die Arbeitsgruppe kommt anhand dieser Studie zu dem Schluss, dass die Spermienmotilität ein physiologisch relevanter Marker sein könnte um von Spermien, die einer hohen Konzentration von reactive oxygen species ausgesetzt waren, diejenigen zu identifizieren, die eine intakte DNA aufweisen (RAMOS et al., 2001). Auch HAMMADEH und Mitarbeiter demonstrierten sowohl bei IVF- als auch bei ICSI-Patienten einen signifikanten negativen Zusammenhang der ROS-Konzentration sowohl mit der Spermienvitalität als auch mit der

Membranintegrität der Spermatozoen (HAMMADEH et al., 2006). Negative Zusammenhänge sowohl von ROS I als auch von ROS II mit der Spermiovitalität und der Membranintegrität (Eosin- und HOS-Test) konnten auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden, sie erreichen aber nur in der ICSI-Gruppe das Signifikanzniveau. Dort fanden sich signifikant negative Zusammenhänge der ROS I- und der ROS II-Messung mit der Spermiovitalität im Eosintest vor Aufbereitung sowie ein negativer signifikanter Zusammenhang der Spermiovitalität im Eosintest nach Aufbereitung mit der ROS II-Messung.

Die Arbeitsgruppe um BAROSSO findet bei Patienten mit einer niedrigen Spermienmotilität einen signifikant höheren Anteil an Spermatozoen mit DNA-Schäden und eine signifikant höhere Konzentration von Reactive oxygen species (ROS) als bei Patienten mit einer normalen bzw. hohen Spermienmotilität (BAROSSO et al., 2000). Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Auch hier zeigen sich im Gesamtkollektiv überwiegend hoch signifikante Zusammenhänge zwischen der Spermienmotilität und der DNA-Integrität der Spermatozoen, welche mit Hilfe der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der TUNEL-Färbung bestimmt wird. So finden sich bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Männer (Gesamtkollektiv), welche viele Spermien der WHO-Motilitätskategorie D (nicht beweglich) im Ejakulat vor der Aufbereitung haben, auch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr apoptotische Spermien (TUNEL-Färbung) bzw. Spermien, welche eine schlechte Chromatinkondensation (CMA<sub>3</sub>-Färbung) aufweisen. Dieser Zusammenhang besteht auch noch nach Aufbereitung der Spermien, bei der TUNEL-Färbung signifikant mit  $p = 0,024$ , bei der CMA<sub>3</sub>-Färbung sehr signifikant mit  $p = 0,007$ . Entsprechende Signifikanzen finden sich auch bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe. Ein Beispiel soll anhand der IVF-Gruppe erläutert werden. Hier findet man nach Aufbereitung folgende Korrelationen der Spermien der Motilitätskategorie B. Mit der Anzahl von Spermien, welche eine schlechte Chromatinkondensation aufweisen, besteht eine negative hoch signifikante mittlere Korrelation ( $r = -0,517$ ;  $p < 0,001$ ), mit der Anzahl von apoptotischen Spermien ebenfalls eine negative hoch signifikante mittlere Korrelation ( $r = -0,647$ ;  $p < 0,001$ ). Außerdem zeigt sich ein negativer sehr signifikanter geringer Zusammenhang mit der ROS-Konzentration (siehe Tab. 4.8) sowohl im Seminalplasma ( $r = -0,427$ ;  $p = 0,009$ ) als auch im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation ( $r = -0,431$ ;  $p = 0,009$ ).

SLOTTER und Kollegen fanden einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen steigendem Alter des Mannes und der Anzahl an motilen Spermien (SLOTTER et al., 2006). Ein entsprechender Zusammenhang kann anhand der Daten des Gesamtkollektivs der vorliegenden Studie auch erkannt werden, er erreicht aber nicht das Signifikanzniveau. Es kann aber gezeigt werden, dass mit steigendem Alter der Männer (Gesamtkollektiv) die Konzentration von ROS im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation signifikant ( $p=0,013$ ) ansteigt (siehe Tab. 4.7), was sich wie ermittelt werden konnte negativ auf die Spermienmotilität auswirkt.

### **5.2.2 Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Spermienmorphologie**

MOUSTAFA et al. (2004) zeigen, dass die ROS-Konzentration bei infertilen Männern sowohl im nativen Ejakulat als auch nach Zentrifugation in der Fraktion mit den Spermiovorstufen signifikant erhöht ist. Weitere Arbeiten belegen einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen einer normalen Spermienmorphologie und der Menge an ROS (WANG et al., 2003; AZIZ et al., 2004; HENKEL et al., 2005; HAMMADEH et al., 2006).

Dies kann Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt werden (siehe hierzu auch Tab. 4.7; 4.8; 4.9). Es wird ermittelt, dass mit steigender ROS-Konzentration die Anzahl der morphologisch normalen Spermatozoen im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung sowohl in der ROS I-Messung (wenn auch hier nicht signifikant) als auch in der ROS II-Messung ( $p=0,012$ ) abnimmt. Auch nach Aufbereitung bleibt dieser negative Zusammenhang zwischen der ROS I-Messung ( $p=0,013$ ) bzw. der ROS II-Messung ( $p<0,001$ ) und der Spermienmorphologie im Gesamtkollektiv erhalten. Nach Aufbereitung kann dieser negative Zusammenhang auch in der IVF-Gruppe (für ROS I und ROS II signifikant) und in der ICSI-Gruppe (nur für ROS II signifikant) gezeigt werden, vor Aufbereitung war dies nicht der Fall. Umgekehrt wird auch gezeigt, dass die Zahl der als amorph eingeordneten Spermien im Gesamtkollektiv nach Aufbereitung mit steigendem oxidativen Stress signifikant sowohl in der ROS I-Messung ( $p=0,031$ ) als auch in der ROS II-Messung ( $p=0,03$ ) zunimmt. Vor Aufbereitung kann dieser Zusammenhang im Gesamtkollektiv, der IVF- und der ICSI-Gruppe weder in der ROS I- noch in der ROS II-Messung als signifikant nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.7; 4.8; 4.9).

SAID und Kollegen erwähnen ebenfalls einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen der Spermienmorphologie und der Präsenz von Reactive oxygen species. Sie schließen daraus, dass eine abnorme Spermienmorphologie eine Möglichkeit sein könnte um Männer zu identifizieren, deren Spermien durch oxidativen Stress verursachte Schädigungen der DNA aufweisen (SAID et al., 2005). Eine Bestätigung dieser Schlussfolgerung lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu, da sich, wie gezeigt werden konnte, Reactive oxygen species negativ auf morphologisch normal geformte Spermien auswirken, sich der Chromatinkondensationsstatus der DNA im Spermium mit steigender ROS-Konzentration hoch signifikant verschlechtert und die Zahl der apoptotischen Spermatozoen hoch signifikant zunimmt (siehe hierzu auch Kapitel 5.2.3 und 5.2.4).

Bei der Untersuchung der genauen Schädigungsorte von Reactive oxygen species am Spermatozoon zeigt sich in dieser Studie, neben den bereits erwähnten wie zum Beispiel die Spermien-DNA und die Plasmamembran, vor allem das Zytoplasma. Es findet sich im Gesamtkollektiv eine sehr signifikante ( $p=0,003$ ) Korrelation ( $r=0,317$ ) zwischen dem Auftreten von Zytoplasmaabnormitäten nach Aufbereitung und der ROS-I-Konzentration sowie eine signifikante Korrelation ( $r=0,217$ ;  $p=0,043$ ) mit der ROS-II-Konzentration. Außerdem treten im Gesamtkollektiv vor Aufbereitung sehr signifikant häufiger elongierte Spermatozoen auf bei einem hohen Messergebnis sowohl in der ROS I-Messung ( $p=0,002$ ) als auch in der ROS II-Messung ( $p=0,004$ ). Auch AZIZ und Mitarbeiter untersuchten die genauen Schädigungsorte von Reactive oxygen species. Seine Arbeitsgruppe zeigt eine signifikante Korrelation der ROS-Menge mit dem Auftreten von Spermien mit Kopf- und Zytoplasmaabnormitäten sowie mit Defekten am Akrosom, Spermienmittelstück und –schwanz (AZIZ et al., 2004).

In der vorliegenden Studie kann belegt werden, dass sich durch die Spermienaufbereitung der Anteil an morphologisch normalen Spermien, betrachtet man das Gesamtkollektiv, etwa verdoppelt werden kann. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien (HAMMADEH et al., 2004).

### **5.2.3 Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Chromatinkondensation**

Im Rahmen der natürlichen Empfängnis ist der DNA-Status des Spermatozoons eine essentielle Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft (EVENSON et al., 1999; SPANO et al., 2000).

Studien haben gezeigt, dass oxidativer Stress durch eine zu hohe Reactive oxygen species-Konzentration die Chromatinkondensation im Spermium schädigt (AGARWAL et al., 2003a, 2003b; EVENSON et al., 2002). Dies kann dann zu DNA-Modifikation zum Beispiel durch „crossing over“, DNA-Fragmentation und sogar zu Apoptose (siehe Kapitel 5.2.4) führen.

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Messungen bestätigen diese Aussagen. So zeigt sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) ein sehr signifikanter ( $p=0,006$ ) negativer Zusammenhang des Chromatinkondensationsstatus der Spermien-DNA vor Aufbereitung mit dem Ergebniss der ROS-Konzentration im Seminalplasma (ROS I) sowie ein hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) Zusammenhang mit der ROS-Konzentration im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (ROS II). Auch nach Aufbereitung findet sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) ein sehr signifikanter ( $p=0,008$  bei der ROS-I-Messung) bzw. hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) bei der ROS-II-Messung) negativer Zusammenhang zwischen ROS und Chromatinkondensation. Bei getrennter Betrachtung von IVF- und ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.8; 4.9) bestätigt sich ebenfalls dieser negative Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration (ROS-I- und ROS-II-Messung) und der Chromatinkondensation sowohl vor als auch nach Aufbereitung. Das Signifikanzniveau wird aber nur in der IVF-Gruppe, hier aber sehr signifikant, erreicht.

Wie bereits unter Kapitel 3.2.3 erwähnt, zeigt der Cyturtest die Esterasenaktivität von Granulozyten an. Eine erhöhte Granulozytenkonzentration im Sperma kann ihren Ursprung zum Beispiel in einer Entzündung im Urogenitaltrakt des Mannes haben, was wiederum eine der Hauptursachen für hohe ROS-Konzentrationen im Ejakulat des Mannes darstellt (ZALATA et al., 1995; LEMKECHER et al., 2005). Ein Beispiel dafür, dass sich oxidativer Stress negativ auf die Chromatinkondensation auswirkt, zeigt im Gesamtkollektiv der hoch signifikante ( $p<0,001$ ) positive Zusammenhang zwischen dem Cyturtest und der Anzahl an Spermien mit schlecht kondensierter DNA sowohl vor als auch nach Spermienaufbereitung. Diese Korrelation ist auch bei

getrennter Betrachtung in der IVF-Gruppe (hoch signifikante, hohe Korrelation) und in der ICSI-Gruppe (positive Korrelation, aber nicht signifikant) zu finden.

Dass eine Störung der Chromatinkondensation der Spermien-DNA zu einer erhöhten Apoptoserate bzw. zu vermehrtem Auftreten von DNA-Strangbrüchen führen kann, wurde bereits erwähnt und bestätigt sich durch Zusammenhänge, welche im Rahmen dieser Studie ermittelt wurden. So findet man im Gesamtkollektiv hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) positive Korrelationen der Anzahl der Spermien mit einer schlechten Chromatinkondensation und der Anzahl der apoptotischen Spermien sowohl vor als auch nach Aufbereitung. Gleiches entdeckt man bei getrennter Betrachtung der IVF-Gruppe (vor Aufbereitung  $p < 0,001$ , nach  $p = 0,001$ ) und der ICSI-Gruppe (vor Aufbereitung  $p < 0,001$ , nach  $p = 0,012$ ). Des Weiteren zeigen sich im Gesamtkollektiv bei beiden Gruppen bzgl. der DNA-Integrität, des Kondensationsstatus und der Fragmentationsrate signifikante bzw. hoch signifikante positive Korrelationen mit den Ergebnissen der ROS I- und ROS II-Messung.

Wie schon erwähnt, halten SAID et. al. es für eine gute Möglichkeit Spermatozoen, welche Schädigungen der DNA-Integrität hervorgerufen durch oxidativen Stress aufweisen, durch Untersuchung der Spermienmorphologie zu identifizieren (SAID et al., 2005). Auf diese Zusammenhänge wurde bereits unter Kapitel 5.2.2 eingegangen und werden deshalb hier nicht näher ausgeführt.

#### **5.2.4 Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Apoptoserate bei Spermatozoen**

Bevor näher auf die Auswirkungen von Reactive oxygen species eingegangen wird, sollen die Zusammenhänge, welche sich im Rahmen dieser Studie zwischen der Apoptoserate und den anderen Spermienparametern zeigen nicht unerwähnt bleiben. So stehen die Ergebnisse anderer Studien, welche ermittelten, dass die Apoptoserate in keinem Zusammenhang mit der Spermienqualität zu stehen scheint (RICCI et al., 2002; CARRELL et al., 2003), in klarem Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es konnte belegt werden, dass bei einer erhöhten Esterasenaktivität von Granulozyten im Ejakulat sowohl vor als auch nach Spermienaufbereitung hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr apoptotische Spermien auftreten. Dies ist sowohl im Gesamtkollektiv (mittlere Korrelation), sowie auch bei getrennter Betrachtung von IVF-Gruppe (hohe Korrelation) und ICSI-Gruppe (mittlere

Korrelation) der Fall. Eine Erklärung für diese Zusammenhänge ist zum Beispiel eine Entzündung im Urogenitaltrakt des Mannes, welche wiederum eine der Hauptursachen für hohe ROS-Konzentrationen im Ejakulat des Mannes darstellt (ZALATA et al., 1995; LEMKECHER et al., 2005). Eine hohe ROS-Konzentration zieht wiederum eine erhöhte Apoptoserate nach sich, wie im Rahmen dieser Studie gezeigt wird (siehe Tab. 4.7; 4.8; 4.9).

Weiterhin finden sich im Gesamtkollektiv hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) positive Zusammenhänge zwischen der Spermienmotilität vor Aufbereitung (WHO-Kategorie C und D) und der Anzahl der apoptotischen Spermatozoen. Auch nach Aufbereitung zeigen sich im Gesamtkollektiv Korrelationen zwischen Spermienmotilität und Apoptoserate. Diese sind in den WHO-Kategorien B und C sehr signifikant, in der WHO-Kategorie D signifikant ausgeprägt. Bei getrennter Betrachtung der beiden Gruppen konnte sowohl in der IVF- als auch in der ICSI-Gruppe ermittelt werden, dass sich mit steigender Anzahl von Spermien mit einer schlechten Motilität auch die Apoptoserate erhöht. Gleiches finden HAN-MING und Kollegen, die zwischen der Anzahl von apoptotischen Spermatozoen eine negative Korrelation mit der Spermienmotilität, der Spermienvitalität sowie morphologisch normalen Spermien ermitteln (HAN-MING et al., 2002). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HAN-MING et al. finden sich in dieser Studie auch negative Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und einer normalen Spermienmorphologie, welche aber im Gesamtkollektiv weder vor noch nach Aufbereitung das Signifikanzniveau erreichen. HAMMADEH und Kollegen ermitteln in einer früheren Arbeit einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen der Anzahl der apoptotischen Spermien und der Spermienvitalität bzw. der Membranintegrität der Spermien (HAMMADEH et al., 2006). In dieser Studie ist der negative Zusammenhang zwischen Apoptoserate und Membranintegrität nur vor Aufbereitung im Gesamtkollektiv signifikant ausgeprägt. Nach Aufbereitung erreicht er nicht mehr das Signifikanzniveau.

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Spermienqualität stellt eine gute Chromatinkondensation im Spermienkopf dar, für die im Gesamtkollektiv in dieser Studie eine hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) negative Korrelation mit der Apoptoserate, sowohl vor als auch nach Spermienaufbereitung, berechnet wird. Gleiches entdeckt man bei getrennter Betrachtung der IVF-Gruppe (vor Aufbereitung  $p < 0,001$ , nach  $p = 0,001$ ) und der ICSI-Gruppe (vor Aufbereitung  $p < 0,001$ , nach  $p = 0,012$ ). Dies bestätigt die Ergebnisse von AGARWAL und Kollegen, welche zeigen dass durch



ROS verursachte Schädigungen der DNA den Prozess der Apoptose beschleunigen (AGARWAL et al., 2003b).

Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Reactive oxygen species und Apoptose sind zahlreich. SHARMA et al. (2004) zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und DNA-Schäden bzw. Apoptose. GARRIDO ermittelte mit seiner Arbeitsgruppe, dass ROS, sei es nun durch eine erhöhte ROS-Konzentration oder durch einen Mangel an antioxidativen Stoffen (TAS), eine Lipidperoxidation induzieren und so die Spermienmembran schädigen kann, was einen vorzeitigen Zelltod nach sich zieht (GARRIDO et al., 2004).

In einer Studie von RAMOS und Kollegen wird Sperma von normal fertilen Männern nach der Ejakulation mit Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) zusammengegeben. Hierdurch kann ein signifikanter Anstieg an Spermien mit DNA-Strangbrüchen gemessen werden (RAMOS et al., 2001). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch eine aktuelle Studie von GRIZARD und Mitarbeitern. Auch sie setzten Sperma einem erhöhten oxidativen Stress aus und konnten dadurch eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentationen und der Apoptoserate der Spermien dokumentieren (GRIZARD et al., 2007).

Eine Studie von WANG und Kollegen zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Apoptoserate und oxidativem Stress, verursacht durch Reactive oxygen species im Sperma von infertilen Männern (WANG et al., 2003). Auch MOUSTAFA et al. (2004) konnten belegen, dass die Apoptoserate bei infertilen Männern signifikant mit der ROS-Konzentration korreliert. In ihrer Studie war dies nicht nur im Nativsperma der Fall, sondern auch in der Fraktion mit reifen Spermatozoen und in der mit Spermiovorstufen nach Zentrifugation.

In der vorliegenden Studie wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und der Anzahl von apoptotischen Spermatozoen gefunden. Es zeigt sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) eine signifikante positive Korrelation zwischen der Apoptoserate, sowohl vor als auch nach Spermienaufbereitung, und der ROS-Konzentration im Seminalplasma (ROS I). Auch bei der Messung der ROS-Konzentration im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (ROS II) findet sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) eine hier hoch signifikante ( $p < 0,001$ ) positive Korrelation mit der Apoptoserate der Spermien sowohl vor als auch nach Aufbereitung. Bei getrennter Betrachtung von IVF- und ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.8;

4.9) erkennt man ebenfalls positive Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und der ROS-Konzentration im Rahmen beider ROS-Messungen.

Eine Studie von SMITH und Mitarbeitern zeigt eine signifikante Korrelation bei Patienten mit Varikozele und dadurch erhöhter Konzentration an Reactive oxygen species und dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen (SMITH et al., 2006). Auch wenn in der vorliegenden Studie keiner der untersuchten Männer eine Varikozele hatte, bestätigen die Ergebnisse doch die Arbeit von SMITH et al., indem gezeigt wird, dass hohe ROS-Konzentrationen zu einer erhöhten Apoptoserate führen.

Eine Erklärung für die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von SCHMID und Kollegen, welche eine signifikant höhere Anzahl an DNA-Strangbrüchen bei Spermatozoen mit steigendem Alter der Männer ermittelten (SCHMID et al., 2007), findet sich in dieser Arbeit. Es kann im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) eine signifikante positive Korrelation ( $p=0,013$ ) zwischen dem Alter des Mannes und der ROS-Konzentration im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation ermittelt werden. Auch mit der ROS-Konzentration im Seminalplasma zeigt sich ein positiver Zusammenhang, dieser erreicht aber im Gesamtkollektiv nicht das Signifikanzniveau. Im ICSI-Kollektiv (siehe Tab. 4.9) findet sich sowohl mit ROS I als auch mit ROS II eine signifikante positive Korrelation zum Alter des Mannes.

### **5.2.5 Auswirkung der Reactive oxygen species (ROS) auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate**

Es besteht kein Zweifel daran, dass Spermienparameter wie die Spermienmorphologie, die Ergebnisse der konventionellen Spermaanlyse, die Chromatinkondensation und die Zahl der apoptotischen Spermatozoen einen wesentlichen Einfluss auf das Eintreten einer Schwangerschaft sowohl in vivo als auch in vitro haben. So fanden HOST und Kollegen in ihren Studien signifikant negative Korrelationen zwischen der Apoptoserate und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate in einem von ihnen untersuchten IVF-Kollektiv (HOST et al., 2000a, 2000b). Eine Studie von MURIEL und Mitarbeitern ermittelte sowohl bei den mit IVF als auch bei den mit ICSI behandelten Patienten einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Spermatozoen mit fragmentierter DNA und der Fertilisationsrate sowie der Implantationsrate der befruchteten Oozyten. In der ICSI-Gruppe konnten sie außerdem eine signifikant negative Korrelation zwischen

der DNA-Fragmentationsrate und einer erfolgreichen Schwangerschaft zeigen. In der IVF-Gruppe konnte diese Korrelation nicht nachgewiesen werden, was sie auf die natürlichen Selektionsmechanismen (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.2) vor dem Eizelltransfer zurückführten (MURIEL et al., 2006). Ähnliches findet sich in der vorliegenden Arbeit. Es kann in der ICSI-Gruppe gezeigt werden, dass die Zahl der befruchteten Eizellen signifikant abnimmt, je mehr apoptotische Spermien in der TUNEL-Färbung (sowohl vor als auch nach Aufbereitung) gemessen werden. In der IVF-Gruppe wird auch ein signifikanter positiver Zusammenhang ( $r=0,364$ ;  $p=0,029$ ) der Fertilisationsrate mit der Zahl der Spermien, die keine Störung der DNA-Integrität in der TUNEL-Färbung zeigen, ermittelt. Dieser ist aber nur vor Aufbereitung signifikant. In der vorliegenden Studie können im Gesamtkollektiv keine signifikanten Zusammenhänge der Apoptoserate von Spermatozoen weder mit der Fertilisations- noch mit der Schwangerschaftsrate gezeigt werden. Auch HENKEL und Kollegen fanden in ihren Arbeiten keine signifikante Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Fertilisationsrate. Zwischen der Schwangerschaftsrate und der Apoptoserate war der Zusammenhang allerdings signifikant (HENKEL et al., 2003, 2004).

Es werden in der vorliegenden Arbeit aber signifikante Korrelationen mit anderen Spermienparametern ermittelt. So findet sich im Gesamtkollektiv eine signifikante negative Korrelation zwischen der Esterasenaktivität von Granulozyten im Ejakulat (Cyturtest) und der Schwangerschaftsrate. Außerdem zeigt sich im Gesamtkollektiv eine signifikante positive Korrelation der Spermindichte vor Aufbereitung mit der Schwangerschaftsrate. Es finden sich noch weitere Korrelationen zwischen der Schwangerschaftsrate und den Spermienparametern, welche für eine gute Spermienqualität sprechen; diese erreichen allerdings nicht das Signifikanzniveau.

Betrachtet man die Summe der Auswirkungen von Reactive oxygen species (ROS) auf die Spermienparameter, dann liegt es nahe, dass ROS sich auch negativ auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate auswirkt.

Die Arbeitsgruppe um LOFT zeigte, dass durch oxidativen Stress verursachte Schädigungen der Spermien-DNA die Fruchtbarkeit signifikant negativ beeinflussen (LOFT et al., 2003). Eine Studie von DURU und Mitarbeitern konnte belegen, dass sich eine hohe ROS-Konzentration und die damit verbundene Schädigung der Spermienplasmamembran ungünstig auf die Fertilisationsrate auswirkt (DURU et al., 2000).

Auch die Arbeitsgruppe von HAMMADEH fand eine signifikant negative Korrelation zwischen der Konzentration von Reactive oxygen species im Seminalplasma und der Fertilisationsrate sowohl bei IVF- als auch bei ICSI-Patienten (HAMMADEH et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wird nach Zusammenhängen zwischen der ROS-Konzentration sowohl im Seminalplasma (ROS I) als auch im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (ROS II) und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate gesucht. Es können keine signifikanten Korrelationen, weder im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.7) noch bei getrennter Betrachtung von IVF- und ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.8; 4.9), ermittelt werden, wenn sich auch im Gesamtkollektiv bei ROS I und ROS II ein negativer Zusammenhang mit der Fertilisationsrate abzuzeichnen scheint, der bei ROS II ( $p=0,063$ ) sogar fast das Signifikanzniveau erreicht.

In einer Metaanalyse von AGARWAL und Kollegen mit IVF-Patienten konnten sie zeigen, dass sich die Konzentration an Reactive oxygen species signifikant negativ auf die Fertilisationsrate auswirkt. Sie halten es außerdem für sinnvoll eine ROS-Messung vor der IVF-Behandlung durchzuführen um auf das zu erwartende „outcome“ schließen zu können (AGARWAL et al., 2005a), was meiner Meinung nach aber nur in einem Teil der Fälle möglich sein wird, da bei infertilen Männern auch häufig das Ejakulatvolumen so gering ist, dass nicht genug Material für eine Untersuchung und eine IVF-Behandlung zur Verfügung steht.

SHARMA und Mitarbeiter ermittelten ebenfalls, dass sich Reactive oxygen species negativ auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate auswirken und dass es durch zu hohe ROS-Konzentrationen im Genitaltrakt der Frau zu gynäkologischen Erkrankungen kommt, welche sich zusätzlich zum paternalen Faktor, ungünstig auf den Eintritt einer Schwangerschaft auswirken können (SHARMA et al., 2004).

In einer Studie von YANG und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass selbst nach erfolgter Fertilisation die ROS-Konzentration noch einen entscheidenden Einfluss hat. Untersucht wurden noch nicht geteilte befruchtete Eizellen und bereits geteilte befruchtete Eizellen. In den apoptotischen Eizellen war die ROS-Konzentration signifikant höher als in den nicht apoptotischen (YANG et al., 1998).

BEDAIWY und Kollegen beschrieben eine schlechtere Entwicklung der Blastozyste eines Maus-Embryos, welcher in eine Kultur (hydrosalpingeal fluid) mit hoher ROS-Konzentration gebracht wurde (BEDAIWY et al., 2002).

Auch in der vorliegenden Studie kommt es mit steigender ROS-Konzentration im Seminalplasma (ROS I) zu einer steigenden Abortrate. Dieser Zusammenhang ist allerdings nicht signifikant.

Zu bedenken ist auch, dass der Embryo in den verschiedenen Stadien seiner Entwicklung eine unterschiedliche Sensibilität für oxidativen Stress zeigt (SHARMA et al., 2004), was wahrscheinlich an unterschiedlichen Schwellenwerten für das Eingreifen von Abwehrmechanismen gegen Reactive oxygen species liegt (MORALES et al., 1999).

Andererseits besitzt die befruchtete Eizelle auch Mechanismen um defekte Spermien-DNA zu reparieren und um so Schäden, hervorgerufen zum Beispiel durch Reactive oxygen species zu beheben (MATSUDA et al., 1989). ASHWOOD-SMITH und Kollegen konnten diese Reparaturmechanismen der Eizelle sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen (ASHWOOD-SMITH et al., 1996).

### **5.3 Auswirkungen des Total antioxidant status (TAS)**

Im Folgenden werden die Auswirkungen des Total antioxidant status (TAS) auf die Reproduktionsmedizin näher beleuchtet und mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie verglichen. Ergebnisse zum Beispiel von SMITH und Kollegen zeigen, dass es wahrscheinlich sinnvoller ist nur den Total antioxidant status zu messen, statt die Konzentration jedes Antioxidanz einzeln zu bestimmen. Er begründet dies damit, dass das Zusammenspiel der Antioxidantien bei der Einzelmessung nicht erfasst wird (SMITH et al., 1996). Trotzdem wird im Folgenden auch auf die Wirkung von einzelnen antioxidativen Stoffen eingegangen, da diese zum Teil an unterschiedlichen Stellen im Bereich der Reproduktionsmedizin einen positiven Effekt haben.

Das im Folgenden nicht speziell auf die Auswirkungen von Zink und Selen eingegangen wird (für allgemeine Angaben siehe Kapitel 2.3.5.2), liegt daran, dass durch einen Strohmausfall die Kühlkette der Proben, die zur Zink- und Selenbestimmung bereitgestellt waren, unterbrochen wurde. Die Messungen wurden trotzdem durchgeführt, die Ergebnisse wurden jedoch verworfen, da bei einem Großteil die Konzentrationen von Zink und Selen im Spermium trotz Bestrahlung mit maximalem Neutronenfluss ( $1,6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) unter der Nachweisgrenze lagen (bei der Neutronen-Aktivierungsmethode im Nanogramm-Bereich) und so nicht verwertet werden konnten. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von KAMPA und Kollegen zeigten Gegenteiliges. Es wurde keine Veränderung der Total Antioxidant Capacity (TAC) nach zweimaligem Auftauen und Einfrieren festgestellt. Auch bei Proben, die bei Raumtemperatur für vier Stunden lagerten blieb die TAC gleich (KAMPA et al., 2002).

#### **5.3.1 Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die konventionelle Spermaanalyse**

Da eine Hauptquelle der ROS-Produktion, wie bereits unter Kapitel 5.2.1 erwähnt, die Leukozyten bzw. neutrophile Granulozyten darstellen (PLANTE et al., 1994; ZALATA et al., 1995; LEMKECHER et al., 2005), erklären sich dadurch die hoch signifikanten ( $p < 0,001$ ) Zusammenhänge des Cyturtests mit den TAS I- und TAS II-Messungen im Gesamtkollektiv (hohe Korrelation), der IVF-Gruppe (sehr hohe Korrelation) und der ICSI-Gruppe (hohe Korrelation).

Nach den Ergebnissen einiger Arbeitsgruppen ist ein niedriger total antioxidant status vor allem bei infertilen Männern zu finden, wobei dies besonders bei Spermaproben mit schlechten Motilitätswerten auffällig war (LEWIS et al., 1995; SMITH et al., 1996). Bestätigt wurde dies durch eine Studie von KOCA und Kollegen, welche einen hoch signifikanten positiven Zusammenhang ( $p=0,001$ ) zwischen dem total antioxidant status und der Spermienmotilität fand (KOCA et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit diesen Aussagen überein. Es zeigt sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.11) ein hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) Zusammenhang zwischen der Anzahl der motilen Spermien vor Aufbereitung (bei der WHO-Kategorie C positive, bei D negative Korrelation) sowohl mit der TAS-Konzentration im Seminalplasma (TAS I) als auch mit der im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (TAS II). Nach Aufbereitung, was für die Techniken der Reproduktionsmedizin eher von Bedeutung ist, finden sich in allen WHO-Motilitätskategorien signifikante bzw. hoch signifikante Korrelationen sowohl mit der TAS I- als auch mit der TAS II-Messung (WHO-Kategorie A, B, C positive Korrelationen; WHO-Kategorie D negative Korrelationen). In der getrennten Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.12; 4.13) finden sich ebenfalls signifikante bis hoch signifikante Korrelationen der Spermienmotilität, sowohl vor als auch nach Aufbereitung, mit den Messungen (TAS I und TAS II) des total antioxidant status (näheres siehe Kapitel 4.6.2).

Anhand von in-vitro-Studien konnte andererseits aber auch gezeigt werden, dass sich durch eine Zugabe von Antioxidantien zum Kulturmedium der negative Effekt von ROS auf die Spermienmotilität reduzieren lässt und die Spermien-Eizellen-Fusion verbessert werden kann (IRVINE, 1996; PARINAUD et al., 1997). Auch ROLF und Mitarbeiter untersuchten in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie, ob sich eine hoch dosierte orale Gabe von Vitamin C und E über eine Zeit von 56 Tagen positiv auf die Spermienparameter von infertilen Männern auswirkt. Untersucht wurden Spermindichte, Spermienmotilität, Spermiovitalität und das Ejakulatvolumen. Es wurde keine Verbesserung der gemessenen Spermienparameter festgestellt. Lediglich durch eine Verlängerung der Abstinenzzeit von zwei auf sieben Tage vor Abgabe der Spermaprobe verbesserte die Parameter Spermindichte, Spermienmotilität und Ejakulatvolumen (ROLF et al., 1999). Dem widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Es finden sich in der ICSI-Gruppe (siehe Kapitel 4.7) sowohl bei Vitamin A (sehr signifikant) als auch bei Vitamin E (signifikant) negative Zusammenhänge mit dem Auftreten von Spermien

mit schlechter Motilität (WHO-Kategorie D). Ein Zusammenhang zwischen Motilität und Vitamin A/E kann in der IVF-Gruppe zwar nicht signifikant gezeigt werden, es findet sich aber ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen Vitamin E und der Schwangerschaftsrate ( $r=0,355$ ;  $p=0,039$ ). Da gerade bei der IVF-Methode die Spermienmotilität aber eine wesentliche Rolle spielt, könnte dieser Zusammenhang auch für eine Verbesserung der Spermienmotilität in der IVF-Gruppe sprechen. Außerdem zeigt sich in der ICSI-Gruppe ein signifikant positiver Zusammenhang ( $r=0,422$ ;  $p=0,022$ ) zwischen Vitamin A und Spermien mit guter Motilität nach Aufbereitung (WHO-Kategorie A). Auch die Verbesserung der Spermiovitalität kann bestätigt werden, wie die Ergebnisse in der IVF-Gruppe zeigen. Dort finden sich zwischen Vitamin A und den Vitalitätstests (siehe Kapitel 4.7) signifikante mittlere (Eosintest) bzw. hohe (HOS-Test) Korrelationen.

SULEIMAN und Kollegen berichteten von einer signifikanten Verbesserung der Spermienmotilität bei Männern mit Asthenozoospermie nach Gabe von Vitamin E über einen Zeitraum von sechs Monaten. In seiner randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppel-blinden Studie wurden 11 von 52 Frauen in der Gruppe mit der Vitamin E Therapie schwanger, während in der Placebo-Gruppe keine Schwangerschaft eintrat (SULEIMAN et al., 1996). Den Unterschied in beiden Studien erklären ROLF und Mitarbeiter damit, dass eine Behandlungsdauer von 56 Tagen nicht ausreichend ist um eine Verbesserung der Spermienparameter zu erreichen (ROLF et al., 1999). Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von ESKENAZI und Kollegen, welche ermittelten, dass die Spermaqualität mit dem Antioxidantiengehalt der Nahrung korreliert. Sie fanden eine signifikante bessere Spermienmotilität (v. a. Spermien der Motilitätskategorie A) und Spermiedichte in der Gruppe mit einem hohen Antioxidantiengehalt der Nahrung (ESKENAZI et al., 2005).

Anhand von Tierversuchen konnten ENGEL und Kollegen zeigen, dass bei Vitamin E Hypovitaminosen vermehrt pathologische Spermatozoen auftreten und gegenüber ROS eine verminderte Resistenz besteht (ENGEL et al., 1985). So fanden auch AGARWAL und Mitarbeiter eine positive Auswirkung von Vitamin E, vor allem in Kombination mit anderen Antioxidantien wie zum Beispiel Selen, auf die Spermienmotilität (AGARWAL et al., 2004).



### **5.3.2 Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Spermienmorphologie**

Es fanden sich nur wenige Studien, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem total antioxidant status und der Spermienmorphologie untersuchten und belegen konnten. So fanden zum Beispiel die Arbeitsgruppen um PASQUALOTTO und KOCA, dass ein niedriger total antioxidant status mit schlechter Spermienmorphologie einhergeht (PASQUALOTTO et al., 2000; KOCA et al., 2003). Dies kann durch die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hier finden sich im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.11), sowohl vor (nur mit TAS I-Messung signifikant) als auch nach Aufbereitung (mit TAS I hoch signifikant, mit TAS II sehr signifikant) positive Zusammenhänge zwischen der Anzahl von morphologisch normalen Spermien und dem TAS. Bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.12; 4.13) bestätigt sich der positive Zusammenhang zwischen total antioxidant status und morphologisch normalen Spermien nur in der ICSI-Gruppe nach Aufbereitung signifikant, hier aber sowohl in der TAS I- als auch in der TAS II-Messung.

Die Arbeitsgruppe um AGARWAL fand einen positiven Zusammenhang zwischen der Vitamin E Konzentration und der Spermienmorphologie (AGARWAL et al., 2004). Dies bestätigt sich in der vorliegenden Studie nur in der ICSI-Gruppe. Hier findet sich eine signifikante negative Korrelation ( $r=-0,32$ ;  $p=0,022$ ) zwischen der Vitamin E Konzentration und dem Auftreten von Zytoplasmaabnormalitäten bei Spermatozoen vor Aufbereitung. Außerdem zeigt die Vitamin A Konzentration eine signifikante negative Korrelation ( $r=-0,386$ ;  $p=0,039$ ) mit dem Auftreten von elongierten Spermien vor Aufbereitung in dieser Gruppe.

AKMAL und Kollegen zeigten, dass eine orale Zufuhr von Vitamin C die Spermienmorphologie bei infertilen Männern signifikant verbessern kann (AKMAL et al., 2006). Die Patienten in der vorliegenden Arbeit erhielten zwar keine orale Vitamin-Substitution, ein entsprechender Zusammenhang wäre aber anhand der gewonnenen Daten denkbar.

### **5.3.3 Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Chromatinkondensation**

SILVER et al. (2005) untersuchten in einer Studie den Effekt von oral zugeführtem Vitamin C, Vitamin E und  $\beta$ -Karotin (ein Pro-Vitamin von Vitamin A) auf die Chromatinkondensation von gesunden Männern. Es konnte keine Verbesserung der Chromatinintegrität festgestellt werden, wobei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass dies nicht ausschließt, dass eine orale Zufuhr von Antioxidantien bei Männern mit Fertilitätsproblemen eine Verbesserung der Chromatinkondensation verursacht. In der vorliegenden Studie kann die Vermutung einer positiven Auswirkung des total antioxidant status bei infertilen Männern bekräftigt werden. Es finden sich sowohl im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.11), als auch bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe (siehe Tab. 4.12; 4.13) signifikante bis hoch signifikante positive Zusammenhänge zwischen TAS und der Anzahl von Spermien die in der CMA<sub>3</sub>-Färbung eine gut kondensierte DNA aufweisen. Diese Korrelationen finden sich sowohl bei den Werten des total antioxidant status im Seminalplasma (TAS I) als auch bei denen, die im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation (TAS II) gemessen werden. Bei der Untersuchung der einzelnen antioxidativ wirksamen Stoffe, zeigt sich in dieser Studie ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Vitamin A Menge und der Anzahl von Spermien mit einer gut kondensierten Chromatinstruktur, sowohl vor ( $r=0,707$ ;  $p=0,022$ ) als auch nach ( $r=0,663$ ;  $p=0,037$ ) Aufbereitung in der IVF-Gruppe. Auch dieser Zusammenhang gibt Grund zu der Annahme, dass sich der total antioxidant status positiv auf die Chromatinkondensation auswirkt; aber es sind wohl noch weitere Studien nötig, um den Effekt von Antioxidantien auf die Chromatinkondensation der Spermien-DNA zu sichern.

### **5.3.4 Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die DNA-Integrität und die Apoptoserate bei Spermatozoen**

Auch ein niedriger total antioxidant status kann durch das entstehende Ungleichgewicht mit der ROS zu einer Schädigung durch Lipidperoxidation führen, was letztendlich zur Apoptose führt (GARRIDO et al., 2004). In der vorliegenden Studie bestätigt sich dieser Zusammenhang. Anhand der durchgeführten Messungen zeigen sich überwiegend hoch signifikante positive Korrelationen (siehe Tab. 4.11;

4.12; 4.13) zwischen dem total antioxidant status, sowohl im Seminalplasma als auch im Ring nach Dichtegradientenzentrifugation, und der Anzahl von Spermien, die in der TUNEL-Färbung keine Zeichen einer gestörten DNA-Integrität oder einer Apoptose zeigen. Dieser, die Apoptoserate senkende Effekt des TAS, zeigt sich sowohl vor als auch nach Aufbereitung.

GRECO et al. (2005a) gaben in einer Studie einer Gruppe von Patienten mit erhöhter Anzahl an Spermatozoen mit fragmentierter DNA oral die Antioxidantien Vitamin C und Vitamin E (jeweils 1g pro Tag für zwei Monate) oder ein Placebopräparat. In der Therapiegruppe kam es zu einer signifikanten Reduktion der Spermien mit fragmentierter DNA im Vergleich zur Placebogruppe. In einer weiteren Studie von GRECO und Kollegen konnte bei Patienten, die zu einer ICSI-Behandlung geplant waren nachdem sie bereits einen frustrierten Versuch hinter sich hatten, durch die gleiche orale Antioxidantientherapie (Vitamin C und Vitamin E jeweils 1g pro Tag für zwei Monate) ebenfalls eine signifikante Abnahme der Spermatozoen mit DNA-Fragmentationen erreicht werden (GRECO et al., 2005b).

In der vorliegenden Arbeit kann kein signifikanter Zusammenhang, weder im Gesamtkollektiv noch in der IVF- oder ICSI-Gruppe, zwischen der Konzentration der einzelnen gemessenen Antioxidantien und der Apoptoserate gezeigt werden. Wenn man aber die Ergebnisse von AGARWAL und Mitarbeitern, welche zeigten dass durch ROS verursachte Schädigungen der DNA den Prozess der Apoptose beschleunigen (AGARWAL et al., 2003b) bedenkt, könnte man speziell durch die gezeigte Verbesserung der Chromatinkondensation der Spermien durch Vitamin A auch eine Reduktion der Apoptoserate durch Vitamin A vermuten. Dies gilt es aber erst noch durch weitere und umfangreichere Studien zu beweisen.

Weiterhin ist es notwendig zu erwähnen, dass die Apoptoserate der Spermien im Ejakulat im Hinblick auf eine geplante assistierte Reproduktion anhand neuester Studien bei der Wahl der Fertilisationstechnik berücksichtigt werden sollte. So zeigt zum Beispiel die Arbeitsgruppe von BUNGUM, dass es ab einem Anteil von >30% Spermien mit fragmentierter DNA, bei Paaren, die sich einer ICSI-Behandlung unterzogen signifikant häufiger zu einer Schwangerschaft kommt als bei den IVF-Paaren. War der Anteil an Spermien mit DNA-Schäden <30% konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden (BUNGUM et al., 2007).

### **5.3.5 Auswirkung des Total antioxidant status (TAS) auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate**

SMITH et al. (1996) haben festgestellt, dass bei der Bestimmung des total antioxidant status in den Spermaproben von fertilen Männern eher eine hohe Konzentration von Antioxidantien zu finden ist. Entsprechend zeigten die Ergebnisse von LEWIS und Kollegen einen niedrigeren total antioxidant status im Seminalplasma von infertilen Männern im Vergleich zu der Konzentration von fertilen Männern (LEWIS et al., 1995). Neben anderen Ursachen führt dieser TAS-Mangel bei infertilen Männern zu einer Häufung von DNA-Abnormitäten, welche wiederum zu Störungen in der Entwicklung der Blastozyste, fehlgeschlagener Implantation und einer höheren Abortrate führen können (BANERJEE et al., 2000; IRVINE et al., 2000; LARSON et al., 2000; MORRIS et al., 2002; AGARWAL et al., 2003a; LARSON-COOK et al., 2003). Auch die Ergebnisse von LAGOD und Mitarbeitern zeigten, dass eine Verschiebung der ROS-TAS-Homöostase zugunsten von reactive oxygen species in einer höheren Rate von Spontanaborten resultiert (LAGOD et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen einige Zusammenhänge, die in den oben genannten Arbeiten erwähnt wurden. So findet sich zum Beispiel im Gesamtkollektiv (siehe Tab. 4.11) ein sehr signifikanter positiver Zusammenhang der Schwangerschaftsrate mit dem total antioxidant status der Messung im Seminalplasma (TAS I). Außerdem scheint der total antioxidant status einen positiven Effekt auf die Fertilisationsrate zu haben. Zu diesem Schluss kann man kommen, wenn man bedenkt, dass in der IVF-Gruppe (siehe Tab. 4.12) für TAS I und TAS II ein negativer Zusammenhang mit der Anzahl von Spermien mit schlechter Motilität (WHO-Kategorie D sowohl vor als auch nach Aufbereitung) gezeigt wird und dass die Anzahl von Spermien mit schlechter Motilität (WHO-Kategorie D) signifikant negativ ( $r=-0,332$ ;  $p=0,048$ ) mit der Zahl der befruchteten Eizellen in der IVF-Gruppe korreliert. Da eine direkte Korrelation hier aber nicht gezeigt werden konnte, wären weitere Studien zur Klärung dieses Zusammenhangs wünschenswert.

COMHAIRE und Kollegen konnten eine signifikante Verbesserung der Spermienparameter und der Schwangerschaftsrate von infertilen Männern durch Gabe des starken Antioxidans Astaxanthin (AstaCarox®, AstaReal AB, Gustavsberg, Sweden) erreichen. Außerdem konnte die ROS-Konzentration, im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant gesenkt werden (COMHAIRE et al., 2005).

Auch in der vorliegenden Arbeit können diese Auswirkungen von Antioxidantien gezeigt werden. Bezüglich der Verbesserung der Spermienparameter möchte ich auf die Kapitel 5.3.1 bis 5.3.4 und die Tab. 4.11; 4.12; 4.13 verweisen. Im Hinblick auf die Schwangerschaftsrate zeigt sich in der IVF-Gruppe eine signifikante positive Korrelation ( $r=0,355$ ;  $p=0,039$ ) mit der Vitamin E Konzentration im Seminalplasma. GRECO und Kollegen erreichten mit oraler Antioxidantientherapie (siehe Kapitel 5.3.4) vor ICSI eine signifikante Verbesserung der Schwangerschaftsrate von 6,9% (in einem vorhergegangenen ICSI-Zyklus ohne antioxidative Therapie) auf 48,2% (GRECO et al., 2005b).

BEDAIWY et al. (2002) konnten zeigen, dass sowohl Vitamin C als auch Vitamin E in der Lage ist den embryotoxischen Effekt, welcher durch eine hohe ROS-Konzentration verursacht wird, signifikant zu senken. Diese Ergebnisse werden durch Arbeiten von WANG und Kollegen bestätigt, in denen sich allerdings Vitamin C als effektiverer Schutz gegen den embryotoxischen Effekt zeigte (WANG et al., 2001, 2002). Es spielen also auch nach der Befruchtung antioxidative Substanzen noch eine wesentliche Rolle. In vivo sind Schutzmechanismen in Form von Antioxidantien gegen reactive oxygen species (ROS), sowohl im Embryo als auch in seiner Umgebung (Follikel- und Eileiterflüssigkeit) vorhanden (SHARMA et al., 2004).

## 5.4 Fazit der Diskussion

Im Bezug auf die Fragestellung (siehe Kapitel 2.4), konnte im Rahmen dieser Studie folgendes gezeigt werden:

- Im Rahmen der konventionellen Spermienanalyse ergaben sich in allen Gruppen positive Korrelationen zwischen ROS und dem Cyturtest (Esterasenaktivität von Granulozyten). Mit TAS finden sich hier negative Korrelationen in allen Gruppen.

Die Spermivitalität im HOS- und Eosintest zeigt eine negative Korrelation mit ROS, welche jedoch nur im ICSI-Kollektiv das Signifikanzniveau erreicht. Mit TAS finden sich hier keine signifikanten Zusammenhänge.

Die Spermiedichte korreliert im Gesamtkollektiv positiv mit TAS, im IVF- und ICSI-Kollektiv erreicht dieser Zusammenhang nicht das Signifikanzniveau. Zwischen ROS und der Spermiedichte besteht ein negativer Zusammenhang, welcher jedoch ebenfalls nur im Gesamtkollektiv das Signifikanzniveau erreicht.

Bezüglich der Spermienmotilität kann gezeigt werden, dass sich mit steigender ROS-Konzentration die Zahl der Spermien mit schlechter Motilität signifikant erhöht. Entsprechend besteht ein positiver Zusammenhang zwischen TAS und der Anzahl von Spermien mit guter Motilität.

Bei der Untersuchung der Zusammenhänge der Spermienmorphologie mit ROS finden sich bei steigender ROS-Konzentration signifikant weniger morphologisch normale Spermien im Gesamtkollektiv und in der IVF-Gruppe, außerdem zeigten sich vermehrt amorphe Spermien im Gesamtkollektiv. Mit steigender TAS-Konzentration fanden sich im Gesamtkollektiv und in der ICSI-Gruppe signifikant mehr morphologisch normale Spermien.

- Mit steigender ROS-Konzentration finden sich signifikant mehr Spermien mit schlecht kondensierter DNA (CMA<sub>3</sub>-Färbung), Störungen der DNA-Integrität bzw. Zeichen von Apoptose (TUNEL-Färbung) sowohl vor als auch nach Aufbereitung im Gesamtkollektiv und in der IVF-Gruppe.

Mit steigender TAS-Konzentration finden sich sowohl im Gesamtkollektiv als auch bei getrennter Betrachtung der IVF- und der ICSI-Gruppe signifikant weniger Spermien mit schlecht kondensierter DNA (CMA<sub>3</sub>-Färbung),

Störungen der DNA-Integrität bzw. Zeichen von Apoptose (TUNEL-Färbung) sowohl vor als auch nach Aufbereitung.

- Bei der Untersuchung der Auswirkungen von ROS und TAS auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsrate fanden sich nur wenige signifikante Zusammenhänge. Es zeigte sich im Gesamtkollektiv eine positive Korrelation zwischen TAS und einer erfolgreichen Schwangerschaft. Einen direkten Zusammenhang zwischen TAS und der Fertilisationsrate konnte nicht ermittelt werden. Dies lässt sich allerdings vermuten, wenn man die positiven Auswirkungen von TAS auf die Spermienqualität bedenkt. Auch zwischen ROS und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate fand sich kein signifikanter direkter Zusammenhang. Hier lassen sich auch nur Vermutungen aufstellen, wenn man die negativen Auswirkungen von ROS auf die Spermienqualität bedenkt.
- Wenn man sich die Zusammenhänge von ROS und dem TAS noch einmal vor Augen führt, kommt man zu dem Schluss, dass Antioxidantien einen Benefit für die Techniken der Reproduktionsmedizin haben. Oder anders ausgedrückt, dass es von Vorteil ist die Verfahren in der Reproduktionsmedizin dahingehend zu optimieren, dass oxidativer Stress weitgehend reduziert bzw. vermieden wird. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von ALLAMANENI und Kollegen, welche zeigen konnten, dass die ROS-Konzentration im Nativsperma von fertilen Spendern signifikant niedriger ist als im Samen nach Aufbereitung (ALLAMANENI et al., 2005).  
Einen interessanten Aspekt beleuchtete die Arbeitsgruppe um GRIVEAU. Sie konnten zeigen, dass sich bei Patienten mit einer Oligozoospermie, welche sich einer IVF-Behandlung unterzogen, die Spermaqualität signifikant verbesserte, wenn man das Sperma in einer Atmosphäre mit 5% O<sub>2</sub> inkubiert anstelle von einer Atmosphäre mit 20% O<sub>2</sub> was der Raumluft entspricht. Verbessert werden konnten zum Beispiel die Spermienmotilität und die Akrosomreaktion, wobei sich bei fertilen Spendern keine signifikante Verbesserung der Spermaqualität erzielen ließ (GRIVEAU et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von YENILMEZ zeigte, dass sich durch Zugabe von Vitamin E

zur HAM'S F10-Lösung ein Schutz gegen oxidativen Stress und die dadurch verursachten Schäden erzielen lässt (YENILMEZ et al., 2006).

Ein Alternative zur vielfach diskutierten medikamentösen Therapie mit antioxidativ wirksamen Substanzen oder der Anreicherung des Ejakulats von subfertilen Männern mit Antioxidantien liegt also in der Vermeidung von oxidativem Stress während der verschiedenen Prozesse der künstlichen Reproduktion.



## 6. Literaturverzeichnis

1. **Abarbanel AR, Brown WE, Greulich WW (1951):** Evaluation of the barren marriage. Minimal procedures. *Fertil. Steril.* 2: 1-14
2. **Abou-Shakra FR, Ward NI, Everard DM (1989):** The role of trace elements in male infertility. *Fertil. Steril.* 52: 307-310
3. **Agarwal A, Said TM (2003a):** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 9: 331-345
4. **Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003b):** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79: 829-843
5. **Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM (2004):** Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online* 8: 616-627
6. **Agarwal A, Allamaneni SS, Nallella KP, George AT, Mascha E (2005a):** Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilisation rate after in vitro fertilisation: a qualified meta-analysis. *Fertil. Steril.* 84: 228-231
7. **Agarwal A, Prabakaran SA (2005b):** Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian. J. Exp. Biol.* 43: 963-974
8. **Agarwal A, Gupta S, Sharma RK (2005c):** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 28
9. **Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS (2006a):** Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 12: 630-633
10. **Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ jr., Alvarez JG, Sikka SC (2006b):** Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 86: 878-885
11. **Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989a):** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40: 183-197
12. **Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB et al. (1989b):** Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J. Androl.* 10: 214-220
13. **Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC (1991):** Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164: 542-551

14. **Aitken RJ (1994):** A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 19-23
15. **Aitken RJ, Fisher H (1994):** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays* 16: 259-267
16. **Akmal M, Oadri JO, Al-Waili NS, Thangal S, Hag A, Saloom KY (2006):** Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *J. Med. Food* 9: 440-442
17. **Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ ir., Sikka SC (2005):** Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil. Steril.* 83: 800-803
18. **Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L et al. (1987):** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxid dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8: 338-348
19. **Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jørgensen N, Anderson AM, Krarup T, Keiding N, Skakkebaek NE (2000):** High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 15: 366-372
20. **Andolz P, Bielsa MA, Vila J (1999):** Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22759 infertile men over 36 year period. *Hum Reprod* 14: 731-735
21. **Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990):** Apoptosis, the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608
22. **Ashwood-Smith MJ, Edwards RG (1996):** DNA repair by oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 46-51
23. **Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ jr., Agarwal A (2004):** Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.* 81: 349-354
24. **Bals-Pratsch M, Schill T, Dietrich K (1998):** Der andrologische Patient in der gynäkologischen Praxis. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 437-490
25. **Banerjee S, Lamond S, McMahon A, Campbell S, Nargund G (2000):** Does blastocyst culture eliminate paternal chromosomal defects and select good embryos?: inheritance of an abnormal paternal genome following ICSI. *Hum. Reprod.* 15: 2455-2459
26. **Barroso C, 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

27. **Bedaiwy M, Goldberg J, Singh M, Wang X, Sharma RK, Nelson D, Falcone T (2002):** Relationship between oxidative stress and the embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid. *Hum. Reprod.* 17: 601-604
28. **Behne D, Jürgensen H.:** Determination of trace elements in human blood serum and in the standard reference material "bovine liver" by instrumental neutron activation analysis. *J. Radioanal. Chem.*, 42: 447-453 (1978)
29. **Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF (2003):** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 18: 1023-1028
30. **Berling S, Wölner-Hanssen P (1997):** No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the past decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod* 12: 1002-1005
31. **Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D (1996):** Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2:139-144
32. **Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Meusset R (1996):** Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *Brit Med J* 312: 471-472
33. **Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A (2007):** Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 22: 174-179
34. **Carbone DJ Jr, Shah A, Thomas AJ Jr et al. (1998):** Partial obstruction, not antisperm antibodies, causing infertility after vasovasostomy. *J. Urol.* 159: 827-830
35. **Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992):** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J* 305: 609-613
36. **Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B (2003):** Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.* 49: 49-55
37. **Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F (2005):** Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl* 7: 257
38. **Compton MM. (1992):** A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast. Rev.* 11: 105-119
39. **Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S (2002):** Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J. Postgrad. Med.* 48: 186-189

40. **Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K (2006):** Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF. *Hum. Reprod.* 21: 2409-2407
41. **de Yebra L, Balleca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R (1998):** Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil. Steril.* 69: 755-759
42. **Dietrich K, Weiss, JM, Felderbaum R (1998): In: Dietrich K (ed.):** Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie, Springer, Heidelberg: 380-407
43. **Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S (2002):** Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.* 17: 3122-3128
44. **Duru NK, Morshedi M, Oehninger S (2000):** Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 74: 1200-1207
45. **Edwards, RG (1981):** Test tube babies. *Nature.* 293: 253
46. **Edwards RG, Steptoe PC (1983):** Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet* 2: 1265-1269
47. **Eliasson R (1971):** Standards for investigation of human semen. *Andrologie* 3: 49-64
48. **Engel S, Möckel C, Diezel W (1985):** Der Einfluss von alpha-Tokopherolazetat auf die Spermienmotilität. *Dermatol. Monatsschr.* 171: 800-805
49. **Eskenazi B, Warner ML (1997):** Epidemiology of endometriosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 24: 235-258
50. **Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ (2005):** Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum. Reprod.* 20: 1006-1012
51. **Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Prinsloo E, Van Rooyen LH (2000):** Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilisation rates. *Hum. Reprod.* 15: 657-661
52. **Evans HM, Bishop KS (1922):** On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56: 650-651
53. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999):** Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14: 1039-1049

54. **Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R (2000):** Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J. Androl.* 21: 739-746
55. **Evenson DP, Larson KJ, Jost LK (2002):** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23: 25-43
56. **Fair WR, Wehner N (1976):** The prostatic antibacterial factor: Identity and significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 6: 383-403
57. **Felderbaum RE, Baumann P, van Steirteghem A, Diedrich K (1998):** Schwangerschaft und Geburt nach Sterilitätsbehandlung. In: Diedrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 424-436
58. **Fish H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH (1996):** Semen analysis in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil. Steril.* 65: 1009-1014
59. **Ford WC, Whittington K (1998):** Debate: Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidant treatment for male subfertility: a promise that remains unfulfilled. *Hum. Reprod.* 13: 1416-1419
60. **Freund M (1966):** Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int. J. Fertil.* 11: 97-118
61. **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
62. **Gavella M, Lipovac V (1998):** In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrologia* 30: 317-327
63. **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. (1992):** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501
64. **Gerardo B, Morshedi M, Sergio O (2000):** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Mol. Reprod.* 15: 1338-1344
65. **Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C (2000):** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 29: 1106-1114
66. **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

67. **Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J (2005a):** Reduction of the Incidence of Sperm DNA Fragmentation by Oral Antioxidant Treatment. *J. Androl.* 26: 349-353
68. **Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J (2005b):** ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum. Reprod.* 20: 2590-2594
69. **Griveau JF, Grizard G, Boucher D, Le Lannou D (1998):** Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. *Hum. Reprod.* 13: 3108-3113)
70. **Grizard G, Ouchcbane L, Roddier H, Artone C, Sion B, Vasson MP, Janny L (2007):** In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa. *Reprod. Toxicol.* 23: 55-62
71. **Hacker-Klom U, Göhde W, Nieschlag E, Behre HM (1999):** DNA flow cytometry of human semen. *Hum. Reprod.* 14: 2506-2512
72. **Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W (1996):** The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilisation, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum. Reprod.* 11: 2468-2471
73. **Hammadeh ME (1997a):** Erster Homburger "hand-on" – Workshop in assistierter Fertilisation durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Universitätskliniken des Saarlandes, Frauenklinik und Poliklinik, Sonderdruck
74. **Hammadeh ME, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W (1997b):** Chromatin and morphology alteration in human spermatozoa affected by freezing and thawing. *Assist. Reprod. Rev.* 8: 131-139
75. **Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998):** Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilisation, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30: 29-35
76. **Hammadeh ME (2000):** Chromatinkondensation in vitro als prognostischer Test der Befruchtungsfähigkeit von Spermien nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). *J. Fertil. Reprod.* 3: 27-31
77. **Hammadeh ME (2004):** Die Auswirkung zweier Spermienaufbereitungsmethoden (PureSperm vs. ISolate) auf die Spermienparameter und ihr Einfluss auf die Erfolgsrate nach in vitro Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Universitätskliniken des Saarlandes, Frauenklinik: 55

78. **Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R, Rosenbaum P, Lorenz M, Schmidt W (2006):** Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 13: 696-706
79. **Hanf V (1998):** Einfluss von Umweltfaktoren auf die Fruchtbarkeit der Frau. In: Dietrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 325-355
80. **Han-Ming S, Jun D, Sin-Eng C, Alvin L, Choon-Nam O (2002):** Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod.* 17: 1266-1273
81. **Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK et al. (1999):** Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J. Urol.* 161: 1831-1834
82. **Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003):** DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online* 7: 477-484
83. **Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF (2004):** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilisation and pregnancy. *Fertil. Steril.* 81: 965-972
84. **Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF (2005):** Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil. Steril.* 83: 635-642
85. **Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000a):** DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilisation in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79: 189-193
86. **Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000b):** The role of DANN strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79: 559-563
87. **Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ et al. (1996):** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 613-619
88. **Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE (1999):** Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 14: 71-75
89. **Irvine DS (1996):** Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1: 6-12

90. **Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J (1996):** Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Brit Med J* 312: 467-471
91. **Irvine S, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne P, Aitken RJ (2000):** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.* 21: 33-44
92. **Iwasaki A, Gagnon C. (1992):** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.* 57: 409-416
93. **Jacob RA, Pianalto FS, Agee RE (1992):** Cellular ascorbate depletion in healthy men. *J. Nutr.* 122: 1111-1118
94. **Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E.(2002):** A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clinical Pathology.* 2: 1-10
95. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972):** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* 26: 239-257
96. **Kierszenbaum AL (2001):** Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 1-3
97. **Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT, Meacham RB (2002):** Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 29: 755-765
98. **Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban N (2003):** Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Arch. Androl.* 49: 355-359
99. **Kodoma H, Yamaguchi R, Fukuda J et al. (1997):** Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil. Steril.* 68: 519-524
100. **Koksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasogul S, Kadioglu A (2003):** Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J. Androl.* 5: 95-99
101. **Kramer JA, Krawetz SA (1997):** RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 473-476
102. **Küpker W, Al-Hassani S, Dietrich, K. (1998):** Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) – assistierte Fertilisation bei schwerer männlicher Subfertilität. In: Dietrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 570-590
103. **Küpker W, Schultze-Mosgau A, Dietrich K (1998):** Physiologie der Befruchtung. In: Dietrich K (ed.): *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie.* Springer, Heidelberg: 356-379



104. **Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA (2003):** Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.* 79: 287-291
105. **Kupka MS, Dorn C, Richter O, Felderbaum R, van der Ven H (2003):** Impact of reproductive history on in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection outcome: evidence from the German IVF Registry. *Fertil Steril* 80: 508-516
106. **Lagod L, Paszkowski T, Sikorski R, Rola R (2001):** The antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion. *Ginekol. Pol.* 72: 1073-1078
107. **Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP (2000):** Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 15: 1717-1722
108. **Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aarnold ET, Evenson DP (2003):** Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* 80: 895-902
109. **Lemcke B, Behre HM, Nieschlag E (1997):** Frequently subnormal semen profiles of normal volunteers recruited over 17 years. *Int J Androl* 20: 144-152
110. **Lemkecher T, Dartiques S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP (2005):** Leukocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 33: 2-10
111. **Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W (1995):** Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 64: 868-870
112. **Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W (1997):** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 67: 142-147
113. **Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM et al. (1997a):** In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 68: 1065-1069
114. **Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM et al. (1997b):** Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J. Urol.* 158: 1791-1793
115. **Liu DY, Gordon Baker HW (1992):** Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding and fertilisation rates in vitro. *Fertil. Steril.* 58: 1178-1184

116. **Liu DY, Baker HW (1994):** Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 9: 1694-1700
117. **Liu X, Yan SW, Ding XP, Zhang N, Lu HO, Tang J (2003):** Evaluation of radiation damage to the sperm DNA of radar operators. *Zhonghua Nan Xue* 9: 494-496, 500
118. **Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Enghusen Poulsen H, Bonde JP (2003):** Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum. Reprod.* 18: 1265-1272
119. **Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998a):** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13: 896-900
120. **Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998b):** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with fertilisation in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 69: 528-532
121. **MacLeod J (1943):** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 138: 512-518
122. **Mak V, Zielenski J, Tsui LC et al. (1999):** Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *J. Am. Med. Assoc.* 281: 2217-2224
123. **Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D (1998):** DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem. J.* 30: 33-39
124. **Matsuda Y, Tobar I (1989):** Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat. Res.* 210: 35-47
125. **Morales H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F, Van Langendonck A (1999):** Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 149-157
126. **Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR (2002):** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilisation and embryo development. *Hum. Reprod.* 17:990-998
127. **Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS (1986):** Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 78: 93-102

128. **Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ jr., Agarwal A (2004):** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum. Reprod.* 19:129-138
129. **Muriel L, Garrido N, Fernandez JF, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M (2006):** Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 85: 371-383
130. **Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SSR, Agarwal A (2005):** Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. *Clinics* 60(4): 317-324
131. **Nieschlag E, Behre HM (eds.) (1996):** *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes.* Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
132. **Oehninger S (2001):** Strategies for the infertile man. *Semin Reprod Med* 19: 231-237
133. **Oehninger S, Mahony M, Özgür K et al. (1997):** Clinical significance of human sperm-zona pellucida binding. *Fertil. Steril.* 67: 1121-1127
134. **Oehninger S, Toner JP, Muasher SJ et al. (1992):** Prediction of fertilisation in vitro with human gametes: is there a litmus test?. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 1760-1767
135. **Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K (1998):** Selenium in human male reproductive organs. *Hum. Reprod.* 13: 2172-2176
136. **Olsen GW, Bodner KM, Ramlow JM, Ross CE, Lipshultz LI (1995):** Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. *Fertil. Steril.* 63: 887-893
137. **Padron OF, Sharma R, Thomal AJ Jr et al. (1997):** Effects of cancer on sperm quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertil. Steril.* 67: 326-331
138. **Palan P, Naz R (1996):** Changes in various antioxidant levels in human seminal plasma related to immunoinfertility. *Arch. Androl.* 36: 139-143
139. **Palermo G, Joris H, Devroey P, van Steirteghem A (1992):** Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17
140. **Parazzini F, Di Cintio E, Chatenoud L, Moroni S, Mezzanotte C, Crosignani PG (1999):** Oral contraceptive use and risk of endometriosis. Italian Endometriosis Study Group. *Br. J. Obstet. Gynaecol* 106: 695-699

141. **Parinaud J, Le Lannou D, Viertz G, Griveau JF, Milhet P, Richoilley G (1997):** Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Hum. Reprod.* 12: 2434-2436
142. **Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ jr., Argarwal A (2000):** Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.* 73: 459-464
143. **Paszkowski T, Clarke RN, Hornstein MD (2002):** Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum. Reprod.* 17: 921-925
144. **Pfleiderer A, Breckwoldt M, Martius G (eds) (2000):** Gynäkologie und Geburtshilfe. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart
145. **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
146. **Ramos L, Wetzels AMM (2001):** Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum. Reprod.* 16: 1703-1707
147. **Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G (2002):** Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum. Reprod.* 17: 2665-2672
148. **Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E (1999):** Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum. Reprod.* 14: 1028-1033
149. **Said TM, Aziz N, Sharma RK, Lewis-Jones I, Thomas AJ jr., Agarwal A (2005):** Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J. Androl.* 7: 121
150. **Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995):** Mammalian sperm DNA susceptibility to in-situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 16: 80-87
151. **Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzarro D, Bianchi PG, 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
152. **Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ Jr. (2003):** Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil. Steril.* 79: Suppl 3: 1597-1605

153. **Sanchez R, Staf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB (1996):** Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and andrological patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13: 228-233
154. **Sanocka D, Kurpisz M (2004):** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2: 12-19
155. **Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ (2007):** The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum. Reprod.* 22: 180-187
156. **Schmidt-Matthiesen H (1992):** Gynäkologie und Geburtshilfe: Kurzlehrbuch für Studium und Praxis unter Berücksichtigung des Lernzielkataloges. 8.Auflage; F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1992
157. **Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Reicheis H, Wick G (1994):** Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.* 10: 41-42
158. **Sharma RK, Argawal A (1996):** Role of reactive oxygen species in male infertility. *J. Urol.* 48: 835-850
159. **Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ jr., Agarwal A (1999):** The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* 14: 2801-2807
160. **Sharma RK, Agarwal A (2004):** Role of oxygen species in gynaecologic diseases. *Reprod. Med. Biol.* Vol3, Issue 4: 177-199
161. **Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002):** Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlation with sperm quality. *Hum. Reprod.* 17: 1266-1273
162. **Sherins RJ (1995):** How is male infertility defined? In Robaire B, Pryor JL, Trailer JM (eds), *Handbook of Andrology*, American Society of Andrology, Allen Press, pp. 48-51
163. **Sheweita SA, Tilmesany AM, Al-Sawaf H (2005):** Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr. Drug. Metab.* 6: 495-501
164. **Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D (1998):** Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum. Reprod.* 13: 1632-1637
165. **Sigman MD, Lipshultz LI, Howards SS (1992):** Evaluation of the subfertile male. In Lipshultz LI, Howards SS (eds), *Infertility in the Male*, 2<sup>nd</sup> edn. Mosby Year Book, pp. 179-210

166. **Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S, Wyrobek AJ (2005):** Effect of Antioxidant Intake on Sperm Chromatin Stability in Healthy Nonsmoking Men. *J. Androl.* 26(4): 165
167. **Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS (1998):** Spontaneous germ cell apoptosis in humans: Evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 152-156
168. **Skandhan KP (1981):** Zinc in human seminal plasma. *Andrologia* 13: 346-351
169. **Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ (2006):** Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum. Reprod.* 21: 2868-2875
170. **Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E (1996):** Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum. Reprod.* 11: 1655-1660
171. **Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A (2006):** Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum. Reprod.* 21: 986-993
172. **Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G (2000):** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.* 73: 43-50
173. **Step toe PC, Edwards RG (1978):** Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet* 2: 366-371
174. **Step toe PC, Edwards RG, Walter DE (1986):** Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in-vitro fertilisation. *Hum Reprod* 1: 89-94
175. **Strauss E (1999):** Selenium's role in infertility explained. *Science* 285: 1339
176. **Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZMS, el-Malik EM, Nasr MA (1996):** Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J. Androl.* 17: 530-537
177. **Swan SH, Elkin EP, Fenster L (1997):** Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* 105: 1228-1232
178. **Taubert HD (1998):** Sterilität und Fertilität. In: Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (eds.): *Gynäkologie und Geburtshilfe. Lehrbuch für Studium und Praxis.* Schattauer, Stuttgart New York: 117-132
179. **Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR (1995):** Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.* 10: 110-115

180. **Tomsu M, Sharma V, Miller D (2002):** Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum. Reprod.* 17: 1856-1862
181. **Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998a):** 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
182. **Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ (1998b):** Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 439-445
183. **Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H (1993):** Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.* 8: 1055-1060
184. **Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F (1996):** Deterioration of sperm in young healthy Belgian men. *Hum Reprod* 11: 325-329
185. **Wang A, Fanning L, Anderson DJ et al. (1997):** Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch. Androl.* 39: 11-17
186. **Wang X, Sharma RK, Goldberg J, Attaran M, Agarwal A, Falcone T (2001):** Vitamin E supplementation reduces oxidative stress and improves blastocyst development rate. *Fertil. Steril.* 75 (Suppl.1): 124-125
187. **Wang X, Goldberg J, Attaran M, Falcone T, Miller K, Sharma RK (2002):** Vitamin C and E supplementation reduces oxidative stress induced embryo toxicity and improves blastocyst development rate. *Fertil. Steril.* 78: 1272-1277
188. **Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ jr., Falcone T, Agarwal A (2003):** Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 80: 531-535
189. **Watanabe T, Endo A (1991):** Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutat. Res.* 262: 93-99
190. **Wen Y, Cooke T, Feely J (1997):** The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 44: 94-97
191. **Woolveridge I, Morris ID (2000):** Apoptosis in male reproductive toxicology. In Roberts R (ed.) *Apoptosis in toxicology.* Taylor and Francis, New York/London, pp. 72-87

192. **World Health Organization (1999):** WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 4. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New-York
193. **World Health Organisation (1993):** WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. 1. Auflage; The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1993
194. **Wong WY, Groenen PMW, Merkus J, Wetzels A, Braat D, Steegers-Theunissen R (1998):** Evaluation of nutritional, environmental and lifestyle factors on sperm density. *Androl in the nineties (Genk)*, 4:46
195. **Wyllie AH (1980):** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556
196. **Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980):** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306
197. **Yang HW, Hwang KJ, Kwon CK, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998):** Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 13: 998-1002
198. **Yenilmez E, Yildirmis S, Yulug E, Aydin S, Tekelioglu Y, Erdem E, Topbas M, Arvas H (2006):** Ham's F-10 medium and Ham's F-10 medium plus vitamin E have protective effect against oxidative stress in human semen. *Urology* 67: 384-387
199. **Zalata A, Hafez T, Comhaire F (1995):** Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum. Reprod.* 10: 1444-1451
200. **Zhao RP, Yang SQ, Huang L, Chang XX, Zhang X, Xu ZS, Liu RF (2003):** Analysis of sterile male semen of occupational drivers. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9: 515-516, 519
201. **Zusterzeel PL, Rutten H, Roelofs HM, Peters WH, Steegers EA (2001):** Protein carbonylation in decidua and placenta of pre-eclamptic women as marker for oxidative stress. *Placenta* 22: 213-219



## 7. Danksagung

Zu aller erst gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Mohammad Eid Hammadeh für die Vergabe dieses interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung in allen sich stellenden Fragen und Problemen. Danke auch für ein immer offenes Ohr, sowie für das freundliche und konstruktive Arbeitsverhältnis.

Weiterhin gebührt mein Dank Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Werner Schmidt für die Möglichkeit die Einrichtungen und Materialien der Universitätsfrauenklinik und insbesondere des IVF-Labors zu nutzen.

Für die ständige Hilfsbereitschaft, die Einweisung in die Laborarbeit und die wertvollen Ratschläge möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des IVF-Labors, insbesondere Frau Seyfried, Frau Maurer und Frau Wiesberger besonders bedanken.

Für die Betreuung und das abschließende Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Frau Dr. Constanze Fischer-Hammadeh

Mein besonderer Dank gilt meiner Verlobten Dr. med Laila El-Masri für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung, die kritische Durchsicht dieser Dissertation vor allem aber für ihre stetige Motivation, Aufmunterung und ihren Glauben an mich.

Außerdem möchte ich mich bei folgenden Instituten bzw. Abteilungen bedanken, durch deren freundliche Unterstützung einige Messungen erst ermöglicht wurden:

- Hahn-Meitner-Institut Berlin, Abteilung Molekulare Spurenelementforschung in den Biowissenschaften (Leiter: Herr Prof. Dr. Dietrich Behne), hier insbesondere Herr Dr. Bertelsmann und Mitarbeiter

- Klinisch-Chemisches Zentrallabor der Universität des Saarlandes (Leiter: Herr Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Wolfgang Herrmann), hier insbesondere Frau Diplom-Biologin Heike Schorr
- Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung für Virologie der Universität des Saarlandes (Leiter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Nikolaus Müller-Lantzsch), für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern für die Ermöglichung des Studiums und dieser Dissertation, sowie meiner Schwester für die Ablenkung von beidem.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Gerdelmann Stephan  
Weiherstr. 2, 66882 Spesbach  
Geboren am 04.07.1977 in Kaiserslautern  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Stephan Gerdelmann  
Helga Gerdelmann, geb. Kreuz

### Schulbildung

1984-1988	Grundschule Spesbach
1988-1994	Priv. Realschule St. Katharina Landstuhl
1994-1997	Sickingengymnasium Landstuhl
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Bundeswehr

1997-2001	Soldat auf Zeit SaZ4
-----------	----------------------

### Hochschulbildung

2001-2007	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg
16.09.2003	Ärztliche Vorprüfung

## **Famulaturen**

03/2004	Famulatur in einer Internistischen Praxis in Primstal
03/2005	Famulatur im Knappschafts Krankenhaus Püttlingen, Orthopädie
08/2005	Famulatur im Knappschafts Krankenhaus Püttlingen, Innere Med.
03/2006	Famulatur in der Universitätsfrauenklinik des Saarlandes, Reproduktionsmedizin

## **Praktisches Jahr**

14.08.06-03.12.06	1.PJ-Tertial Chirurgie, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
04.12.06-25.03.07	2.PJ-Tertial Neurologie, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
26.03.06-15.07.07	3.PJ-Tertial Innere, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen