

Aus dem Bereich Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Reactive Oxygen Species (ROS) und enzymatische  
Antioxidantien im Seminalplasma sowie  
deren Einfluss auf die Spermienqualität und die Resultate  
nach IVF und ICSI**

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

der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von Stephanie Zenner  
geb. am 11.10.1982 in Saarburg



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2	Englische Zusammenfassung (Summary).....	3
<b>2</b>	<b>Einleitung und Eigene Fragestellung</b> .....	<b>5</b>
2.1	Allgemeine Aspekte.....	5
2.2	Bedeutung der untersuchten Parameter.....	9
	2.2.1 SpermioGrammparameter.....	10
	2.2.2 DNA-Integrität.....	12
	2.2.3 Oxidantien und Antioxidantien.....	14
2.3	Eigene Fragestellung.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	<b>19</b>
3.1	Patienten.....	19
3.2	SpermioGrammparameter.....	21
	3.2.1 Spermienausstriche und Fixierung der Objektträger.....	21
	3.2.2 Volumen.....	21
	3.2.3 pH-Wert.....	22
	3.2.4 Viskosität.....	22
	3.2.5 Dichte.....	22
	3.2.6 Motilität.....	23
	3.2.7 Vitalität.....	23
	3.2.8 Cytur-Test.....	25
	3.2.9 MAR-Test.....	26
	3.2.10 Spermienmorphologie.....	27
3.3	DNA-Integrität.....	30
	3.3.1 Chromomycin A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) Färbung.....	30
	3.3.2 Acridine Orange (AO) Färbung.....	32

---

3.3.3 TUNEL-Färbung.....	34
3.4 Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma.....	37
3.4.1 Seminalplasmagewinnung und Aufbereitung.....	37
3.4.2 ROS-Messung.....	39
3.4.3 TAS-Messung .....	42
3.4.4 Glutathionperoxidase-Messung.....	47
3.4.5 Glutathionreduktase-Messung.....	52
3.4.6 Superoxiddismutase-Messung .....	56
3.5 Patientinnen .....	63
3.6 Fertilisationsmethoden .....	64
3.6.1 In-vitro-Fertilisation (IVF).....	64
3.6.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) .....	68
3.6.3 Schwangerschaftsnachweis .....	71
3.7 Statistische Auswertung .....	72
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
4.1 Ergebnisse der einzelnen Parameter im Gesamtkollektiv sowie im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv.....	75
4.1.1 Spermogrammparameter .....	75
4.1.2 DNA-Integrität .....	78
4.1.3 Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma.....	80
4.1.4 Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnisse.....	82
4.2 Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität und den Spermogrammparametern.....	84
4.3 Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und den Spermogrammparametern.....	90
4.4 Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und der DNA-Integrität .....	96
4.5 Zusammenhang zwischen den Spermogrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen.....	100

---

4.6	Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen .....	104
4.7	Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen .....	108
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>119</b>
5.1	Spermiogrammparameter .....	119
5.2	DNA-Integrität .....	120
5.3	Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma .....	127
5.3.1	Reactive Oxygen Species (ROS) .....	129
5.3.2	Totaler Antioxidantienstatus (TAS) .....	134
5.3.3	Enzymatische Antioxidantien .....	137
5.4	Fazit und Ausblick .....	142
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>171</b>
7.1	Standardisierte Auswertungsbögen .....	171
7.1.1	Spermiogrammprotokoll .....	171
7.1.2	Beurteilungsbogen zur Spermienmorphologie .....	172
7.2	Häufig verwendete Lösungen .....	172
7.2.1	Phosphate Buffered Saline (PBS) .....	172
7.2.2	HAM'S F10 .....	173
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>175</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>177</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>180</b>
	<b>Nachwort</b> .....	<b>183</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>185</b>



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Deutsche Zusammenfassung

### **Reactive Oxygen Species (ROS) und enzymatische Antioxidantien im Seminalplasma sowie deren Einfluss auf die Spermienqualität und die Resultate nach IVF und ICSI**

In der vorliegenden Studie zum zunehmend komplexer erscheinenden Thema der modernen Reproduktionsmedizin werden primär die andrologischen Ursachen und Einflussfaktoren für eine ungewollte Kinderlosigkeit untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen werden die Ejakulatproben von insgesamt 46 subfertilen Patienten, die entweder mittels IVF (n=31) oder ICSI (n=15) therapiert wurden, im Hinblick auf die von der WHO definierten Standardspermiogrammparameter, die DNA-Integrität der Spermatozoen sowie die Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma analysiert. Von den dabei gewonnenen Ergebnissen erfolgt anschließend jeweils die Betrachtung im Vergleich zwischen den beiden Therapiekollektiven, dem IVF- und dem ICSI-Kollektiv. Zudem werden sämtliche Resultate mittels bivariater Korrelationen sowohl untereinander als auch mit den Schwangerschafts- und Befruchtungsergebnissen der Patientinnen nach IVF- oder ICSI-Therapie in Bezug gesetzt.

Zur Analyse der Spermiogrammparameter werden neben dem Volumen, dem pH-Wert, der Viskosität, der Dichte und der Motilität zusätzlich die Vitalität mittels Eosin- und HOS-Test, die Anzahl der Leukozyten mittels Cytur-Test, das Vorhandensein von Antikörpern mit Hilfe des MAR-Tests sowie die Spermienmorphologie betrachtet. Die Beurteilung der DNA-Integrität erfolgt mit Hilfe dreier Fluoreszenzfärbungen, die im Einzelnen den Chromatinkondensationsstatus (Chromomycin A<sub>3</sub> Färbung), die DNA-Denaturierung (Acridine Orange Färbung) sowie den programmierten Zelltod, die Apoptose (TUNEL-Färbung) abbilden. Die mittels photometrischer Messverfahren durchgeführten Bestimmungen der Oxidantienkonzentration (ROS), des Gesamtantioxidantienstatus (TAS) und der verschiedenen antioxidativen Enzymaktivitäten (Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase, Superoxiddismutase) erfolgen im Anschluss an die Aufbereitung der im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit der PureSperm<sup>®</sup>-Dichtegradientenzentrifugation behandelten Ejakulatproben im Seminalplasma.

Die untersuchten Patientenproben zeigen der Definition der Subfertilität entsprechend im Hinblick auf die SpermioGrammparameter vor allem für die Motilität, die Vitalität und die normale Morphologie der Spermien deutlich reduzierte, von der von der WHO definierten Norm abweichende Werte. Die vielzitierte Behauptung, die DNA-Fragmentation sei ein überzeugender prädiktiver Parameter für die männliche Infertilität kann aufgrund des insgesamt eher geringen Schädigungsgrades der DNA-Integrität in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings lässt sich eine der überwiegenden Literaturmeinung entsprechende, generell positive Beziehung der DNA-Integrität zu normwertigen SpermioGrammparametern beobachten. Auch die Resultate zu der den oxidativen Status einer Probe erfassenden im Seminalplasma bestimmten ROS-Konzentration decken sich im Bezug auf die SpermioGrammparameter mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage, wobei mit steigender ROS-Konzentration vor allem für den pH-Wert, die Progressivmotilität und die normale Morphologie schlechtere Werte erzielt werden. Die Korrelationen zwischen den einzelnen hier bestimmten enzymatischen Antioxidantien und den SpermioGrammparametern lassen eine deutliche Tendenz eines protektiven Einflusses der antioxidativen Parameter erkennen.

Die beobachtete, im Gegensatz zur mehrheitlichen Literaturmeinung stehende, negative Beziehung der Chromatindendensation zur ROS-Konzentration stützt die These einer physiologischen ROS-Produktion, nach der eine gewisse Menge an ROS für die normalen Funktionen und Abläufe in den Spermatozoen von essentieller Bedeutung ist. Dahingegen zeigt sich den Annahmen mehrerer Autoren entsprechend ein wiederum protektiver Einfluss der antioxidativ wirksamen Parameter auf die DNA-Integrität.

Die Frage nach bestehenden Unterschieden für die einzelnen hier durchgeführten Untersuchungen im Vergleich der beiden Patientenkollektive, dem IVF- und dem ICSI-Kollektiv führt zu der sich deutlich herausstellenden Tendenz der insgesamt schlechteren Resultate bzw. eines höheren Schädigungsgrades in der ICSI-Therapiegruppe. Interessanterweise ergeben sich bei den mittels ICSI therapierten Patientenpaaren trotz des höheren Schädigungsgrades der Spermatozoen im Vergleich zu den mit IVF Behandelten sowohl höhere Befruchtungs- ( $63,78 \pm 27,84 \%$  versus  $55,14 \pm 23,81 \%$ ) als auch Schwangerschaftsraten ( $50 \%$  versus  $24,14 \%$ ).

Die Untersuchungen zur Auswirkung sämtlicher in der vorliegenden Arbeit bestimmter Parameter auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate der Patientinnen nach IVF- oder ICSI-Therapie ergeben wenig eindeutige Ergebnisse. Insgesamt kann im Rahmen der vorliegenden Dissertation kein Parameter identifiziert werden, mit dessen Hilfe sich der



Erfolg einer Therapie mit IVF und/oder ICSI sicher voraussagen ließe. Dementsprechend und aufgrund der ebenfalls unklaren Studienlage besteht zur Beeinflussung der Therapiere-sultate nach Anwendung assistierter Reproduktionsverfahren noch erheblicher Forschungsbedarf.

Da sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse aus der reproduktionsmedizinischen For-schung als unzureichend darstellen und noch zahlreiche Fragen offen lassen, müssen zur endgültigen Klärung des hier untersuchten Themenkomplexes schließlich noch weitere Studien folgen.

## 1.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

### **Reactive oxygen species (ROS) and enzymatic antioxidants in seminal plasma as well as their effect on sperm quality and the results after IVF and ICSI**

In the context of the increasingly complex subject of reproductive medicine this study primarily examines the male factor causes of unintentional childlessness.

In these examinations semen samples of 46 subfertile patients total distributed to the two fertilization programs IVF (n=31) or ICSI (n=15) are analysed according to the WHO defined standard sperm parameters, the DNA integrity of spermatozoa and the concentrations of oxidants and antioxidants in seminal plasma. All achieved results are considered in comparison between the two therapy groups, the IVF and the ICSI group. The connection of all the results with each other as well as with the results of fertilization and pregnancy are examined by bivariat correlations.

The evaluation of the standard semen parameters such as sample volume, pH-value, viscosity, sperm concentration and motility also include the assessment of vitality with eosin and HOS test, the cytur and MAR test as well as the assessment of sperm morphology. The DNA-integrity is analysed with three methods: the chromomycin A<sub>3</sub> test, which shows the chromatin condensation of spermatozoa, the acridine orange assay, which is used to evaluate the susceptibility of in situ DNA denaturation and the TUNEL test in order to detect sperm DNA fragmentation by apoptosis. For sperm preparation exclusively the PureSperm<sup>®</sup>-density gradient centrifugation is used. After this preparation the concentration of reactive oxygen species (ROS), the total antioxidant status (TAS) as well as the activities of any

enzymatic antioxidants (glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase) are measured by different colorimetric assays in seminal plasma.

For the parameters of classical semen analysis this thesis can determine reduced values especially for sperm motility, vitality and normal morphology in compliance with the definition of male subfertility. Because DNA-integrity is only damaged in a low level, the present examinations do not confirm the often published assertion of DNA fragmentation as a convincing predictive parameter of male infertility. However there is – in agreement to a lot of other studies – a generally positive relationship between DNA-integrity and normal sperm parameters. There is also an agreement between the present and other current studies in view of the negative relationship between ROS concentration and sperm parameters, especially for pH-value, progressive motility and normal morphology. The correlations between the three antioxidative enzymes and the sperm parameters show a clearly protective effect of these enzymes.

In contrast to many other analyses this study finds a negative relationship between chromatin decondensation and ROS concentration. This negative relationship confirms the thesis of a physiological ROS production, which is necessary for normal sperm function. On the other hand there is – as noted by many other authors – also a protective effect of antioxidative parameters on DNA-integrity.

The comparison of the two fertilization programs IVF and ICSI represents a generally higher grade of sperm damage in the ICSI group. Nevertheless the ICSI group shows better fertilization ( $63,78 \pm 27,84$  % versus  $55,14 \pm 23,81$  %) and pregnancy rates (50 % versus 24,14 %) as patients undergoing IVF treatment.

In this thesis any evident effect of these male parameters on female fertilization and pregnancy rates after IVF or ICSI treatment cannot be identified. Therefore and because of the also uncertain results of many earlier studies no parameter predicting the success of assisted reproductive therapy can be described. Further clinical studies of this subject are urgently required.

Currently there are still many unanswered questions in reproductive medicine research. To answer these questions and in order to find a final clarification of this subject further studies and examinations are necessary and important.

## 2 Einleitung und Eigene Fragestellung

### 2.1 Allgemeine Aspekte

„Ungewollt kinderlos“, so lautet der Titel einer aktuellen Studie des Berlin-Instituts für Bevölkerung und Entwicklung, das in Zusammenarbeit mit dem Institut für Demoskopie Allensbach der Frage nachgeht, welchen Beitrag die Fortpflanzungsmedizin zur Abmilderung der demografischen Krise in Deutschland leisten kann. Nach einer im Rahmen dieser Studie durchgeführten Umfrage, bei der 3.496 Deutsche zwischen 25 und 59 Jahren nach ihren Kinderwünschen befragt wurden, leben in Deutschland 1,4 Millionen Menschen, die aus medizinischen Gründen ungewollt kinderlos sind und denen mittels künstlicher Befruchtung geholfen werden könnte. Eine der Antworten auf die demografischen Herausforderungen könnte also laut der Studie in der „Kunststoffschale“ liegen, dort „wo Spermium und Eizelle miteinander verschmelzen und so neues Leben entsteht“. [Berlin-Institut, 2007]

Seit Oliver 1981 in Erlangen als erstes Retortenbaby Deutschlands – drei Jahre nach der Geburt von Louise Joy Brown in Großbritannien, des allerersten außerhalb des menschlichen Körpers gezeugten Babys weltweit – das Licht der Welt erblickte, wurden in Deutschland bisher über 100.000 Kinder auf diese Weise gezeugt, weltweit über drei Millionen. Nach Angaben von Dr. Reiner Klingholz, dem Leiter des Berlin-Instituts für Bevölkerung und Entwicklung könnten dies deutlich mehr Kinder sein, wenn die künstliche Befruchtung nicht so teuer wäre. [Berlin-Institut, 2007]

Am 1. Januar 2004 trat das Gesundheitsmodernisierungsgesetz (GMG) in Kraft. Seither sei die Zahl der im Deutschen IVF-Register (DIR) aufgeführten hormonellen Stimulationsbehandlungen, die jeder künstlichen Befruchtung vorausgehen, insgesamt um 52 Prozent zurückgegangen und auch die Zahl der Geburten nach künstlicher Befruchtung habe sich von 2003 auf 2004 von 18.872 auf 9.568 etwa halbiert. [Berlin-Institut, 2007]

Nach dem neuen Gesetz werden von der gesetzlichen Krankenversicherung nur noch drei Behandlungszyklen bei 50 Prozent Eigenbeteiligung bezahlt (vorher wurden vier Behandlungszyklen voll erstattet), wobei die Frauen nicht jünger als 25 und nicht älter als 40 sein dürfen, die Männer nicht älter als 50 und das Paar verheiratet sein muss. Laut Berlin-Institut bedeutet dies, dass bei drei Zyklen rund 4.800 Euro vom Paar selbst bezahlt werden müssen. [Berlin-Institut, 2007]

Die Berliner Wissenschaftler gelangen in ihrer 2007 veröffentlichten Studie zum Thema „Ungewollt kinderlos – Was kann die moderne Medizin gegen Kindermangel in Deutschland tun?“ zu dem Ergebnis, dass künstliche Befruchtung als gesamtgesellschaftliches Thema im Kontext einer modernen Familienpolitik und vermehrter Prävention zur Vermeidung medizinisch bedingter Unfruchtbarkeit einen gewissen Beitrag zur Erhöhung der Geburtenstatistik leisten kann. Würde die künstliche Befruchtung in vergleichbarem Ausmaß wie in Dänemark genutzt, dem Land mit der höchsten Zahl von IVF-Behandlungen pro Einwohner, wo Paare mit unerfülltem Kinderwunsch drei Behandlungen voll bezahlt bekommen, könnte sie sogar nach Angaben des Berlin-Instituts einen wesentlichen Beitrag zur Erhöhung der Geburtenstatistik leisten. [Berlin-Institut, 2007]

Diese Studie zeigt deutlich die hoch aktuelle Bedeutung sowie auch das wachsende öffentliche Interesse am Thema der modernen Reproduktionsmedizin. Die stetige Weiterentwicklung und Verbesserung der reproduktionsmedizinischen Verfahren, allen voran die in-vitro-Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI), die auch im Rahmen dieser Dissertation von großer Bedeutung sind und im Abschnitt 3.6 näher erläutert werden, haben seit ihrer weltweiten Etablierung zu einer zunehmenden Reduzierung des Behandlungsrisikos bei gleichzeitiger Verbesserung der Erfolgsaussichten geführt. Die Einführung der ICSI im Jahr 1992 hat der modernen Reproduktionsmedizin nochmals einen deutlichen Aufschwung beschert, da mit Hilfe dieses Mikromanipulationsverfahrens, bei dem nur ein einziges vitales Spermium pro Eizelle – im Gegensatz zu mehreren tausend Spermien bei der IVF – benötigt wird, auch Männer mit schwerer Subfertilität, bei denen ein Erfolg durch IVF aussichtslos erscheint, Kinder zeugen können.

Auf die Frage, warum eigentlich so viele Menschen von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen sind, gibt es laut Berlin-Institut zahlreiche Antworten. Die Berliner Wissenschaftler unterscheiden in ihrer Studie „Ungewollt kinderlos“ zwei Gruppen von ungewollt Kinderlosen. „Erstens die Paare, bei denen es aus biologisch-medizinischen Gründen nicht zu einer Schwangerschaft kommt. Zweitens jene, die das Kinderkriegen auf später verschieben bis es möglicherweise zu spät ist und sie sich dann zusammen mit den Paaren aus der ersten Gruppe in einer Kinderwunschbehandlung wiederfinden“. [Berlin-Institut, 2007]

Nach Angaben der Kölner Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung ist jede 7. Partnerschaft vom Ausbleiben des ersehnten Nachwuchses trotz allen „Probierens“ betroffen [BZgA, 2007]. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man von Unfruchtbarkeit eines Paares, wenn bei regelmäßigem ungeschütztem Geschlechtsverkehr über zwei Jahre hinweg keine Schwangerschaft eintritt [Berlin-Institut, 2007]. Dabei wird grundsätzlich

zwischen Sterilität und Infertilität unterschieden [Lübke, 2004]. Unter Sterilität versteht man das Unvermögen, schwanger zu werden, während mit Infertilität der Frau das Unvermögen, eine Schwangerschaft auszutragen, gemeint ist [Lübke, 2004]. „Infertilität des Mannes bedeutet Unfruchtbarkeit auf Grund der erhobenen Befunde im Spermogramm“ [Stauber, 2001]. Hierbei sind nicht nur Kinderlose, bei denen noch nie eine Schwangerschaft vorgelegen hat, betroffen, was man als primäre Sterilität bezeichnen würde, sondern auch Eltern, die ein weiteres Kind wollen (sekundäre Sterilität) [Lübke, 2004].

„1967 wurde die ungewollte Kinderlosigkeit (Zeugungs- und/oder Empfängnisunfähigkeit) durch die Scientific Group on the Epidemiology of Infertility der WHO als Krankheit anerkannt“ [Robert Koch Institut, 2004]. Ursächlich können dabei sowohl biologische Störungen oder Fehlfunktionen als auch seelische Belastungen durch Stress oder sozialen Druck sein [Berlin-Institut, 2007]. Für die männliche Infertilität konnten Hurst et al. eine Verschlechterung des Spermogramms in Abhängigkeit von alltäglichem Stress und seiner Bewältigung bereits nachweisen [Hurst, 2000].

Entgegen dem in der Studie des Berlin-Instituts offenkundig gewordenen, immer noch weit verbreiteten Vorurteil, dass allein Frauen unfruchtbar sein können, verteilen sich die medizinischen und biologischen Störungen laut den Berliner Wissenschaftlern etwa zu gleichen Teilen auf Männer wie auf Frauen. So liegt nach Angabe des Berlin-Instituts in ca. 30 bis 40 Prozent der Fälle der Grund für die Unfruchtbarkeit eines Paares allein beim Mann und ebenfalls in ca. 30 bis 40 Prozent ausschließlich bei der Frau. In etwa 20 bis 30 Prozent, je nach Literatur sogar in bis zu 40 Prozent [Strowitzki, 1996; Lübke, 2004] der Fälle liegen Fertilitätsstörungen sowohl bei der Frau als auch beim Mann vor. [Berlin-Institut, 2007]

Erektionsstörungen und Impotenz seien laut Berlin-Institut dabei das geringste Problem [Berlin-Institut, 2007]. Männliche Unfruchtbarkeit geht auch nach Angaben des Deutschen IVF-Registers [DIR, 2003] überwiegend auf schlechte Spermienqualität zurück. In selteneren Fällen sind urogenitale Fehlbildungen oder eine eingeschränkte Funktion der Hoden, welche beispielsweise als Folge einer Mumps-Infektion in der Pubertät auftreten kann, der Grund für die Unfruchtbarkeit. [Berlin-Institut, 2007]

Als Ursache der andrologisch bedingten Sterilität kommen außerdem Varikozelen, Verletzungen, bakterielle Infektionen, Hormonstörungen, immunologische Störungen, aber auch Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus oder Arteriosklerose sowie iatrogen verursachte Störungen, z.B. nach einer Vasektomie oder durch Medikamenteneinnahme, in Frage [Stauber, 2001].

Weibliche Unfruchtbarkeit lässt sich nach Angaben des Deutschen IVF-Registers [DIR, 2003] am häufigsten auf ungenügende Durchlässigkeit oder Schädigung der Eileiter zurückführen. Daneben finden sich als Ausdruck hormoneller Fehlregulation bzw. einer Störung des hormonellen Gleichgewichts gehäuft Störungen des Menstruationszyklus. Eine weitere häufige Ursache der weiblichen Unfruchtbarkeit stellt die Endometriose dar. [Berlin-Institut, 2007]

Daneben kann bei etwa 5 bis 10 Prozent der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch trotz sorgfältiger Abklärung keine Ursache für die Unfruchtbarkeit gefunden werden. Laut Berlin-Institut können diese Fälle der ungeklärten Unfruchtbarkeit auf fehlerhaften Vorgängen bei der Entwicklung oder Reifung der Keimzellen beruhen. So können beispielsweise die letzten Zellteilungen fehlerhaft ablaufen oder dabei die Chromosomen unvollständig verteilt werden. [Berlin-Institut, 2007]

Neben den bisher beschriebenen Erkrankungen und Schädigungen werden auch Umwelteinflüsse in Form von Umweltgiften und Schadstoffen für eine gestörte Fertilität verantwortlich gemacht [Wong, 1998]. So wurden schon einige Studien veröffentlicht, die eine Veränderung medizinischer Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit infolge von Schadstoffeinflüssen annehmen, insbesondere eine Abnahme der Spermienqualität beim Mann, die anhand der vorliegenden Datenlage aber noch nicht eindeutig zu beurteilen ist [Haidl, 1999; Schuppe, 1999]. Eindeutig sind laut Berlin-Institut die Befunde für Faktoren, die mit einer mehr oder weniger gesunden Lebensführung zusammen hängen [Berlin-Institut, 2007]. „So kann starkes Unter- oder Übergewicht der Frau den Hormonhaushalt durcheinander bringen und den Eisprung stören. Ständiges Diäthalten und wieder Zunehmen hat den gleichen Effekt. Und wer raucht, ob Mann oder Frau, vermindert damit enorm die Chancen für eine Empfängnis.“ [Berlin-Institut, 2007]

In der ständig zunehmenden Gruppe der Menschen, die die Entscheidung des Kinderkriegen auf später vertagen, kann laut Berlin-Institut „aus einer zunächst gewollten Kinderlosigkeit unversehens eine unfreiwillige werden“ [Berlin-Institut, 2007]. „Das durchschnittliche Alter, in dem Frauen das erste Mal ein Kind zur Welt bringen, verschiebt sich seit Jahren beständig nach oben“ [Berlin-Institut, 2007]. Lag es in den sechziger Jahren im früheren Bundesgebiet noch bei knapp 25 Jahren, so liegt es gesamtdeutsch mittlerweile bei fast 30 Jahren [BiB, 2007]. Dabei verringert sich nach Angaben der Berliner Wissenschaftler mit jedem zusätzlichen Lebensjahr der Frau die Wahrscheinlichkeit, schwanger zu werden, um 4,7 Prozent [Berlin-Institut, 2007]. „Hormonell bedingte Störungen des Menstruationszyklus nehmen mit dem Alter der Frau kontinuierlich zu und auch die Wahrscheinlichkeit, ein

gesundes Baby zur Welt zu bringen, sinkt mit dem Alter“, so dass „eine 35-jährige Frau im Vergleich zu einer 25-jährigen nur noch halb so gute Chancen hat, schwanger zu werden und ein gesundes Kind zu bekommen“ [Berlin-Institut, 2007].

Die Männer bleiben laut Berlin-Institut mit zunehmendem Alter zwar grundsätzlich zeugungsfähig, aber die Qualität ihrer Spermien sinkt im Laufe der Zeit, so dass nach einem Lebensalter von 30 Jahren die „Trefferquote“ kontinuierlich abnimmt [Berlin-Institut, 2007]. Außerdem nimmt für Männer wie für Frauen mit zunehmendem Alter auch die Expositionszeit gegenüber den heutzutage ohnehin schon verstärkten nicht nur für die Fertilität schädlichen Faktoren zu – seien das Umwelttoxine oder ungesunde Lebensgewohnheiten wie Rauchen, übermäßiger Alkoholenuss [Donnelly, 1999], Drogenkonsum, Fastenkuren oder Übergewicht. Auch der häufige Wechsel von Sexualpartnern und das damit erhöhte Infektionsrisiko sexuell übertragbarer Krankheiten (z.B. Chlamydieninfektionen) wirken sich negativ auf die Fertilität aus [Robert Koch Institut, 2004].

Dass sich viele Paare auch einfach der Konsequenz eines leichtfertigen Aufschiebens der Familienplanung nicht bewusst sind, zeigt eine Untersuchung des Instituts für Demoskopie Allensbach im Rahmen der mehrfach erwähnten Studie. Danach glaubt eine Mehrheit von 54 Prozent der Bevölkerung, dass erst ab einem Alter von 40 Jahren und darüber hinaus die Fruchtbarkeit der Frau abnimmt. Die Tatsache, dass es mit den Jahren allerdings für die Frauen wie für die Männer immer schwieriger wird, sowohl auf natürlichem Wege als auch mit Hilfe der Reproduktionsmedizin ein Kind zu zeugen, muss laut Dr. Reiner Klingholz mehr ins Bewusstsein der Öffentlichkeit gerückt werden. „Der Glaube, man habe alle Zeit der Welt, weil am Ende eine Kinderwunschklinik für den Nachwuchs sorgt, kann sich – so Klingholz – leicht als fataler Irrglaube entpuppen.“ [Berlin-Institut, 2007]

## **2.2 Bedeutung der untersuchten Parameter**

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich im Rahmen der angesprochenen Problematik der ungewollten Kinderlosigkeit aus biologisch-medizinischer Ursache im Speziellen mit dem Aspekt der männlichen Unfruchtbarkeit und ihrer Wirkung auf die Ergebnisse einer Kinderwunschtherapie.

Die Arbeit versucht entscheidende Einflussfaktoren für eine gestörte männliche Fertilität sowie für die Therapie mit IVF oder ICSI zu identifizieren. Es sollen Parameter gefunden werden, die eine bessere Vorhersagbarkeit des Erfolgs reproduktionsmedizinischer Verfah-

ren erlauben, sowie solche, die generell einen positiven oder negativen Einfluss auf die Spermienqualität ausüben. Dazu werden verschiedene Parameter im menschlichen Ejakulat untersucht und anschließend mit den Behandlungsergebnissen nach IVF oder ICSI verglichen.

Die folgenden Abschnitte beinhalten eine kurze Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Parameter sowie ihrer Bedeutung in der andrologischen Fertilitätsdiagnostik.

Auch wenn der Fokus der vorliegenden Dissertation auf eine gestörte männliche Fertilität als Ursache der ungewollten Kinderlosigkeit gerichtet ist, dürfen dabei die oben beschriebenen zahlreichen Ursachen und Einflussfaktoren weiblicher Unfruchtbarkeit nie ganz außer Acht gelassen werden.

### **2.2.1 SpermioGrammparameter**

Die Analyse des Ejakulats, das SpermioGramm zählt neben Hormonbestimmungen und einer klinischen Untersuchung des männlichen Genitale und der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale zu den obligaten diagnostischen Schritten zur Abklärung einer männlichen Subfertilität [Steck, 2001]. Im Rahmen des SpermioGramms werden das Ejakulatvolumen, der pH-Wert, die Viskosität, die Spermiedichte, die Motilität, die Vitalität und die Leukozytenzahl einer Ejakulatprobe bestimmt. Zudem wird das Vorhandensein von Antikörpern überprüft und die Spermienmorphologie beurteilt. Die im SpermioGramm erhobenen von der Norm abweichenden Befunde dienen der Definition und Klassifikation der andrologischen Sub- bzw. Infertilität und spiegeln somit die Spermienqualität einer Ejakulatprobe wider.

Zur Standardisierung der Ejakulatanalyse hat die WHO ein Laborhandbuch herausgegeben, in dem die Arbeitsschritte erklärt werden und die für das Erstellen eines SpermioGramms notwendigen Materialien sowie Normalwerte und die zu benutzende Terminologie genau aufgeführt sind. Das Vorgehen zur Erstellung eines SpermioGramms und die Normalwerte der einzelnen SpermioGrammparameter werden im Kapitel 3 ausführlich beschrieben. Die zur Beurteilung eines SpermioGramms zu verwendende Nomenklatur zeigt Tabelle 2-1.



Tabelle 2-1: Nomenklatur zur Beurteilung eines Spermogramms [nach WHO, 1999]

Nomenklatur	Erläuterung
Normozoospermie	Normale Ejakulatparameter
Oligozoospermie	Spermatozonenkonzentration/-dichte reduziert
Asthenozoospermie	Beweglichkeit/Motilität reduziert
Teratozoospermie	Anteil von Spermatozoen mit normaler Morphologie reduziert
Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom)	Dichte, Motilität und Morphologie pathologisch
Azoospermie	Keine Spermatozoen im Ejakulat (nach Zentrifugation)
Aspermie	Kein Ejakulat

Die Beurteilung der andrologischen Einschränkung erfolgt anhand der Kriterien Konzentration, Beweglichkeit und Morphologie der Spermien, wobei man grob unterteilt in leichtgradige, mittelgradige und schwere Einschränkung entsprechend der Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom) Grad I, II und III, deren Klassifikation in Tabelle 2-2 dargestellt ist [Steck, 2001]. Das OAT-Syndrom stellt als kombinierte Störung die häufigste Form eingeschränkter Samenqualität dar [Weidner, 2006].

Tabelle 2-2: Klassifikation der Oligoasthenoteratozoospermie [nach Steck, 2001]

Spermogrammparameter	Grad I	Grad II	Grad III
Konzentration [Mio/ml]	10-20	5-10	< 5
Globalmotilität [%]	30-50	20-30	< 20
Morphologie [% normal]	10-30	< 10	< 10

Die von der WHO definierten Normalwerte der einzelnen Spermogrammparameter erlauben zwar eine prognostische Einschätzung, aber außer für die Azoospermie und die Aspermie keine definitive Beurteilung der männlichen Zeugungsfähigkeit [Köhn, 2006]. Auch im Hinblick auf die Ergebnisse reproduktionsmedizinischer Therapieverfahren hat sich in einigen Studien gezeigt, dass die Standardparameter der Ejakulatanalyse in keiner Beziehung zum Erfolg einer ICSI-Therapie stehen [Nagy, 1995; Novero, 1997] und ebenfalls ungeeignet sind, den Erfolg einer Schwangerschaft nach IVF vorherzusagen [Paasch, 2007].

Unter den Reproduktionsforschern wird seit längerer Zeit das Thema einer kontinuierlichen Verschlechterung der männlichen Samenqualität kontrovers diskutiert. Aitken et al. finden selbst in Ejakulatproben von gesunden fertilen Männern eine Rate von 85 % an morphologischen Spermienabnormalitäten [Aitken, 2003]. Carlsen et al. beobachten in einer Metaanalyse einen signifikanten Abfall der mittleren Spermienkonzentration im Zeitraum zwischen 1940 und 1990 [Carlsen, 1992]. Dieses Ergebnis wird in mehreren Studien bestätigt [Auger, 1995; Irvine, 1996; Waeleghem, 1996; Swan, 1997]. Olsen et al. sowie Fisch et al. dagegen können keinen Rückgang der Spermiedichte verzeichnen [Olsen, 1995; Fisch, 1996]. Auch Studien an unselektierten jungen Männern aus Dänemark bestätigen einen Rückgang der Samenqualität [Andersen, 2000], der laut Bonde et al. mit verminderter Fertilität assoziiert ist [Bonde, 1998].

### **2.2.2 DNA-Integrität**

Da das Spermioogramm – abgesehen von der Azoospermie – keine sichere Fertilitätsprognose ermöglicht, versucht man durch zusätzliche funktionelle Tests eine bessere Aussage über die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen zu bekommen. Köhn et al. gehen davon aus, dass 25 bis 30 % der Männer mit Kinderwunsch reduzierte Spermatozoenfunktionen aufweisen, die sich mit dem Routinespermioogramm nicht nachweisen lassen. Sie postulieren daher Spezialuntersuchungen aus dem Ejakulat, die es Reproduktionsmedizinern im Vorfeld oder nach erfolglosen Versuchen der assistierten Fertilisation ermöglichen sollen, das weitere Vorgehen für ein Paar mit Kinderwunsch festzulegen. [Köhn, 2006]

Ärzte und Wissenschaftler stehen jedoch noch immer vor der schwer lösbaren Frage, welche dieser funktionellen Spermatozoenparameter am Besten zur Fertilitätsprognose bei der assistierten Reproduktion geeignet sind. Als biochemische Parameter können in diesem Zusammenhang die im Abschnitt 2.2.3 beschriebenen „reaktiven Sauerstoffspezies“ (ROS) bestimmt werden. Es existieren zahlreiche weitere funktionelle Spermatozoenparameter, deren Funktionstüchtigkeit als Voraussetzung für eine ungestörte Fertilisation anzusehen ist. Mit dem sogenannten Hemizona-Assay kann beispielsweise die suffiziente Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida der Eizelle überprüft werden. Der Hamsteroovum-Penetrationstest (HOP-Test) dient der Beurteilung einer hinreichenden akrosomalen Reaktion der Spermatozoen und der Beurteilung ihrer Fähigkeit an das Oolemma zu binden und schließlich mit der Eizelle zu verschmelzen. Da beide Testmethoden sehr zeitaufwändig sind und biologisches Material benötigen, können sie nur an selektierten Patientengruppen durchgeführt werden. [Henkel, 2000]

Immer mehr Forscher sind hingegen der Ansicht, dass Untersuchungen der DNA-Integrität der Spermatozoen fester Bestandteil der Routinediagnostik werden sollten. Da vor allem für das ICSI-Verfahren, bei dem die Spermiselektion ausschließlich nach den Kriterien der Motilität und Morphologie erfolgt, die Gefahr besteht, unter Umgehung der physiologischen Selektion defektes väterliches Erbgut weiterzugeben, ist es von großer Wichtigkeit, die DNA-Integrität nachweisen zu können [Sakkas, 2000; Perreault, 2003]. Die Methoden zur Erfassung von Spermiendefekten, welche die Integrität des Genoms betreffen, sind wiederum zahlreich. In der vorliegenden Dissertation werden zusätzlich zu den Standardparametern der Ejakulatanalyse drei Fluoreszenzfärbungen zur Beurteilung der DNA-Integrität angefertigt. Dabei werden als Marker der DNA-Integrität der Chromatinkondensationsstatus der Spermatozoen-DNA, die DNA-Denaturierung und der Grad der durch Apoptose entstandenen DNA-Fragmentation beurteilt sowie deren Auswirkungen auf die Fertilisation untersucht.

Es hat sich gezeigt, dass die DNA-Integrität der Spermatozoen einen ganz entscheidenden Faktor für die normale Fertilisation und das normale Embryowachstum sowohl im Rahmen der natürlichen als auch bei der assistierten Konzeption darstellt [De Jonge, 2002; Agarwal, 2003a]. So haben verschiedene klinische Untersuchungen nachweisen können, dass Schädigungen der DNA-Integrität im Sinne einer DNA-Fragmentation und/oder einer abnormen Chromatinkondensation sich negativ auf die natürliche Reproduktion auswirken und dass die Spermien infertiler Männer einen wesentlich größeren Anteil an DNA-Schädigungen aufweisen als die fertiler Männer [Kodama, 1997; Evenson, 1999; Spano, 2000; Zini, 2001]. Sergerie et al. berichten über einen Unterschied von 20 % Schädigungen der Spermatozoen-DNA zwischen einer fertilen Kontrollgruppe und infertilen Männern, was verdeutlicht, dass die DNA-Integrität als ein effektiver Indikator für das männliche Fertilitätspotential unter natürlichen Bedingungen gesehen werden kann [Sergerie, 2005]. Evenson et al. sprechen von einem Schwellenwert von 30 % Spermien im Ejakulat mit fragmentierter DNA, bei dessen Überschreiten die Erfüllung des Kinderwunsches auf natürlichem Wege progressiv abnimmt [Evenson, 1999]. Im Vergleich mit den konventionellen Spermioogrammparametern zeigen sich diese in ihrer Prädiktion der DNA-Fragmentation unterlegen, zumal sie einer deutlichen Subjektivität unterliegen [Zini, 2001].

Es existieren zum Thema der DNA-Integrität von Spermatozoen zahlreiche verschiedene Studien, die fast alle zum Ergebnis gelangen, dass Schädigungen der DNA-Integrität das männliche Fertilitätspotential beeinträchtigen [Zhongxiang, 2006]. Im Hinblick auf die Erfolge einer IVF- oder ICSI-Therapie herrscht allerdings nicht zuletzt aufgrund der Vielfalt der verwendeten Testmethoden Uneinigkeit. So finden einige Forscher keinen negativen Einfluss der Schädigung der Spermien-DNA auf die Fertilisationsrate [Tomlinson, 2001; Morris, 2002;

Tesarik, 2002; Henkel, 2003; Henkel, 2004] und die Schwangerschaftsrate nach IVF und ICSI [Gandini, 2004; Seli, 2004; Huang, 2005], während andere Autoren von einer negativen Korrelation zwischen der DNA-Fragmentation und der Fertilisationsrate [Sun, 1997; Lopes, 1998a,b; Host, 2000; Huang, 2005] sowie von einer signifikanten Abnahme der Schwangerschaftsrate bei Patienten mit einem hohen Grad an DNA-geschädigten Spermien [Larson, 2000; Benchaib, 2003; Henkel, 2003; Larson-Cook, 2003; Henkel, 2004] berichten. Nach Gardiner-Garden korreliert die im Ejakulat messbare DNA-Fragmentationsrate auch negativ mit der weiteren Embryonalentwicklung nach IVF und ICSI [Gardiner-Garden, 1999].

### 2.2.3 Oxidantien und Antioxidantien

„Seit der Erstbeschreibung des Einflusses von reaktiven Sauerstoffspezies (= Reactive Oxygen Species = ROS) auf menschliche Spermatozoen [Aitken, 1989a] ist es jetzt weitgehend akzeptiert, dass oxidativer Stress mit männlicher Infertilität assoziiert ist“ [Henkel, 2000]. Die reaktiven Sauerstoffspezies wurden in den letzten Jahrzehnten als zentrale Agenzien bei Entzündungen, Ischämien/Reperfusionsschäden, Alterung und Karzinogenese identifiziert [Ochsendorf, 1999].

Unter reaktiven Sauerstoffspezies versteht man verschiedene Sauerstoffmoleküle enthaltende oxidierende Substanzen, die entweder als freie Radikale wie das Superoxidanion und das Hydroxyl-Radikal oder als langlebige ungeladene Verbindungen wie Wasserstoffperoxid in Erscheinung treten können und physiologischerweise in Mitochondrien im Rahmen des aeroben Stoffwechsels bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser gebildet werden [Ochsendorf, 1999]. Im Ejakulat werden ROS überwiegend aus Leukozyten freigesetzt [De Lamirande, 1995]; ein geringer Anteil kann aber auch von Spermatozoen selbst gebildet werden [Aitken, 1992; Aitken, 1997; De Iulius, 2006]. Untersuchungen haben gezeigt, dass ROS offenbar als physiologische Transmitter wirken und eine Rolle bei der Erfüllung physiologischer Funktionen wie der Kapazitation und der akrosomalen Reaktion spielen [Ochsendorf, 1999]. Unphysiologisch hohe ROS-Mengen können sich auf diese Funktionen allerdings ebenso negativ auswirken [Ochsendorf, 1997; Saleh, 2002a]. Weiterhin führen hohe ROS-Konzentrationen zur Oxidation der Lipide der Spermatozoen-Plasmamembranen, die wegen der zahlreichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren gegenüber einer Oxidation besonders anfällig sind, und damit zur Schädigung der vielfach von der Membranfunktion abhängigen Spermatozoenfunktionen [Ochsendorf, 1999; Henkel, 2000]. Eine erhöhte ROS-Bildung im Ejakulat wird mit einer erhöhten DNA-Oxidation in den Spermatozoen [Motchnik, 1997; Kodama, 1997], verminderter Oolemmabindungs- und Penetrationsfähigkeit und

Infertilität assoziiert [Aitken, 1989a]. Verschiedene Studien haben zudem den negativen Einfluss einer hohen ROS-Konzentration auf die SpermioGrammparameter, vor allem auf die Spermienkonzentration [Aitken, 1992; Ochsendorf, 1994], die Motilität [Mortimer, 1991; Aitken, 1992; Agarwal, 1994; Ochsendorf, 1994; Gomez, 1998] und die Morphologie [Aziz, 2004; Mohammad Reza Moein, 2007] nachgewiesen. Die durch ROS induzierten DNA-Schäden vermindern die Befruchtungsfähigkeit der Spermien und können wohl auch den Prozess der Apoptose beschleunigen [Agarwal, 2003b].

Darüber hinaus beschreibt Ford eine positive Korrelation der oxidativen Schädigung von Spermatozoen mit entzündlichen Prozessen im Genitaltrakt und dem vermehrten Auftreten von ROS produzierenden Granulozyten [Ford, 1990]. Iwasaki und Henkel et al. haben unabhängig voneinander in etwa 30 bis 40 % der Ejakulate von infertilen Männern eine zu hohe Produktion von ROS gefunden [Iwasaki, 1992; Henkel, 1997]. Auch Mohammad Reza Moein et al. gelangen zur Erkenntnis, dass die ROS-Konzentration im Seminalplasma infertiler Männer im Vergleich zu derjenigen fertiler Männer signifikant höher ist [Mohammad Reza Moein, 2007]. Besonders Patienten mit Oligozoospermie zeigen eine zu hohe Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Spermatozoen selbst [Aitken, 1989b; Henkel, 1998]. Auch bei Patienten mit Varikozelen lässt sich eine höhere Konzentration an ROS nachweisen als bei solchen, deren Infertilität ungeklärt ist [Agarwal, 2006; Mohammad Reza Moein, 2007].

Auch Oxidantien aus der Umwelt können im menschlichen Organismus eine ROS-Freisetzung bewirken. Der Mensch wird durch das moderne Leben zunehmend mit Umweltverschmutzung, Alkohol- und Medikamentenkonsum, längerfristiger Sonneneinstrahlung und Tabakrauchen konfrontiert. Diese Faktoren können im Körper zu einer übermäßigen ROS-Produktion mit anschließender Schwächung der antioxidativen Schutzmechanismen sowie letztlich zu Schäden an den Zellen führen. Saleh et al. haben gezeigt, dass das Rauchen von Zigaretten einer der Gründe für eine erhöhte ROS-Bildung im Seminalplasma von infertilen Männern ist [Saleh, 2002b]. Frühere Studien bestätigen eine erhöhte oxidative Belastung der Spermien-DNA bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern [Fraga, 1996; Shen, 1997]. Loft et al. dagegen können keinen Zusammenhang zwischen verschiedenen Lebensgewohnheiten wie dem Zigarettenrauchen und einer erhöhten oxidativen DNA-Schädigung der Spermien feststellen [Loft, 2003].

Letztlich „entscheidend für die resultierenden Effekte gebildeter ROS ist offensichtlich das Gleichgewicht zwischen oxidativen Prozessen und antioxidativ wirkenden Schutzsystemen“ [Ochsendorf, 1999]. „Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugun-

ten der ersteren wird als „Oxidativer Stress“ bezeichnet“, der eine häufig irreversible Schädigung der Zellen zur Folge hat [Ochsendorf, 1999].

Die antioxidativ wirksamen Schutzsysteme sind sowohl in den Zellen als auch im Seminalplasma lokalisiert und lassen sich in die zwei großen Gruppen der enzymatischen und der nicht-enzymatischen Antioxidantien unterteilen [Ochsendorf, 1999]. Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPX) zählen zu den bekanntesten enzymatischen Antioxidantien [Sikka, 2004]. Sie katalysieren die Umwandlung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser und leisten so einen wesentlichen Beitrag zum Schutz der Zellen vor oxidativen Schäden. Zum großen System der nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören beispielsweise Transferrin, Ferritin, Caeruloplasmin, Glutathion, Harnsäure, Billirubin, Ubichinon, Pyruvat, Taurin und Hypotaurin, die Vitamine A, C und E sowie die Spurenelemente Kupfer, Zink und Selen, die für die Aktivität der antioxidativen Enzyme unverzichtbar sind [Garrido, 2004; Sikka, 2004].

Da das das antioxidative Abwehrsystem der Zelle enthaltende zytoplasmatische Volumen der Spermatozoen zu klein ist, um der Zelle einen adäquaten Schutz vor extrazellulären oxidativen Schädigungen zu bieten, kommt dem die Spermatozoen umgebenden Seminalplasma eine besondere Bedeutung im Schutz der Spermatozoen vor ROS zu [Ochsendorf, 1999; Garrido, 2004]. Das Seminalplasma enthält eine Reihe von sowohl enzymatischen Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase oder Glutathionreduktase [Mennella, 1980; Zini, 1993; Alvarez, 1989; Giannattasio, 2002], die im Rahmen dieser Arbeit alle drei näher betrachtet werden, als auch von den oben aufgeführten nicht-enzymatischen Antioxidantien [Saleh, 2002a].

Neben den genannten antioxidativen Enzymaktivitäten werden in der vorliegenden Dissertation der oxidative Status mittels ROS-Konzentration und der Gesamtantioxidantienstatus im Seminalplasma ermittelt und analysiert. Der Gesamt- oder Totale Antioxidantienstatus (= Total Antioxidant Status = TAS) umfasst dabei die Summe der Einzelaktivitäten aller in dem untersuchten biologischen Milieu vorliegenden Antioxidantien [Ghiselli, 2000]. Untersuchungen haben gezeigt, dass im Seminalplasma infertiler Männer im Vergleich zu fertilen Männern geringere Antioxidantienkonzentrationen vorliegen [Lewis, 1995], besonders bei jenen Männern mit herabgesetzter Motilität [Smith, 1996; Balercia, 2003] und/oder schlechter Spermienmorphologie [Koca, 2003]. Zudem sollen hohe ROS-Konzentrationen bei infertilen Männern mit niedrigeren Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma assoziiert sein [Lewis, 1995] bzw. soll eine exzessive ROS-Produktion zur Überwältigung der antioxidativen Abwehr und damit zur oxidativen Zerstörung der Spermatozoen und folgender Infertilität

führen [Maiorino, 2002]. Die Erfassung des Gesamtantioxidantienstatus erscheint nicht zuletzt im Hinblick auf die Beurteilung des Gleichgewichts zwischen oxidativen Prozessen und der antioxidativen Abwehr sinnvoller als die Bestimmung einer einzelnen antioxidativen Komponente. Der Totale Antioxidantienstatus berücksichtigt zudem das Zusammenspiel der einzelnen Antioxidantien [Smith, 1996; Balercia, 2003] und dient darüber hinaus über einen zu errechnenden ROS-TAS-Score einer besseren Beurteilung der männlichen Infertilität [Sharma, 1999]. Nach Sharma et al. zeigt dieser ROS-TAS-Score die oxidative Belastung deutlicher an, ist stärker mit männlicher Infertilität assoziiert und besitzt einen besseren Vorhersagewert für das Eintreten einer Schwangerschaft bei Patienten mit klinischer Infertilität als ROS oder TAS alleine [Sharma, 1999].

Dennoch hat sich eine exzessive ROS-Produktion als einer der besten Vorhersagewerte für ein schlechtes Ergebnis, d.h. für niedrige Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten bei der in-vitro-Fertilisation herausgestellt [Krausz, 1994; Sukcharoen, 1995; Sukcharoen, 1996; Zorn, 2003]. Für die Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion ist im Hinblick auf die Beeinflussung durch ROS bisher noch wenig bekannt. Zorn et al. können für die Therapie mit ICSI keinen negativen Einfluss hoher ROS-Konzentrationen auf die Fertilisation, wohl aber eine negative Assoziation mit der frühen Embryonalentwicklung feststellen [Zorn, 2003]. Hammadeh et al. beschreiben eine schwach negative Korrelation zwischen der Befruchtungsrate sowohl nach IVF- als auch nach ICSI-Therapie und der ROS-Konzentration im Seminalplasma [Hammadeh, 2006].

Auch für die verschiedenen Antioxidantien und den Gesamtantioxidantienstatus zeigt sich die aktuelle Studienlage im Hinblick auf Fertilisation, Schwangerschaft und Therapieresultate assistierter Reproduktionsverfahren noch wenig fundiert. Erste Therapiestudien deuten daraufhin, dass sich eine systemische antioxidative Behandlung günstig auf die männliche Infertilität auswirken kann [Ochsendorf, 1999]. Auch werden Behandlungen mit verschiedenen Antioxidantien im Rahmen der assistierten Reproduktion diskutiert. Für die Zukunft gilt es auf jeden Fall, die optimale Diagnostik zur Erkennung von Patienten mit einer durch ROS bedingten Infertilität zu identifizieren sowie die optimale Therapie bezüglich Präparat und Dosierung festzulegen [Ochsendorf, 1999].

## 2.3 Eigene Fragestellung

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation besteht in der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen verschiedenen SpermioGrammparametern, oxidativen und antioxidativen Parametern des Seminalplasmas und der DNA-Integrität sowohl untereinander als auch gegenüber den klinisch bedeutsamen Therapieresultaten einer IVF- bzw. ICSI-Behandlung.

Es sollen somit Parameter identifiziert werden, die entscheidende Einflussfaktoren für die andrologische Sub- bzw. Infertilität sowie für die assistierten Reproduktionsverfahren und ihre Ergebnisse darstellen.

Zu diesem Zweck werden zunächst die verschiedenen SpermioGrammparameter in den Ejakulatproben bestimmt. Dabei werden neben dem Volumen, dem pH-Wert, der Viskosität, der Dichte und der Motilität zusätzlich die Vitalität mittels Eosin- und HOS-Test, die Anzahl der Leukozyten mittels Cytur-Test, das Vorhandensein von Antikörpern mit Hilfe des MAR-Tests sowie die Spermienmorphologie betrachtet. Zudem erfolgen Färbungen zur Beurteilung der DNA-Integrität im Speziellen zur Analyse der Chromatinkondensation (Chromomycin A<sub>3</sub> Färbung), der DNA-Denaturierung (Acridine Orange Färbung) und des programmierten Zelltodes, der Apoptose (TUNEL-Färbung) sowie Messungen zur Bestimmung der Oxidantienkonzentration (ROS), des Gesamtantioxidantienstatus (TAS) und verschiedener enzymatischer Antioxidantienkonzentrationen (Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase, Superoxiddismutase) im Seminalplasma.

Zusammenfassend kann man die Fragestellung dieser Arbeit in folgenden Punkten festhalten:

1. Welchen Einfluss haben die Parameter der DNA-Integritätsbestimmung sowie die Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma auf die SpermioGrammparameter?
2. Welcher Zusammenhang besteht zwischen den Parametern der DNA-Integritätsbestimmung und den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma?
3. Welche Auswirkungen haben die untersuchten Parameter auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnisse der Patientinnen nach IVF- und ICSI-Therapie?
4. Ergeben sich Unterschiede für die Untersuchungen im Vergleich der beiden Patientenkollektive, dem IVF- und dem ICSI-Kollektiv?



### **3 Material und Methodik**

Das folgende Kapitel beinhaltet die Beschreibung aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Methoden zur Erfassung und Beurteilung der Untersuchungsergebnisse.

Dabei erfolgt zunächst die Betrachtung der Patienten, deren Ejakulatproben den Hauptuntersuchungsgegenstand der Arbeit darstellen. Anschließend werden die Methoden und Tests zur Erfassung der SpermioGrammparameter und der DNA-Integrität sowie das Vorgehen zur Messung der Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma näher beleuchtet.

Im Anschluss an die Schilderung dieses experimentellen ausschließlich die Männer betreffenden Teils der Arbeit erfolgt die Darstellung der behandelten Patientinnen und des klinischen Vorgehens bei der Therapie mit IVF und ICSI.

Zuletzt werden noch die Methoden zur statistischen Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erläutert.

#### **3.1 Patienten**

Im Rahmen dieser Studie werden Spermaproben von insgesamt 46 Patienten im Alter zwischen 25 und 49 Jahren untersucht, die im Zeitraum von Juli 2005 bis Januar 2007 mit ihren Ehefrauen oder Lebenspartnerinnen wegen unerfülltem Kinderwunsch die Fertilitätssprechstunde der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätskliniken des Saarlandes aufsuchten. Die Aufteilung in zwei Patientenkollektive erfolgt nach der Behandlungsmethode entweder in die IVF-Gruppe, die 31 Patienten umfasst, oder in die ICSI-Gruppe bestehend aus 15 Patienten. Das Alter der Patienten unterscheidet sich zwischen beiden Gruppen statistisch nicht signifikant ( $p=0,236$ ).

Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Vergleich der beiden Therapieverfahren IVF und ICSI liegt und zudem bereits eine Vielzahl von Untersuchungen der gleichen Zielsetzung vorhanden ist, die allesamt Referenzwerte von gesunden, fertilen Männern zur Gegenüberstellung heranziehen, wird in der vorliegenden Dissertation auf den Vergleich der hier untersuchten subfertilen Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verzichtet.

Die Spermaproben werden nach mindestens dreitägiger sexueller Karenz in einem dafür vorgesehenen Raum in unmittelbarer Nähe des Labors der Frauenklinik durch Masturbation in ein mit den Patientendaten, Datum und Uhrzeit der Probengewinnung beschriftetes steriles Plastikgefäß gewonnen. Zur korrekten Probengewinnung und zum Transport des Ejakulats werden die Patienten vorher genau aufgeklärt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Proben während des Transports zum Labor vor extremen Temperaturen geschützt werden und nur vollständige Proben analysiert werden [WHO, 1999]. Um eine möglichst optimale Temperatur zu gewährleisten, werden die Proben sofort nach der Gewinnung auf eine Heizplatte bei 37°C bis zur weiteren Untersuchung gestellt.

Anschließend erfolgt noch innerhalb der ersten Stunde nach Probengewinnung die Untersuchung des Ejakulats nach makroskopischen Aspekten wie Liquefizierung, Aussehen, Volumen, Viskosität und pH-Wert. Zudem werden mittels Cytur-Test die Leukozyten im Ejakulat bestimmt. Nach mikroskopischen Gesichtspunkten werden die Proben auf Dichte und Motilität untersucht. Außerdem werden die Vitalitätsprüfungen Eosin- und HOS-Test sowie der MAR-Test zur Detektion von Immunglobulin G-Antikörpern auf den Spermien durchgeführt. Nach Liquefizierung, d.h. nach der Verflüssigung der Nativprobe (nach circa 15 bis 30 Minuten) erfolgt die Anfertigung von Ausstrichpräparaten zur späteren Färbung. Diese müssen sorgfältig mit der jeweiligen Patientennummer und dem Vermerk „vor“ für „Probe vor Aufbereitung“ beschriftet werden.

Alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Proben werden ausschließlich mit der PureSperm<sup>®</sup>-Aufbereitungsmethode behandelt. Während der Aufbereitung wird nach einer 20 Minuten dauernden Dichtegradientenzentrifugation der Überstand der mit PureSperm<sup>®</sup> behandelten Spermaprobe, welcher dem Seminalplasma entspricht, abpipettiert und in mit der jeweiligen Patientennummer beschrifteten Eppendorfgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung eingefroren. Im Anschluss an die Aufbereitung werden erneut Dichte und Motilität bestimmt sowie der HOS-Test durchgeführt und zusammen mit den bisher gewonnenen Ergebnissen für jeden Patienten in einem dafür vorgesehenen standardisierten Spermogrammprotokoll (siehe 7.1.1) dokumentiert.

Die aufbereiteten Spermaproben können dann anschließend weiter zur in-vitro-Fertilisation (IVF) bzw. für die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) verwendet werden. Des Weiteren erfolgt die erneute Anfertigung von Ausstrichpräparaten – diesmal mit dem Vermerk „nach“ für „Probe nach Aufbereitung“ – zur späteren Färbung und Auswertung. Da die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit also an exakt dem gleichen Probenmaterial durchgeführt werden, das auch in der IVF- und ICSI-Therapie Anwendung findet, können alle

erzielten Ergebnisse direkt mit den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten in Bezug gesetzt bzw. verglichen werden.

## **3.2 SpermioGrammparameter**

Die SpermioGrammbefunde werden routinemäßig vom Laborfachpersonal der Universitäts-frauenklinik bestimmt und in die entsprechenden standardisierten Protokolle eingetragen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Daten dieser SpermioGramme werden retrospektiv aus den Akten erhoben.

### **3.2.1 Spermienausstriche und Fixierung der Objektträger**

Wie unter 3.1 bereits beschrieben, werden kurz nach der Liquefizierung der Ejakulatprobe von der Nativprobe sowie nach der PureSperm<sup>®</sup>-Aufbereitung Ausstrichpräparate für weitere Untersuchungen angefertigt.

Dabei wird ein Tropfen des Ejakulats auf einen gesäuberten am Rand mit der Patienten-nummer sowie dem Vermerk „vor“ bzw. „nach“ versehenen Objektträger (MENZEL, Braun-schweig) aufgebracht und anschließend durch eine „ziehende Bewegung“ mit der Kante eines weiteren Objektträgers gleichmäßig verteilt [WHO, 1999]. Danach werden die Objekt-träger ungefähr zehn Minuten luftgetrocknet und mit Fixationsspray (Merckofix<sup>®</sup>, MERCK, Darmstadt) eingedeckt.

### **3.2.2 Volumen**

Das Volumen der Ejakulatprobe wird nach der Liquefizierung auf der Heizplatte bei 37°C mit Hilfe eines graduierten Zylinders, in den die Probe vollständig einzufüllen ist, abgelesen. Hierbei gilt es zu beachten, dass bei der Handhabung der Proben, die für IVF oder ICSI vorbereitet werden, ausschließlich sterile Materialien verwendet werden.

Die untere Normgrenze für das Spermavolumen liegt bei 2,0 ml. [WHO, 1999]

### 3.2.3 pH-Wert

Ein Ejakulattropfen wird innerhalb der ersten Stunde nach Gewinnung gleichmäßig auf pH-Papier (pH-Indikatorstäbchen, pH 6,4-10,0, MERCK, Darmstadt) gestrichen. Nach 30 Sekunden zeigt sich eine uniforme Färbung, die zur Bestimmung des pH-Werts mit dem Kalibrationsstreifen verglichen wird. Ein normaler pH-Wert sollte mindestens bei 7,2 liegen [WHO, 1999] und idealerweise nicht höher als 8 sein [WHO, 1992].

### 3.2.4 Viskosität

Zur Beurteilung der Viskosität, die man in der Literatur auch als Konsistenz bezeichnet, wird in die verflüssigte Probe ein Glasstab eingeführt und beim langsamen Herausziehen des Stabes die Fadenlänge beobachtet. Der Faden sollte dabei nicht länger als 2 cm sein. Alternativ kann nach vorsichtiger Aspiration in eine 5 ml-Pipette die Fadenlänge der durch die Schwerkraft heraustropfenden Probe beobachtet werden. Als normal gilt hierbei das Herauslaufen kleiner einzelner Tropfen, während wiederum eine Fadenlänge von mehr als 2 cm als abnorm anzusehen ist. [WHO,1999]

### 3.2.5 Dichte

Die Spermiendichte oder Spermienkonzentration wird bestimmt, indem man 10 µl der verflüssigten Probe in die 10 mm Vertiefung einer Zählkammer, der sogenannten Maklerkammer [Makler, 1980] pipettiert und mit einem Deckglas (MENZEL, Braunschweig) abdeckt. Diese Maklerkammer ist in 10 mal 10 Quadranten aufgeteilt, von denen unter einem Mikroskop (OLYMPUS BH2-RFCA) bei 200facher Vergrößerung dreimal hintereinander 10 Quadranten ausgezählt werden. Der Mittelwert aus diesen drei Ergebnissen gibt dann die Anzahl der Spermien in Millionen pro Milliliter an. Die Spermiendichte wird sowohl vor als auch nach Aufbereitung erfasst.

Die normale Spermiendichte sollte mindestens 20 Millionen Spermien pro Milliliter betragen. Durch Multiplikation der Spermiendichte oder Spermienkonzentration mit dem Gesamtvolumen des Ejakulats ergibt sich die Gesamtspermienzahl, welche bei mindestens 40 Millionen Spermien pro Ejakulat liegen sollte. [WHO, 1999]

### 3.2.6 Motilität

Zur Beurteilung der Spermienmotilität werden analog zur Spermiedichte wiederum 10  $\mu\text{l}$  des verflüssigten Ejakulats in die Vertiefung der Maklerkammer gegeben. Bei 200facher Vergrößerung werden dann 100 Spermien in möglichst vielen Quadranten hinsichtlich ihrer Beweglichkeit ausgezählt. Dabei werden die folgenden vier Kategorien der WHO zur Klassifizierung der Spermienmotilität berücksichtigt [WHO, 1999]:

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

Bei der Auszählung erhält man schließlich für jede Motilitätskategorie einen Wert. Da genau 100 Spermien ausgezählt werden, können diese Werte direkt in Prozent angegeben werden. Zur Minderung von Zählungenauigkeiten erfolgt eine zweite Auszählung, wobei der Durchschnitt von beiden Auszählungen als Ergebnis für die Motilität festgehalten wird. Sollte die Abweichung dieser Doppelbestimmung größer als 10 % sein, muss mit einem neuen Ejakulattropfen erneut ausgezählt werden. [WHO, 1999]

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wird zwischen globaler Motilität, d.h. WHO-Kategorien a) und b) und progressiver Motilität, d.h. WHO-Kategorie a) unterschieden [Bals-Pratsch, 1998]. Die Normalwerte liegen hierbei für die Globalmotilität bei mindestens 50 %, für die Progressivmotilität bei mindestens 25 % [WHO, 1999].

Die Bestimmung der Spermienmotilität erfolgt wiederum vor und nach Aufbereitung der Probe.

### 3.2.7 Vitalität

Der Anteil lebensfähiger Spermien kann mittels Vitalfärbungen oder Testverfahren ermittelt werden, die die osmotische Belastungsfähigkeit der Spermatozoen unter hypoosmotischen Bedingungen prüfen [WHO, 1999]. Die standardmäßig verwendeten Methoden Eosin- und HOS-Test dienen demnach der Bestimmung der Lebensfähigkeit von Spermien.

## Eosin-Test

Das Prinzip des Eosin-Tests basiert darauf, dass tote Spermatozoen durch ihre geschädigten Plasmamembranen bestimmte Farbstoffe aufnehmen und somit selektiv angefärbt werden können [WHO, 1999]. Bei vitalen Zellen ist die Barrierefunktion der Plasmamembran intakt, so dass kein Farbstoff hindurch diffundieren kann.

Zur Durchführung des Eosin-Tests mischt man 10 bis 15 µl frisches Ejakulat mit einem Tropfen 0,5-prozentiger (5 g/l) Eosin Y-Lösung (Klinikapotheke, Uniklinik Homburg) auf einem Objektträger und bedeckt es mit einem Deckglas. Nach ein bis zwei Minuten werden bei 400facher Vergrößerung 100 Spermatozoen unter einem Lichtmikroskop mit Hellfeld- oder Phasenkontrastbeleuchtung ausgezählt, wobei die vitalen, also lebendigen Spermien weiß bzw. ungefärbt erscheinen, während die toten Spermien rot gefärbt sind. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich tote Spermien von solchen unterscheiden, die unbeweglich, aber lebensfähig sind. Vor allem bei einer Immotilitätsrate von mehr als 50 % sollte der Anteil der vitalen Spermien mit Hilfe von Vitalfärbungen ermittelt werden. Von einem normalen Eosin-Test spricht man, wenn mindestens 50 % vitale, d.h. ungefärbte Zellen vorhanden sind. [WHO, 1999]

Der Eosin-Test dient auch zur Überprüfung einer korrekt durchgeführten Beurteilung der Motilität, wobei der prozentuale Anteil toter Zellen nicht den Prozentsatz an immotilen Zellen übersteigen sollte. Darüber hinaus liefert ein hoher Anteil immotiler, aber vitaler Zellen einen wichtigen Hinweis auf eventuell vorliegende Strukturdefekte des Flagellums. [WHO, 1999]

## HOS-Test

Beim sogenannten Hypoosmotischen Schwelltest (kurz: HOS-Test) kommt es aufgrund der Semipermeabilität der intakten Spermienzellmembran unter hypoosmotischen Bedingungen durch Wassereinstrom in die Zelle zu einer Anschwellung des Spermiums [Drevius, 1966], was an den Änderungen der Schwanzformen sichtbar wird. 1984 wurde der HOS-Test von Jeyendran et al. ursprünglich für klinische Zwecke eingeführt. [WHO, 1999]

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

1 ml dieser Schwelllösung wird bei 37°C in einem verschlossenen Eppendorfgefäß für circa 5 Minuten erwärmt. Man gibt 0,1 ml liquefiziertes Ejakulat hinzu und durchmischt vorsichtig mit

einer Pipette. Anschließend wird für mindestens 30 Minuten, aber nicht länger als 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Beurteilung gibt man 10 µl der zuvor inkubierten Lösung auf einen Objektträger und versieht diesen mit einem Deckglas. Der Anteil geschwollener, d.h. vitaler Spermenschwänze wird unter dem Phasenkontrastmikroskop zweifach von jeweils 100 Spermien unter anschließender Mittelwertberechnung bestimmt. [WHO, 1999]

Bei der mikroskopischen Auswertung bietet sich folgendes in Abbildung 3-1 schematisch dargestelltes Bild [WHO, 1999]:

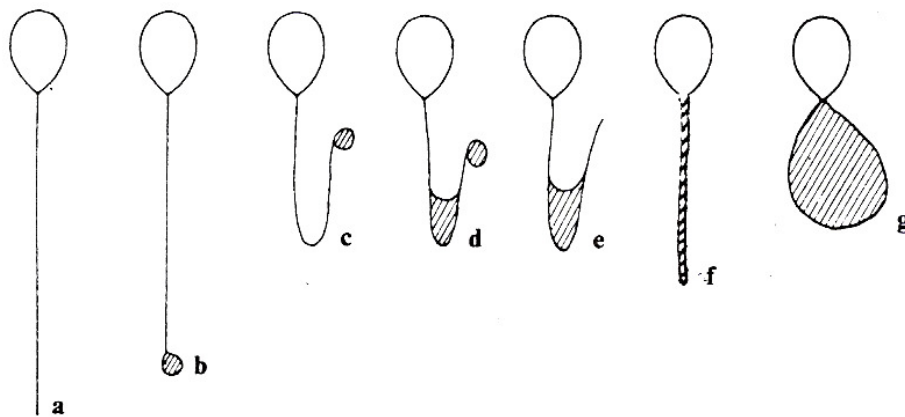


Abbildung 3-1: „Schematische Darstellung typischer morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen nach Kontakt mit hypoosmotischer Lösung: a) keine Änderungen, b)-g) unterschiedliche Schwanzveränderungen. Die schraffierten Flächen kennzeichnen die ein Schwellen anzeigenden Schwanzregionen.“ [WHO, 1999]

Das Ergebnis des HOS-Tests ist als normal anzusehen, wenn mindestens 50 % der Spermenschwänze anschwellen und somit vital sind [WHO, 1999].

Dabei gilt es zu beachten, dass manche Spermien schon vor Testbeginn aufgerollte Schwänze aufweisen. Diese müssen vor der Testdurchführung ermittelt und später vom Gesamtergebnis subtrahiert werden. [Eliasson, 1971; Eliasson, 1981; Jeyendran, 1984]

Die Durchführung des HOS-Tests erfolgt vor und nach Aufbereitung der Ejakulatprobe.

### 3.2.8 Cytur-Test

Der Cytur-Test dient der Quantifizierung von Leukozytenpopulationen im Ejakulat. Das Prinzip des Tests basiert auf dem Nachweis der Esteraseaktivität von Granulozyten. Die Esterasen spalten den Indoxylester des Teststreifens zu Indoxyl, welches dann mit einem

Diazoniumsalz unter Entwicklung eines blau violetten Farbstoffs reagiert. Es werden semiquantitativ intakte sowie bereits lysierte Leukozyten erfasst.

Zur Testdurchführung wird ein Teststreifen (Combur<sup>2</sup>-Test<sup>®</sup> LN, ROCHE, Schweiz) in frisches Ejakulat eingetaucht und das Ergebnis anhand des Farbumschlages nach ein bis zwei Minuten abgelesen. Dabei finden sich drei Abstufungen der Farbreaktion, welche mit einer Referenztafel auf der Packung verglichen werden.

Eine Anzahl von höchstens einer Million Leukozyten pro Milliliter gilt als normal [WHO, 1999], wobei zu berücksichtigen ist, dass Leukozyten in den meisten menschlichen Ejakulaten vorhanden sind [Wolff, 1988a, b; Aitken, 1990; Barratt, 1990]. Ein exzessives Vorhandensein von Leukozyten im Ejakulat, eine sogenannte Leukozytospermie deutet möglicherweise auf eine eventuell antibiotisch behandelbare Infektion der ableitenden Samenwege hin [WHO, 1999] oder kann ferner mit anderen Defekten einhergehen, z.B. mit einer Reduzierung des Ejakulatvolumens, der Spermienkonzentration und der -motilität sowie mit einem Verlust der Spermienfunktion als Resultat von oxidativem Stress [Aitken, 1989a; Aitken, 1990] und/oder mit der Sekretion von zytotoxischen Zytokinen [Hill, 1987].

### 3.2.9 MAR-Test

Mit dem gemischten Antiglobulin Test (**m**ixed **a**ntiglobulin **r**eaction test, MAR-Test) lassen sich auf der Oberfläche der Spermatozoen gebundene spezifische Immunglobulin G-Antikörper nachweisen. Dazu wird frisch gewonnenes Ejakulat mit Latexpartikeln vermischt, die mit humanem IgG beschichtet sind. Anschließend fügt man ein monospezifisches Antihuman-IgG-Antiserum hinzu. Entstehen Mischagglutinate aus Partikeln und motilen Spermatozoen, ist der Beweis für das Vorhandensein von IgG-Antikörpern auf den Spermien erbracht. [WHO, 1999]

Der MAR-Test (SpermMar IgG Test, FertiPro N.V., Beernem, Belgien) wird wie folgt durchgeführt:

Man gibt 10 µl frisches Ejakulat, 10 µl IgG-beschichtete Latexpartikel und 10 µl Antiserum gegen menschliches IgG auf einen Objektträger. Zuerst werden der Ejakulattropfen und die Latexpartikel zusammen gemischt, dann wird mit Hilfe eines Deckglases das Antiserum hinzugemischt. Das Nasspräparat wird nach Abdecken mit einem Deckglas unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung sowohl nach 2-3 Minuten als auch nach 10 Minuten im Hellfeld oder Phasenkontrast betrachtet. [WHO, 1999]



Antikörperfreie Spermatozoen bewegen sich frei zwischen den zusammen gelagerten Latexpartikeln, während die antikörperbehafteten Spermatozoen mit den Latexpartikeln Agglutinate bilden. Dabei schwimmen die Spermatozoen zunächst noch mit den angehefteten Partikeln umher. Wird die Agglutination jedoch zu groß, können sich die gebundenen Spermatozoen nur noch auf der Stelle bewegen. [WHO, 1999]

Es werden 100 bewegliche Spermatozoen beurteilt und der prozentuale Anteil derer, an denen Partikel haften, ermittelt. Dieser sollte weniger als 10 % betragen [WHO, 1999].

Wenn 50 % oder mehr der motilen Spermatozoen Partikel gebunden haben, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine immunologische Infertilität [Barratt, 1992]. Liegen nur auf 10 bis 50 % der beweglichen Spermatozoen gebundene Partikel vor, erlaubt dies lediglich die Verdachtsdiagnose einer immunologischen Infertilität [WHO, 1999].

### **3.2.10 Spermienmorphologie**

Um die Morphologie der Spermatozoen beurteilen zu können, werden die Ausstrichpräparate, die sowohl von der Nativprobe als auch von der aufbereiteten Probe angefertigt wurden, mit der für Spermien modifizierten Färbung nach Papanicolaou [WHO, 1999] gefärbt und anschließend unter Berücksichtigung der WHO-Kriterien [WHO, 1999] ausgewertet.

#### **Modifizierte Färbung nach Papanicolaou**

Bei dieser in andrologischen Labors häufig verwendeten Färbemethode werden der akrosomale und postakrosomale Anteil des Spermienkopfes ebenso wie das Mittelstück und der Schwanz angefärbt. Das Verfahren kann auch bei sehr viskösen Proben angewendet werden. [WHO, 1999]

Da die Färbung recht komplex ist und aus vielen Einzelschritten besteht, wird sie maschinell nach standardisierten Bedingungen durchgeführt (SHANDON, Cheshire, Großbritannien). Die Anleitung zur Färbung zeigt Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Für Spermien modifizierte Färbung nach Papanicolaou [nach WHO, 1999]

Färbelösung	Färbevorgang
<b>Äthanol 80 %</b>	<b>10 mal eintauchen a</b>
<b>Äthanol 70 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 50 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Destilliertes Wasser</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Hämatoxylin nach Harris</b>	<b>exakt 3 Minuten eintauchen</b>
<b>Fließendes Wasser</b>	<b>3 bis 5 Minuten eintauchen</b>
<b>Saurer Alkohol</b>	<b>2 mal eintauchen</b>
<b>Fließendes Wasser</b>	<b>3 bis 5 Minuten eintauchen</b>
<b>Scotts Lösung b</b>	<b>4 Minuten eintauchen</b>
<b>Destilliertes Wasser</b>	<b>1 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 50 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 70 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 80 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 90 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Orange G6</b>	<b>2 Minuten eintauchen</b>
<b>Äthanol 95 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 95 %</b>	<b>10 mal eintauchen</b>
<b>EA-50</b>	<b>5 Minuten eintauchen</b>
<b>Äthanol 95 %</b>	<b>5 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 95 %</b>	<b>5 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 95 %</b>	<b>5 mal eintauchen</b>
<b>Äthanol 99,5 %</b>	<b>2 Minuten eintauchen</b>
<b>Xylol (3 Färbetröge)</b>	<b>1 Minute in jeden eintauchen</b>

<sup>a</sup> Einmal eintauchen entspricht ca. 1 Sekunde. <sup>b</sup> Scotts Lösung wird verwendet, wenn das gewöhnliche Leitungswasser hart ist.

Die einzelnen zur Färbung verwendeten Lösungen sind alle kommerziell erhältlich und gewöhnlich von zufriedenstellender Qualität [WHO, 1999]. Auf die nähere Beschreibung ihrer Zusammensetzung wird an dieser Stelle verzichtet.

Direkt nach der Färbung werden die Präparate mit einer Lösung von Polymeren in Xylol (Entellan<sup>®</sup>, MERCK, Darmstadt) eingedeckt, mit einem Deckglas versehen und stehen dann zur lichtmikroskopischen Auswertung bei 1000facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl (MERCK, Darmstadt) bereit.

## Bewertung nach WHO-Kriterien

Es werden jeweils 100 Spermien pro Objektträger ausgezählt und in „vollständig normal“ geformte Spermien sowie Spermien mit „Abnormalitäten“ unterteilt. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden mit Hilfe standardisierter Beurteilungsbögen zur Spermienmorphologie erfasst und dokumentiert (siehe 7.1.2).

Ein normal geformtes Spermium muss folgenden in Tabelle 3-2 dargestellten WHO-Kriterien genügen:

Tabelle 3-2: WHO-Kriterien für die Morphologie eines normal geformten Spermiums [nach WHO, 1999]

Kopf	Hals, Mittelstück und Zytoplasma	Schwanz
<ul style="list-style-type: none"> <li>Form: oval</li> <li>Länge: 4,0 - 5,5 µm</li> <li>Breite: 2,5 - 3,5 µm</li> <li>Quotient Länge/Breite: 1,5 - 1,75</li> <li>Akrosom: deutlich abgrenzbar, 40-70 % der Kopfoberfläche</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hals: keine Abweichung von der axialen Lage, nicht geknickt</li> <li>Mittelstück: anhaftend, Länge 7 - 8 µm, Breite weniger als 1/3 der Kopfbreite</li> <li>Zytoplasma: Zytoplasmotropfen maximal 1/3 der normalen Kopfgröße</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eigenschaften: anhaftend, deutlich abgrenzbar, nicht spiralisiert</li> <li>Länge: mindestens 45 µm</li> </ul>

Als weitere Kriterien zur Beurteilung der Spermatozoenmorphologie dienen die in Tabelle 3-3 aufgeführten Abnormalitäten und möglichen Defekte eines Spermiums. Beispiele der verschiedenen morphologischen Abnormalitäten sind auf dem exemplarischen Auswertungsbogen zur Spermienmorphologie unter 7.1.2 schematisch dargestellt.

Tabelle 3-3: WHO-Kriterien für morphologische Spermiendefekte [nach WHO, 1999]

Abnorme Form und/oder Größe des Kopfes	Defekte von Hals, Mittelstück und Zytoplasma	Schwanzdefekte
<ul style="list-style-type: none"> <li>Große, kleine, amorphe oder Doppel-Köpfe</li> <li>Vakuolen (&gt; 20 % der Kopffläche)</li> <li>Überstreckungen (zigarrenförmig, birnenförmig)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fehlen des Schwanzes</li> <li>Irregulärer Ansatz des Flagellums mit Abknickungen</li> <li>Formstörungen des Mittelstückes (unregelmäßig geformt, geknickt, erweitert, dünn)</li> <li>Zytoplasmotropfen &gt; 1/3 des Kopfes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Flagellum: zu kurz, Abknickungen, Aufrollungen</li> <li>Kaliberschwankungen</li> <li>Doppel-/Mehrfachschwänze</li> </ul>

Die WHO legt sich in ihrem Laborhandbuch von 1999 auf keinen konkreten Normalwert für die Spermienmorphologie fest. Dennoch weisen Köhn und Haidl auf die Anmerkung in einer Fußnote des Handbuchs hin, nach der Untersuchungen bei weniger als 15 % normal geformten Spermatozoen eine Abnahme der Fertilisierungsraten in vitro gezeigt haben [Köhn, 2006].

### **3.3 DNA-Integrität**

Zur Beurteilung der DNA-Integrität der Spermatozoen werden drei verschiedene Fluoreszenzfärbungen von den Ausstrichpräparaten der Ejakulatproben jeweils vor und nach Aufbereitung angefertigt.

Mit Hilfe der Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) Färbung lässt sich die An- bzw. Abwesenheit von Protaminen, welche wesentlich an der Chromatinkondensation beteiligt sind, und somit der Chromatinkondensationsstatus beurteilen. Die Acridine Orange (AO) Färbung dient über den Nachweis von DNA-Einzelsträngen der Beurteilung denaturierter DNA im Zellkern der Spermatozoen. Zur Analyse des programmierten Zelltodes, der Apoptose in der Spermatozoen-DNA erfolgt die TUNEL-Färbung. Dabei werden DNA-Fragmente detektiert, die durch Apoptose entstanden sind.

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

Die in dieser Form von Bianchi et al. [Bianchi, 1993] bereits beschriebene und durchgeführte Färbung dient der Beurteilung des Kondensationszustandes der Spermatozoen-DNA im Spermienkopf. Normalerweise werden während der Spermatogenese in den Spermatiden die in allen somatischen Zellen im Zellkern enthaltenen lysinreichen DNA-bindenden Histone gegen Protamine, die eine Kondensation des Chromatins erst ermöglichen, ausgetauscht [Henkel, 2000]. Bei Abwesenheit bzw. ungenügendem Austausch der für die Kondensation maßgeblichen Protamine färbt Chromomycin Guanin-Cytosin-reiche DNA-Sequenzen an, die daraufhin unter einem Fluoreszenzmikroskop hell aufleuchten. Fluoreszenz zeigt bei dieser Färbung also das Fehlen von Protaminen und somit das Vorliegen einer unvollständigen oder schlechten Kondensation des Chromatins an.

## Vorbereitung

Die Ausstrichpräparate werden zunächst für 5 Minuten in der sogenannten Carnoy's solution, einer Lösung bestehend aus drei Teilen Methanol (MERCK, Darmstadt) und einem Teil Essigsäure (MERCK, Darmstadt) entsprechend einer Glasküvette mit 150 ml Methanol und 50 ml Essigsäure für 10 bis 18 Objektträger fixiert und anschließend kurz getrocknet.

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

Die Färbelösung besteht aus 0,25 mg CMA<sub>3</sub> (SIGMA, St. Louis, USA) gelöst in 1 ml Phosphate Buffered Saline (PBS). Die Zusammensetzung der PBS-Lösung ist im Abschnitt 7.2.1 dargestellt. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wird ein 10 mg CMA<sub>3</sub>-Glasfläschchen mit 1 ml PBS-Lösung gefüllt und leicht geschüttelt. Der gelöste Inhalt wird sodann in einen mit Alufolie umwickelten Erlenmeyerkolben gefüllt und anschließend werden 39 ml PBS-Lösung dazu gegeben.

Die fixierten Objektträger werden für 20 Minuten mit jeweils 100 µl CMA<sub>3</sub>-Färbelösung beschichtet und in eine dunkle, feuchte Kammer bei Raumtemperatur zum Trocknen gelegt. Anschließend werden sie in PBS-Lösung gespült, mit Glycerin (MERCK, Darmstadt) eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

Das Arbeiten mit der Fluoreszenzlösung muss unter Lichtausschluss erfolgen, da der Farbstoff bei Belichtung sehr schnell ausbleicht.

## Auswertung

Zur Auswertung werden die gefärbten Präparate noch am selben Tag unter einem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BH2-RFCA) mit einem 490 nm Exzitationsfilter bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet. Dabei ist darauf zu achten, dass der ganze Raum abgedunkelt ist und die verschiedenen Areale auf den Objektträgern nicht zu lange belichtet werden, um eine Ausbleichung der Fluoreszenz zu verhindern. Es werden jeweils 100 Spermien ausgezählt und in fluoreszierend oder nicht fluoreszierend unterteilt, wobei die fluoreszierenden Spermien am hellen Aufleuchten ihrer Köpfe zu erkennen sind.

Abbildung 3-2 zeigt ein am Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS AX70) unter Verwendung des FITC Filters mit dem Farb-Fluoreszenz-Bildsystem isis (in situ imaging system, Version 2.56,

MetaSystems) aufgenommenes Foto von mit Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) gefärbten Spermien, wobei sowohl fluoreszierende als auch nicht fluoreszierende Spermien zu erkennen sind.

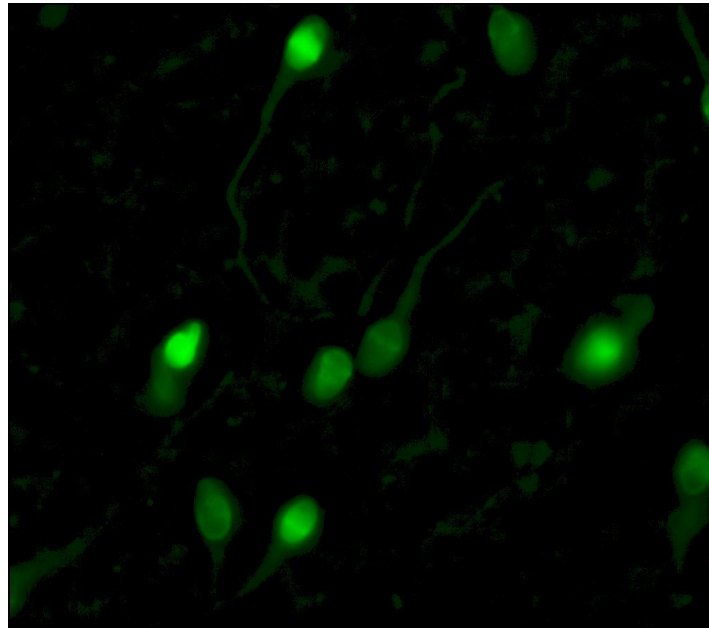


Abbildung 3-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CMA<sub>3</sub>-gefärbten Spermien

### 3.3.2 Acridine Orange (AO) Färbung

Diese von Tejada et al. [Tejada, 1984] beschriebene Färbung wird zur Analyse der in situ-DNA-Denaturierung benutzt. Das Prinzip der Färbung basiert darauf, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff Acridine Orange in normaler doppelsträngiger DNA als Monomer anlagert, während er an denaturierte Einzelstrang-DNA im aggregierten Zustand bindet und jeweils anders farbige Fluoreszenz erzeugt. Das als Monomer angelagerte AO bzw. die Doppelstrang-DNA erscheint grün fluoreszierend, während der aggregierte Farbstoff an denaturierter DNA orange bis rot aufleuchtet.

#### Vorbereitung

Zur Fixation werden die Ausstrichpräparate für mindestens 2 Stunden, besser über Nacht in Carnoy's solution aufbewahrt. Entsprechend der Fixationslösung bei der CMA<sub>3</sub>-Färbung besteht die Lösung für eine Glasküvette aus 150 ml Methanol und 50 ml Essigsäure. Im Anschluss daran lässt man die Objektträger wenige Minuten trocknen.

### **Färbung mit Acridine Orange (AO)**

Auch bei dieser Färbung muss zur Verhinderung einer Ausbleichung unter Lichtausschluss gearbeitet werden. Zunächst wird die sogenannte stock solution hergestellt, die im Dunkeln bei 4°C einige Zeit aufbewahrt werden kann. Dazu werden je nach benötigter Menge beispielsweise 100 mg Acridine Orange (SIGMA, St. Louis, USA) in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und danach filtriert.

Die eigentliche Färbelösung muss vor jeder Färbung frisch angesetzt werden, wobei darauf zu achten ist, dass die verwendeten Lösungen Raumtemperatur aufweisen. Zur Herstellung der Färbelösung werden zu 30 ml der stock solution 120 ml 0,1 molare Zitronensäure (4,8 g Zitronensäure gelöst in 250 ml destilliertem Wasser) und 7,5 ml 0,3 molare Natriumhydrogenphosphat-Lösung (10,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  gelöst in 250 ml destilliertem Wasser) hinzugegeben. Der pH-Wert der Lösung sollte letztlich 2,5 betragen.

Die fixierten Objektträger werden in einer Glasküvette, in der sich die Färbelösung befindet, 5 Minuten gefärbt. Anschließend erfolgt die Spülung in destilliertem Wasser. Zuletzt werden die Präparate noch mit jeweils einem Tropfen Glycerin eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

### **Auswertung**

Bei 1000facher Vergrößerung werden die gefärbten Präparate in Ölimmersion noch am selben Tag unter einem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS BH2-RFCA) mit einem 490 nm Exzitationsfilter ausgewertet. Unter Beachtung einer geringen Belichtungszeit für die verschiedenen Areale der Objektträger und der Abdunkelung des Raumes werden pro Präparat 100 Spermien ausgezählt und in verschieden farbig fluoreszierende Gruppen unterteilt. Die Gruppe mit den grün fluoreszierenden Spermien enthält normale gut kondensierte Spermatozoen-DNA, wohingegen die Gruppen mit den gelb, orange und rot leuchtenden Spermien eine zunehmende DNA-Denaturierung im Spermienkopf anzeigen. Die Spermien, die gelb, orange oder rot fluoreszierend erscheinen, werden zusammengefasst zur Gruppe der Spermien mit DNA-Denaturierung.

In Abbildung 3-3 sind mit der Acridine Orange (AO) Färbung behandelte Spermien zu sehen.

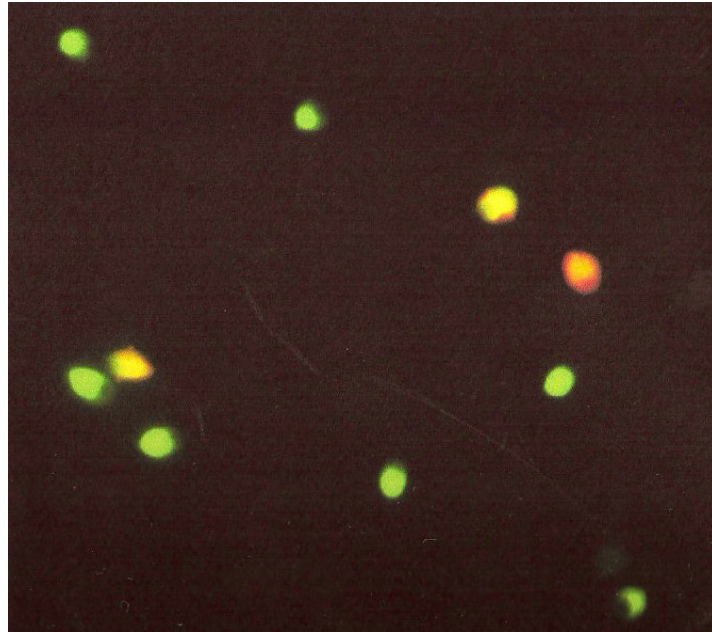


Abbildung 3-3: AO-gefärbte Spermien [El-Masri, 2004]

### 3.3.3 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung oder der TUNEL-Test (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) dient der Detektion von durch Apoptose entstandenen DNA-Fragmenten. Der verwendete Test (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, ROCHE, Deutschland) basiert darauf, dass mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifizierte Nukleotide in einer enzymatischen Reaktion an durch Apoptose entstandene DNA-Strangbrüche binden. Dazu enthält der Test sowohl eine Lösung mit Nukleotiden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff zur späteren Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop markiert sind, als auch eine Enzymlösung mit terminaler Desoxynucleotidyltransferase (TdT), welche die Anlagerung der markierten freien Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden der durch Apoptose fragmentierten DNA katalysiert. Durch diese enzymatische TUNEL-Reaktion lassen sich selektiv DNA-Strangbrüche fluoreszierend anfärben, die während der Apoptose entstanden sind. Dies erlaubt die Abgrenzung der Apoptose von anderen Zerstörungsmechanismen wie etwa der Nekrose oder von Zytostatika induzierten DNA-Schädigungen [Gorczyca, 1993a].



## Vorbereitung

Zunächst werden die Ausstrichpräparate in einer Fixationslösung eines pH-Wertes von 7,4 bestehend aus 4 % Paraformaldehyd in PBS-Lösung (Klinikapotheke, Uniklinik Homburg) für 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert.

Während dieser Fixationszeit erfolgen die Herstellung der restlichen für die Färbung benötigten Lösungen und die Bereitstellung von notwendigen Arbeitsmaterialien. Folgende Lösungen werden gebraucht:

- Permeabilisationslösung: diese besteht aus 0,1 % Triton X-100 (Klinikapotheke, Uniklinik Homburg) in 0,1 % Natriumzitratlösung (Klinikapotheke, Uniklinik Homburg) und muss frisch hergestellt werden.
- Waschlösung: zum Spülen der Präparate wird Phosphate Buffered Saline (PBS-Lösung) analog zur CMA<sub>3</sub>-Färbung verwendet.
- TUNEL reaction mixture: hierbei ist zu beachten, dass alle Arbeitsschritte unter Lichtausschluss erfolgen. Zur Herstellung der TUNEL reaction mixture wird das Gesamtvolumen (50µl) eines Fläschchens der im Test enthaltenen Enzyme solution mit 450 µl der ebenfalls im Test enthaltenen Label solution gemischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 500 µl ergibt. Die in dem Fläschchen noch verbleibenden 100 µl der Label solution werden später für zwei negative Kontrollen verwendet. Das Eppendorfgefäß, welches die TUNEL reaction mixture enthält, wird zum Lichtausschluss mit Alufolie umwickelt, gut durchmischt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

## Färbung mit TUNEL reaction mixture

Die fixierten Präparate werden nach 1 Stunde in PBS-Lösung abgespült und anschließend mit der Permeabilisationslösung für 2 Minuten im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, die auf dem Objektträger fixierten Spermatozoen für die TUNEL reaction mixture durchlässig zu machen. Danach werden die Objektträger jeweils zweimal in PBS gespült und leicht abgetrocknet, bevor dann die eigentliche TUNEL-Färbung in einem abgedunkelten Raum beginnt.

Dazu werden jeweils 50 µl der TUNEL reaction mixture auf jedem Objektträger verteilt und die Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas sorgt für eine bessere und

gleichmäßigere Verteilung der Lösung auf dem Objektträger. Die 500 µl der hergestellten Lösung reichen für 10 Objektträger. Für die beiden negativen Kontrollen werden auf vorher gekennzeichneten, ebenfalls fixierten und permeabilisierten Ausstrichpräparaten anstelle der TUNEL reaction mixture jeweils 50 µl der verbliebenen Label solution verteilt und mit einem Deckglas bedeckt.

Im Anschluss lässt man die Objektträger in einer dunklen, feuchten Kammer für 1 Stunde auf einer Wärmeplatte bei 37°C inkubieren. Nach dieser Stunde werden die Deckgläser entfernt und jeder Objektträger muss dreimal in PBS gespült werden, bevor er dann mit einem Tropfen Glycerin eingedeckt und wieder mit einem Deckglas versehen wird. Bis zur schnellst möglichen Auswertung werden die gefärbten Präparate unter Lichtausschluss im Gefrierschrank bei -20 bis -80°C aufbewahrt.

## **Auswertung**

Die Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop (OLYMPUS AX70) unter Verwendung des FITC Filters bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion. Es werden 100 Spermien pro Präparat ausgezählt, wobei diese in fluoreszierende und nicht fluoreszierende Spermien unterteilt werden. Die fluoreszierenden apoptotischen Spermien sind durch ihr leuchtend grünes Erscheinungsbild von den normalen, nicht apoptotischen Spermien, die blass grün, fast durchsichtig aussehen, zu unterscheiden.

Ein mit Hilfe des Farb-Fluoreszenz-Bildsystems isis (Version 2.56, MetaSystems) aufgenommenes Foto von mit dem TUNEL-Test behandelten Spermien zeigt Abbildung 3-4. Darauf sind zwei grün fluoreszierende Spermien neben einigen weniger deutlich erkennbaren nicht fluoreszierenden Spermien zu sehen.

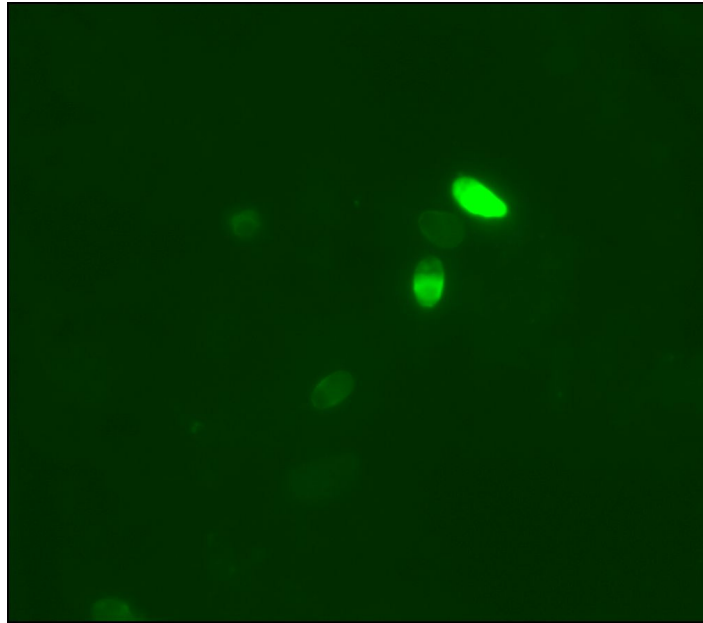


Abbildung 3-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TUNEL-gefärbten Spermien

### 3.4 Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Bestimmung der Oxidantienkonzentration und der Konzentrationen verschiedener Antioxidantien sowie des Gesamtantioxidantienstatus im Seminalplasma beschrieben.

#### 3.4.1 Seminalplasmagewinnung und Aufbereitung

Wie im Abschnitt 3.1 bereits beschrieben, erfolgt die Gewinnung des Seminalplasmas, also der reinen Ejakulatflüssigkeit, die weitestgehend frei von Spermatozoen ist und den Untersuchungsgegenstand für die nachfolgenden Messungen der Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen liefert, im Rahmen der Aufbereitung der Spermaprobe.

#### **PureSperm<sup>®</sup>**

Die bei allen Proben dieser Studie angewandte PureSperm<sup>®</sup>-Aufbereitungsmethode dient der effektiven Trennung der normalen und motilen Spermien von beschädigten oder abgestorbenen Zellen, Zellresten, Bakterien oder dem Seminalplasma und ist somit ein geeignetes Verfahren zur Gewinnung der „guten Spermien“ für anschließende assistierte Reproduktions-

techniken. Das Prinzip der PureSperm<sup>®</sup>-Aufbereitung basiert auf der Herstellung eines Dichtegradienten, durch den sich nach Zentrifugation ein Pellet bestehend aus motilen Spermien am Boden des Gradienten absetzt.

Die verwendete PureSperm<sup>®</sup> 100-Lösung (NIDACON, Schweden) stellt eine sterile kolloidale Silica Lösung in einer isotonischen Salzlösung eines pH-Wertes zwischen 7,4 und 7,8 und einer Osmolalität von 300 bis 310 mOsm/kg H<sub>2</sub>O dar.

### **Herstellung des PureSperm<sup>®</sup>-Dichtegradienten**

Aus der 100-prozentigen PureSperm<sup>®</sup>-Lösung werden zunächst zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt. Für 10 ml der 80-prozentigen Lösung benötigt man 8 ml der PureSperm<sup>®</sup> 100-Lösung und 2 ml HAM'S F10-Lösung mit Humanalbumin (20 % Immuno, Baxter, Unterschleißheim). Die Zusammensetzung der häufig verwendeten HAM'S F10-Lösung ist unter 7.2.2 aufgeführt. Die 40-prozentige Lösung besteht aus 4 ml 100-prozentiger PureSperm<sup>®</sup>-Lösung und 6 ml HAM'S F10-Lösung mit Humanalbumin. Die Menge ist ausreichend für fünf Spermienpräparationen.

Es werden nun 2 ml der 40-prozentigen PureSperm<sup>®</sup>-Lösung in ein steriles Röhrchen gegeben. Mit Hilfe einer langen Kanüle werden dann 2 ml der 80-prozentigen PureSperm<sup>®</sup>-Lösung direkt auf den Boden dieses Röhrchens gefüllt, wobei streng darauf zu achten ist, dass sich die beiden Konzentrationen nicht vermischen.

### **Aufbereitung mit PureSperm<sup>®</sup>**

Die PureSperm<sup>®</sup>-Säule wird nun vorsichtig mit etwa 1,5 ml des Ejakulats überschichtet und anschließend bei 2300 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 20 Minuten zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugation bildet sich am Boden des Röhrchens ein Pellet. Der Überstand, der dem für weitere Untersuchungen wichtigen Seminalplasma entspricht, wird abpipettiert und in mit der jeweiligen Patientenummer beschrifteten Eppendorfgläsern bis zur weiteren Analyse bei -80°C eingefroren.

Das Pellet wird dann mit HAM'S F10-Lösung und Humanalbumin resuspendiert und erneut bei 2300 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgehoben, diesmal jedoch verworfen. Anschließend folgen die weitere Resuspension des Pellet mit HAM'S F10-

Lösung und Humanalbumin und die Inkubation dieser Lösung bei 37°C, wobei die motilen Spermien circa eine Stunde lang Zeit haben, um nach oben zu schwimmen.

Im Anschluss an die Aufbereitung werden die Spermien erneut bezüglich Dichte und Motilität beurteilt. Auch der HOS-Test wird wiederholt und mit dem nach der IVF- bzw. ICSI-Behandlung noch übrig gebliebenen Rest der aufbereiteten Probe werden nochmals Ausstrichpräparate erstellt.

### 3.4.2 ROS-Messung

Der folgende Abschnitt beschreibt die Bestimmung des oxidativen Status bzw. der Konzentration der "Reactive Oxygen Species" (ROS), durch die Zellen und Gewebe oxidativem Stress ausgesetzt werden, im Seminalplasma. Bei ungenügender Desaktivierung dieser reaktiven Sauerstoffspezies, zu denen die freien Radikale zählen, z.B. durch Antioxidantien entstehen organische Peroxide und Hydroperoxide, die ihrerseits mit Zellbestandteilen reagieren und diese schädigen können.

Die indirekte Messung der ROS-Konzentration erfolgt im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden, d.h. also von oxidativen Reaktionsprodukten in EDTA Plasma, Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten wie etwa dem Seminalplasma (OxyStat, Kat.Nr. BI-5007, BIOMEDICA, Österreich). Da laut Herstellerangaben des BIOMEDICA OxyStat Testkits die Ergebnisse der Messung in direktem Zusammenhang mit freien Radikalen und zirkulierenden biologischen Peroxiden stehen, kann der oxidative Status einer biologischen Probe mit diesem Test ermittelt werden.

Das Testprinzip basiert auf einer enzymatischen Reaktion von zugegebener Peroxidase-Enzymlösung mit in der zu messenden Probe frei zirkulierenden biologischen Peroxiden bei gleichzeitiger Farbreaktion mit TMB (3,3,5,5-Tetramethylbenzidin) als Substrat. Nach Zugabe einer Stopplösung wird die gefärbte Lösung in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen. Die anschließende Berechnung der Peroxidkonzentration in der jeweiligen Probe erfolgt mit Hilfe eines Kalibrators (Ein-Punkt-Kalibrierung).

## Vorbereitung

Folgende Lösungen und Reagenzien sind in dem Test enthalten:

- Lösung A: Probenpuffer, gebrauchsfertig,
- Lösung B: Reaktionspuffer, gebrauchsfertig,
- Lösung C: Enzymlösung, gebrauchsfertig,
- Lösung D: Reaktionslösung, gebrauchsfertig,
- 2 Kontrollen, lyophilisiert,
- 3 Kalibratoren, lyophilisiert,
- Stopplösung  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , gebrauchsfertig.

Zudem finden sich als Inhalt des Testkits noch Mikrotiterstreifen im Streifenhalter für  $12 \times 8$  Tests, eine detaillierte Arbeitsanleitung sowie ein Protokollblatt.

Zunächst werden jeweils  $250 \mu\text{l}$  der Lösung D (Reaktionslösung) in ein Kalibrator-Röhrchen und in ein Röhrchen mit Kontrolllösung pipettiert. Diese lässt man nun bei Raumtemperatur ( $18 - 26^\circ\text{C}$ ) für 45 Minuten lösen.

Die Herstellung der ABC-Reaktionsmischung, die erst unmittelbar vor der Verwendung erfolgt, muss mengenmäßig an die Anzahl der Bestimmungen adaptiert werden. Aufgrund von Doppelbestimmungen des Kalibrators, der Kontrolle sowie der 46 Patientenproben muss die Menge an ABC-Reaktionsmischung für 96 Bestimmungen ausreichen. Zur Herstellung einer Mischung, die für 100 Bestimmungen ausreicht, müssen  $12,5 \text{ ml}$  der Lösung A (Probenpuffer) mit  $250 \mu\text{l}$  der Lösung B (Reaktionspuffer) und  $12,5 \mu\text{l}$  der Lösung C (Enzymlösung) gemischt werden. Die ABC-Reaktionsmischung ist vor direktem Sonnenlicht zu schützen, weshalb sie in ein mit Alufolie umwickeltes Gefäß gegeben wird.

Die aufgetauten Seminalplasmaproben werden vor der Verwendung gut gemischt, trübe Proben sind zunächst etwa 5 Minuten bei  $5000 \times g$  zu zentrifugieren. Bei der Testdurchführung ist darauf zu achten, dass nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur aufweisen. Vor Testbeginn werden noch die Positionen des Kalibrators, der Kontrolle und der von 1 bis 46 nummerierten Seminalplasmaproben auf der Mikrotiterplatte festgelegt und sorgfältig in das beiliegende Protokollblatt eingetragen.

## Testdurchführung

Zunächst werden jeweils 2 mal 10 µl des gelösten Kalibrators, der Kontrolle und der jeweiligen Proben in die Mikrotiterstreifen pipettiert, so dass aufgrund der Doppelbestimmungen letztlich alle 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte ausgefüllt sind.

Nachdem in alle Vertiefungen (Wells) jeweils 100 µl der Lösung A (Probenpuffer) pipettiert wurden, erfolgt die erste Messung mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Multiskan® PLUS, TITERTEK) bei 450 nm. Die gemessene Adsorption, welche in der Testanleitung mit OD<sub>1</sub> bezeichnet wird, kann für jede Vertiefung der Mikrotiterplatte von einem Ausdruck (Multiskan® PLUS, Version 1.43) eines mit dem Photometer verbundenen Druckers abgelesen werden.

Nun werden jeweils 100 µl der frisch hergestellten ABC-Reaktionslösung in alle Wells pipettiert. Die Mikrotiterstreifen werden mit Abdeckfolie bedeckt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Zugabe von jeweils 50 µl der Stopplösung erfolgt schließlich die zweite Messung im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm. Der mit dem Photometer verbundene Drucker liefert erneut einen Ausdruck diesmal der mit OD<sub>2</sub> bezeichneten, zuvor gemessenen Adsorption.

## Auswertung

Die Differenz der Werte für die Adsorption aus den beiden Messungen ist proportional zur Peroxidkonzentration der Probe.

Zur Berechnung der gesuchten ROS-Konzentrationen müssen zunächst von der Kontrolle, dem Kalibrator sowie von allen Proben die Differenzen der Messwerte aus beiden Messungen im Sinne einer Änderung der Werte über der Zeit ( $\Delta OD$ ) bestimmt werden.

$$\Delta OD_{(\text{Probe/Kontrolle/Kalibrator})} = OD_2 - OD_1$$

Aufgrund der Doppelbestimmungen erhält man sowohl von den Proben als auch von der Kontrolle und dem Kalibrator jeweils zwei  $\Delta OD$ -Werte, von denen der gebildete Mittelwert zur weiteren Berechnung verwendet wird.

Unter Verwendung des Kalibrators wird eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt. Der erhaltene  $\Delta OD$ -Wert ist proportional zur Konzentration des Kalibrators, welche am Etikett in  $H_2O_2$ -Äquivalenten in  $\mu mol/l$  angegeben ist und hier  $340 \mu mol/l$  beträgt.

Die ROS-Konzentration einer Probe sowie die der Kontrolllösung wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ROS - Konzentration } [\mu mol/l] = \frac{\Delta OD_{\text{Probe/Kontrolle}} \times \text{Konzentration}_{\text{Kalibrator}} (340 \mu mol/l)}{\Delta OD_{\text{Kalibrator}}}$$

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzte Kontrolllösung ergibt sich nach Einsetzen eines Mittelwertes für  $\Delta OD_{\text{Kontrolle}}$  von  $0,365$  und einem  $\Delta OD_{\text{Kalibrator}}$  von  $0,722$  in die obige Formel eine berechnete Konzentration von  $171,65 \mu mol/l$ , die klar im Referenzbereich ( $139$  bis  $259 \mu mol/l$ ) liegt und damit als Kriterium für eine korrekte Testdurchführung anzusehen ist.

Die gemessenen Seminalplasmaproben liegen allesamt oberhalb der Detektionsgrenze des Tests, die mit  $7 \mu mol/l$  angegeben ist. Konzentrationen von  $< 400 \mu mol/l$  im EDTA Plasma und  $< 350 \mu mol/l$  im Blutserum gelten als Normalwerte.

### 3.4.3 TAS-Messung

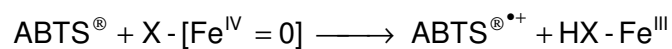
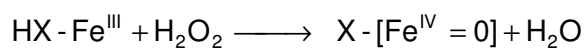
Nach der Betrachtung des oxidativen Status im Seminalplasma ist es nun von entscheidender Bedeutung auch die gegenregulatorische antioxidative Situation zu untersuchen.

Zu diesem Zweck erfolgt zunächst die Erfassung des Gesamtantioxidantienstatus, der auch als Totaler Antioxidantienstatus (TAS) bezeichnet wird und die Summe der Einzelaktivitäten aller im biologischen Milieu des Seminalplasmas vorliegenden Antioxidantien abbildet. Im Folgenden werden dann speziell die enzymatischen Antioxidantien näher betrachtet. Als wichtige Vertreter dieser Gruppe werden die Enzyme Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase und Superoxiddismutase gezielt untersucht und deren Konzentrationen bzw. Enzymaktivitäten im Seminalplasma bestimmt.

Die Messung des Totalen Antioxidantienstatus im Seminalplasma erfolgt mit Hilfe einer photometrischen Testmethode (Total Antioxidant Status, Kat.Nr. NX 2332, RANDOX, Großbritannien) für die quantitative in vitro-Bestimmung von TAS in Serum, Plasma, Bier und Fruchtsaft. Diese Methode wurde erstmals 1993 von Miller et al. beschrieben und für die Beurteilung der antioxidativen Kapazität im Blutplasma entwickelt [Miller, 1993].



Das Testprinzip beruht darauf, dass ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulphonat]) mit einer Peroxidase (Metmyoglobin) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Entstehung des radikalischen Kations ABTS<sup>®•+</sup> inkubiert wird. Dieses Kation besitzt eine relativ stabile blau-grüne Farbe, die bei 600 nm photometrisch gemessen werden kann. Das Vorhandensein von Antioxidantien in einer zugesetzten Probe führt über deren Funktion als Radikalfänger zu einer Unterdrückung dieser Farbproduktion, welche proportional zur Konzentration der Antioxidantien ist. D.h. also, je stärker die Farbentwicklung unterdrückt wird, desto höher ist die Konzentration der in der gemessenen Probe vorhandenen Antioxidantien. Die folgenden Reaktionsgleichungen dienen der Veranschaulichung dieses Testprinzips:



(HX-Fe<sup>III</sup> = Metmyoglobin, X-[Fe<sup>IV</sup>=O] = Ferrylmyoglobin).

## Vorbereitung

Vor der eigentlichen Testdurchführung stellt eine präzise Vorarbeit, die z.B. die korrekte Vorbereitung der verwendeten Reagenzien einschließt, die entscheidende Grundlage für das spätere Gelingen des Tests dar.

Die folgenden im Test enthaltenen Reagenzien werden benötigt:

- Puffer: Phosphate Buffered Saline (80 mmol/l, pH 7,4), gebrauchsfertig
- Chromogen: Metmyoglobin (6,1 µmol/l), ABTS<sup>®</sup> (610 µmol/l); der Inhalt eines Gefäßes wird in 10 ml Puffer gelöst und ist dann bei Raumtemperatur etwa 8 Stunden, im Kühlschrank 2 Tage haltbar.
- Substrat: Hydrogenperoxid (in stabilisierter Form, 250 µmol/l); 1 ml Substrat wird mit 1,5 ml Puffer verdünnt und ist bei Lagerung zwischen 2 und 8 °C etwa 24 Stunden haltbar.
- Standard: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchrom-2-carboxylsäure (Lot Nr. 210 NX 1,87 mmol/l); der Inhalt eines Gefäßes wird in exakt 1 ml zweifach deionisiertem Wasser (Ultra Pure Water, BIOCHROM, Berlin) gelöst und erreicht im Kühlschrank eine Haltbarkeit von 2 Tagen, bei -20 °C von 1 Monat.

Weiterhin benötigt man eine nicht im Test enthaltene Kontrolllösung (Total Antioxidant Control, Kat.Nr. NX 2331, RANDOX, Großbritannien). Diese Kontrolle muss sehr sorgfältig

unter Vermeidung jeglichen Verlusts an Material in exakt 5 ml destilliertem Wasser einer Temperatur zwischen 20 und 25 °C 30 Minuten gelöst werden. Die Haltbarkeit der gelösten Kontrolle beträgt 2 Tage bei 2 bis 8 °C oder 12 Stunden bei Raumtemperatur.

Zur Vermeidung von Störfaktoren und damit zur Minimierung von Ungenauigkeiten im Testergebnis ist es allgemein sehr wichtig, sowohl bei der Mischung der Reagenzien als auch bei der späteren Testdurchführung sehr präzise zu arbeiten und sich genau an die Testanweisungen zu halten. So sollte beispielsweise die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösungen aufgrund ihrer begrenzten Haltbarkeit erst kurz vor der Verwendung erfolgen.

Bevor der eigentliche Test beginnen kann, müssen noch die bei -80 °C aufbewahrten Seminalplasmaproben aufgetaut und zentrifugiert werden.

### Testdurchführung

Wie bereits erwähnt, folgt die Testdurchführung strengen Vorgaben der Testanleitung. Der Hersteller, die Firma RANDOX weist ausdrücklich darauf hin, dass es wichtig ist, die Reaktionszeiten so genau wie möglich einzuhalten und betont, dass Änderungen von Volumen oder Temperatur das Ergebnis des Tests wesentlich beeinflussen können.

Folgende in Tabelle 3-4 dargestellte Versuchsbedingungen am Photometer (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, PHARMACIA BIOTECH) sind zu beachten:

Tabelle 3-4: Versuchsbedingungen am Photometer zur TAS-Messung

Zu beachtender Parameter am Photometer	Bedingung
Wellenlänge	600 nm
Küvette	1 cm Lichtweg
Temperatur	37 °C
Messung	gegen Luft

Nach Einstellung der Wellenlänge und Bestimmung des Leerwertes, welcher einer Messung bei 600 nm mit einer aufgrund der Messung gegen Luft leeren Küvette entspricht, ist das Photometer einsatzbereit. Die Temperaturbedingung von 37 °C wird erfüllt, indem die verwendeten Halbmikroküvetten (Acryl-Cuvettes, 10×4×45 mm, Nr./REF 67.740, SARSTEDT, Deutschland) in einem Heizblock (Blockthermostat, LABOTECT) bei 37 °C vorge-

wärmt werden und dadurch, dass sämtliche Reagenzien und die zu messenden Proben ebenfalls entweder in diesem Heizblock oder was vor allem auf die Reagenzien zutrifft in einem Wasserbad bei 37°C unmittelbar vor der Messung erwärmt werden. Dadurch herrschen während der nur Sekunden andauernden Messung im Photometer annähernd 37°C in der zu messenden Küvette.

Tabelle 3-5 enthält das für die Testdurchführung notwendige Pipettierschema sowie die Testanleitung.

Tabelle 3-5: Pipettierschema und Testanleitung zur TAS-Messung

	<b>Reagent Blank</b>	<b>Standard</b>	<b>Probe/Kontrolle</b>
<b><i>DDH<sub>2</sub>O</i></b>	20 µl	---	---
<b><i>Standard</i></b>	---	20 µl	---
<b><i>Probe/Kontrolle</i></b>	---	---	20 µl
<b><i>Chromogen</i></b>	1 ml	1 ml	1 ml
Gut mischen, 1 Minute im Heizblock inkubieren und Ablesen der initialen Adsorption (A <sub>1</sub> ). Im Anschluss Hinzufügen des Substrates.			
<b><i>Substrat</i></b>	200 µl	200 µl	200 µl
Mischen und gleichzeitig die Stoppuhr starten. Nach exakt 3 Minuten Ablesen der Adsorption (A <sub>2</sub> ).			

Um die vorgegebenen Reaktionszeiten genau einzuhalten, wird nach folgendem in Tabelle 3-6 dargestelltem Zeitplan verfahren.

Tabelle 3-6: Zeitplan zur TAS-Messung

Zeit [min]	Pipettierbeginn	Messung	Substratzugabe
0	Start Blank	---	---
1	Start Standard	A <sub>1</sub> Blank	---
2	Start Kontrolle	A <sub>1</sub> Standard	Blank + Substrat
3	Start Probe 1	A <sub>1</sub> Kontrolle	Standard + Substrat
4	---	A <sub>1</sub> Probe 1	Kontrolle + Substrat
5	---	A <sub>2</sub> Blank	Probe 1 + Substrat
6	---	A <sub>2</sub> Standard	---
7	---	A <sub>2</sub> Kontrolle	---
8	---	A <sub>2</sub> Probe 1	---

Der hier dargestellte Zeitplan beschreibt den ersten Messblock von 8 Minuten Dauer, während dessen zwei Adsorptionen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> von dem so bezeichneten Reagent Blank, dem Standard, einer Kontrolle sowie der ersten Probe bestimmt werden. Wie in der Testanleitung gefordert, erfolgt die Messung von A<sub>2</sub> exakt 3 Minuten nach Zugabe des Substrates. Die restlichen Proben werden analog zu diesem Zeitschema gemessen, wobei der zweite Messblock mit Probe 2 startet, wieder 8 Minuten dauert und bis zur A<sub>2</sub>-Bestimmung von Probe 5 reicht. Im Anschluss an den letzten Block erfolgt nach der Messung der hier untersuchten 46 Patientenproben eine weitere Kontrollmessung der vorher bereits bestimmten Kontrolllösung. Auf Doppelbestimmungen der Proben wird in diesem Test verzichtet.

## Auswertung

Zur Auswertung der Messergebnisse werden zunächst unter Erhalt der jeweiligen Adsorptionsänderung die Differenzen der zugehörigen Adsorptionen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> berechnet.

$$\Delta A_{(\text{Probe/Kontrolle/Standard/Blank})} = A_2 - A_1$$

Die Berechnung des Totalen Antioxidantienstatus erfolgt in zwei Schritten unter Verwendung der folgenden Formeln:

$$\text{Faktor} = \frac{\text{Konzentration}_{\text{Standard}} (1,87 \text{ mmol/l})}{\Delta A_{\text{Blank}} - \Delta A_{\text{Standard}}}$$

$$\text{TAS-Konzentration [mmol/l]} = \text{Faktor} \times (\Delta A_{\text{Blank}} - \Delta A_{\text{Probe/Kontrolle}})$$

Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kontrolllösung ergibt sich nach Einsetzen der in Tabelle 3-7 gezeigten Werte für  $\Delta A_{\text{Blank}}$  und  $\Delta A_{\text{Standard}}$  in obige Formel ein Faktor von 9,84, mit dessen Hilfe eine in Tabelle 3-8 dargestellte TAS-Konzentration von 1,390 berechnet werden kann. Diese Konzentration liegt im unteren Referenzbereich (1,36 bis 2,04 mmol/l) und zeigt eine korrekte Testdurchführung an.

Tabelle 3-7: Messwerte für  $\Delta A_{\text{Blank}}$  und  $\Delta A_{\text{Standard}}$ 

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	ΔA
<b>Blank</b>	-0,024	0,216	0,24
<b>Standard</b>	-0,018	0,032	0,05

Tabelle 3-8: TAS-Ergebnis für die Kontrolle

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	ΔA	TAS [mmol/l]
<b>Kontrolle</b>	-0,002	0,097	0,099	1,390

Als Referenzbereich der TAS-Konzentration im Blutplasma werden Werte zwischen 1,30 und 1,77 mmol/l angegeben.

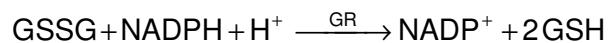
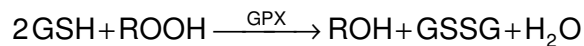
### 3.4.4 Glutathionperoxidase-Messung

Die enzymatische Aktivität der antioxidativ wirksamen Glutathionperoxidase kann mittels einer photometrischen Testmethode basierend auf der Beschreibung von Paglia und Valentine [Paglia, 1967] bestimmt werden. Der für die zu untersuchenden Seminalplasma-proben verwendete Test (RANSEL Glutathione Peroxidase, Kat.Nr. RS 504, zusätzlich Drabkin's Reagent, Kat.Nr. MS 181, RANDOX, Großbritannien) dient der quantitativen in vitro-Bestimmung der Glutathionperoxidase im Blut.

Die Testmethode basiert auf folgendem Prinzip: Glutathionperoxidase katalysiert die Oxidation von Glutathion durch Cumolhydroperoxid. In Anwesenheit von Glutathionreduktase

und NADPH wird das oxidierte Glutathion sofort wieder in die reduzierte Form überführt. Gleichzeitig kommt es zur Oxidation von NADPH zu  $\text{NADP}^+$ , was als Abfall der Adsorption bei 340 nm photometrisch gemessen werden kann. [Paglia, 1967]

Die folgenden Reaktionsgleichungen verdeutlichen das Reaktionsprinzip:



(GSH = Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion, GPX = Glutathionperoxidase, GR = Glutathionreduktase).

Untersuchungen an heparinisierem Blut haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Peroxidasen im menschlichen Blut zu falsch erhöhten Testergebnissen führen kann, wobei diese positive Interferenz durch die Zugabe von Zyaniden gehemmt wird [Prohaska, 1977, Kraus, 1980]. Aus diesem Grund wird eine Verdünnung der zu untersuchenden Proben mit der Zyanide enthaltenden Lösung Drabkin's Reagenz empfohlen.

Bei der Anwendung von Drabkin's Reagenz ist es allerdings notwendig, die Proben vorher mit dem im Test enthaltenen Verdünnungsmittel zu behandeln, da dieses die Überführung des Glutathions in die reduzierte Form bewirkt. Das ist deshalb von großer Bedeutung, da die oxidierte Form durch die Zyanide sehr schnell inaktiviert wird. [Prohaska, 1977, Kraus, 1980]

## Vorbereitung

Auch die Durchführung dieses Tests erfordert zunächst eine sorgfältige Vorbereitung, die sowohl das Mischen der verwendeten Substanzen als auch die Bereitstellung aller benötigten Arbeitsmaterialien sowie das Auftauen und die anschließende Zentrifugation der Serumplasmaproben beinhaltet.

Folgende Reagenzien werden benötigt:

- Puffer: Phosphatpuffer (0,05 mol/l, pH 7,2), EDTA (4,3 mmol/l), gebrauchsfertig
- Reagenz: Glutathion (4 mmol/l), Glutathionreduktase ( $\geq 0,5$  U/l), NADPH (0,34 mmol/l); der Inhalt eines Gefäßes wird mit 6,5 ml Puffer aufgefüllt und ist dann bei Temperaturen zwischen 2 und 8°C 48 Stunden, bei Raumtemperatur etwa 8 Stunden haltbar.

- Cumolhydroperoxid (0,18 mmol/l): 10 µl werden mit einer Glaskapillare aus dem 1 ml-Gefäß entnommen und mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt. Wegen der schlechten Lösbarkeit des Cumolhydroperoxids muss das Gemisch unter Umständen heftig geschüttelt werden. Diese Mischung ist vor jedem Gebrauch frisch herzustellen, wobei eine exakte Einhaltung der abzumessenden Volumina beachtet werden muss.
- Verdünnungsmittel: der Inhalt eines Gefäßes wird in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und ist im Kühlschrank 4 Wochen, bei Raumtemperatur 3 Tage haltbar.
- Drabkin's Reagenz: Kaliumphosphat (104 mmol/l), Kalium-Eisenzyanid (60,8 mmol/l), Zyankali (78,8 mmol/l); der Inhalt eines Gefäßes wird in 480 ml destilliertem Wasser gelöst, sollte im Dunkeln gelagert werden und ist dann bei Raumtemperatur etwa 6 Monate haltbar.

Des Weiteren muss noch eine nicht im Test enthaltene Kontrolllösung (RANSEL Control, Kat.Nr. SC 692, RANDOX, Großbritannien) vorbereitet werden. Dazu wird der Inhalt eines Kontroll-Fläschchens in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und ist dann im Kühlschrank 3 Tage haltbar. Die Kontrolle wird anschließend behandelt wie eine Probe und muss zunächst verdünnt werden. Die Verdünnung erfolgt analog zu den Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 41, wozu 50 µl der gelösten Kontrolle mit 2 ml Verdünnungsmittel gemischt werden.

Die aufgetauten und zentrifugierten Seminalplasmaproben werden behandelt als seien sie menschliche Blutproben und mit Drabkin's Reagenz verdünnt. Wie bereits erwähnt, muss die Verdünnung der Proben zunächst mit dem im Test enthaltenen Verdünnungsmittel im Verhältnis 25 µl Probe zu 500 µl Verdünnungsmittel und anschließend nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten unter Hinzufügen von 500 µl Drabkin's Reagenz erfolgen, so dass das Ergebnis später mit einem Verdünnungsfaktor von 41 zu multiplizieren ist.

Die Verdünnung der Proben mit Drabkin's Reagenz erfolgt jeweils unmittelbar vor der Messung im Photometer, da die Proben nach Empfehlung des Testherstellers RANDOX innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe von Drabkin's Reagenz ausgewertet sein sollen.

### **Testdurchführung**

Als erstes sind die folgenden in Tabelle 3-9 aufgezeigten Versuchsbedingungen am Photometer (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, PHARMACIA BIOTECH) zu erfüllen.

Tabelle 3-9: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Glutathionperoxidase

Zu beachtender Parameter am Photometer	Bedingung
Wellenlänge	340 nm
Küvette	1 cm Lichtweg
Temperatur	37°C
Messung	gegen Luft

Nach der unter 3.4.3 bereits beschriebenen Bestimmung eines Leerwertes am Photometer bei 340 nm und der Gewährleistung der Temperaturbedingung von 37°C, die wiederum mittels Vorwärmen der verwendeten Halbmikroküvetten (Acryl-Cuvettes, 10×4×45 mm, Nr./REF 67.740, SARSTEDT, Deutschland) in einem Heizblock (Blockthermostat, LABO-TECT) und Erwärmen der Reagenzien und Proben im Wasserbad geschieht, folgt die eigentliche Testdurchführung dem in Tabelle 3-10 dargestellten Pipettierschema bzw. der Testanleitung.

Tabelle 3-10: Pipettierschema und Testanleitung zur Messung der Glutathionperoxidase

	Verdünnte Probe/ Kontrolle	Reagent Blank
<b>Verdünnte Probe/Kontrolle</b>	20 µl	---
<b>Destilliertes Wasser</b>	---	20 µl
<b>Reagenz</b>	1 ml	1 ml
<b>Cumol</b>	40 µl	40 µl
Mischen, Ablesen der initialen Adsorption ( $A_1$ ) von Probe/Kontrolle und Reagent Blank nach 1 Minute und gleichzeitig Starten der Stoppuhr. Erneutes Ablesen der Adsorptionen nach 1 ( $A_2$ ) und nach 2 ( $A_3$ ) Minuten.		

Zur genauen Einhaltung der vorgeschriebenen Messzeiten wird nach einem vorher festgelegten Zeitplan, den Tabelle 3-11 zeigt, verfahren.



Tabelle 3-11: Zeitplan zur Messung der Glutathionperoxidase

Zeit [min]	Pipettierbeginn	Messung	Zeit [min]	Pipettierbeginn	Messung
0	Start Blank	---	3,5	Start Probe 2	A <sub>3</sub> Kontrolle
0,5	Start Kontrolle	---	4	---	A <sub>1</sub> Probe 1
1	---	A <sub>1</sub> Blank	4,5	---	A <sub>1</sub> Probe 2
1,5	---	A <sub>1</sub> Kontrolle	5	---	A <sub>2</sub> Probe 1
2	---	A <sub>2</sub> Blank	5,5	---	A <sub>2</sub> Probe2
2,5	---	A <sub>2</sub> Kontrolle	6	---	A <sub>3</sub> Probe1
3	Start Probe 1	A <sub>3</sub> Blank	6,5	---	A <sub>3</sub> Probe2

Der hier dargestellte erste Messblock ermöglicht die zeitgenaue Messung der benötigten drei Adsorptionen des Reagent Blanks, einer Kontrolle sowie der ersten beiden vorher mit Zahlen von 1 bis 46 beschrifteten Seminalplasmaproben. Der nächste Messblock läuft dann analog dazu ab: er beginnt mit der verdünnten Probe 3 und endet nach 6,5 Minuten mit der A<sub>3</sub>-Messung von Probe 6. Im Anschluss an die letzte Patientenprobenbestimmung der Probe 46 erfolgt erneut eine Kontrollmessung. Auf Doppelbestimmungen der Proben wird auch in diesem Test verzichtet.

### Auswertung

Der erste Schritt der Auswertung besteht in der Berechnung eines  $\Delta A/\text{min}$  sowohl für die gemessenen Adsorptionen des Reagent Blanks als auch für die Adsorptionen der Proben und der Kontrolle. Dazu können folgende Rechenschritte durchgeführt werden:

a)  $\Delta A_1 = A_1 - A_2$

b)  $\Delta A_2 = A_2 - A_3$

c)  $\Delta A / \text{min}_{(\text{Probe/Kontrolle/Blank})} = \frac{\Delta A_1 + \Delta A_2}{2}$ .

Im zweiten Schritt wird dann die Glutathionperoxidasekonzentration (GPX) mit unten stehender Formel berechnet, von der in einem weiteren Schritt der für den Reagent Blank errechnete Wert zu subtrahieren ist.

d)  $\text{GPX-Konzentration}_{(\text{Probe/Kontrolle/Blank})} [\text{U/l}] = 8412 \times \Delta A/\text{min}$

$$e) \text{ GPX-Konzentration}_{(\text{ohne Blank})} [\text{U/l}] = \text{GPX}_{\text{Probe/Kontrolle}} - \text{GPX}_{\text{Blank}}$$

Diese in e) erhaltene Enzymaktivität der Glutathionperoxidase muss zuletzt noch für die verdünnten Proben mit dem Verdünnungsfaktor 41 multipliziert werden.

Die für die Kontrolllösung berechnete und in Tabelle 3-12 dargestellte GPX-Konzentration von 588,840 U/l liegt im angegebenen Referenzbereich zwischen 522 und 706 U/l. Auch der sich nach Subtraktion des Blanks ergebende Wert von 386,952 U/l liegt im angegebenen Referenzbereich zwischen 294 und 398 U/l.

Tabelle 3-12: GPX-Ergebnisse für den Reagent Blank und die Kontrolle

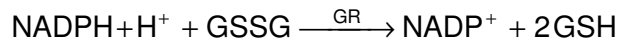
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	ΔA/min	GPX [U/l]
<b>Blank</b>	1,176	1,156	1,128	0,024	201,888
<b>Kontrolle</b>	1,216	1,135	1,076	0,070	588,840

Ein sich in zwei Fällen ergebendes negatives Endergebnis bei der Auswertung der Seminalplasmaproben wird als unterhalb der Nachweisgrenze des Tests befindlich interpretiert, wobei von Seiten des Herstellers keine Angaben über eine Nachweisgrenze gemacht werden. Werte von 27,5 bis 73,6 U/g Hb bzw. 4171 bis 10881 U/l dienen als Referenzbereich der Glutathionperoxidase in Blutproben.

### 3.4.5 Glutathionreduktase-Messung

Die Messung der Glutathionreduktase im Seminalplasma erfolgt ähnlich wie die Glutathionperoxidase-Messung mit Hilfe eines photometrischen Tests (Glutathione Reductase, Kat.Nr. GR 2368, RANDOX, Großbritannien) zur quantitativen in vitro-Bestimmung der Glutathionreduktase in Serum, Plasma und Erythrozyten, der wie die bisher beschriebenen Testmethoden zur manuellen Anwendung geeignet ist.

Das von Goldberg und Spooner [Goldberg, 1983] beschriebene und unten anhand einer Reaktionsgleichung dargestellte Testprinzip basiert darauf, dass die durch die Glutathionreduktase katalysierte Reduktion von Glutathion in Anwesenheit von NADPH abläuft, welches dabei zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird. Die daraus resultierende Adsorptionsabnahme kann dann bei 340 nm gemessen werden.



(GSSG = Glutathion, GR = Glutathionreduktase, GSH = reduziertes Glutathion)

## Vorbereitung

Bevor die eigentliche Testdurchführung beginnen kann, müssen neben dem Auftauen und Zentrifugieren der gefrorenen Seminalplasmaproben und dem Bereitlegen der notwendigen Arbeitsmaterialien die folgenden zu verwendenden Reagenzien gemischt bzw. zum Gebrauch vorbereitet werden.

- Puffer: Kupferphosphat (250 mmol/l, pH 7,3), EDTA (0,5 mmol/l), gebrauchsfertig
- Substrat: Glutathion (GSSG 2,2 mmol/l); der Inhalt einer Flasche wird mit 5 ml Puffer aufbereitet und ist dann bei 2 bis 8 °C 2 Tage haltbar.
- NADPH (0,17 mmol/l): der Inhalt einer Flasche ist in 3 ml destilliertem Wasser zu lösen. Unter Aufbewahrung bei 2 bis 8 °C ist mit einer Haltbarkeit von 2 Tagen zu rechnen.

Der Inhalt einer Flasche der verwendeten Kontrolllösung (Glutathione Reductase Control Serum, Kat.Nr. GR 2608, RANDOX, Großbritannien) muss sehr vorsichtig unter Vermeidung jeglichen Verlusts an Material mit exakt 5 ml destilliertem Wasser einer Temperatur von 20 bis 25 °C aufbereitet werden und vor dem Gebrauch nach erneutem Verschluss der Flasche für 30 Minuten gelöst werden. Die Haltbarkeit dieser Lösung beträgt bei 2 bis 8 °C 1 Tag, bei 15 bis 25 °C 8 Stunden.

## Testdurchführung

Die Testdurchführung richtet sich streng nach den Vorgaben der Testanleitung und beginnt mit der korrekten Einstellung des Photometers (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, PHARMACIA BIOTECH) nach den in Tabelle 3-13 aufgeführten Kriterien.

Tabelle 3-13: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Glutathionreduktase

Zu beachtender Parameter am Photometer	Bedingung
Wellenlänge	340 nm
Küvette	1 cm Lichtweg
Temperatur	37°C
Messung	gegen Luft

Nach der Bestimmung eines Leerwertes bei 340 nm und vorheriger Erwärmung der auch hier verwendeten Halbmikroküvetten (Acryl-Cuvettes, 10×4×45 mm, Nr./REF 67.740, SARSTEDT, Deutschland) im Heizblock (Blockthermostat, LABOTECT) bzw. der Reagenzien und Proben im Wasserbad bei 37°C kann nach der in Tabelle 3-14 dargestellten Testanleitung verfahren werden.

Tabelle 3-14: Testanleitung zur Messung der Glutathionreduktase

In die Küvetten zu pipettierende Substanz	Volumen
<b>Probe/Kontrolle</b>	20 µl
<b>Substrat</b>	500 µl
Gut mischen.	
<b>NADPH</b>	100 µl
Mischen und gleichzeitig Stoppuhr starten. Anfangsadsorption (A <sub>1</sub> ) nach 1 Minute ablesen. Wiederholte Ablesungen nach 2 (A <sub>2</sub> ), 3 (A <sub>3</sub> ), 4 (A <sub>4</sub> ) und 5 (A <sub>5</sub> ) Minuten.	

Tabelle 3-15 zeigt den ersten Messblock des zur genauen Einhaltung der Messzeiten vorher erstellten und verwendeten Zeitplans, der aufgrund der fünfmaligen Adsorptionsbestimmung einer Probe für die Messung von 4 Proben 10,5 Minuten in Anspruch nimmt.

Tabelle 3-15: Zeitplan zur Messung der Glutathionreduktase

Zeit [min]	Pipettierbeginn	Messung	Zeit [min]	Pipettierbeginn	Messung
0	Start Kontrolle	---	5,5	Start Probe 3	A <sub>5</sub> Probe 1
0,5	Start Probe 1	---	6	---	A <sub>1</sub> Probe 2
1	---	A <sub>1</sub> Kontrolle	6,5	---	A <sub>1</sub> Probe 3
1,5	---	A <sub>1</sub> Probe 1	7	---	A <sub>2</sub> Probe 2
2	---	A <sub>2</sub> Kontrolle	7,5	---	A <sub>2</sub> Probe 3
2,5	---	A <sub>2</sub> Probe 1	8	---	A <sub>3</sub> Probe 2
3	---	A <sub>3</sub> Kontrolle	8,5	---	A <sub>3</sub> Probe 3
3,5	---	A <sub>3</sub> Probe 1	9	---	A <sub>4</sub> Probe 2
4	---	A <sub>4</sub> Kontrolle	9,5	---	A <sub>4</sub> Probe 3
4,5	---	A <sub>4</sub> Probe 1	10	---	A <sub>5</sub> Probe 2
5	Start Probe 2	A <sub>5</sub> Kontrolle	10,5	---	A <sub>5</sub> Probe 3

Die Bestimmung der restlichen Proben erfolgt analog zu diesem Zeitplan, wobei der nächste Messblock mit Probe 4 beginnt und mit Probe 7 nach 10,5 Minuten endet. Der Adsorptionsunterschied der gemessenen Proben pro Minute ist wie in der Testanleitung gefordert durchweg kleiner als 0,06, weshalb eine Verdünnung der Proben nicht notwendig ist. Im Anschluss an die Messung der 46 Seminalplasmaproben erfolgt erneut eine Kontrollmessung mit Hilfe der am Anfang der Testdurchführung bereits verwendeten Kontrolllösung. Auf Doppelbestimmungen der Proben wird wiederum verzichtet.

## Auswertung

Um die Enzymaktivität der Glutathionreduktase aus den Messwerten zu bestimmen, muss zunächst ein  $\Delta A/\text{min}$  für alle Proben und die Kontrolle berechnet werden. Dies lässt sich analog zur Berechnung der Glutathionperoxidasekonzentration wie folgt durchführen:

- a)  $\Delta A_1 = A_1 - A_2$
- b)  $\Delta A_2 = A_2 - A_3$
- c)  $\Delta A_3 = A_3 - A_4$
- d)  $\Delta A_4 = A_4 - A_5$

$$e) \Delta A / \min_{(\text{Probe/Kontrolle})} = \frac{\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4}{4}.$$

Die Glutathionreduktasekonzentration bzw. -enzymaktivität (GR) kann nun mit folgender Formel berechnet werden:

$$f) \text{GR-Konzentration}_{(\text{Probe/Kontrolle})} [\text{U/l}] = 4983 \times \Delta A / \min.$$

Mit den in Tabelle 3-16 aufgeführten Messergebnissen für die Kontrolllösung ergibt sich eine Enzymaktivität der Glutathionreduktase von 85,957, die deutlich im Referenzbereich von 76 bis 102 U/l liegt und damit den Nachweis für eine korrekte Testdurchführung erbringt.

Tabelle 3-16: GR-Ergebnisse für die Kontrollmessung

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	ΔA/min	GR [U/l]
<b>Kontrolle</b>	1,542	1,523	1,510	1,501	1,473	0,01725	85,957

Bei acht Seminalplasmaproben lässt sich anstelle der zu erwartenden Adsorptionsabnahme eine deutliche Zunahme beobachten, was nur auf die Abwesenheit bzw. eine sehr geringe Konzentration der zu untersuchenden Glutathionreduktase in der jeweiligen Probe hindeuten kann. Infolgedessen werden diese acht Proben als unterhalb der Nachweisgrenze des Tests, die bei etwa 10 U/l liegen soll, befindlich interpretiert und bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die für die Seminalplasmaproben berechneten und unter 4.1.3 dargestellten Enzymaktivitäten weichen teilweise sehr stark nach oben von den vom Hersteller angegebenen Referenzdaten für Blutproben, die für Plasma und Serum zwischen 33 und 73 U/l, für Erythrozyten bei 4,7 bis 13,2 U/g Hb liegen, ab.

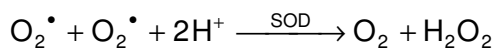
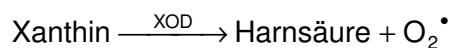
### 3.4.6 Superoxiddismutase-Messung

Die Enzymaktivität der ebenfalls antioxidativ wirksamen Superoxiddismutase wird wiederum mit Hilfe eines photometrischen Testverfahrens (RANSOD Superoxide dismutase, Kat.Nr. SD 125, zusätzlich RANSOD Diluent, Kat.Nr. SD 124, RANDOX, Großbritannien) zur quantitativen in vitro-Bestimmung der Superoxiddismutase im Blut ermittelt. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Seminalplasmaproben verwendete Test ist zur manuellen Anwendung geeignet.

Die zu untersuchende Superoxiddismutase katalysiert die Umwandlung von während oxidativen Prozessen produzierten toxischen Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff.

Die hier verwendete Testmethode bedient sich der durch die Xanthinoxidase katalysierten Reaktion von Xanthin zu Harnsäure unter Entstehung eines Superoxid-Radikals ( $O_2^\bullet$ ), welches mit 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid (I.N.T.) unter Bildung eines roten Farbstoffs (1,3,5-Triphenylformazan) reagiert. Bei Anwesenheit von Superoxiddismutase wird das entstandene Superoxid-Radikal zur Umwandlung in Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff genutzt. Die Aktivität der Superoxiddismutase kann dann gemessen werden als Grad der Hemmung der beschriebenen Farbentwicklung, wobei eine Einheit (Unit) der unter den Testbedingungen gemessenen Superoxiddismutase einer 50-prozentigen Hemmung der Farbreaktionsrate des I.N.T. entspricht.

Die folgenden Reaktionsgleichungen sollen das Testprinzip nochmals veranschaulichen:



(XOD = Xanthinoxidase, SOD = Superoxiddismutase).

## Vorbereitung

Neben den üblichen Vorbereitungsschritten wie dem Auftauen und Zentrifugieren der Seminalplasmaproben und dem Bereitlegen der für den Test notwendigen Arbeitsmaterialien sind noch die folgenden Reagenzien gebrauchsfertig herzustellen.

- Puffer: CAPS (40 mmol/l, pH 10,2), EDTA (0,94 mmol/l), gebrauchsfertig
- Gemischtes Substrat: Xanthin (0,05 mmol/l), I.N.T. (0,025 mmol/l); der Inhalt eines Gefäßes wird mit 20 ml Puffer aufbereitet und erreicht dann bei Lagerung im Kühlschrank eine Haltbarkeit von 10 Tagen.
- Xanthinoxidase (80 U/l): der Inhalt einer Flasche wird in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und ist dann bei 2 bis 8°C 2 Wochen haltbar.

- Standard: der lyophilisierte Inhalt einer Flasche der verwendeten Standardlösung (Lot Nr. 212 RD, Konzentration 4,0 U/ml) muss sorgfältig in 10 ml destilliertem Wasser gelöst werden, wobei darauf zu achten ist, dass der gesamte Inhalt in Lösung geht. Von diesem Standard werden nun verschiedene Verdünnungen hergestellt, die zur Anfertigung einer Standardkurve und damit zur späteren Auswertung des Tests dienen. Zur Herstellung der in Tabelle 3-17 dargestellten Verdünnungen wird das eigens dafür vorgesehene RANSOD Verdünnungsmittel (RANSOD Diluent, Phosphat Puffer 0,01 mmol/l, pH 7,0) benutzt.

Tabelle 3-17: Standardverdünnungen zur Messung der Superoxiddismutase

Nummer der Standardverdünnung	Volumen der Standardverdünnung	Volumen des Verdünnungsmittels
S6	Unverdünnter Standard	---
S5	5 ml von S6	5 ml
S4	5 ml von S5	5 ml
S3	5 ml von S4	5 ml
S2	3 ml von S3	6 ml
S1 = Verdünnungsmittel Alle Verdünnungen des Standards sind bei 2 bis 8°C 2 Wochen haltbar.		

Schließlich bleibt noch die Vorbereitung der Kontrolllösung (RANSOD Control, Kat.Nr. SD 126, RANDOX, Großbritannien). Dazu wird ein Fläschchen der lyophilisierten Kontrolle mit 1 ml destilliertem Wasser aufgefüllt, wobei darauf zu achten ist, dass die Lösung nicht geschüttelt wird. Der Inhalt des Kontrollfläschchens soll vor dem Gebrauch mindestens 15 Minuten gelöst werden und ist dann bei Raumtemperatur einige Stunden, bei Lagerung im Kühlschrank 1 bis 2 Tage haltbar. Bevor die Kontrolllösung photometrisch gemessen und ausgewertet werden kann, muss sie noch im Verhältnis 1 zu 200 mit RANSOD Verdünnungsmittel behandelt werden, was sich bei der späteren Auswertung insofern bemerkbar macht, als dass der Wert des Endergebnisses mit 200 multipliziert werden muss.

Die zu bestimmenden Proben sollen laut Angabe der Testanleitung so verdünnt werden, dass letztlich eine Hemmung zwischen 30 % und 60 % der ungehemmten  $S_1$ -Reaktion mit reinem Verdünnungsmittel resultiert. Dazu wurden die Seminalplasmaproben im Verhältnis 1 zu 1 mit RANSOD Verdünnungsmittel behandelt.



## Testdurchführung

Zur Testdurchführung müssen zunächst die in Tabelle 3-18 abgebildeten Bedingungen am Photometer (UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, PHARMACIA BIOTECH) erfüllt werden.

Tabelle 3-18: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Superoxiddismutase

Zu beachtender Parameter am Photometer	Bedingung
Wellenlänge	505 nm
Küvette	1 cm Lichtweg
Temperatur	37°C
Messung	gegen Luft

Nach der Bestimmung eines Leerwertes bei 505 nm und der Erwärmung der Halbmikroküvetten (Acryl-Cuvettes, 10×4×45 mm, Nr./REF 67.740, SARSTEDT, Deutschland) im Heizblock (Blockthermostat, LABOTECT) sowie der Reagenzien und Proben im Wasserbad bei 37°C kann die eigentliche Testdurchführung nach dem in Tabelle 3-19 dargestellten Schema beginnen.

Tabelle 3-19: Testanleitung zur Messung der Superoxiddismutase

	Verdünnungsmittel (S <sub>1</sub> )	Standardverdünnungen (S <sub>2</sub> -S <sub>6</sub> )	Verdünnte Probe / Kontrolle
<b>Verdünnte Probe / Kontrolle</b>	---	---	25 µl
<b>Standard</b>	---	25 µl	---
<b>RANSOD Verdünnungsmittel</b>	25 µl	---	---
<b>Gemischtes Substrat</b>	850 µl	850 µl	850 µl
Gut mischen.			
<b>Xanthinoxidase</b>	125 µl	125 µl	125 µl
Mischen, Ablesen der initialen Adsorption A <sub>1</sub> nach 30 Sekunden und gleichzeitig Stoppuhr starten. Nach weiteren 3 Minuten Ablesen der Adsorption A <sub>2</sub> .			

Zur genauen Einhaltung der vorgeschriebenen Messzeiten empfiehlt sich auch hier wieder das Vorgehen nach einem festen Zeitplan. Tabelle 3-20 zeigt die ersten beiden Messblöcke.

Tabelle 3-20: Erster und zweiter Messblock zur Bestimmung der Superoxiddismutase

Zeit [min]	Messblock 1		Messblock 2	
	Pipettierbeginn	Messung	Pipettierbeginn	Messung
0	Start S <sub>1</sub>	---	Start Kontrolle	---
0,5	Start S <sub>2</sub>	A <sub>1</sub> S <sub>1</sub>	Start Probe 1	A <sub>1</sub> Kontrolle
1	Start S <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> S <sub>2</sub>	Start Probe 2	A <sub>1</sub> Probe 1
1,5	Start S <sub>4</sub>	A <sub>1</sub> S <sub>3</sub>	Start Probe 3	A <sub>1</sub> Probe 2
2	Start S <sub>5</sub>	A <sub>1</sub> S <sub>4</sub>	Start Probe 4	A <sub>1</sub> Probe 3
2,5	Start S <sub>6</sub>	A <sub>1</sub> S <sub>5</sub>	Start Probe 5	A <sub>1</sub> Probe 4
3	---	A <sub>1</sub> S <sub>6</sub>	---	A <sub>1</sub> Probe 5
3,5	---	A <sub>2</sub> S <sub>1</sub>	---	A <sub>2</sub> Kontrolle
4	---	A <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	---	A <sub>2</sub> Probe 1
4,5	---	A <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	---	A <sub>2</sub> Probe 2
5	---	A <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	---	A <sub>2</sub> Probe 3
5,5	---	A <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	---	A <sub>2</sub> Probe 4
6	---	A <sub>2</sub> S <sub>6</sub>	---	A <sub>2</sub> Probe 5

Bevor die Messung der 46 Seminalplasmaproben beginnt, werden zunächst die Adsorptionen der zur Erstellung einer Standardkurve und damit zur späteren Auswertung der Proben notwendigen Standards bzw. Standardverdünnungen bestimmt. Der dritte sowie alle weiteren Messblöcke verlaufen in Analogie zu den hier dargestellten ersten beiden Messblöcken, wobei nach Abschluss der Patientenprobenbestimmungen erneut eine Kontrollmessung erfolgt. Auf Doppelbestimmungen der Proben wird auch im Rahmen dieses Tests verzichtet.

## Auswertung

Als erstes muss aus den gemessenen Adsorptionen des Standards und seiner Verdünnungen, der Kontrolle sowie der Proben gemäß folgender Formel ein  $\Delta A/\text{min}$  berechnet werden.

$$\Delta A / \min_{(\text{Standard/Probe/Kontrolle})} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

Da S<sub>1</sub> reines Verdünnungsmittel enthält und keinerlei Enzymaktivität besitzt, findet nach Zugabe der Testreagenzien eine ungehemmte, in vollem Umfang ablaufende Farbreaktion statt. Unter der Annahme, dass die Verdünnungsmittelrate (S<sub>1</sub>-Rate) der Rate der vollständig ungehemmten Reaktion, die demnach 100 % beträgt, entspricht, müssen alle Standardverdünnungen, die verdünnten Proben sowie die Kontrolle in Prozent dieser Verdünnungsmittelrate angegeben werden. Wie die unten stehende Formel zeigt, müssen die ermittelten Prozentwerte zur Bestimmung einer prozentualen Hemmung der untersuchten Farbreaktion dann noch von 100 % subtrahiert werden.

$$\text{Hemmung}[\%] = 100 - \frac{(\Delta A / \min_{(\text{Standard/Probe/Kontrolle})} \times 100)}{\Delta A / \min_{(S_1)}}$$

Der nächste Schritt besteht nun in der Erstellung einer Standardkurve. Dazu wird die mit Hilfe der gemessenen Adsorptionen errechnete prozentuale Hemmung einer jeden Standardverdünnung auf der y-Achse gegen die logarithmische Darstellung (Log<sub>10</sub>) der Standardkonzentration (SOD in U/ml) auf der x-Achse aufgetragen. Die Konzentrationen der jeweiligen Standardverdünnungen ergeben sich unter Annahme der oben bereits beschriebenen Konzentration des unverdünnten Standards S<sub>6</sub> von 4 U/ml entsprechend ihrer Verdünnung. Für den im Verhältnis 1 zu 1 verdünnten Standard S<sub>5</sub> ergibt sich so z.B. eine auf der x-Achse halblogarithmisch aufzutragende SOD-Konzentration von 2 U/ml.

Mittels der in Tabelle 3-21 aufgeführten Ergebnisse für die einzelnen Standards lässt sich die in Abbildung 3-5 gezeigte und hier mit Hilfe des Programms Origin Version 7.5 erstellte Standardgerade zeichnen.

Tabelle 3-21: Ergebnisse für die Standards im Rahmen der SOD-Messung

	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2</sub></b>	<b>ΔA/min</b>	<b>Hemmung [%]</b>
<b>S<sub>1</sub></b>	-0,021	0,043	0,021 $\bar{3}$	0
<b>S<sub>2</sub></b>	0,005	0,066	0,020 $\bar{3}$	4,69
<b>S<sub>3</sub></b>	-0,026	0,023	0,016 $\bar{3}$	23,44
<b>S<sub>4</sub></b>	-0,024	0,010	0,011 $\bar{3}$	46,87
<b>S<sub>5</sub></b>	-0,030	-0,007	0,007 $\bar{6}$	64,06
<b>S<sub>6</sub></b>	-0,032	-0,018	0,004 $\bar{6}$	78,12

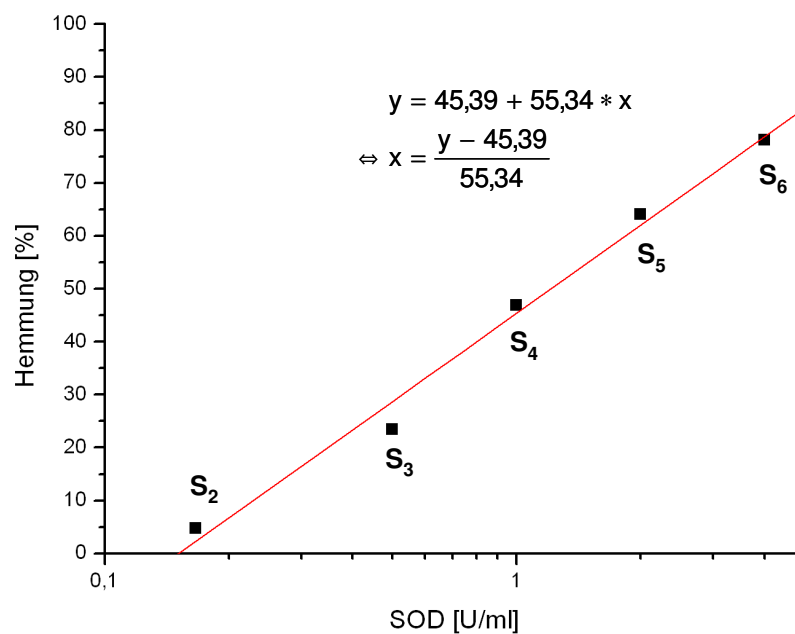


Abbildung 3-5: Standardgerade zur Auswertung der SOD-Messergebnisse

Die zu untersuchende Superoxiddismutaseaktivität kann für die einzelnen Seminalplasma-proben und die Kontrolle mittels errechneter Hemmung von der Standardgeraden abgelesen bzw. mit Hilfe der nach  $x$  aufgelösten Geradengleichung berechnet werden. Von den so ermittelten Ergebnissen muss wegen der halb-logarithmischen Darstellung zunächst je die Umkehrfunktion des Zehnerlogarithmus ( $10^x$ ) gebildet werden. Anschließend müssen diese Ergebnisse dann in einem letzten Schritt aufgrund der 1 zu 1 Verdünnung der jeweiligen Proben noch mit 2 multipliziert werden; das Ergebnis der Kontrolle ist – wie bereits erwähnt – mit 200 zu multiplizieren.

Nach Einsetzen einer errechneten Hemmung für die verdünnte Kontrolle von 53,905% in die nach x aufgelöste Geradengleichung der Standardgeraden, der Bildung der Umkehrfunktion  $10^x$  sowie nach Multiplikation des so gewonnenen Ergebnisses mit 200 ergibt sich eine SOD-Aktivität von 285,08 U/ml, die durch ihre unmittelbare Nähe zum Zielwert der Kontrolle (291 U/ml) wiederum eine korrekte Testdurchführung anzeigt.

Die Normalwerte im Blut liegen zwischen 1102 und 1601 U/g Hb bzw. zwischen 164 und 240 U/ml. Die Enzymaktivität der im Rahmen der vorliegenden Studie bestimmten Seminalplasma-Proben liegt deutlich unterhalb dieses Referenzbereichs.

### 3.5 Patientinnen

Die 46 Patientinnen, die wie unter 3.1 bereits beschrieben zusammen mit ihren Ehe- oder Lebenspartnern die Fertilitätssprechstunde der Universitätsfrauenklinik in Homburg/Saar aufsuchten, werden analog zu ihren Männern nach dem jeweiligen Behandlungsverfahren der IVF- oder der ICSI-Gruppe zugeteilt. Alle die Patientinnen betreffenden Daten werden retrospektiv aus den Akten erhoben.

Das Alter der Frauen zum Zeitpunkt der Behandlung liegt mit einem Durchschnittsalter von  $34,83 \pm 4,68$  Jahren zwischen 25 und 42 Jahren, wobei es sich zwischen IVF- und ICSI-Gruppe ( $p=0,196$ ) nicht signifikant unterscheidet.

Im Rahmen eines Behandlungszyklus werden die Patientinnen zunächst zur Gewinnung mehrerer reifer Eizellen nach hypophysärer Downregulation vorwiegend mittels GnRH- (Gonadotropin Releasing Hormon) Analoga einer kontrollierten ovariellen Stimulation unterzogen. Die anschließende Eizellpunktion erfolgt transvaginal unter sonographischer Kontrolle.

#### Kontrollierte ovarielle Stimulation

Sowohl für die Therapie mittels IVF als auch für die ICSI-Therapie stellt die Ovarstimulation mit hMG (humanes Menopausengonadotropin) oder FSH (follikelstimulierendes Hormon) nach hypophysärer Blockade mit einem GnRH-Analogen im sogenannten „langen Protokoll“ das Stimulationsvorgehen der Wahl dar [Steck, 2001].

Beim „langen Protokoll“ wird bereits ab dem 20. Tag des Vorzyklus mit der Gabe eines GnRH-Analogons zur Downregulation der endogenen Gonadotropinausschüttung begonnen. Anschließend erfolgt dann unter Ultraschall- und Hormonkontrolle die gezielte Stimulation entweder mit hMG, das zu gleichen Teilen LH- (luteinisierendes Hormon) und FSH-Aktivität besitzt, mit rekombinantem FSH oder mit einer Kombination aus beidem. Bei den in dieser Studie behandelten Frauen fand das hMG Menotropin (Menogon<sup>®</sup>) Anwendung. Als rekombinantes FSH wurden beispielsweise Follitropin alfa (Gonal<sup>®</sup>) oder Follitropin beta (Puregon<sup>®</sup>) eingesetzt.

Die Follikelreifung wird anschließend sonographisch kontrolliert und bei ausreichender Follikelzahl und einer Mindestgröße des Leitfollikels von 18 bis 20 mm erfolgt dann die Ovulationsinduktion durch eine i.m.-Injektion von 10.000 Injektionseinheiten (IU) hCG (humanes Choriongonadotropin). Die sonographisch gesteuerte transvaginale Eizellentnahme erfolgt 36 Stunden später.

Danach erhalten die Frauen zur Lutealphasenunterstützung und damit zur Entwicklung und Reifung des Endometriums noch zweimal täglich über mindestens 14 Tage 150 mg Progesteron Vaginalkapseln. Zusätzlich kann auch hCG (1500 oder 2500 IU alle 3 bis 4 Tage oder 5000 IU einmalig) verabreicht werden, wobei es fraglich ist, ob dadurch die Implantationsrate über die Supplementierung mit Progesteron hinaus gesteigert werden kann [Steck, 2001]. „Die alleinige Gabe von hCG in der Lutealphase ist im Hinblick auf die Schwangerschaftsrate nach IVF ebenso effektiv wie die Applikation von Progesteron, aber mit einem erhöhten Risiko der ovariellen Überstimulation (OHSS) behaftet“ [Steck, 2001].

## **3.6 Fertilisationsmethoden**

Die Patienten und Patientinnen dieser Studie werden nach zwei verschiedenen Fertilisationsmethoden behandelt, der in-vitro-Fertilisation (IVF) und der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), die im Folgenden näher erläutert werden.

### **3.6.1 In-vitro-Fertilisation (IVF)**

Die in-vitro-Fertilisation (IVF), d.h. also die extrakorporale Befruchtung einer Eizelle, die mit mehreren tausend Spermien zusammengebracht wird, stellt das neben der homologen oder heterologen Insemination älteste reproduktionsmedizinische Verfahren dar. „Es beinhaltet

die Eizellentnahme, die Insemination der Oozyten mit präparierten Spermien, die Embryokultur und den intrauterinen Embryotransfer.“ [Steck, 2001]

Allgemein akzeptierte Indikationen für eine IVF-Behandlung sind neben tubaren Funktionseinschränkungen, fortgeschrittener Endometriose, langjähriger ungeklärter Sterilität und zervikal oder immunologisch bedingter Sterilität vor allem die einen wesentlichen Aspekt dieser Arbeit darstellende leichte bis mittelgradige andrologische Subfertilität [Steck, 2001].

### **Methodik der IVF**

Die durch die Punktion gewonnenen Eizellen werden in kommerziell erhältlichen Medien zunächst gewaschen (Universal IVF Medium, MediCult, Dänemark) und dann kultiviert (GFERT™ PLUS, Vitrolife, Schweden). Die Aufbewahrung erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für circa 3 Stunden.

Anschließend wird der Reifegrad der Eizellen beurteilt. Dies ist von großer Bedeutung, da unreife Eizellen sich in der Regel weder durch IVF noch durch ICSI fertilisieren lassen und eine Insemination oder Injektion sinnlos wäre. Kultiviert man diese unreifen Eizellen allerdings noch einige Stunden, kommt es häufig zu einer Nachreifung, so dass die zuvor unreifen Eizellen dann inseminiert werden können. [Steck, 2001]

Bei der Beurteilung des Reifegrads der Eizellen unterscheidet man drei Stadien.

1. In dem in Abbildung 3-6 gezeigten Germinalstadium befindet sich die unreife Eizelle in der Prophase und enthält noch einen großen Kern („germinal vesicle“, GV). Zudem liegen in diesem Stadium die Kumuluszellen sehr dicht um die Eizelle und das erste Polkörperchen ist noch nicht ausgestoßen. Diese Eizellen müssen noch 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> nachreifen.



Abbildung 3-6: Eizelle im Germinalstadium [Brinsden, 1999]

2. Ein weiteres in Abbildung 3-7 zu sehendes Reifestadium stellt die Metaphase I dar, in der kein Germinalvesikel mehr vorhanden ist, das erste Polkörperchen jedoch noch nicht sichtbar ist und die Oozyte vor der Befruchtung noch 4 bis 6 Stunden im Inkubator kultiviert werden muss.



Abbildung 3-7: Eizelle in der Metaphase I [Brinsden, 1999]

3. Befindet sich die Eizelle in der in Abbildung 3-8 dargestellten Metaphase II, so ist sie reif und bereit zur Insemination. Die Corona radiata ist voll ausgebildet und eng anliegend, der Cumulus oophorus breit und schleimig, das Zytoplasma homogen und das erste Polkörperchen ist ausgestoßen.





Abbildung 3-8: Eizelle in der Metaphase II [Brinsden, 1999]

Die reifen Eizellen werden in einem weiteren Kulturmedium (G-1<sup>TM</sup>V<sub>3</sub> PLUS, Vitrolife, Schweden) in eine Vier-Loch-Platte (Nunclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) überführt, wo sie dann mit im Mittel 100.000 – nach der unter 3.4 beschriebenen Aufbereitung behandelten – beweglichen Spermien pro Milliliter Kulturmedium zusammengebracht werden. Nach einer erneuten 24stündigen Inkubationszeit werden die Eizellen auf Zeichen der Fertilisation überprüft. Hierzu werden einige Kumuluszellen durch wiederholte Aspiration mit Glaskapillaren von den Eizellen entfernt. Eine Eizelle gilt als korrekt befruchtet, wenn zwei Vorkerne (Pronuklei) samt Polkörperchen erkennbar sind. Diese befruchtete Eizelle kann dann nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden Dauer, also insgesamt 48 Stunden nach erfolgter Insemination als Embryo im Zwei- bis Achtzellstadium in das Cavum uteri bzw. in die Tube der Patientin transferiert werden. Abbildung 3-9 zeigt einen Embryo im Vierzellstadium.



Abbildung 3-9: Embryo im Vierzellstadium [Brinsden, 1999]

Nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz von 1991 dürfen aufgrund des deutlich erhöhten Risikos einer Mehrlingsschwangerschaft maximal drei Embryonen transferiert werden.

### 3.6.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

Die Fertilisation mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI), bei der ein einzelnes Spermium in das Zytoplasma einer Eizelle injiziert wird, stellt seit ihrer weltweiten Einführung etwa 1994 die Therapiemethode der Wahl bei schwerer männlicher Subfertilität dar und ist laut Steck gleichzeitig eine wirksame Methode zur Verhinderung des Fertilisationsversagens bei IVF. „Durch die ICSI können Männer mit extremen Einschränkungen der Ejakulatqualität (Oligoasthenoteratozoospermie = OAT, Kryptozoospermie), bei denen die Anwendung alternativer Behandlungsmethoden aussichtslos ist, noch zu einer Vaterschaft kommen.“ [Steck, 2001]

Absolute und relative Indikationen der ICSI sind im Folgenden in Tabelle 3-22 dargestellt:

Tabelle 3-22: Absolute und relative Indikationen der ICSI [nach Steck, 2001]

Absolute Indikationen der ICSI	Relative Indikationen der ICSI
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwere OAT (Grad III) und Kryptozoospermie</li> <li>• Globozoospermie, akrosomlose Spermien</li> <li>• Komplette Asthenozoospermie</li> <li>• Obstruktive und nicht-obstruktive Azoospermie mit Verwendung epidymaler oder testikulärer Spermien</li> <li>• Zweimaliges Fertilisationsversagen nach IVF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Langjährige leichte und mäßiggradige andrologische Subfertilität (OAT Grad I, II) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung</li> <li>• Retrograde Ejakulation</li> <li>• Einmaliges Fertilisationsversagen oder ungenügende Fertilisationsrate (&lt; 30 %) bei IVF</li> <li>• Hohe Titer von Spermienantikörpern (ASA)</li> </ul>

Voraussetzung für die Anwendung der ICSI ist, dass keine alternativen, medikamentösen oder chirurgischen Möglichkeiten der Verbesserung der Spermienqualität bei andrologischer Subfertilität zur Verfügung stehen. Nach der bisher vorliegenden Datenlage über dieses doch noch relativ junge Verfahren ist die Häufigkeit von Fehlbildungen nach ICSI gegenüber dem Basisrisiko in der Gesamtbevölkerung nicht nennenswert erhöht. Dennoch stellen Männer, bei denen wegen einer schweren andrologischen Subfertilität die ICSI indiziert ist, ein genetisches Risikokollektiv dar. Deshalb sind gerade bei den Patienten einer ICSI-Behandlung eine humangenetische Betreuung sowie eine intensive Schwangerschaftsüberwachung angezeigt. [Steck, 2001]

### Methodik der ICSI

Ein bis zwei Stunden nach der Punktion der Eizellen werden diese mit 80 IU/ml Hyaluronidase behandelt, was innerhalb weniger Minuten zu einer Ablösung der Kumuluszellen von der Eizelle führt. Damit während der Spermieninjektion keine maternale DNA in die Eizelle gelangen kann, müssen die abgelösten Kumuluszellen mit Hilfe von Glaskapillaren vollständig entfernt werden. Nach diesem als Denudation bezeichneten Vorgang werden die Eizellen in Universal IVF Medium (MediCult, Dänemark) gewaschen.

Die anschließende Beurteilung ihrer Reife erfolgt analog zur IVF-Behandlung, wobei zur Injektion nur reife Metaphase II-Oozyten verwendet werden.

Zur Durchführung der ICSI werden folgende Instrumente benutzt:

- ein Interphase Differentialmikroskop mit Wärmeplatte (Nikon/Narishige, Modell IM-69, Japan),

- zwei Mikromanipulator Sets mit einem elektrischen und einem hydraulischen Manipulator sowie mit einem Injektor (Nikon/Narishige, Modell MM188, Japan),
- eine Haltepipette (10 MPH-120, 35°Angel, Micro-Pipets, Humagen, USA) und
- eine Injektionspipette (10 MIC, 35°Angel, Micro-Pipets, Humagen, USA).

Die denudierten Oozyten werden einzeln in Tropfen von jeweils 5  $\mu$ l Kulturmedium (Universal IVF Medium, MediCult, Dänemark) auf eine Petrischale aufgetragen. Hierbei erfolgt die Anordnung der Tropfen kreisförmig um einen Tropfen im Zentrum der Schale, der 1  $\mu$ l der vorher aufbereiteten Spermien suspension und 5  $\mu$ l 10-prozentiges Polyvinylpyrrolidon (PVP-Medium, MediCult, Dänemark) enthält. Das PVP verlangsamt die Eigenmotilität der Spermien, so dass sie anschließend leichter aufzusuchen und zu immobilisieren sind. Zudem verhindert PVP ein Anhaften des Spermiums an der Injektionskapillare.

Die Petrischale wird nun auf die Wärmeplatte des Interphase Differentialmikroskops gesetzt und es wird ein einzelnes vitales, motiles Spermium mit normaler Morphologie ausgewählt. Dieses wird mit der Spitze der Injektionspipette an der Geißel verletzt und dadurch immobilisiert. Anschließend wird es vom Schwanzende her in die Injektionspipette aufgezogen (Abbildung 3-10a)). Die reife Eizelle wird durch den Sog an der Öffnung der Haltepipette in 9 Uhr-Stellung so fixiert, dass die Polkörperchen bei 6 oder 12 Uhr stehen (Abbildung 3-10b)). Gegenüberliegend in 3 Uhr-Stellung wird nun die Injektionspipette in die Eizelle eingeführt, wobei eine kleine Menge Zytoplasma angesaugt und anschließend zusammen mit dem Spermium in die Eizelle injiziert wird (Abbildung 3-10c)). Die Position der Spermieninjektion bei 3 Uhr wird bewusst gewählt, um eine Verletzung des Spindelapparats der Eizelle zu vermeiden. Danach wird die Injektionspipette durch langsames Zurückziehen wieder vorsichtig entfernt (Abbildung 3-10d)).

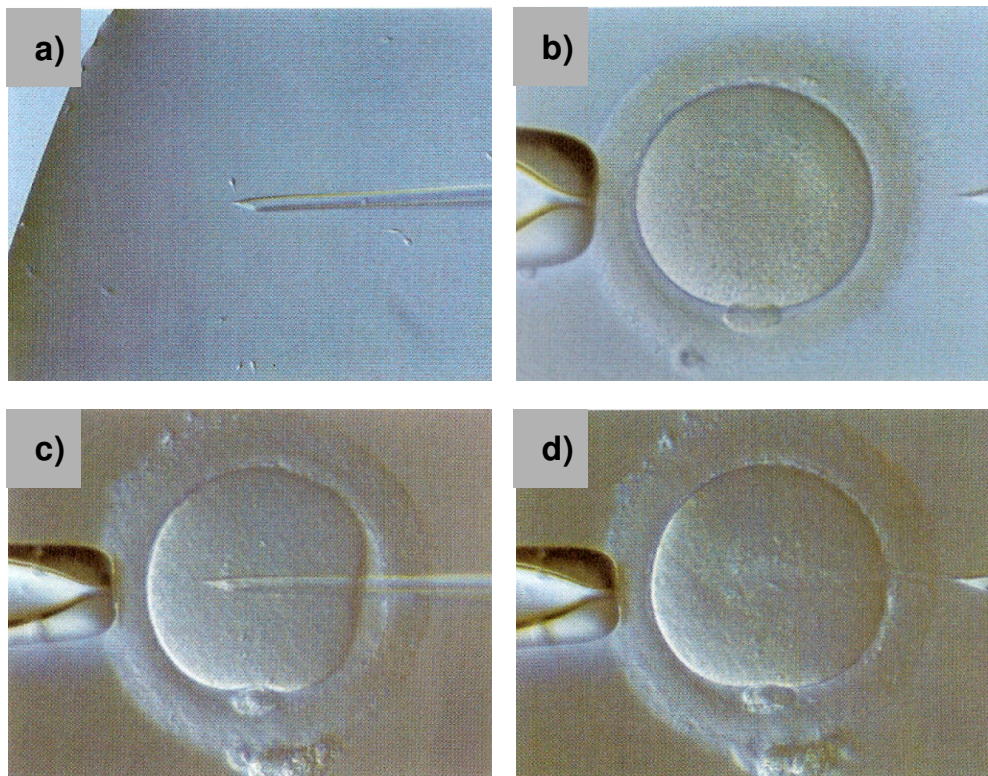


Abbildung 3-10: ICSI-Prozedur [Brinsden, 1999]

Die Kultivierung der befruchteten Eizellen sowie der Embryotransfer unterscheiden sich nicht vom Vorgehen bei der IVF-Behandlung.

### 3.6.3 Schwangerschaftsnachweis

Die Feststellung einer Schwangerschaft der Patientinnen erfolgt über die quantitative Bestimmung des  $\beta$ -hCG im Serum am 12. und 14. Tag nach dem Embryotransfer. Zudem wird der Schwangerschaftsverlauf sonographisch überwacht.

Die Dokumentation einer Schwangerschaft im Deutschen IVF-Register (DIR) erfordert den Nachweis eines Seruntiters von  $\beta$ -hCG über 100 IU/l. Die klinische Schwangerschaft ist darüber hinaus definiert durch den gleichzeitigen Nachweis einer intra- oder extrauterinen Chorionhöhle oder embryonaler Strukturen. [Steck, 2001]

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des vorliegenden Datenmaterials erfolgt mit Hilfe des Programms SPSS Version 13.0 und 14.0 für Windows.

Zur deskriptiven Statistik werden zunächst für alle zu untersuchenden Parameter Häufigkeitsverteilungen mit Anzahl, Mittelwert und Standardabweichung sowie Median, Minimum und Maximum bestimmt. Dabei werden jeweils das Gesamtkollektiv, das IVF- sowie das ICSI-Kollektiv betrachtet.

Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Kollektiven erfolgt für eine normalverteilte stetige Variable mit Hilfe des t-Tests bei unabhängigen Stichproben. Zur Prüfung der Variablen auf Normalverteilung wird der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, wobei ein p-Wert  $> 0,05$  das Vorliegen einer Normalverteilung anzeigt. Eine weitere Bedingung, die für die Verwendung des t-Tests erfüllt sein muss, ist die annähernde Gleichheit der Varianzen, welche mittels Levene-Test (F-Test) überprüft wird. Ist eine Variable nicht normalverteilt, wird zum Vergleich der Mittelwerte der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die graphische Darstellung der Variablen in Boxplots dient ebenfalls der Prüfung auf Normalverteilung sowie dem Vergleich der Variablen zwischen den verschiedenen Kollektiven.

Die weitere analytische Statistik zur Untersuchung bestehender Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern erfolgt rechnerisch mittels bivariater Korrelation, wobei jeweils der Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson und der p-Wert (zweiseitige Signifikanz) bestimmt werden. Graphisch werden die Korrelationen in Streudiagrammen dargestellt.

Die Korrelationen zwischen der einzig nicht stetigen, dichotomen Variable der eingetretenen Schwangerschaft (schwanger oder nicht schwanger) und den anderen stetigen Variablen können aufgrund des zu geringen Stichprobenumfangs nicht für alle Kollektive mittels logistischer Regression beurteilt werden. Aus diesem Grund werden sämtliche Korrelationen der Variable Schwangerschaft ja/nein graphisch mittels Boxplot dargestellt. Zur Berechnung eines p-Wertes wird der t-Test bei unabhängigen Stichproben bzw. der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, wobei Schwangerschaft ja/nein die Gruppenvariable darstellt.

---

Zur Interpretation wird das Signifikanzniveau wie folgt festgelegt: ab einem p-Wert von  $\leq 0,05$  liegt statistische Signifikanz vor;  $p \leq 0,01$  gilt als stark signifikant und  $p \leq 0,001$  als hoch signifikant. Ein Korrelationskoeffizient von  $|r| \geq 0,7$  zeigt eine starke Korrelation an.





## 4 Ergebnisse

Das folgende Kapitel beinhaltet die Darstellung der Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter, wobei nach einer deskriptiven Statistik und dem Vergleich von Mittelwerten zwischen den Kollektiven eine Analyse von Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern erfolgt.

### 4.1 Ergebnisse der einzelnen Parameter im Gesamtkollektiv sowie im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Zunächst werden die Ergebnisse der untersuchten Parameter unter Berücksichtigung der jeweiligen Mittelwerte und ihrer Standardabweichung ( $M \pm SD$ ), des Medians sowie im Gesamtkollektiv auch der Minima und Maxima in Form von Tabellen dargestellt. Des Weiteren erfolgt unter Abbildung des jeweiligen Signifikanzniveaus mittels p-Wert-Angabe jeweils ein Vergleich der Parameter zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv.

Von den insgesamt 46 behandelten Patientenpaaren werden 31 Paare mit der IVF-Methode und 15 Paare mittels ICSI therapiert.

#### 4.1.1 SpermioGrammparameter

Tabelle 4-1 dient der Gesamtbeurteilung der retrospektiv aus den Akten erhobenen SpermioGrammparameter, welche hier im Gesamtkollektiv zu sehen sind.

Aus dieser Übersicht geht hervor, dass nach den WHO-Kriterien in Bezug auf das Ejakulatvolumen, die Dichte vor sowie nach Aufbereitung, die Global- und Progressivmotilität nach Aufbereitung sowie in Bezug auf den HOS-Test nach Aufbereitung im Durchschnitt normale Ergebnisse vorliegen. Der durchschnittliche pH-Wert liegt in allen Kollektiven oberhalb der oberen Normgrenze von pH 8. Im Hinblick auf die morphologischen Normalformen vor und nach Aufbereitung, die mehr als 15 % ausmachen sollten, weichen die Mittelwerte, welche gerade noch im Normbereich liegen, mehr oder weniger stark von ihren Medianen, die sich unterhalb des Normbereichs befinden, ab. Auch unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen sowie von Minima und Maxima der normalen Morphologieformen wird deutlich, dass die wenigen Patienten mit sehr guten Ergebnissen trotz eines Großteils an

Patienten mit schlechten Ergebnissen für die gerade noch im Normalbereich liegenden Mittelwerte verantwortlich sind.

Die Ergebnisse für die Global- und vor allem die Progressivmotilität vor Aufbereitung sowie die Ergebnisse von Eosin- und HOS-Test vor Aufbereitung liegen zum Teil deutlich unterhalb der von der WHO definierten Norm.

Tabelle 4-1: Spermogrammparameter im Gesamtkollektiv (n=46)

Spermogrammparameter	Anzahl [n]	M±SD	Median	Minimum	Maximum
Volumen [ml]	46	3,45±1,28	3,50	1,00	6,00
pH-Wert	46	8,66±0,32	8,70	7,90	9,50
Dichte vor [Mio/ml]	46	70,00±33,43	75,00	5,00	101,00
Dichte nach [Mio/ml]	46	37,36±30,91	30,00	0,00	101,00
Globalmotilität vor [%]	46	24,46±14,62	20,00	5,00	65,00
Globalmotilität nach [%]	46	55,43±31,53	65,00	5,00	100,00
Progressivmotilität vor [%]	46	2,93±4,54	0,00	0,00	20,00
Progressivmotilität nach [%]	46	38,26±35,52	20,00	0,00	95,00
Eosin-Test vor [% tot]	46	67,83±18,00	70,00	30,00	95,00
HOS-Test vor [% geschädigt]	45 <sup>1</sup>	48,89±23,00	50,00	20,00	95,00
HOS-Test nach [% geschädigt]	39 <sup>1</sup>	14,62±10,09	10,00	5,00	40,00
Morphologie vor [% normal]	45 <sup>1</sup>	16,89±18,39	10,00	0,00	72,00
Morphologie nach [% normal]	42 <sup>1</sup>	21,40±23,56	10,50	2,00	85,00

<sup>1</sup>Die fehlenden Proben waren nicht auswertbar.

Im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv lassen sich in Tabelle 4-2 für die Dichte ( $p=0,043$ ) und die Globalmotilität ( $p=0,047$ ) vor Aufbereitung, für die Progressivmotilität ( $p=0,030$ ) und die Morphologie ( $p=0,034$ ) nach Aufbereitung statistisch signifikante Unterschiede erkennen. Für die Globalmotilität nach Aufbereitung ( $p=0,006$ ) lässt sich ein stark signifikanter und für den HOS-Test nach Aufbereitung ( $p=0,001$ ) gar ein hoch signifikanter Unterschied beobachten, was auch graphisch mittels Boxplotdarstellung in den Abbildungen 4–1 und 4–2 verdeutlicht wird. Dabei sind in der ICSI-Gruppe insgesamt jeweils die schlechteren Resultate zu verzeichnen.

Während die Ergebnisse im IVF-Kollektiv im Hinblick auf die WHO-Normwerte im Wesentlichen denen des Gesamtkollektivs entsprechen, ergeben sich für das ICSI-Kollektiv deutlich schlechtere Ergebnisse, die außer für das Volumen, den pH-Wert, die Dichte sowie den HOS-Test nach Aufbereitung für alle anderen SpermioGrammparameter unterhalb der Norm liegen.

Tabelle 4-2: SpermioGrammparameter im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

SpermioGrammparameter	IVF-Kollektiv (n=31)			ICSI-Kollektiv (n=15)			Signifikanz (p-Wert)
	n	M±SD	Median	n	M±SD	Median	
Volumen [ml]	31	3,57±1,26	4,00	15	3,30±1,35	3,50	0,517
pH-Wert	31	8,64±0,35	8,70	15	8,71±0,26	8,70	0,491
Dichte vor [Mio/ml]	31	76,90±29,74	100,00	15	55,73±37,05	60,00	0,043*
Dichte nach [Mio/ml]	31	37,82±29,07	30,00	15	36,42±35,49	32,00	0,606
Globalmotilität vor [%]	31	27,10±14,99	25,00	15	19,00±12,56	15,00	0,047*
Globalmotilität nach [%]	31	64,35±29,46	80,00	15	37,00±28,21	30,00	0,006**
Progressivmotilität vor [%]	31	3,23±4,19	0,00	15	2,33±5,30	0,00	0,241
Progressivmotilität nach [%]	31	45,48±36,89	30,00	15	23,33±28,01	10,00	0,030*
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	31	65,16±17,96	70,00	15	73,33±17,39	80,00	0,151
HOS-Test vor [% geschädigt]	31	44,84±21,78	40,00	14	57,86±23,92	55,00	0,079
HOS-Test nach [% geschädigt]	29	11,55±8,25	10,00	10	23,50±10,01	25,00	0,001**
Morphologie vor [% normal]	31	17,81±20,30	10,00	14	14,86±13,68	10,50	0,624
Morphologie nach [% normal]	28	25,96±26,10	18,50	14	12,29±14,20	5,50	0,034*

\* Signifikanz auf dem 5 %-Niveau ( $p \leq 0,05$ ), \*\* Signifikanz auf dem 1 %-Niveau ( $p \leq 0,01$ )

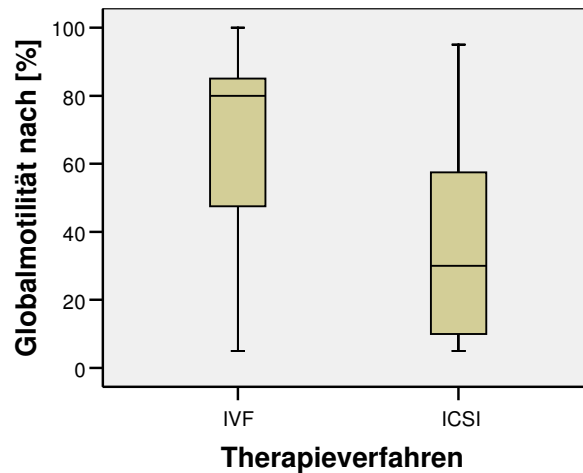


Abbildung 4-1: Boxplotdarstellung der Globalmotilität nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

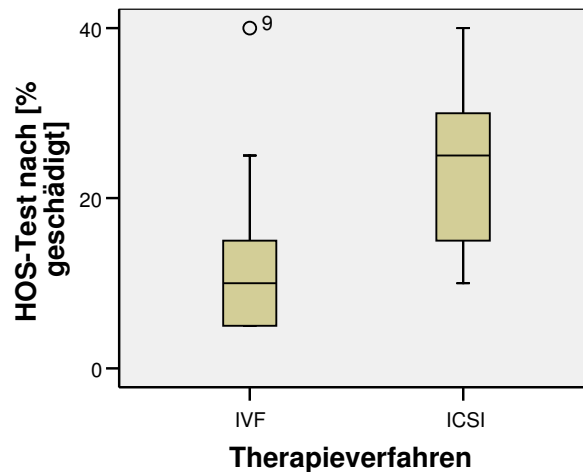


Abbildung 4-2: Boxplotdarstellung der geschädigten Spermien im HOS-Test nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Zuletzt ist hinsichtlich der Ergebnisse der SpermioGrammparameter noch zu bemerken, dass die Ergebnisse, die vor und nach Aufbereitung erfasst werden, in allen Kollektiven (Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv) nach Aufbereitung deutlich besser sind als davor, was die Funktion der Aufbereitung, die „guten Spermien“ zu selektieren nochmals unterstreicht.

#### 4.1.2 DNA-Integrität

Die Ergebnisse der Parameter der DNA-Integrität im Gesamtkollektiv zeigt Tabelle 4-3. Hierbei zeigen sich für alle Parameter Ergebnisse mit verhältnismäßig geringen Schädigungen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen durch die verschiedenen Färbungen dargestellten

Schädigungen der DNA-Integrität liegt im Durchschnitt unter 15 %, für die AO-Färbung sogar unter 10 %.

Tabelle 4-3: DNA-Integrität im Gesamtkollektiv (n=46)

Färbungen	Anzahl [n]	M±SD	Median	Minimum	Maximum
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	46	16,74±8,23	15,00	5,00	47,00
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	45 <sup>1</sup>	10,36±4,59	10,00	3,00	23,00
AO vor [% Denaturierung]	42 <sup>1</sup>	8,36±3,92	8,00	1,00	18,00
AO nach [% Denaturierung]	42 <sup>1</sup>	8,12±5,81	7,00	1,00	25,00
TUNEL vor [% Apoptose]	46	11,15±7,04	9,50	2,00	30,00
TUNEL nach [% Apoptose]	45 <sup>1</sup>	10,38±7,79	8,00	2,00	38,00

<sup>1</sup>Bei den fehlenden Angaben waren keine Ausstriche vorhanden.

Der in Tabelle 4-4 abgebildete Vergleich der DNA-Integrität zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv liefert lediglich für die CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung (p=0,028) einen signifikanten Unterschied, wobei wiederum im ICSI-Kollektiv das schlechtere Ergebnis, ein höherer Prozentsatz an dekondensierten Spermien vorliegt (Abbildung 4-3). Insgesamt lässt sich zusätzlich eine leichte Tendenz dahingegen erkennen, dass die Ergebnisse in der ICSI-Gruppe etwas schlechter sind als diejenigen in der IVF-Gruppe.

Tabelle 4-4: DNA-Integrität im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Färbungen	IVF-Kollektiv (n=31)			ICSI-Kollektiv(n=15)			Signifikanz (p-Wert)
	n	M±SD	Median	n	M±SD	Median	
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	31	15,87±7,26	14,00	15	18,53±9,99	17,00	0,309
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	31	9,35±4,34	9,00	14	12,57±4,50	12,00	0,028*
AO vor [% Denaturierung]	29	8,34±4,43	8,00	13	8,38±2,57	8,00	0,971
AO nach [% Denaturierung]	29	7,79±6,20	6,00	13	8,85±4,96	8,00	0,593
TUNEL vor [% Apop.]	31	10,94±7,02	9,00	15	11,60±7,29	11,00	0,768
TUNEL nach [% Apop.]	31	10,48±7,72	8,00	14	10,14±8,21	8,00	0,894

\* Signifikanz auf dem 5 %-Niveau ( $p \leq 0,05$ )

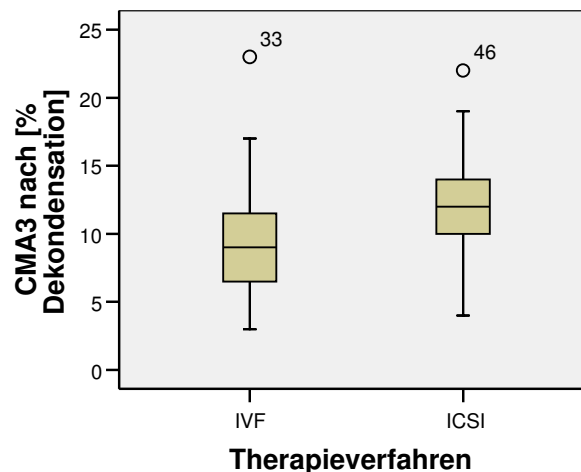


Abbildung 4-3: Boxplotdarstellung der dekondensierten Spermien-DNA in der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Insgesamt betrachtet, finden sich in allen Kollektiven (Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv) vergleichsweise gute Ergebnisse mit einem relativ geringen Prozentsatz an Schädigungen der DNA-Integrität (für die CMA<sub>3</sub>-Färbung durchweg < 20 % Dekondensation, für die AO-Färbung durchweg < 10 % Denaturierung und für die TUNEL-Färbung durchweg < 15 % Apoptose), wobei die Ergebnisse nach Aufbereitung – wenn auch nicht so eindrucksvoll wie bei den Spermioграмmparametern – wiederum etwas besser als diejenigen vor Aufbereitung sind.

### 4.1.3 Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma

Tabelle 4-5 liefert eine Ergebnisübersicht der im Seminalplasma gemessenen ROS- und TAS-Konzentrationen sowie der enzymatischen Antioxidantien im Gesamtkollektiv. Zudem wird der Quotient aus in die gleiche Einheit umgerechneter ROS- und TAS- Konzentration gebildet und ebenfalls in der Tabelle aufgeführt. Dabei bedeutet ein ROS/TAS-Quotient > 1, dass die Konzentration an Oxidantien die antioxidative Kapazität übersteigt und berücksichtigt so über die Einzeldarstellung der ROS- und TAS- Konzentrationen hinaus immer das Verhältnis von beiden.

Da – wie bereits im Kapitel 3 beschrieben – die hier verwendeten Testmethoden primär für Bestimmungen im Blut entwickelt wurden und deshalb auch jeweils nur Referenz- bzw. Normalwerte für Blutproben vorliegen, müssen über die Betrachtung der Mittelwerte im Gesamtkollektiv eigene Referenzen für die in dieser Arbeit untersuchten Seminalplasmaproben definiert werden.

Tabelle 4-5: Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma im Gesamtkollektiv (n=46)

Konzentrationen / Enzymaktivitäten im Seminalplasma	Anzahl [n]	M±SD	Median	Minimum	Maximum
ROS [µmol/l]	46	52,58±27,77	44,04	15,30	120,79
TAS [mmol/l]	46	1,30±0,67	1,38	0,03	2,26
ROS/TAS	46	0,190±0,432	0,034	0,010	1,813
GPX [U/l]	44 <sup>1</sup>	2082,34±1348,55	1638,00	172,00	5863,00
GR [U/l]	38 <sup>1</sup>	129,75±72,23	113,78	26,16	300,23
SOD [U/ml]	46	3,76±2,56	3,14	0,58	14,96

<sup>1</sup>Die fehlenden Werte liegen unterhalb der Nachweisgrenze der Testmethode.

Der in Tabelle 4-6 dargestellte Vergleich der Ergebnisse für die im Seminalplasma gemessenen Oxidantien- und Antioxidantien zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv zeigt nur für die Enzymaktivität der Glutathionperoxidase GPX ( $p=0,012$ ) einen signifikanten Unterschied, wobei die GPX-Aktivität im ICSI-Kollektiv auch im Vergleich zum Gesamtkollektiv deutlich niedriger ist (Abbildung 4-4).

Tabelle 4-6: Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Konzentrationen / Enzymaktivitäten im Seminalplasma	IVF-Kollektiv (n=31)			ICSI-Kollektiv(n=15)			Signifikanz (p-Wert)
	n	M±SD	Median	n	M±SD	Median	
ROS [µmol/l]	31	56,22±28,55	45,91	15	45,07±25,37	37,91	0,205
TAS [mmol/l]	31	1,32±0,66	1,42	15	1,26±0,73	1,32	0,725
ROS/TAS	31	0,189±0,448	0,033	15	0,193±0,412	0,036	0,690
GPX [U/l]	30	2364,37 ±1477,20	2241,50	14	1478,00 ±755,38	1207,00	0,012*
GR [U/l]	25	135,34±75,40	114,61	13	118,99±67,27	112,12	0,515
SOD [U/ml]	31	4,08±2,83	3,35	15	3,11±1,80	3,14	0,236

\* Signifikanz auf dem 5 %-Niveau ( $p \leq 0,05$ )

Auch für die übrigen Antioxidantien sowie für den Gesamtantioxidantienstatus TAS sind im ICSI-Kollektiv – wenn auch nicht signifikant – niedrigere Ergebnisse als in der IVF-Gruppe zu

verzeichnen. Da die ROS-Konzentration in der ICSI-Gruppe ebenfalls etwas geringer ist, findet sich auch nur ein marginal höherer ROS/TAS-Quotient als in der IVF-Gruppe.

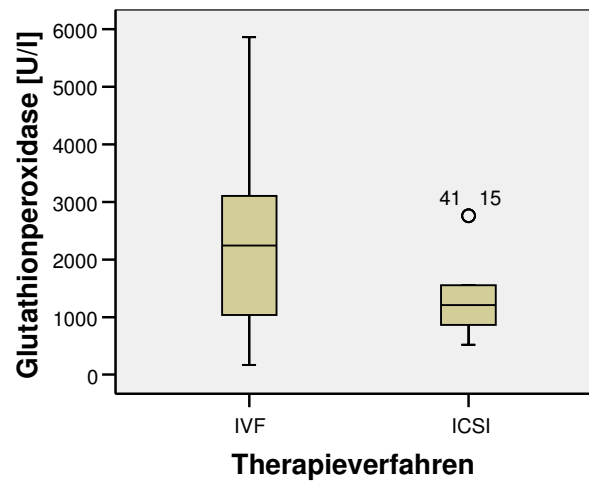


Abbildung 4-4: Boxplotdarstellung der Glutathionperoxidaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

#### 4.1.4 Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate

Zur Beurteilung der Resultate von Befruchtung und Schwangerschaft müssen neben den retrospektiv aus den Akten der Patientinnen erhobenen Daten über die jeweilige Anzahl der entnommenen, befruchteten und transferierten Eizellen sowie darüber, ob eine Schwangerschaft eingetreten ist und ob es zum Abort gekommen ist, zusätzlich die zu errechnenden Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten berücksichtigt werden.

Die Befruchtungsrate wird für jede der 46 im Rahmen dieser Studie behandelten Patientinnen in Abhängigkeit von der jeweiligen Therapiemethode nach den unten aufgeführten Formeln berechnet.

$$\text{Befruchtungsrate [\%]} = \left( \frac{\text{Befruchtete Eizellen}}{\text{Entnommene Eizellen}} \right) \times 100 \Rightarrow \text{zu verwenden bei IVF-Therapie}$$

$$\text{Befruchtungsrate [\%]} = \left( \frac{\text{Befruchtete Eizellen}}{\text{Injizierte Eizellen}} \right) \times 100 \Rightarrow \text{zu verwenden bei ICSI-Therapie}$$

Die Schwangerschaftsrate wird für jedes Kollektiv (Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv) nach folgender Formel berechnet:



$$\text{Schwangerschaftsrate [\%]} = \left( \frac{\text{Anzahl der Schwangeren}}{\text{Anzahl der Patientinnen}} \right) \times 100,$$

wobei im Folgenden die Schwangerschaftsraten sowohl auf den begonnenen Zyklus als auch auf den Embryotransfer bezogen angegeben werden. Unter Bezugnahme auf den Transfer ist die Anzahl der Schwangeren durch die Anzahl der Patientinnen mit Transfer (n=43) zu dividieren.

Es erfolgt jeweils die Berechnung der klinischen Schwangerschaftsrate, bei der auch die Graviditäten enthalten sind, die vorzeitig als Abort, Tubargravidität oder Abbruch z.B. wegen einer fetalen Fehlbildung oder Chromosomenanomalie enden sowie die Totgeburten mit einem Geburtsgewicht über 500 g [Steck, 2001]. Die stattgehabten Aborte werden zusätzlich als absolute Zahl angegeben.

Tabelle 4-7 zeigt die Ergebnisse bezüglich der entnommenen, befruchteten und transferierten Eizellen sowie der Befruchtungsrate im Gesamtkollektiv. Die nur im Rahmen der ICSI-Methode wichtige Anzahl der injizierten Eizellen wird zwar bei der Berechnung der Befruchtungsraten der Patientinnen mit ICSI-Therapie berücksichtigt, ist in den folgenden Tabellen jedoch nicht separat aufgeführt.

Das Gesamtkollektiv verzeichnet insgesamt 14 Schwangerschaften; davon 6 Aborte. Wie bereits erwähnt, wurde bei 43 Patientinnen ein Transfer durchgeführt (n=43), so dass sich eine klinische Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer von 32,56 %, pro begonnenem Zyklus von 30,43 % für das Gesamtkollektiv ergibt.

Tabelle 4-7: Parameter zu Befruchtung und Transfer im Gesamtkollektiv (n=46)

Parameter zu Befruchtung und Transfer	Anzahl [n]	M±SD	Median	Minimum	Maximum
Entnommene Eizellen [n]	46	9,37±6,21	7,5	2	29
Befruchtete Eizellen [n]	46	5,41±4,66	3,5	1	17
Befruchtungsrate [%]	46	57,96±25,22	57,52	14,29	100
Transferierte Eizellen <sup>1</sup> [n]	46	1,89±0,80	2	0 <sup>1</sup>	3

<sup>1</sup>Bei 3 Patientinnen erfolgte kein Transfer.

Der in Tabelle 4-8 aufgeführte Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv liefert im Hinblick auf die Parameter zu Befruchtung und Transfer keinerlei signifikante Unterschiede. Es ist

lediglich zu bemerken, dass die Zahlen der entnommenen und befruchteten Eizellen in der IVF-Gruppe etwas größer sind, die Befruchtungsrate und die durchschnittliche Anzahl der transferierten Eizellen jedoch in der ICSI-Gruppe die höheren Resultate erreichen.

Auch bei einer absoluten Zahl an Schwangerschaften von insgesamt 7, wovon 4 Aborte waren, liegt die klinische Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer in der ICSI-Gruppe mit exakt 50 % (pro begonnenem Zyklus 46,67 %) deutlich über derjenigen in der IVF-Gruppe, für die sich bei einer Zahl von ebenfalls absolut 7 Schwangerschaften und 2 Aborten nur 24,14 % pro Embryotransfer ergeben (pro begonnenem Zyklus 22,58 %).

Tabelle 4-8: Parameter zu Befruchtung und Transfer im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv

Parameter zu Befruchtung und Transfer	IVF-Kollektiv (n=31)			ICSI-Kollektiv(n=15)			Signifikanz (p-Wert)
	n	M±SD	Median	n	M±SD	Median	
Entnommene Eizellen [n]	31	10,06±6,58	8	15	7,93±5,27	7	0,280
Befruchtete Eizellen [n]	31	5,90±4,94	4	15	4,40±3,96	3	0,310
Befruchtungsrate [%]	31	55,14±23,81	57,14	15	63,78±27,84	61,54	0,281
Transferierte Eizellen <sup>1</sup> [n]	31	1,81±0,75	2	15	2,07±0,88	2	0,303

<sup>1</sup>Im IVF-Kollektiv erfolgte bei 2 Patientinnen kein Transfer, im ICSI-Kollektiv bei 1 Patientin.

## 4.2 Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität und den Spermio-grammparametern

Die folgenden Abschnitte dieses Kapitels der Ergebnisdarstellung dienen der Untersuchung und Analyse von bestehenden Zusammenhängen zwischen den einzelnen unter 4.1 bereits deskriptiv dargestellten Parametern.

Tabelle 4-9 zeigt zunächst bestehende Zusammenhänge zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermio-grammparametern im Gesamtkollektiv auf. Hierbei fallen in erster Linie die hoch signifikanten negativen Korrelationen zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der Dichte ( $r=-0,493$ ,  $p=0,001$ ) sowie der Globalmotilität ( $r=-0,469$ ,  $p=0,001$ ) vor Aufbereitung sowie die stark signifikante negative Korrelation zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der Globalmotilität ( $r=-0,427$ ,  $p=0,003$ ) nach Aufbereitung auf.

Zudem lassen sich noch mehrere signifikante Korrelationen erkennen zwischen der TUNEL-Färbung und der Dichte ( $r=-0,298$ ,  $p=0,047$ ) nach Aufbereitung, der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und der Globalmotilität nach Aufbereitung ( $r=-0,370$ ,  $p=0,011$ ) sowie dem Eosin-Test ( $r=0,351$ ,  $p=0,017$ ) und zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der Progressivmotilität vor Aufbereitung ( $r=-0,306$ ,  $p=0,041$ ).

Tabelle 4-9: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermio-grammparametern im Gesamtkollektiv (n=46)

Färbungen		CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	AO vor [% Denaturierung]	AO nach [% Denaturierung]	TUNEL vor [% Apoptose]	TUNEL nach [% Apoptose]
Volumen [ml]	r	-0,050	-0,078	0,075	0,085	-0,003	0,052
	p	0,740	0,611	0,636	0,593	0,982	0,732
pH-Wert	r	0,173	0,280	-0,010	0,255	-0,158	0,001
	p	0,250	0,062	0,951	0,103	0,295	0,995
Dichte vor [Mio/ml]	r	-0,290	-0,493**	-0,227	-0,108	-0,233	-0,187
	p	0,051	0,001	0,148	0,497	0,119	0,220
Dichte nach [Mio/ml]	r	0,088	-0,268	0,080	-0,296	-0,117	-0,298*
	p	0,559	0,075	0,617	0,057	0,439	0,047
Globalmotilität vor [%]	r	-0,265	-0,469**	0,125	0,061	-0,013	-0,075
	p	0,075	0,001	0,432	0,702	0,930	0,623
Globalmotilität nach [%]	r	-0,370*	-0,427**	-0,102	0,034	-0,123	0,030
	p	0,011	0,003	0,522	0,830	0,415	0,845
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,157	-0,306*	0,218	0,049	-0,136	-0,211
	p	0,296	0,041	0,166	0,758	0,368	0,163
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,216	-0,182	0,095	0,171	-0,023	-0,004
	p	0,149	0,231	0,550	0,280	0,880	0,980
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	0,351*	0,270	0,002	-0,046	-0,004	0,058
	p	0,017	0,073	0,988	0,773	0,977	0,707
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,256	0,009	0,064	0,116	0,145	0,099
	p	0,089	0,953	0,691	0,471	0,343	0,522
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,036	0,236	0,117	-0,176	0,024	-0,077
	p	0,828	0,154	0,504	0,311	0,887	0,647
Morphologie vor [% normal]	r	-0,107	0,163	-0,047	0,102	-0,130	-0,134
	p	0,485	0,290	0,769	0,527	0,396	0,386
Morphologie nach [% normal]	r	-0,098	0,126	0,013	0,073	-0,082	-0,167
	p	0,537	0,433	0,940	0,657	0,607	0,297

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Bei all diesen Korrelationen besteht ein Zusammenhang dahingegen, dass ein schlechteres Ergebnis in der Färbung ein ebenso schlechteres Resultat des entsprechenden Spermio-grammparameters bewirkt und umgekehrt. Diese Beziehung lässt sich im Wesentlichen auf die meisten der in Tabelle 4-9 untersuchten Zusammenhänge – wenn auch nicht in Form einer signifikanten Korrelation – übertragen, wobei die Korrelationen der AO-Färbung (teilweise auch der TUNEL-Färbung) sehr schwach sind sowie häufig auch von der eben beschriebenen Beziehung abweichen.

Im IVF-Kollektiv zeigt sich in Tabelle 4-10 nur noch eine stark signifikante negative Korrelation zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der Globalmotilität vor Aufbereitung ( $r=-0,532$ ,  $p=0,002$ ). Außerdem bestehen weitere signifikante Korrelationen zwischen der AO-Färbung nach Aufbereitung und dem pH-Wert ( $r=0,422$ ,  $p=0,022$ ), der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der Dichte ( $r=-0,431$ ,  $p=0,015$ ) vor Aufbereitung, der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der Dichte vor Aufbereitung ( $r=-0,412$ ,  $p=0,021$ ) sowie der Globalmotilität nach Aufbereitung ( $r=-0,402$ ,  $p=0,025$ ). Im Hinblick auf positive und negative Korrelationen bzw. Zusammenhänge entspricht das IVF-Kollektiv im Wesentlichen dem Gesamtkollektiv.

Tabelle 4-10: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermio-grammparametern im IVF-Kollektiv (n=31)

Färbungen		CMA <sub>3</sub> vor [% Dekon-densation]	CMA <sub>3</sub> nach [% Dekon-densation]	AO vor [% Denaturierung]	AO nach [% Denaturierung]	TUNEL vor [% Apoptose]	TUNEL nach [% Apoptose]
Volumen [ml]	r	0,032	0,078	0,064	0,302	0,197	0,117
	p	0,864	0,676	0,742	0,111	0,288	0,531
pH-Wert	r	0,246	0,251	0,022	0,422*	-0,174	0,028
	p	0,182	0,173	0,912	0,022	0,348	0,882
Dichte vor [Mio/ml]	r	-0,431*	-0,412*	-0,170	0,077	-0,226	-0,130
	p	0,015	0,021	0,378	0,693	0,221	0,486
Dichte nach [Mio/ml]	r	-0,016	-0,191	0,146	-0,248	-0,021	-0,239
	p	0,931	0,304	0,451	0,195	0,948	0,195
Globalmotilität vor [%]	r	-0,264	-0,532**	0,101	0,135	0,179	0,030
	p	0,151	0,002	0,604	0,485	0,336	0,873
Globalmotilität nach [%]	r	-0,344	-0,402*	-0,195	0,144	-0,018	0,054
	p	0,058	0,025	0,310	0,455	0,924	0,772
Progressivmotilität vor [%]	r	0,009	-0,312	0,219	0,048	0,019	-0,163
	p	0,963	0,087	0,254	0,803	0,921	0,381
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,112	-0,001	0,062	0,275	0,046	-0,007
	p	0,547	0,995	0,749	0,149	0,804	0,971
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	0,292	0,264	0,147	-0,004	0,049	0,112
	p	0,111	0,151	0,447	0,982	0,794	0,547
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,076	-0,061	0,169	0,093	0,147	0,193
	p	0,684	0,744	0,381	0,631	0,430	0,299
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,066	0,178	0,024	-0,230	-0,091	-0,115
	p	0,735	0,357	0,905	0,249	0,638	0,553
Morphologie vor [% normal]	r	-0,053	0,160	-0,017	0,191	-0,110	-0,169
	p	0,776	0,390	0,932	0,320	0,555	0,364
Morphologie nach [% normal]	r	-0,027	0,230	0,052	0,129	-0,026	-0,208
	p	0,891	0,239	0,795	0,523	0,896	0,287

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Für das ICSI-Kollektiv (Tabelle 4-11) ergeben sich lediglich noch zwei signifikante negative Korrelationen zwischen der AO-Färbung vor Aufbereitung und dem Eosin-Test ( $r=-0,644$ ,  $p=0,018$ ) sowie zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung und dem HOS-Test ( $r=-0,650$ ,  $p=0,012$ ) vor Aufbereitung. Dass die Korrelationen in diesem Fall negativ sind, bedeutet im Gegensatz zu den signifikanten Zusammenhängen im Gesamt- und IVF-Kollektiv, dass mit zunehmender

Denaturierung bzw. Dekondensation die in Eosin- und HOS-Test nachgewiesene Schädigung abnimmt bzw. die Vitalität der Spermien zunimmt. Dieser Zusammenhang gilt aufgrund der bivariaten Korrelation auch in umgekehrter Reihenfolge.

Tabelle 4-11: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermio-grammparametern im ICSI-Kollektiv (n=15)

Färbungen Spermio-grammparam.		CMA <sub>3</sub> vor [% Dekon- densation]	CMA <sub>3</sub> nach [% Dekon- densation]	AO vor [% Denaturierung]	AO nach [% Denaturierung]	TUNEL vor [% Apoptose]	TUNEL nach [% Apoptose]
		r	p	r	p	r	p
Volumen [ml]	r	-0,135	-0,313	0,137	-0,439	-0,376	-0,078
	p	0,632	0,276	0,656	0,134	0,167	0,790
pH-Wert	r	0,001	0,303	-0,183	-0,414	-0,140	-0,066
	p	0,996	0,292	0,550	0,160	0,619	0,823
Dichte vor [Mio/ml]	r	-0,044	-0,466	-0,511	-0,488	-0,240	-0,342
	p	0,876	0,093	0,074	0,091	0,389	0,231
Dichte nach [Mio/ml]	r	0,232	-0,413	-0,159	-0,407	-0,293	-0,406
	p	0,406	0,142	0,603	0,168	0,289	0,150
Globalmotilität vor [%]	r	-0,203	-0,150	0,317	-0,069	-0,445	-0,367
	p	0,468	0,608	0,292	0,824	0,096	0,197
Globalmotilität nach [%]	r	-0,349	-0,204	0,226	-0,126	-0,324	-0,043
	p	0,203	0,484	0,458	0,683	0,238	0,885
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,335	-0,282	0,279	0,088	-0,381	-0,300
	p	0,222	0,329	0,355	0,774	0,161	0,297
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,334	-0,358	0,286	-0,059	-0,164	-0,021
	p	0,210	0,209	0,344	0,848	0,558	0,943
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	0,402	0,088	-0,644*	-0,292	-0,149	-0,042
	p	0,137	0,765	0,018	0,334	0,595	0,887
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,650*	-0,036	-0,388	0,111	0,122	-0,090
	p	0,012	0,906	0,212	0,730	0,677	0,770
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,349	-0,288	0,220	-0,342	0,096	0,088
	p	0,323	0,452	0,601	0,408	0,792	0,821
Morphologie vor [% normal]	r	-0,214	0,332	-0,275	-0,297	-0,184	-0,029
	p	0,463	0,268	0,386	0,348	0,528	0,925
Morphologie nach [% normal]	r	-0,106	0,397	-0,267	-0,081	-0,186	-0,074
	p	0,720	0,179	0,402	0,802	0,524	0,811

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Für die meisten übrigen nicht signifikanten Korrelationen ergeben sich jedoch die gleichen durch ein positives oder negatives Vorzeichen ausgedrückten Tendenzen wie im Gesamt-

und IVF-Kollektiv. Danach führen schlechtere Ergebnisse in den Färbungen auch zu schlechteren Ergebnissen bei den Spermogrammparametern und umgekehrt.

Die Abbildungen 4–5 und 4–6 dienen der graphischen Veranschaulichung der negativen Korrelation zwischen den mit Hilfe der Färbungen erfassten Schädigungen der DNA-Integrität und den Spermogrammparametern (am Beispiel der Dichte) für das Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.

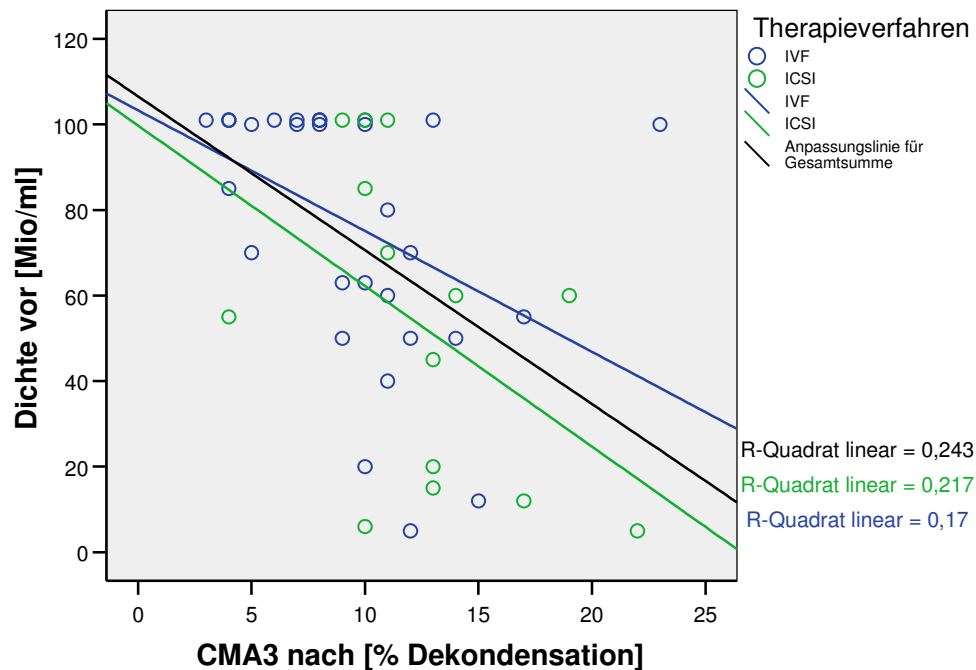


Abbildung 4-5: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

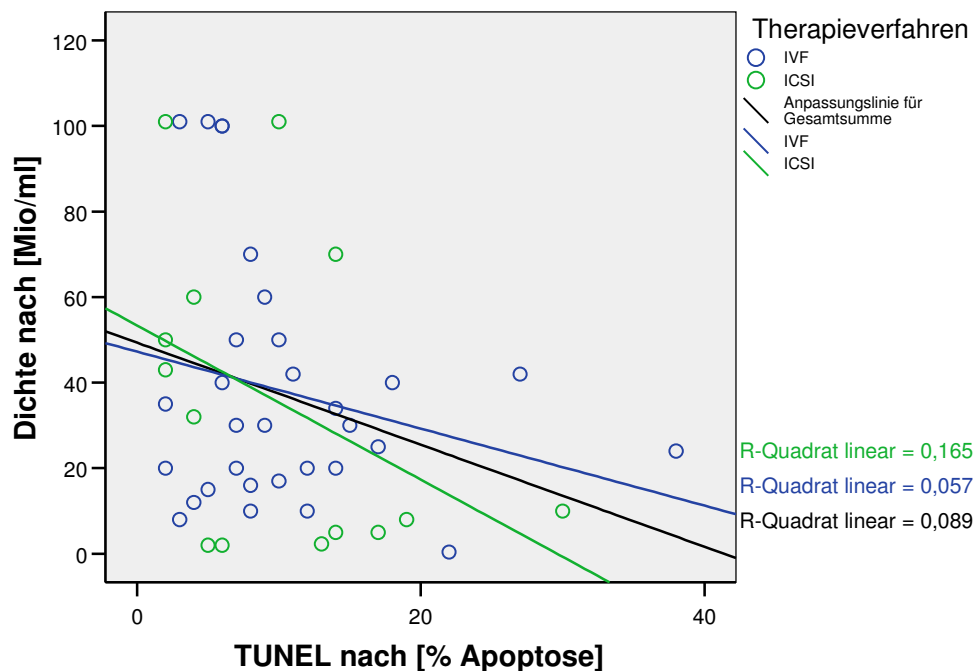


Abbildung 4-6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte und der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

### 4.3 Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und den Spermogrammparametern

Die in Tabelle 4-12 abgebildete Übersicht der Zusammenhänge zwischen den im Seminalplasma gemessenen Oxidantien- bzw. Antioxidantienkonzentrationen und den Spermogrammparametern im Gesamtkollektiv liefert einige aufschlussreiche Korrelationen. So fallen besonders die hoch signifikanten Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert ( $r=-0,693$ ,  $p=0,000$ ) sowie zwischen der SOD-Aktivität und der Morphologie nach Aufbereitung ( $r=0,492$ ,  $p=0,001$ ) auf. Des Weiteren verzeichnet das Gesamtkollektiv stark signifikante Korrelationen zwischen der GPX-Aktivität und dem Volumen ( $r=-0,436$ ,  $p=0,003$ ) sowie zwischen der SOD-Aktivität und der Dichte ( $r=0,404$ ,  $p=0,005$ ) sowie der Morphologie ( $r=0,412$ ,  $p=0,005$ ) vor Aufbereitung. Zwischen dem ROS/TAS-Quotienten und der Progressivmotilität vor Aufbereitung ( $r=0,308$ ,  $p=0,038$ ), der GPX-Aktivität und dem HOS-Test nach Aufbereitung ( $r=-0,349$ ,  $p=0,034$ ) sowie zwischen der ROS-Konzentration und der Morphologie vor Aufbereitung ( $r=-0,354$ ,  $p=0,017$ ) bestehen weitere signifikante Korrelationen.



Tabelle 4-12: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermio-grammparametern im Gesamtkollektiv (n=46)

Spermio-grammparam.	Konz. / Enzymakt. im Seminalplasma	ROS [µmol/l]	TAS [mmol/l]	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
		r	p	r	p	r	p
Volumen [ml]	r	0,055	0,284	-0,200	-0,436**	-0,052	-0,038
	p	0,719	0,056	0,182	0,003	0,759	0,803
pH-Wert	r	-0,693**	-0,029	-0,214	0,044	-0,197	-0,140
	p	0,000	0,848	0,153	0,778	0,235	0,353
Dichte vor [Mio/ml]	r	0,144	0,024	0,120	-0,058	-0,106	0,404**
	p	0,340	0,875	0,428	0,708	0,528	0,005
Dichte nach [Mio/ml]	r	-0,197	-0,200	0,156	-0,116	0,116	0,016
	p	0,189	0,183	0,299	0,453	0,486	0,915
Globalmotilität vor [%]	r	0,136	-0,107	0,248	-0,159	0,112	0,075
	p	0,368	0,479	0,097	0,304	0,504	0,619
Globalmotilität nach [%]	r	-0,024	0,077	0,056	0,180	-0,002	0,245
	p	0,872	0,610	0,711	0,242	0,988	0,101
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,079	-0,190	0,308*	-0,186	-0,121	-0,032
	p	0,603	0,206	0,038	0,226	0,471	0,833
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,241	0,206	-0,138	0,111	-0,059	0,241
	p	0,107	0,169	0,359	0,473	0,726	0,106
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	-0,100	-0,115	0,055	0,136	-0,209	0,111
	p	0,507	0,446	0,717	0,378	0,208	0,462
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	0,016	0,278	-0,167	-0,053	-0,229	0,124
	p	0,918	0,065	0,274	0,738	0,173	0,418
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,148	-0,013	-0,017	-0,349*	-0,278	-0,233
	p	0,369	0,936	0,918	0,034	0,123	0,153
Morphologie vor [% normal]	r	-0,354*	-0,095	0,173	-0,082	-0,118	0,412**
	p	0,017	0,535	0,255	0,602	0,479	0,005
Morphologie nach [% normal]	r	-0,229	-0,121	0,164	0,046	-0,008	0,492**
	p	0,144	0,445	0,299	0,777	0,965	0,001

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Unter Berücksichtigung der Vorzeichen dieser teilweise sogar hoch signifikanten Korrelationen fällt auf, dass mit steigender Konzentration an freien Radikalen (ROS) der pH-Wert immer niedriger wird und morphologisch immer weniger Normalformen vorhanden sind. Im Hinblick auf die Enzymaktivität der SOD ist festzustellen, dass mit zunehmender antioxidativer Aktivität vor allem der prozentuale Anteil an morphologischen Normalformen zunimmt

und im Speziellen die Dichte vor Aufbereitung ansteigt. Unter Zunahme der GPX-Aktivität lässt sich einerseits ein niedrigeres Ejakulatvolumen, andererseits eine Verbesserung der Vitalität im HOS-Test beobachten. Für den ROS/TAS-Quotienten ergibt sich lediglich im Zusammenhang mit der Progressivmotilität vor Aufbereitung eine signifikante Korrelation, wobei ein höherer Quotient eine bessere Progressivmotilität bedingt. Im Hinblick auf die Progressivmotilität nach Aufbereitung zeigt sich eine – wenn auch nicht signifikante, aber wie man es erwarten würde – umgekehrte Beziehung. Insgesamt lässt sich anhand der übrigen nicht signifikanten Zusammenhänge keine klare Linie erkennen, da die Korrelationen der einzelnen Parameter doch zu verschiedene Tendenzen aufweisen.

Das in Tabelle 4-13 dargestellte IVF-Kollektiv bietet ein dem Gesamtkollektiv deutlich ähnelndes Bild. So lassen sich wieder die beiden hoch signifikanten Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert ( $r=-0,688$ ,  $p=0,000$ ) sowie zwischen der SOD-Aktivität und der Morphologie nach Aufbereitung ( $r=0,571$ ,  $p=0,001$ ) erkennen. Außerdem finden sich stark signifikante Korrelationen erneut zwischen der GPX-Aktivität und dem Volumen ( $r=-0,467$ ,  $p=0,009$ ), der SOD-Aktivität und der Morphologie vor Aufbereitung ( $r=0,494$ ,  $p=0,005$ ) sowie zusätzlich zwischen dem ROS/TAS-Quotienten und der Progressivmotilität vor Aufbereitung ( $r=0,486$ ,  $p=0,006$ ). Signifikante Korrelationen zeigen sich zwischen der TAS-Konzentration und dem Volumen ( $r=0,407$ ,  $p=0,023$ ), dem ROS/TAS-Quotienten und dem Volumen ( $r=-0,401$ ,  $p=0,025$ ), der SOD-Aktivität und der Dichte vor Aufbereitung ( $r=0,370$ ,  $p=0,041$ ) sowie zwischen der ROS-Konzentration und der Progressivmotilität nach Aufbereitung ( $r=-0,414$ ,  $p=0,021$ ).

Im Hinblick auf die Vorzeichen der Korrelationen bestehen keine Unterschiede zum Gesamtkollektiv. Die im Gesamtkollektiv nicht feststellbaren, jedoch in der IVF-Gruppe bestehenden signifikanten Korrelationen zwischen der TAS-Konzentration sowie dem ROS/TAS-Quotienten und dem Volumen verhalten sich so, dass bei höherem TAS auch ein höheres Volumen bzw. bei höherem ROS/TAS-Quotienten ein niedrigeres Volumen vorliegt. Zwischen der ROS-Konzentration und der Progressivmotilität nach Aufbereitung zeigt sich – wie man es erwarten würde – eine negative Korrelation.

Tabelle 4-13: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermio-graphparametern im IVF-Kollektiv (n=31)

Spermio-grammparam.	Konz. / Enzymakt. im Seminal-plasma	ROS	TAS	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
		[ $\mu\text{mol/l}$ ]	[ $\text{mmol/l}$ ]				
Volumen [ml]	r	0,091	0,407*	-0,401*	-0,467**	0,163	-0,108
	p	0,625	0,023	0,025	0,009	0,436	0,564
pH-Wert	r	-0,688**	-0,028	-0,188	0,043	-0,281	-0,101
	p	0,000	0,881	0,311	0,822	0,173	0,588
Dichte vor [Mio/ml]	r	0,155	-0,030	0,201	-0,129	-0,072	0,370*
	p	0,406	0,874	0,277	0,497	0,733	0,041
Dichte nach [Mio/ml]	r	-0,242	-0,330	0,157	-0,101	0,153	-0,060
	p	0,189	0,070	0,400	0,597	0,464	0,750
Globalmotilität vor [%]	r	0,101	-0,140	0,269	-0,228	0,211	0,120
	p	0,587	0,453	0,143	0,225	0,310	0,520
Globalmotilität nach [%]	r	-0,140	0,143	0,121	0,112	-0,052	0,322
	p	0,453	0,441	0,515	0,555	0,804	0,078
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,139	-0,275	0,486**	-0,290	-0,182	0,083
	p	0,456	0,135	0,006	0,120	0,385	0,656
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,414*	0,265	-0,157	0,072	-0,011	0,257
	p	0,021	0,149	0,400	0,706	0,958	0,163
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	0,023	-0,174	0,198	0,177	-0,281	0,154
	p	0,902	0,350	0,285	0,348	0,174	0,408
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	0,147	0,282	-0,108	0,024	-0,255	0,149
	p	0,431	0,124	0,562	0,898	0,219	0,423
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,042	-0,316	0,119	-0,164	-0,159	-0,254
	p	0,830	0,094	0,539	0,403	0,469	0,184
Morphologie vor [% normal]	r	-0,348	-0,144	0,305	-0,151	-0,125	0,494**
	p	0,055	0,440	0,096	0,427	0,552	0,005
Morphologie nach [% normal]	r	-0,295	-0,157	0,262	-0,077	-0,041	0,571**
	p	0,127	0,426	0,177	0,702	0,858	0,001

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Im ICSI-Kollektiv (Tabelle 4-14) finden sich deutlich weniger signifikante und keine hoch signifikanten Zusammenhänge zwischen den im Seminalplasma gemessenen Oxidantien bzw. Antioxidantien und den Spermio-graphparametern. Stark signifikante Korrelationen bestehen lediglich zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert ( $r=-0,705$ ,  $p=0,003$ ) sowie zwischen der TAS-Konzentration und dem HOS-Test nach Aufbereitung ( $r=0,785$ ,

p=0,007). Dabei verhält sich der Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert wie im Gesamt- und IVF-Kollektiv, während die positive Korrelation zwischen der TAS-Konzentration und der prozentualen Schädigung im HOS-Test nach Aufbereitung in den beiden anderen Kollektiven (nicht signifikant) nur für den HOS-Test vor Aufbereitung erkennbar ist.

Tabelle 4-14: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermioграмmparametern im ICSI-Kollektiv (n=15)

Konz. / Enzymakt. im Seminalplasma		ROS [μmol/l]	TAS [mmol/l]	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
Spermio- grammparam.							
Volumen [ml]	r	-0,086	0,053	0,234	-0,574*	-0,532	0,099
	p	0,761	0,850	0,401	0,032	0,061	0,726
pH-Wert	r	-0,705**	-0,017	-0,306	0,260	0,101	-0,229
	p	0,003	0,953	0,267	0,369	0,743	0,412
Dichte vor [Mio/ml]	r	-0,024	0,075	-0,009	-0,328	-0,280	0,446
	p	0,933	0,792	0,976	0,253	0,354	0,096
Dichte nach [Mio/ml]	r	-0,139	0,002	0,160	-0,333	0,069	0,214
	p	0,622	0,994	0,568	0,245	0,823	0,445
Globalmotilität vor [%]	r	0,060	-0,088	0,228	-0,411	-0,310	-0,332
	p	0,831	0,756	0,414	0,145	0,302	0,227
Globalmotilität nach [%]	r	-0,052	-0,095	-0,076	-0,097	-0,086	-0,255
	p	0,855	0,737	0,787	0,740	0,779	0,360
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,026	-0,075	-0,007	-0,080	-0,158	-0,412
	p	0,926	0,792	0,982	0,785	0,607	0,127
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,012	0,051	-0,103	-0,229	-0,447	-0,045
	p	0,967	0,858	0,715	0,432	0,126	0,874
Eosin-Test vor [% tote Spermien]	r	-0,274	0,023	-0,291	0,384	0,072	0,172
	p	0,323	0,936	0,293	0,175	0,814	0,539
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,145	0,341	-0,335	0,137	-0,152	0,272
	p	0,620	0,233	0,241	0,655	0,636	0,346
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,096	0,785**	-0,353	-0,636	-0,771*	0,183
	p	0,793	0,007	0,317	0,065	0,015	0,613
Morphologie vor [% normal]	r	-0,484	0,027	-0,286	0,229	-0,117	-0,086
	p	0,079	0,927	0,322	0,453	0,703	0,770
Morphologie nach [% normal]	r	-0,336	-0,160	-0,192	0,312	-0,019	-0,190
	p	0,241	0,584	0,512	0,300	0,956	0,515

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Weitere signifikante negative Korrelationen bestehen im ICSI-Kollektiv zwischen der GPX-Aktivität und dem Volumen ( $r=-0,574$ ,  $p=0,032$ ), was sich auch im Gesamt- und IVF-Kollektiv beobachten lässt, sowie zwischen der GR-Aktivität und dem HOS-Test nach Aufbereitung ( $r=-0,771$ ,  $p=0,015$ ), was aufgrund der stark signifikanten positiven Korrelation der TAS-Konzentration erstaunlich ist, jedoch eher zu erwarten gewesen wäre als eine positive Korrelation. Die GPX-Aktivität weist im Zusammenhang mit der Schädigung im HOS-Test nach Aufbereitung ebenfalls eine (nicht signifikante) negative, die SOD-Aktivität eine (nicht signifikante) positive Korrelation auf.

Abbildung 4-7 stellt in einem Streudiagramm nochmals die positiven Korrelationen zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der SOD-Aktivität im Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv graphisch dar.

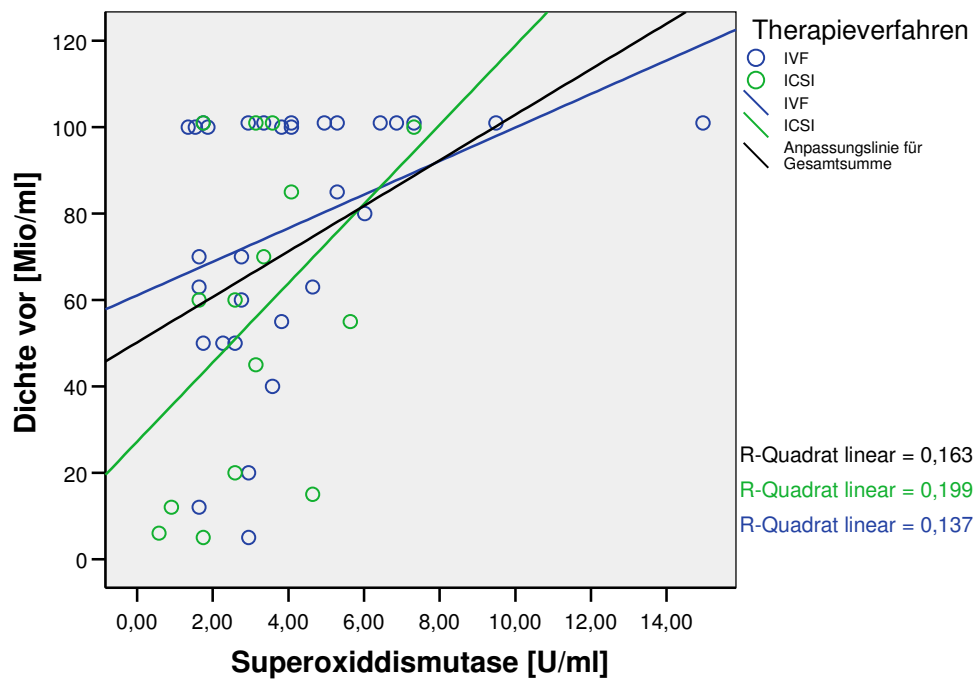


Abbildung 4-7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

#### 4.4 Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und der DNA-Integrität

Der folgende Abschnitt dient dazu, die Zusammenhänge zwischen den Oxidantien- bzw. Antioxidantienkonzentrationen und den Parametern der DNA-Integrität aufzuzeigen und näher zu beleuchten.

Die Untersuchung des Gesamtkollektivs (Tabelle 4-15) liefert lediglich eine signifikante negative Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung ( $r=-0,299$ ,  $p=0,046$ ). Insgesamt lassen sich aufgrund der teilweise nur sehr schwachen und scheinbar willkürlich das Vorzeichen wechselnden Korrelationen keine richtungweisenden Tendenzen erkennen.

Tabelle 4-15: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im Gesamtkollektiv (n=46)

Konz. / Enzymakt. im Seminalplasma		ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	TAS [mmol/l]	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
Färbungen							
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	-0,236	-0,085	-0,040	0,012	0,045	-0,208
	p	0,114	0,573	0,792	0,937	0,789	0,166
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	-0,299*	0,006	-0,232	-0,082	-0,042	-0,282
	p	0,046	0,971	0,126	0,603	0,807	0,061
AO vor [% Denaturierung]	r	-0,065	-0,105	0,095	-0,152	0,180	0,146
	p	0,682	0,510	0,548	0,350	0,300	0,355
AO nach [% Denaturierung]	r	-0,070	0,112	-0,053	-0,119	0,067	0,025
	p	0,660	0,482	0,740	0,466	0,703	0,874
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,061	0,013	0,041	-0,110	0,178	0,179
	p	0,688	0,934	0,786	0,479	0,284	0,234
TUNEL nach [% Apoptose]	r	0,090	-0,112	0,100	-0,024	-0,114	0,061
	p	0,557	0,465	0,512	0,880	0,504	0,693

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Auch für das in Tabelle 4-16 abgebildete IVF-Kollektiv lassen sich außer der leicht signifikanten negativen Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung ( $r=-0,365$ ,  $p=0,044$ ) keinerlei signifikante Zusammenhänge erfassen.

Tabelle 4-16: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im IVF-Kollektiv (n=31)

Konz. / Enzymakt. im Seminal- plasma		ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	TAS [ $\text{mmol/l}$ ]	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
Färbungen							
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	-0,365*	0,057	-0,108	0,002	-0,049	-0,186
	p	0,044	0,760	0,564	0,991	0,818	0,318
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	-0,312	0,147	-0,310	-0,077	-0,105	-0,150
	p	0,087	0,429	0,090	0,685	0,617	0,422
AO vor [% Denaturierung]	r	-0,138	-0,231	0,126	-0,129	0,223	0,231
	p	0,474	0,227	0,514	0,515	0,294	0,228
AO nach [% Denaturierung]	r	-0,267	0,261	-0,090	-0,222	-0,012	0,118
	p	0,162	0,172	0,644	0,255	0,956	0,542
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,070	0,029	0,026	-0,147	0,187	0,145
	p	0,709	0,879	0,888	0,440	0,371	0,436
TUNEL nach [% Apoptose]	r	0,061	0,024	-0,014	-0,112	-0,288	0,056
	p	0,746	0,897	0,938	0,555	0,162	0,766

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Im ICSI-Kollektiv (Tabelle 4-17) bestehen signifikante Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration ( $r=0,670$ ,  $p=0,012$ ) sowie der GPX-Aktivität ( $r=0,581$ ,  $p=0,047$ ) und der AO-Färbung nach Aufbereitung und zwischen der SOD-Aktivität und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung ( $r=-0,600$ ,  $p=0,023$ ). Lediglich die negative Korrelation zwischen der SOD-Aktivität und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung wird – wenn auch nicht signifikant – im Gesamt- und IVF-Kollektiv bestätigt. Die beiden anderen signifikanten positiven Korrelationen im ICSI-Kollektiv entsprechen nicht signifikanten negativen Korrelationen im Gesamt- und IVF-Kollektiv.

Tabelle 4-17: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im ICSI-Kollektiv (n=15)

Konz. / Enzymakt. im Seminal- plasma		ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	TAS [ $\text{mmol/l}$ ]	ROS/TAS	GPX [U/l]	GR [U/l]	SOD [U/ml]
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	0,038	-0,273	0,069	0,127	0,264	-0,226
	p	0,892	0,325	0,806	0,666	0,384	0,417
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	-0,147	-0,201	-0,116	0,358	0,203	-0,600*
	p	0,616	0,491	0,692	0,229	0,528	0,023
AO vor [% Denaturierung]	r	0,250	0,377	-0,066	-0,389	0,014	-0,326
	p	0,409	0,204	0,830	0,212	0,966	0,276
AO nach [% Denaturierung]	r	0,670*	-0,300	0,122	0,581*	0,338	-0,326
	p	0,012	0,320	0,691	0,047	0,309	0,277
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,015	-0,012	0,074	0,031	0,194	0,354
	p	0,957	0,968	0,793	0,917	0,525	0,195
TUNEL nach [% Apoptose]	r	0,156	-0,381	0,366	0,359	0,289	0,077
	p	0,595	0,180	0,198	0,228	0,363	0,793

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Die leicht signifikante negative Korrelation des Gesamtkollektivs zwischen der ROS-Konzentration und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung ist in Abbildung 4-8 im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv nochmals graphisch dargestellt.

Abbildung 4-9 zeigt die negativen Korrelationen des Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektivs zwischen der SOD-Aktivität und der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung, wobei besonders die signifikante negative Korrelation im ICSI-Kollektiv auffällt.



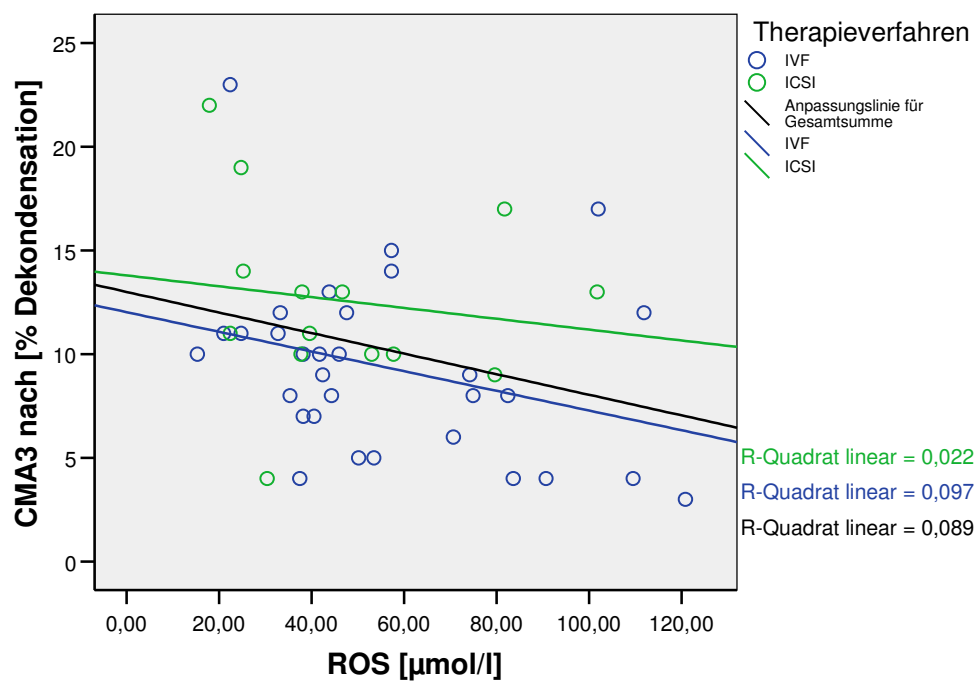


Abbildung 4-8: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

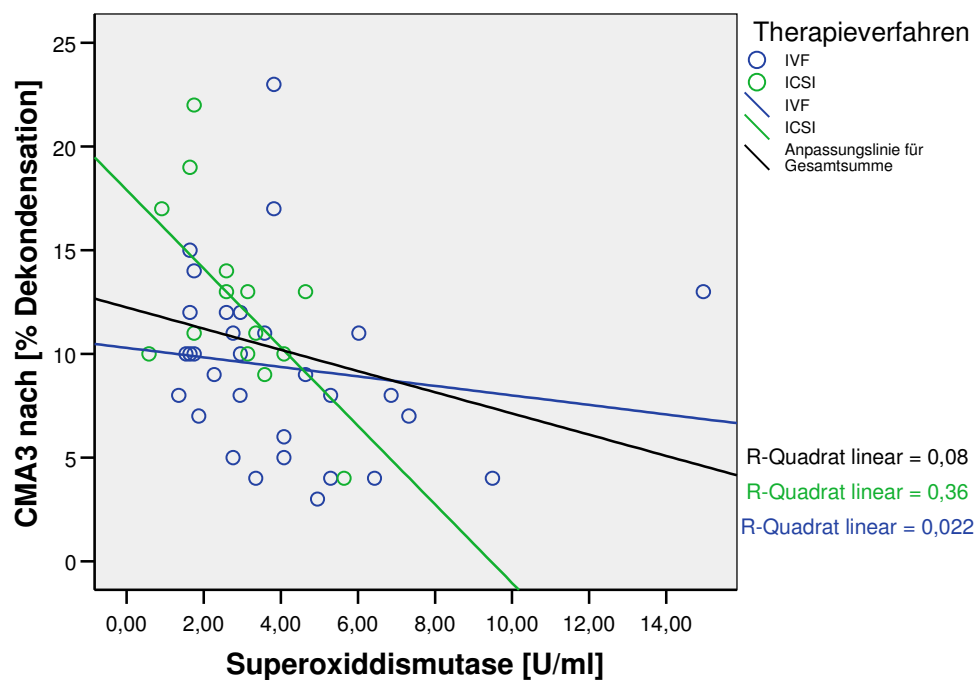


Abbildung 4-9: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung nach Aufbereitung und der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

## 4.5 Zusammenhang zwischen den SpermioGrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten

In Tabelle 4-18, die einen Überblick über bestehende Zusammenhänge zwischen den SpermioGrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im Gesamtkollektiv gibt, sind wenige leicht signifikante Korrelationen zu erkennen. Diese bestehen zwischen dem pH-Wert und der Anzahl der entnommenen Eizellen ( $r=0,346$ ,  $p=0,019$ ) sowie dem pH-Wert und der Befruchtungsrate ( $r=-0,306$ ,  $p=0,038$ ), zwischen der Progressivmotilität nach Aufbereitung und der Anzahl an transferierten Eizellen ( $r=-0,322$ ,  $p=0,029$ ) und zwischen dem HOS-Test vor Aufbereitung und der Anzahl an entnommenen ( $r=-0,337$ ,  $p=0,024$ ) sowie befruchteten Eizellen ( $r=-0,297$ ,  $p=0,047$ ). Der Vergleich zwischen den Schwangeren und Nicht-Schwangeren im Gesamtkollektiv liefert im Hinblick auf die SpermioGrammparameter keinerlei signifikante Unterschiede. Die Befruchtungsrate zeigt nicht signifikante positive Korrelationen gegenüber dem Volumen, der Dichte vor Aufbereitung sowie gegenüber den Schädigungen in Eosin- und HOS-Test vor Aufbereitung. Für alle übrigen SpermioGrammparameter ergeben sich im Hinblick auf die Befruchtungsrate (nicht signifikante) negative Korrelationen.

Das IVF-Kollektiv (Tabelle 4-19) verzeichnet lediglich eine stark signifikante positive Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der Befruchtungsrate ( $r=0,465$ ,  $p=0,008$ ), wobei eine höhere Dichte mit einer höheren Befruchtungsrate verbunden ist. Des Weiteren besteht für die prozentualen Schädigungen im HOS-Test nach Aufbereitung ein stark signifikanter Unterschied ( $p=0,009$ ) im Vergleich zwischen der Gruppe der Paare, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denjenigen, bei denen die Frauen nicht schwanger geworden sind dahingegen, dass in der Gruppe der Schwangeren für die Männer eine bessere Vitalität im HOS-Test nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich zum Gesamtkollektiv bestehen im IVF-Kollektiv zusätzliche (nicht signifikante) positive Korrelationen zwischen der Befruchtungsrate und der Globalmotilität vor und nach Aufbereitung sowie der Progressivmotilität nach Aufbereitung, während die Korrelationen gegenüber Eosin- und HOS-Test hier negativ sind.

Tabelle 4-18: Korrelationen zwischen den Spermio-grammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im Gesamtkollektiv (n=46)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften <sup>1</sup> [ja n=14, nein n=29]
Volumen [ml]	r	0,057	0,142	0,122	-0,024	--
	p	0,706	0,348	0,420	0,873	0,934
pH-Wert	r	0,346*	0,173	-0,306*	-0,061	--
	p	0,019	0,249	0,038	0,688	0,686
Dichte vor [Mio/ml]	r	0,064	0,128	0,207	-0,059	--
	p	0,670	0,395	0,168	0,695	0,491
Dichte nach [Mio/ml]	r	0,095	0,084	-0,095	0,022	--
	p	0,530	0,578	0,531	0,885	0,681
Globalmotilität vor [%]	r	-0,021	-0,010	-0,046	0,119	--
	p	0,890	0,949	0,761	0,431	0,914
Globalmotilität nach [%]	r	0,204	0,211	-0,001	-0,206	--
	p	0,175	0,160	0,997	0,169	0,507
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,102	-0,122	-0,157	-0,033	--
	p	0,498	0,421	0,298	0,829	0,287
Progressivmotilität nach [%]	r	0,195	0,186	-0,089	-0,322*	--
	p	0,194	0,216	0,558	0,029	0,478
Eosintest vor [% tote Spermien]	r	-0,141	-0,126	0,071	0,076	--
	p	0,350	0,406	0,640	0,614	0,394
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,337*	-0,297*	0,105	0,218	--
	p	0,024	0,047	0,493	0,151	0,650
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,207	-0,293	-0,242	0,187	--
	p	0,207	0,071	0,138	0,254	0,783
Morphologie vor [% normal]	r	0,031	-0,005	-0,066	0,010	--
	p	0,838	0,973	0,666	0,948	0,708
Morphologie nach [% normal]	r	0,025	-0,027	-0,114	-0,024	--
	p	0,873	0,866	0,473	0,882	0,963

<sup>1</sup>Die 3 Patientinnen, bei denen kein Transfer stattfand, werden nicht berücksichtigt. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 4-19: Korrelationen zwischen den SpermioGrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im IVF-Kollektiv (n=31)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften <sup>1</sup> [ja n=7, nein n=22]
Volumen [ml]	r	0,030	0,124	0,266	0,031	--
	p	0,874	0,505	0,147	0,867	0,402
pH-Wert	r	0,320	0,148	-0,301	-0,175	--
	p	0,079	0,428	0,100	0,345	0,489
Dichte vor [Mio/ml]	r	0,112	0,247	0,465**	-0,002	--
	p	0,547	0,180	0,008	0,990	0,668
Dichte nach [Mio/ml]	r	-0,027	-0,028	-0,127	-0,120	--
	p	0,887	0,880	0,495	0,522	0,589
Globalmotilität vor [%]	r	-0,128	-0,087	0,075	0,260	--
	p	0,492	0,641	0,686	0,158	0,740
Globalmotilität nach [%]	r	0,192	0,293	0,352	-0,157	--
	p	0,301	0,110	0,052	0,399	0,862
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,135	-0,113	-0,082	-0,007	--
	p	0,470	0,545	0,662	0,971	0,772
Progressivmotilität nach [%]	r	0,272	0,293	0,085	-0,340	--
	p	0,139	0,110	0,651	0,061	0,941
Eosintest vor [% tote Spermien]	r	-0,172	-0,191	-0,099	0,052	--
	p	0,354	0,302	0,598	0,781	0,386
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,263	-0,223	-0,019	0,243	--
	p	0,153	0,228	0,919	0,187	0,439
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,114	-0,227	-0,284	0,101	--
	p	0,556	0,235	0,135	0,601	0,009**
Morphologie vor [% normal]	r	-0,011	-0,063	-0,112	-0,042	--
	p	0,953	0,738	0,550	0,822	0,294
Morphologie nach [% normal]	r	-0,045	-0,106	-0,129	-0,032	--
	p	0,821	0,591	0,514	0,870	0,448

<sup>1</sup>Die 2 Patientinnen, bei denen kein Transfer stattfand, werden nicht berücksichtigt. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Für das in Tabelle 4-20 dargestellte ICSI-Kollektiv zeigen sich außer der bereits im Gesamtkollektiv beschriebenen leicht signifikanten positiven Korrelation zwischen dem pH-Wert und der Anzahl der entnommenen Eizellen ( $r=0,546$ ,  $p=0,035$ ) auch im Hinblick auf eingetretene Schwangerschaften sonst keinerlei signifikante Ergebnisse.

Positive (nicht signifikante) Korrelationen bestehen im ICSI-Kollektiv unter anderem zwischen der Befruchtungsrate und dem Eosin- und HOS-Test vor Aufbereitung sowie der Morphologie vor und nach Aufbereitung.

Tabelle 4-20: Korrelationen zwischen den Spermio-grammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im ICSI-Kollektiv (n=15)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften <sup>1</sup> [ja n=7, nein n=7]
Volumen [ml]	r	0,073	0,143	-0,076	-0,078	--
	p	0,795	0,610	0,789	0,782	0,441
pH-Wert	r	0,546*	0,354	-0,423	0,152	--
	p	0,035	0,196	0,116	0,590	0,350
Dichte vor [Mio/ml]	r	-0,188	-0,249	-0,013	-0,030	--
	p	0,503	0,370	0,965	0,916	0,204
Dichte nach [Mio/ml]	r	0,360	0,328	-0,040	0,241	--
	p	0,188	0,232	0,887	0,386	0,876
Globalmotilität vor [%]	r	0,128	0,059	-0,176	-0,026	--
	p	0,648	0,835	0,529	0,927	0,922
Globalmotilität nach [%]	r	0,042	-0,193	-0,458	-0,163	--
	p	0,882	0,491	0,086	0,561	0,710
Progressivmotilität vor [%]	r	-0,096	-0,201	-0,235	-0,036	--
	p	0,733	0,473	0,399	0,900	0,485
Progressivmotilität nach [%]	r	-0,252	-0,357	-0,354	-0,197	--
	p	0,364	0,191	0,196	0,481	0,661
Eosintest vor [% tote Spermien]	r	0,061	0,166	0,295	0,031	--
	p	0,829	0,554	0,286	0,913	0,888
HOS-Test vor [% geschädigt]	r	-0,432	-0,381	0,241	0,110	--
	p	0,122	0,179	0,406	0,708	0,467
HOS-Test nach [% geschädigt]	r	-0,613	-0,524	-0,312	0,053	--
	p	0,059	0,120	0,380	0,885	0,723
Morphologie vor [% normal]	r	0,149	0,182	0,118	0,203	--
	p	0,611	0,533	0,688	0,486	0,382
Morphologie nach [% normal]	r	0,102	0,109	0,147	0,152	--
	p	0,728	0,710	0,617	0,604	0,729

<sup>1</sup>Die Patientin, bei der kein Transfer stattfand, wird nicht berücksichtigt. \* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

In Abbildung 4-10 wird die im Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv negative Korrelation zwischen der prozentualen Schädigung der Spermien im HOS-Test nach Aufbereitung und der Befruchtungsrate nochmals graphisch dargestellt.

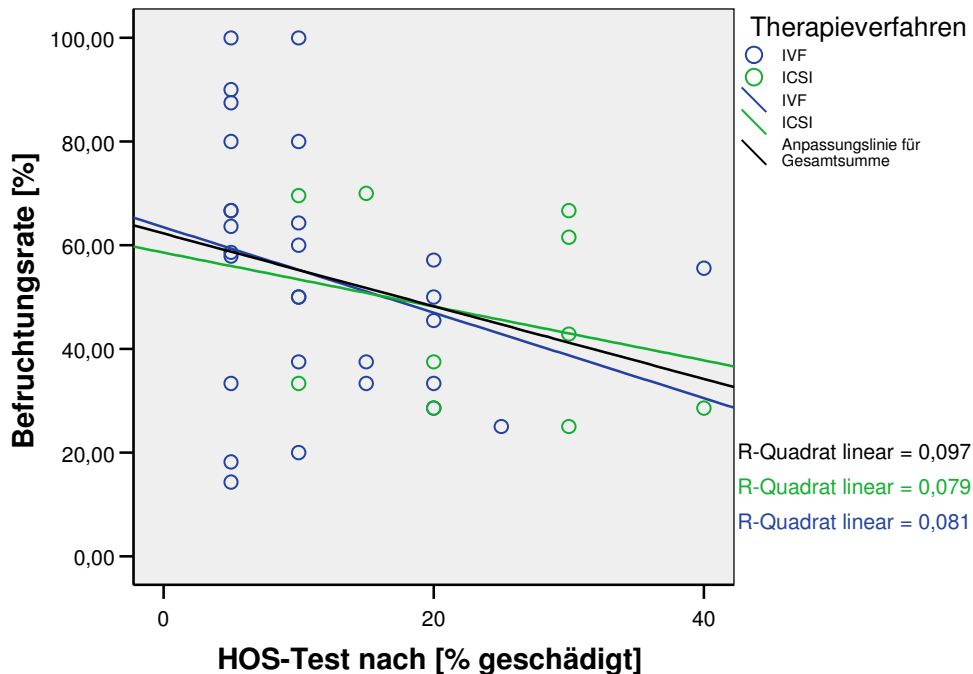


Abbildung 4-10: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und den geschädigten Spermien im HOS-Test nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

#### 4.6 Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen

Bei Betrachtung der in Tabelle 4-21 für das Gesamtkollektiv dargestellten Zusammenhänge zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen lassen sich außer einer leicht signifikanten negativen Korrelation zwischen der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung und der Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r=-0,301$ ,  $p=0,044$ ) keinerlei sonstige signifikante Ergebnisse erkennen. Die Befruchtungsrate korreliert außer mit der AO-Färbung nach Aufbereitung mit den übrigen durch die Färbungen zum Ausdruck gebrachten Schädigungen der DNA-Integrität durchweg negativ.

Tabelle 4-21: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im Gesamtkollektiv (n=46)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=14, nein n=29]
Färbungen						
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	0,008	-0,079	-0,222	-0,018	--
	p	0,960	0,600	0,138	0,905	0,479
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	0,077	-0,022	-0,188	0,026	--
	p	0,616	0,888	0,217	0,865	0,635
AO vor [% Denaturierung]	r	-0,085	-0,098	-0,182	-0,023	--
	p	0,594	0,537	0,249	0,883	0,428
AO nach [% Denaturierung]	r	0,141	0,142	0,042	-0,130	--
	p	0,373	0,370	0,790	0,411	0,479
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,149	-0,212	-0,263	0,043	--
	p	0,323	0,158	0,077	0,778	0,187
TUNEL nach [% Apoptose]	r	-0,282	-0,301*	-0,179	-0,122	--
	p	0,061	0,044	0,240	0,426	0,849

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Im IVF-Kollektiv (Tabelle 4-22) zeigen sich im Hinblick auf die Befruchtungsrate ausschließlich negative Korrelationen gegenüber den einzelnen Färbungen, wobei zwischen der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung und der Befruchtungsrate ( $r=-0,482$ ,  $p=0,006$ ) eine stark signifikante Korrelation besteht. Weitere leicht signifikante negative Korrelationen ergeben sich zwischen der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung und der Anzahl der entnommenen ( $r=-0,377$ ,  $p=0,037$ ) sowie der befruchteten Eizellen ( $r=-0,355$ ,  $p=0,050$ ). Im Vergleich zwischen den Schwangeren und Nicht-Schwangeren bestehen für die einzelnen Färbungen wiederum keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4-23 liefert für das ICSI-Kollektiv keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen. Die nicht signifikanten Korrelationen zwischen der Befruchtungsrate und den jeweiligen Färbungen besitzen außer für die CMA<sub>3</sub>-Färbung vor und die AO-Färbung nach Aufbereitung ein negatives Vorzeichen.

Tabelle 4-22: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im IVF-Kollektiv (n=31)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=7, nein n=22]
Färbungen						
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	-0,119	-0,259	-0,482**	-0,183	--
	p	0,523	0,160	0,006	0,326	0,256
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	0,090	-0,045	-0,352	-0,101	--
	p	0,629	0,810	0,052	0,588	0,711
AO vor [% Denaturierung]	r	-0,111	-0,123	-0,205	-0,100	--
	p	0,568	0,526	0,286	0,605	0,482
AO nach [% Denaturierung]	r	0,234	0,216	-0,007	0,018	--
	p	0,222	0,260	0,970	0,926	0,637
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,177	-0,250	-0,291	-0,021	--
	p	0,340	0,175	0,112	0,909	0,163
TUNEL nach [% Apoptose]	r	-0,377*	-0,355*	-0,054	0,080	--
	p	0,037	0,050	0,775	0,668	0,751

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 4-23: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im ICSI-Kollektiv (n=15)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=7, nein n=7]
Färbungen						
CMA <sub>3</sub> vor [% Dekondensation]	r	0,333	0,328	0,049	0,141	--
	p	0,225	0,232	0,861	0,615	0,099
CMA <sub>3</sub> nach [% Dekondensation]	r	0,263	0,217	-0,112	0,156	--
	p	0,364	0,232	0,702	0,595	0,804
AO vor [% Denaturierung]	r	0,096	0,092	-0,146	0,191	--
	p	0,755	0,766	0,633	0,532	1,000
AO nach [% Denaturierung]	r	-0,105	-0,054	0,122	-0,497	--
	p	0,733	0,862	0,690	0,084	0,434
TUNEL vor [% Apoptose]	r	-0,060	-0,103	-0,247	0,138	--
	p	0,831	0,715	0,376	0,625	0,639
TUNEL nach [% Apoptose]	r	-0,063	-0,188	-0,407	-0,492	--
	p	0,829	0,520	0,149	0,074	0,646



Die folgenden Abbildungen 4–11 und 4–12 dienen der graphischen Veranschaulichung der im Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv überwiegend negativen Korrelationen zwischen den mit Hilfe der verschiedenen Färbemethoden dargestellten Schädigungen der DNA-Integrität und der Befruchtungsrate.

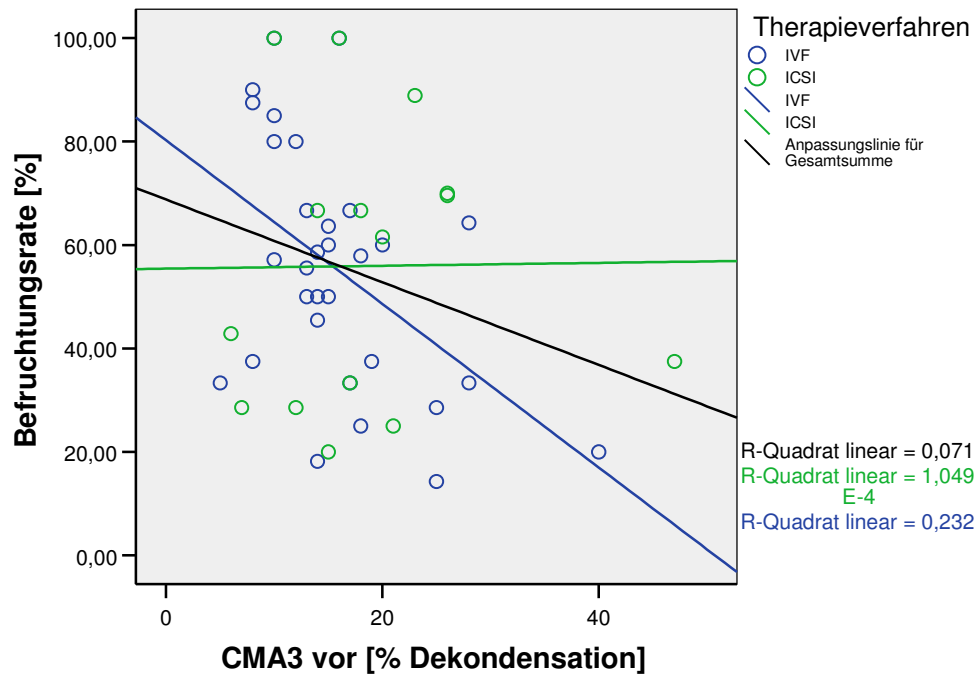


Abbildung 4-11: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der CMA<sub>3</sub>-Färbung vor Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

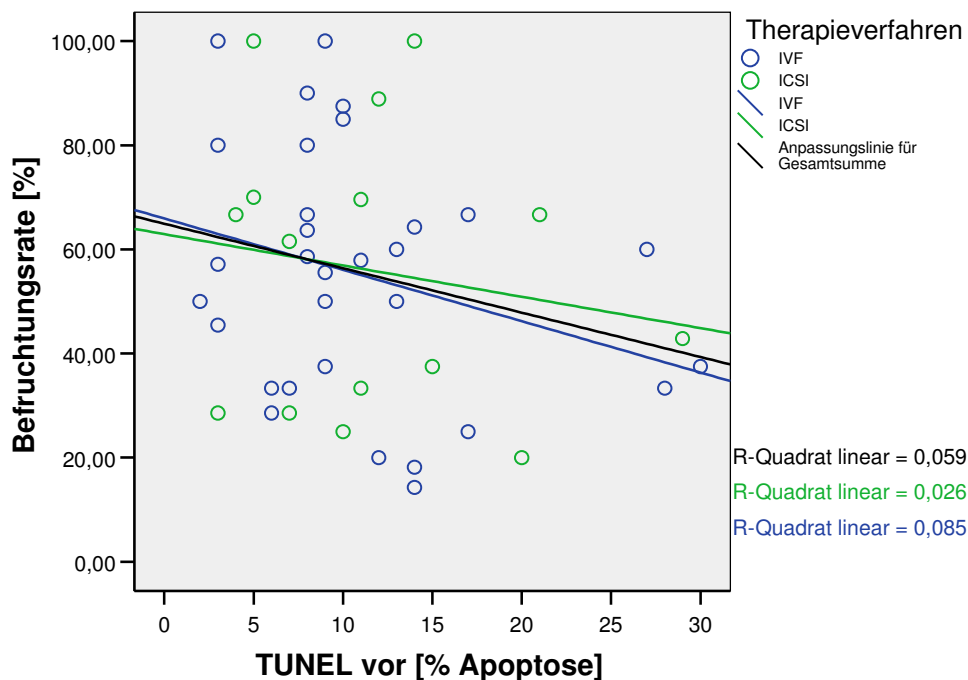


Abbildung 4-12: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

#### 4.7 Zusammenhang zwischen den Oxidantien-/ Antioxidantienkonzentrationen und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen

Zuletzt folgt noch die Darstellung bestehender Zusammenhänge zwischen den im Seminalplasma bestimmten Oxidantien- bzw. Antioxidantienkonzentrationen und den klinisch bedeutsamen Resultaten von Befruchtung und Schwangerschaft.

Die in Tabelle 4-24 abgebildete Übersicht der Ergebnisse des Gesamtkollektivs zeigt eine stark signifikante positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Befruchtungsrate ( $r=0,377$ ,  $p=0,010$ ) sowie weitere signifikante Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und der Anzahl der entnommenen Eizellen ( $r=-0,324$ ,  $p=0,028$ ), der GPX-Aktivität und der Befruchtungsrate ( $r=-0,300$ ,  $p=0,048$ ) und zwischen der GR-Aktivität und der Anzahl an entnommenen ( $r=0,369$ ,  $p=0,023$ ) sowie an befruchteten Eizellen ( $r=0,376$ ,  $p=0,020$ ). Für den Vergleich zwischen den im Hinblick auf eine eingetretene Schwangerschaft erfolgreich und den nicht erfolgreich behandelten Patientenpaaren ergeben sich für die einzelnen oxidativen und antioxidativen Parameter keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4-24: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im Gesamtkollektiv (n=46)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=14, nein n=29]
ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	r	-0,324*	-0,163	0,377**	0,025	--
	p	0,028	0,279	0,010	0,872	0,364
TAS [mmol/l]	r	-0,109	-0,055	0,077	0,289	--
	p	0,469	0,717	0,613	0,051	0,938
ROS/TAS	r	-0,125	-0,088	-0,009	-0,131	--
	p	0,408	0,563	0,950	0,387	0,486
GPX [U/l]	r	0,191	0,020	-0,300*	-0,170	--
	p	0,215	0,899	0,048	0,269	0,145
GR [U/l]	r	0,369*	0,376*	0,085	-0,126	--
	p	0,023	0,020	0,611	0,452	0,812
SOD [U/ml]	r	-0,163	-0,169	-0,044	-0,113	--
	p	0,278	0,261	0,773	0,454	0,758

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. \*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Im IVF-Kollektiv (Tabelle 4-25) zeigt sich wiederum eine signifikante positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Befruchtungsrate ( $r=0,380$ ,  $p=0,035$ ) sowie eine negative Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Anzahl der entnommenen Eizellen ( $r=-0,418$ ,  $p=0,019$ ). Auch im Hinblick auf die Schwangerschaftsresultate lassen sich ansonsten keine weiteren signifikanten Korrelationen erkennen.

Tabelle 4-25: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im IVF-Kollektiv (n=31)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=7, nein n=22]
ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	r	-0,418*	-0,256	0,380*	0,347	--
	p	0,019	0,164	0,035	0,056	0,503
TAS [mmol/l]	r	-0,095	-0,081	-0,066	0,223	--
	p	0,610	0,666	0,724	0,227	0,635
ROS/TAS	r	-0,156	-0,097	0,074	-0,043	--
	p	0,402	0,602	0,691	0,816	0,120
GPX [U/l]	r	0,117	-0,072	-0,341	-0,057	--
	p	0,536	0,706	0,065	0,766	0,289
GR [U/l]	r	0,275	0,340	0,194	-0,142	--
	p	0,183	0,096	0,353	0,497	0,642
SOD [U/ml]	r	-0,192	-0,214	-0,040	-0,125	--
	p	0,300	0,247	0,831	0,504	0,271

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Auch für das ICSI-Kollektiv (Tabelle 4-26) besteht die im Gesamt- und IVF-Kollektiv bereits beschriebene signifikante positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Befruchtungsrate ( $r=0,518$ ,  $p=0,048$ ). Zudem finden sich weitere leicht signifikante Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und der Anzahl an transferierten Eizellen ( $r=-0,538$ ,  $p=0,038$ ) sowie zwischen der GR-Aktivität und der Anzahl an entnommenen Eizellen ( $r=0,608$ ,  $p=0,028$ ). Im Hinblick auf die ROS-Konzentration ergibt sich außerdem für den Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren ein leicht signifikanter Unterschied ( $p=0,050$ ), wobei in der Gruppe der Schwangeren die Konzentration an freien Radikalen etwas höher ist als bei den Nicht-Schwangeren (Abbildung 4-13).

Tabelle 4-26: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im ICSI-Kollektiv (n=15)

Parameter zu Befruchtung und Schwangerschaft		Entnommene Eizellen [n]	Befruchtete Eizellen [n]	Befruchtungsrate [%]	Transferierte Eizellen [n]	Schwangerschaften [ja n=7, nein n=7]
ROS [ $\mu\text{mol/l}$ ]	r	-0,212	-0,024	0,518*	-0,538*	--
	p	0,448	0,931	0,048	0,038	0,050*
TAS [mmol/l]	r	-0,179	-0,021	0,321	0,427	--
	p	0,523	0,941	0,244	0,112	0,794
ROS/TAS	r	-0,039	-0,060	-0,181	-0,314	--
	p	0,891	0,831	0,518	0,255	0,993
GPX [U/l]	r	0,310	0,210	-0,008	-0,501	--
	p	0,281	0,470	0,979	0,068	0,793
GR [U/l]	r	0,608*	0,448	-0,084	-0,053	--
	p	0,028	0,125	0,784	0,863	0,766
SOD [U/ml]	r	-0,228	-0,154	0,054	0,004	--
	p	0,414	0,583	0,847	0,988	0,504

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Die folgenden Abbildungen dienen der graphischen Darstellung und Veranschaulichung von bestehenden Zusammenhängen im Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv zwischen den oxidativen bzw. antioxidativen Parametern des Seminalplasmas und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen.

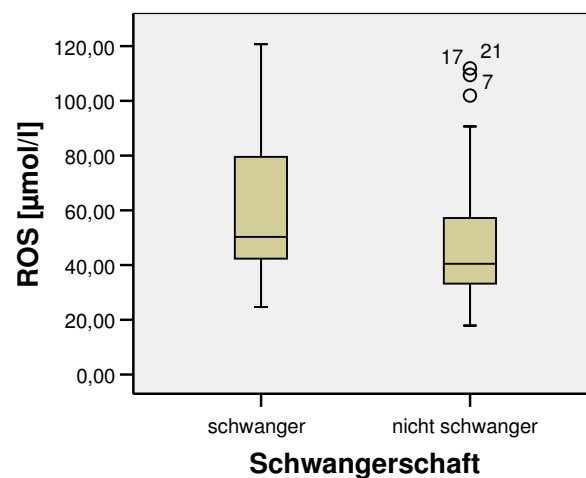


Abbildung 4-13: Boxplotdarstellung der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29)

Abbildung 4-14 stellt die bereits beschriebene in allen drei Kollektiven signifikante positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Befruchtungsrate dar.

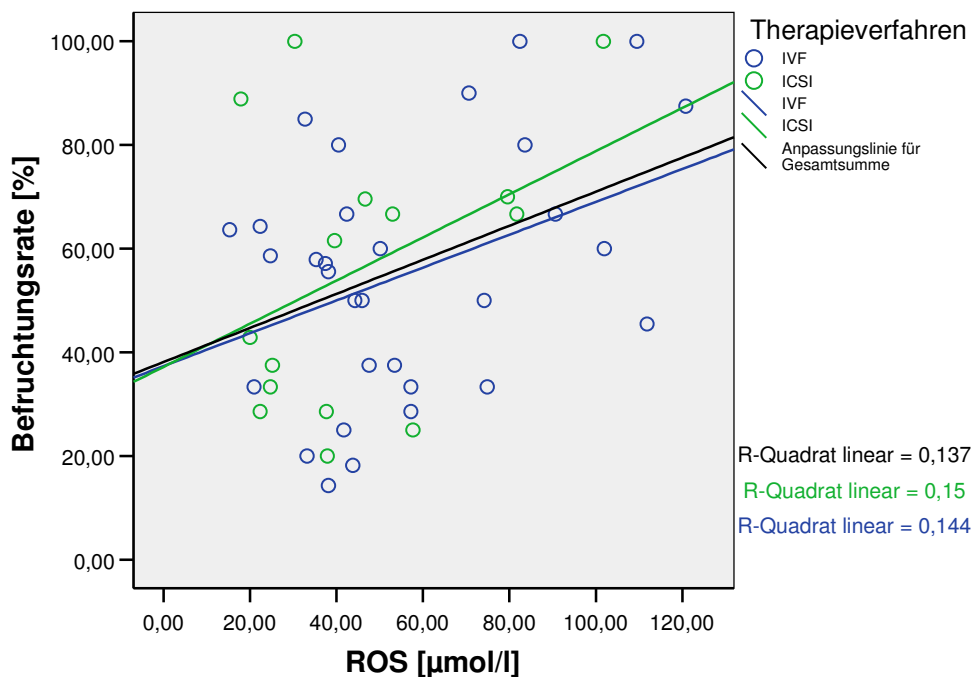


Abbildung 4-14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

Die gruppierte Boxplotdarstellung in Abbildung 4-15 zeigt ebenfalls eine etwas höhere ROS-Konzentration bei den Männern, deren Frauen schwanger geworden sind. Im Hinblick auf das jeweils angewandte Therapieverfahren weisen die Patienten, deren Frauen unter der ICSI-Behandlung nicht schwanger geworden sind, die im Durchschnitt niedrigste ROS-Konzentration auf.

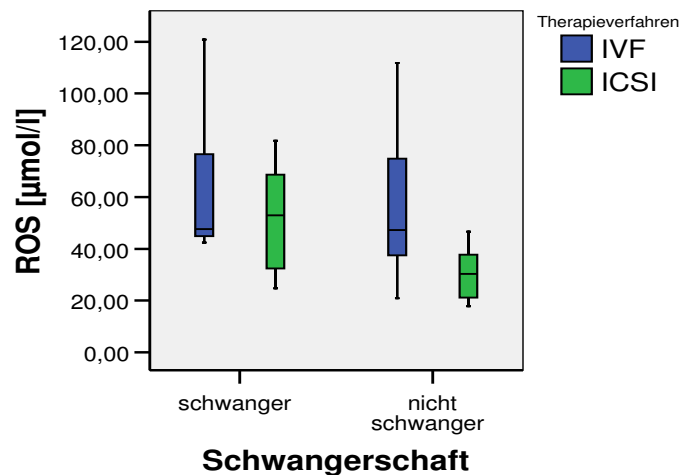


Abbildung 4-15: Boxplotdarstellung der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29) gruppiert nach Therapieverfahren (IVF: schwanger n=7, nicht schwanger n=22; ICSI: schwanger n=7, nicht schwanger n=7)

Zwischen der TAS-Konzentration und der Befruchtungsrates lässt sich lediglich im ICSI-Kollektiv eine leichte (nicht signifikante) positive Korrelation erkennen (Abbildung 4-16).

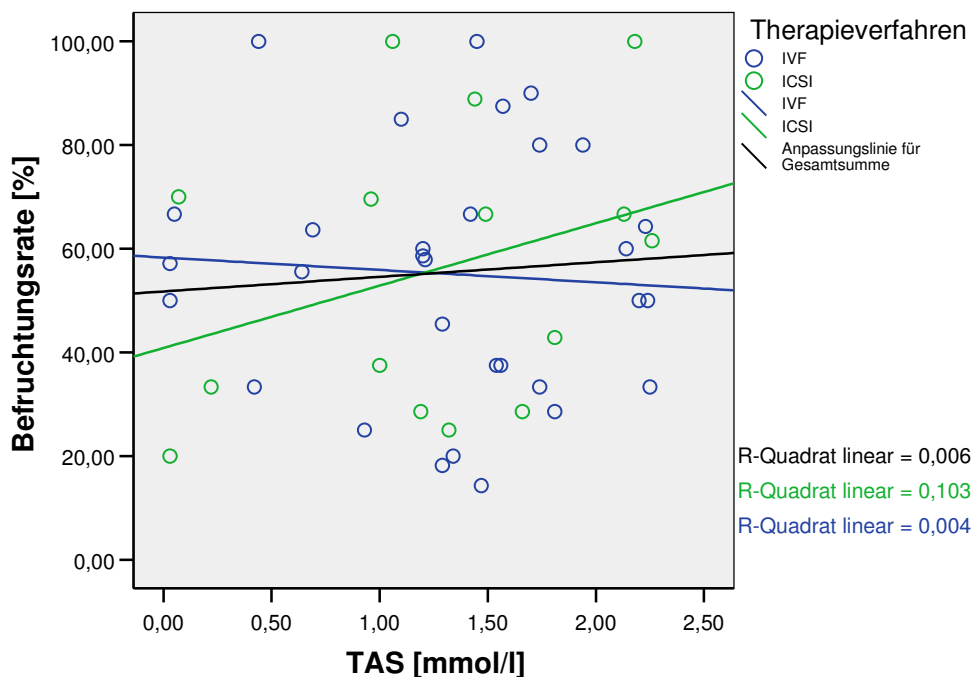


Abbildung 4-16: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrates und der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

Die Abbildungen 4–17 und 4–18 liefern im Vergleich der Schwangeren mit den Nicht-Schwangeren für die TAS-Konzentration keine signifikanten Unterschiede. Für die Patientenpaare, bei denen unter IVF-Therapie eine Schwangerschaft eingetreten ist, zeigt sich in

Abbildung 4-18 verglichen mit den übrigen Paaren eine im Durchschnitt etwas höhere TAS-Konzentration.

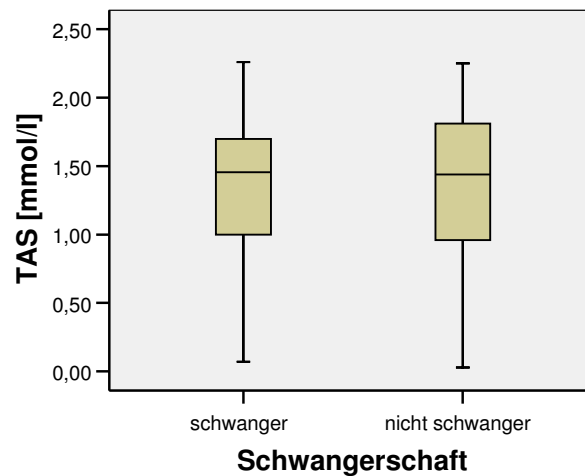


Abbildung 4-17: Boxplotdarstellung der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29)

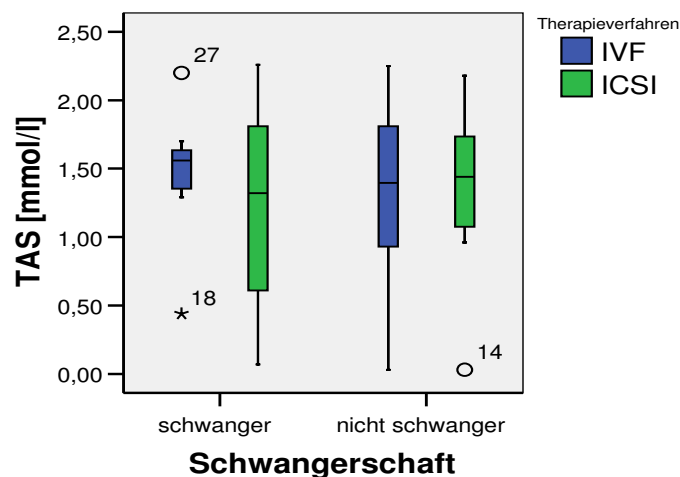


Abbildung 4-18: Boxplotdarstellung der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29) gruppiert nach Therapieverfahren (IVF: schwanger n=7, nicht schwanger n=22; ICSI: schwanger n=7, nicht schwanger n=7)

Zwischen dem in Abbildung 4-19 dargestellten ROS/TAS-Quotienten und der Befruchtungsrates lässt sich für das IVF-Kollektiv eine sehr geringe positive Korrelation beobachten, während im ICSI-Kollektiv eine deutliche negative Korrelation zu erkennen ist. Dieses Ergebnis führt zur Relativierung der in allen drei Kollektiven signifikanten positiven Korrelation zwischen der alleinigen ROS-Konzentration und der Befruchtungsrates (Abbildung 4-14).



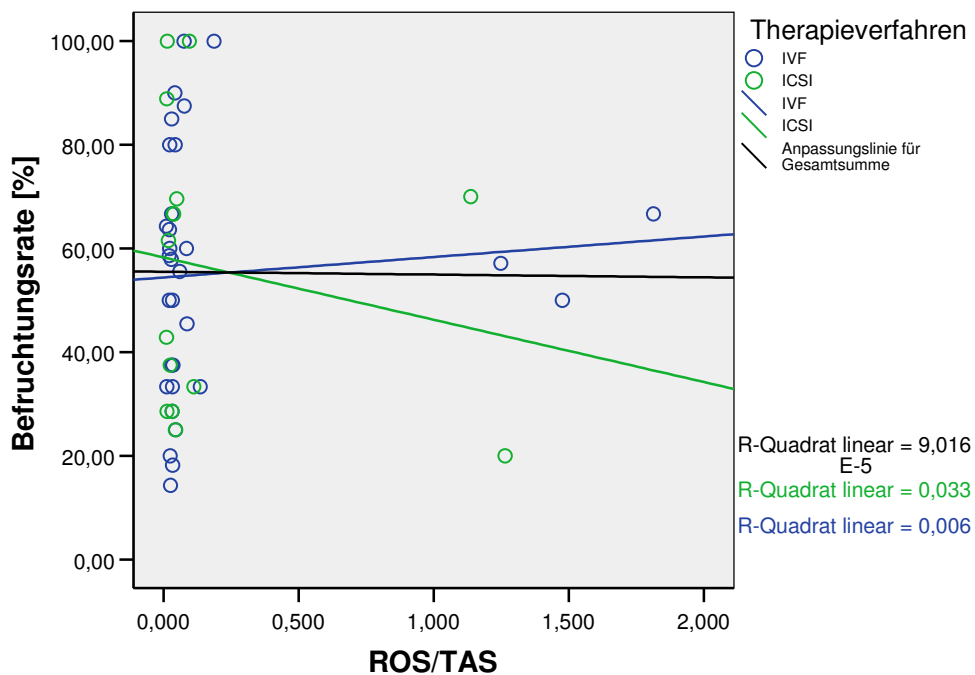


Abbildung 4-19: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und dem ROS/TAS-Quotienten im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv

Die einfache Boxplotdarstellung des ROS/TAS-Quotienten im Vergleich zwischen den Schwangeren und Nicht-Schwangeren (Abbildung 4-20) liefert keinen signifikanten Unterschied. Lediglich die dargestellten „Ausreißer“ erreichen in der Gruppe der Nicht-Schwangeren die höheren Werte.

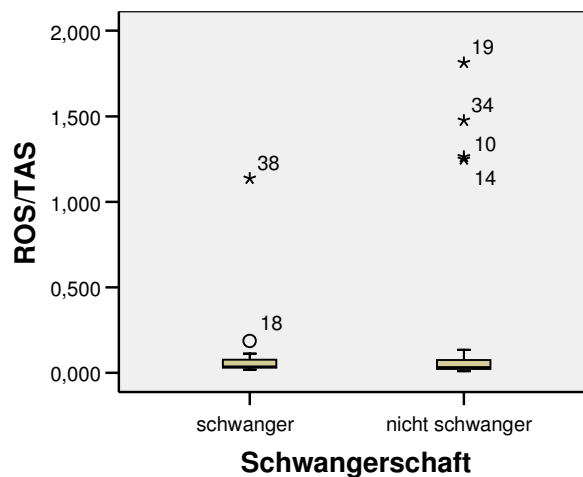


Abbildung 4-20: Boxplotdarstellung des ROS/TAS-Quotienten im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29)

Die nach dem jeweiligen Therapieverfahren gruppierte Abbildung 4-21 zeigt für die Nicht-Schwangeren eine etwas höhere GPX-Aktivität, wobei diese in der IVF-Gruppe nochmals etwas höher liegt als in der ICSI-Gruppe.

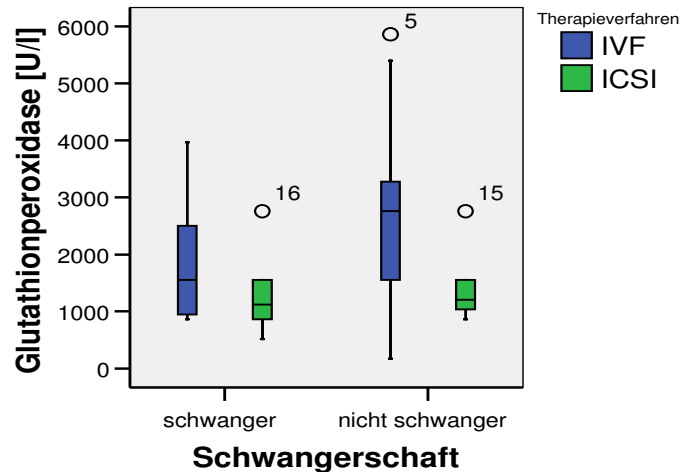


Abbildung 4-21: Boxplotdarstellung der Glutathionperoxidaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29) gruppiert nach Therapieverfahren (IVF: schwanger n=7, nicht schwanger n=22; ICSI: schwanger n=7, nicht schwanger n=7)

Die Enzymaktivitäten der Glutathionreduktase (Abbildung 4-22) und der Superoxiddismutase (Abbildung 4-23) weisen im Vergleich der Schwangeren mit den Nicht-Schwangeren sowie auch zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv keine richtungweisenden Unterschiede auf.

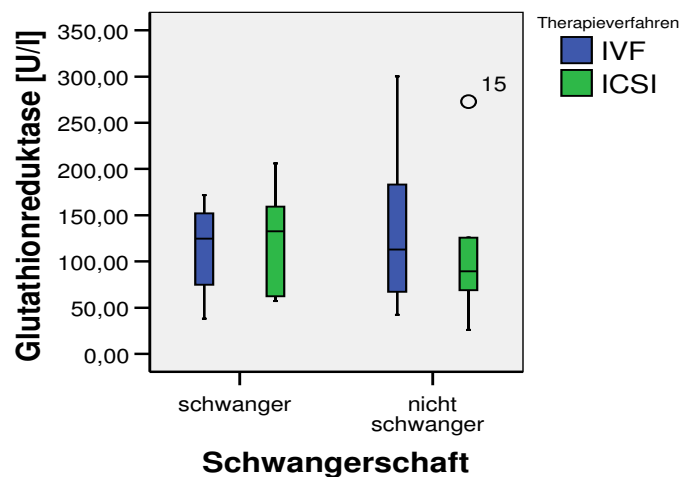


Abbildung 4-22: Boxplotdarstellung der Glutathionreduktaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29) gruppiert nach Therapieverfahren (IVF: schwanger n=7, nicht schwanger n=22; ICSI: schwanger n=7, nicht schwanger n=7)

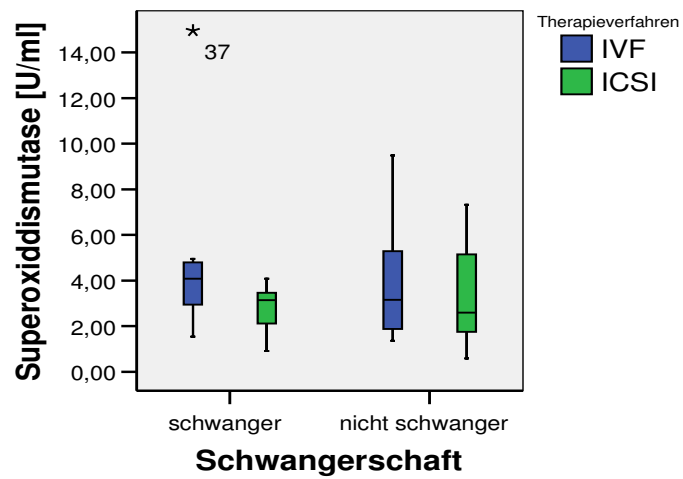


Abbildung 4-23: Boxplotdarstellung der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren (n=14) und Nicht-Schwangeren (n=29) gruppiert nach Therapieverfahren (IVF: schwanger n=7, nicht schwanger n=22; ICSI: schwanger n=7, nicht schwanger n=7)



## 5 Diskussion

Die nachfolgende Diskussion wird aufgrund der Vielzahl und der Komplexität der Daten und gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zur strukturierten Darstellung analog zur bisherigen Systematik nochmals untergliedert. Dabei werden zunächst wieder die SpermioGrammparameter, dann die Parameter zur DNA-Integrität und zuletzt die Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma betrachtet.

Entsprechend der unter 2.3 formulierten Eigenen Fragestellung der Arbeit werden die einzelnen Parameter sowohl im Hinblick auf ihre gegenseitige Beeinflussung, im Bezug auf die Fertilisations- und Schwangerschaftsresultate als auch im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Therapiegruppe beurteilt und diskutiert. Die Diskussion beinhaltet den Vergleich der eigenen Daten mit Erkenntnissen aus anderen bereits veröffentlichten Untersuchungen und Studien.

### 5.1 SpermioGrammparameter

Die in dieser Arbeit untersuchten Ejakulatproben zeigen im Hinblick auf die unter 4.1.1 dargestellten SpermioGrammparameter vor allem für die Motilität, die Vitalität und die normale Morphologie der Spermien deutlich reduzierte, von der von der WHO definierten Norm abweichende Werte. Wie bei Betrachtung der Indikationsstellung einer Therapie mit ICSI zu erwarten, ergeben sich auch für das ICSI-Patientenkollektiv der vorliegenden Studie signifikant schlechtere Ergebnisse bei den SpermioGrammparametern im Vergleich zur IVF-Gruppe, insbesondere für die Parameter Dichte, Motilität, Vitalität und Morphologie.

Aus den unter 4.5 dargestellten Korrelationen lassen sich keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen den einzelnen SpermioGrammparametern und den Fertilisations- und Schwangerschaftsresultaten erkennen. Lediglich im IVF-Kollektiv zeigen sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Dichte und der Befruchtungsrate ( $p=0,008$ ) sowie eine signifikant höhere Vitalität bei den Männern, deren Frauen schwanger geworden sind ( $p=0,009$ ). Die Tendenz, dass mit abnehmender Vitalität der Spermien auch die Befruchtungsrate geringer wird, ist in allen Kollektiven (Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv) erkennbar.

Auch in der Literatur herrscht dementsprechend Konsens darüber, dass die StandardspermioGrammparameter insgesamt ungeeignet sind, eine erfolgreiche Schwangerschaft nach IVF oder ICSI vorherzusagen [Nagy, 1995; Novero, 1997; Paasch, 2007].

## 5.2 DNA-Integrität

An der Entstehung von DNA-Fragmentationen, d.h. von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA und damit von Störungen der DNA-Integrität können zahlreiche Faktoren und Prozesse beteiligt sein, deren genaue Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind und die letztlich zu den mit den unterschiedlichsten Methoden nachweisbaren DNA-Fragmentationen in ejakulierten Spermatozoen führen. Die Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, dessen Ablauf von chromosomalen Anomalien, Veränderungen auf DNA-Ebene und äußeren Einflüssen gestört werden kann [Seli, 2005]. Intratestikulär kann es bis zur finalen Chromatinkondensation zu DNA-Fragmentationen kommen [Sailer, 1995] mit dem Ergebnis einer DNA-Struktur, die nicht zur Entwicklung gesunden neuen Lebens führt [Evenson, 2002]. Verschiedene Studien weisen sogar daraufhin, dass selbst nach erfolgreichem Abschluss der Chromatinkondensation noch DNA-Fragmentierungen durch freie Sauerstoffradikale [Aitken, 1998] oder apoptotische Prozesse [Gorczyca, 1993b] möglich sind. [Paasch, 2007]

Laut Paasch et al. werden derzeit drei Theorien zur Entstehung der DNA-Fragmentation favorisiert: Defekte in der Chromatinkondensation, Apoptose und oxidativer Stress [Paasch, 2007]. Alvarez geht davon aus, dass posttestikulär zusätzliche Schäden verursacht werden können durch reaktive Sauerstoffspezies, die Reaktivierung von Caspasen, Radio- und Chemotherapie sowie durch Lifestyle-Faktoren wie Rauchen, Adipositas, Haschisch- und Medikamentenkonsum und durch chronische Wärmeapplikation [Alvarez, 2005].

Den vielfältigen Bestimmungsmöglichkeiten der DNA-Fragmentation bzw. der DNA-Integrität ist nach einer Studie von Chohan et al. gemeinsam, dass sie mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität an Spermatozoen DNA-Veränderungen nachweisen, die in Beziehung zur männlichen Fertilität stehen [Chohan, 2006].

Die unter 4.1.2 dargestellten Untersuchungen zur DNA-Integrität menschlicher Spermatozoen, die in der vorliegenden Dissertation mit Hilfe dreier Fluoreszenzfärbungen erfolgt sind, die im Einzelnen den Chromatinkondensationsstatus (CMA<sub>3</sub>-Färbung), die DNA-Denaturierung (AO-Färbung) und den Apoptosegrad der Spermatozoen-DNA (TUNEL-Test) abbilden, zeigen insgesamt einen im Durchschnitt eher geringen Schädigungsgrad an. So liegt der prozentuale Anteil an geschädigter Spermatozoen-DNA pro Ejakulat bei allen drei Nachweismethoden mit einer DNA-Schädigung < 20 %, bei der AO-Färbung sogar < 10 % deutlich unterhalb des von Evenson et al. postulierten Schwellenwertes von 30 % Spermien im Ejakulat mit fragmentierter DNA, oberhalb dessen die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt

einer Schwangerschaft auf natürlichem Wege progressiv abnehmen soll [Evenson, 1999]. Von einer normwertigen Ejakulatprobe kann nach Evenson et al. also ausgegangen werden, wenn nicht mehr als 30 % der Zellen fragmentierte DNA aufweisen [Evenson, 1999].

Der hier nachgewiesene relativ geringe Schädigungsgrad kann mangels fertiler Kontrollgruppe allerdings nicht in direktem Vergleich zu zahlreichen anderen Studien gesehen werden, die unter Anwendung nahezu aller verfügbaren Testmethoden gezeigt haben, dass Infertilitätspatienten jeweils höhere Raten fragmentierter DNA aufweisen [Paasch, 2007]. Baccetti et al. finden unter Verwendung des TUNEL-Tests beispielsweise eine stufenweise Zunahme von apoptotischen Spermien in unterschiedlichen Patientenkollektiven vor, beginnend mit gerade 0,1 % apoptotischen Zellen in einer fertilen Kontrollgruppe über Patienten mit Varikozelen oder Infektionen mit etwa 10 % apoptotischen Spermien, Patienten mit Kryptorchismus mit einer 20-prozentigen Apoptoserate bis hin zu Seminom-Patienten mit einer Apoptoserate von 50 % [Baccetti, 1996]. Ähnliche Ergebnisse liefern Gandini et al., die eine signifikant geringere Apoptoserate in den Ejakulaten gesunder Männer im Vergleich zu Patienten mit Oligoasthenoteratozoospermie, Morbus Hodgkin oder Hodenkrebs nachweisen [Gandini, 2000]. Mehrere Autoren postulieren zudem die DNA-Fragmentation als unabhängigen, mit den konventionellen Verfahren nicht zu detektierenden prädiktiven Parameter für die männliche Infertilität [Host, 1999a, b; Host, 2000; Saleh, 2002c; Sergerie, 2005].

Im Gegensatz dazu zeigt Lorenz in seiner Dissertation zum Thema Oxidantien, Antioxidantien und DNA-Integrität bei subfertilen Männern ebenfalls unter Verwendung der CMA<sub>3</sub>-, der AO- und der TUNEL-Färbung einen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit teilweise noch geringeren Schädigungsgrad der DNA-Integrität auf. So liegt die von Lorenz beobachtete Apoptoserate nach Anwendung des TUNEL-Tests nur bei etwa 5 %. [Lorenz, 2005]

Die Gegenüberstellung von IVF- und ICSI-Therapiegruppe liefert wiederum für die Männer der Patientinnen, die mittels ICSI behandelt wurden, in allen drei Färbungen die höheren prozentualen DNA-Schädigungen, signifikant jedoch nur in der CMA<sub>3</sub>-Färbung ( $p=0,028$ ).

Bei Betrachtung der unter 4.2 aufgeführten Korrelationen zwischen der DNA-Integrität und den SpermioGrammparametern wird insgesamt deutlich, dass eine hohe DNA-Integrität bzw. geringe DNA-Schädigungen mit normwertigen bzw. sich den Normalwerten der WHO annähernden SpermioGrammparametern verbunden sind. Statistisch signifikant stellt sich dieser Zusammenhang vor allem in der CMA<sub>3</sub>-Färbung für die Dichte, die Motilität und die Vitalität dar. Unter Verwendung des TUNEL-Tests zeigt sich lediglich für die Dichte ein signifikanter Zusammenhang, während in der AO-Färbung keinerlei Signifikanzen im

Gesamtpatientenkollektiv erkennbar sind. Betrachtet man die einzelnen Kollektive getrennt voneinander, so bestehen im IVF-Kollektiv signifikante Zusammenhänge zwischen der Chromatindekondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der Dichte sowie der Motilität. Zudem ergibt sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der DNA-Denaturierung in der AO-Färbung und dem pH-Wert. Weit weniger eindeutig stellen sich die Korrelationen im ICSI-Kollektiv dar, welche lediglich zwischen den DNA-Schädigungen in der CMA<sub>3</sub>- und in der AO-Färbung und der Vitalität signifikant sind, jedoch in ihrem Vorzeichen von dem im Gesamt- und IVF-Kollektiv abweichen.

Die hier beobachteten allgemeinen Zusammenhänge entsprechen der überwiegenden Literaturmeinung, nach der die Frequenz von DNA-Fragmentationen positiv mit der Verschlechterung der klassischen SpermioGrammparameter korreliert ist [Lopes, 1998a; Paasch, 2007]. Verschiedene Studien liefern den Nachweis, dass Spermatozoen aus Ejakulaten mit subnormaler Konzentration, Motilität oder Morphologie jeweils erhöhte Raten fragmentierter DNA besitzen [Kodama, 1997; Shen, 1999; Irvine, 2000; Tomlinson, 2001; Saleh, 2003]. Zini et al. weisen in Ejakulat-Untersuchungen infertiler Männer für die denaturierte DNA den geringsten Variationskoeffizienten, gefolgt von der Motilität und der Konzentration der Spermatozoen, nach [Zini, 2001]. Die häufig beschriebenen Zusammenhänge zwischen der DNA-Integrität und der Morphologie [Sterzik, 1989; Claassens, 1992; Duran, 1998; Tesarik, 1998; Host, 1999b; Shen, 1999; Esterhuizen, 2000; Molina, 2001; Irvine, 2000; Sakkas, 2002; Shen, 2002; Zini, 2002; Saleh, 2003] können in der vorliegenden Studie mit keiner der verwendeten Nachweismethoden signifikant bestätigt werden.

Betrachtet man die verschiedenen Färbemethoden getrennt voneinander, so zeigen sich die meisten Signifikanzen in der CMA<sub>3</sub>-Färbung, gefolgt vom TUNEL-Test, wobei vor allem für die Dichte, gefolgt von der Motilität und der Vitalität signifikante positive Korrelationen zur DNA-Integrität auffallen. Unter Verwendung der AO-Färbung ergeben sich im Gesamtkollektiv keine signifikanten Zusammenhänge mit den SpermioGrammparametern.

Diese weniger eindeutigen Ergebnisse in der AO-Färbung stehen im Gegensatz zu zahlreichen früheren Untersuchungen, die mit Hilfe der Acridine Orange Färbung signifikante Korrelationen vor allem zur Spermienmorphologie, zur Motilität und auch zur Dichte aufzeigen [Sterzik, 1989; Claassens, 1992; Angelopoulos, 1998; Duran, 1998; Zini, 2002]. Entsprechend den hier gezeigten Ergebnissen und entgegen den beschriebenen Untersuchungen sehen Hoshi et al. sowie Eggert-Kruse et al. keinen Zusammenhang zwischen der in der AO-Färbung dargestellten DNA-Denaturierung und den SpermioGrammparametern [Eggert-



Kruse, 1996; Hoshi, 1996]. Eggert-Kruse et al. stellen die AO-Färbung zudem als klinisch nicht brauchbaren Test zum Infertilitätsscreening heraus [Eggert-Kruse, 1996].

Außer für die Morphologie entsprechen die in dieser Arbeit unter Verwendung der CMA<sub>3</sub>-Färbung erzielten Ergebnisse im Wesentlichen den Studien von Lorenz, Molina und Tomlinson et al., die ebenfalls mittels CMA<sub>3</sub>-Färbung signifikante positive Zusammenhänge zwischen der DNA-Integrität und den Spermioigrammparametern Dichte, Motilität, Vitalität und Morphologie nachweisen [Molina, 2001; Tomlinson, 2001; Lorenz, 2005]. Spano sowie Hashimoto et al. sehen dagegen keinen Zusammenhang zwischen dem Chromatinkondensationsstatus und den klassischen Spermioigrammparametern [Spano, 2000; Hashimoto, 2003]. Die im TUNEL-Test nachweisbaren signifikanten negativen Korrelationen zwischen einer erhöhten Apoptoserate und insbesondere der Dichte werden von Sun, Oosterhuis sowie von Sakkas et al. in ihren Untersuchungen bestätigt [Sun, 1997; Oosterhuis, 2000; Sakkas, 2002]. Des Weiteren zeigen mehrere Autoren signifikante Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Apoptoserate und anderen Spermioigrammparametern wie der Motilität [Sun, 1997; Shen, 2002; Piasecka, 2003] oder der Morphologie [Tesarik, 1998; Host, 1999b; Sakkas, 2002; Shen, 2002]. Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von Ricci und Carrell et al., die keinerlei Zusammenhänge zwischen der Apoptoserate und den Spermioigrammparametern aufzeigen [Ricci, 2002; Carrell, 2003]. Carrell et al. beschreiben allerdings eine Verbindung zwischen erhöhten Apoptoseraten und ungeklärten Abort-Fällen [Carrell, 2003].

Die unter 4.4 dargestellten Untersuchungen zu bestehenden Zusammenhängen zwischen der DNA-Integrität und den in dieser Arbeit bestimmten oxidativen und antioxidativen Parametern liefern außer der in fast allen Kollektiven signifikanten negativen Korrelation zwischen der Chromatinkondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der ROS-Konzentration sowie der in allen Kollektiven negativen, in der ICSI-Gruppe auch signifikanten Korrelation zwischen der Chromatinkondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der SOD-Aktivität sonst keine eindeutigen Ergebnisse. Im ICSI-Kollektiv finden sich zudem zwei weitere signifikante positive Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration sowie der GPX-Aktivität und der DNA-Denaturierung in der AO-Färbung, die in den beiden anderen Kollektiven allerdings nicht signifikanten negativen Korrelationen entsprechen. Nähere Erläuterungen hierzu finden sich im Abschnitt 5.3.

Vergleicht man schließlich die Ergebnisse der DNA-Integrität mit den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (siehe 4.6), so ist festzustellen, dass zwischen den Patientenpaaren, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denen, die im Hinblick auf eine

Schwangerschaft nicht erfolgreich waren, in allen Kollektiven keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der durch die verschiedenen Färbungen nachgewiesenen Schädigungen der DNA-Integrität bestehen. Die Befruchtungsrate zeigt jedoch in allen Kollektiven eine deutliche, wenn auch nur im IVF-Kollektiv bezüglich der CMA<sub>3</sub>-Färbung signifikante Tendenz dahingegen, dass mit zunehmendem Schädigungsgrad der DNA-Integrität unabhängig von der jeweils verwendeten Nachweismethode die Befruchtungsrate abnimmt.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, existieren zum Thema der DNA-Integrität von Spermatozoen zahlreiche Untersuchungen und Studien, darunter einige aktuelle Übersichtsarbeiten [Agarwal, 2005; O'Brien, 2005; Seli, 2005; Spano, 2005; Erenpreiss, 2006], die beinahe alle zur Erkenntnis gelangen, dass Schädigungen der DNA-Integrität das männliche Fertilitätspotential beeinträchtigen. Im Hinblick auf den Vorhersagewert der DNA-Integrität für den Erfolg einer Therapie mit IVF oder ICSI herrscht allerdings nicht zuletzt aufgrund der Vielfalt der verwendeten Testmethoden und damit auch aufgrund der schlechten direkten Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse Uneinigkeit unter den Autoren [Zhongxiang, 2006]. So gelangen einige Forscher in ihren Arbeiten zu dem sich ebenfalls in der vorliegenden Dissertation präsentierenden Ergebnis, dass die DNA-Integrität unter Anwendung verschiedener Nachweisverfahren keinen Einfluss auf den Eintritt einer Schwangerschaft nach IVF und/oder ICSI hat [Gandini, 2004; Seli, 2004; Huang, 2005; Hammadeh, 2006; Zhongxiang, 2006].

Zhongxiang et al. zeigen in ihrer Metaanalyse, dass die DNA-Fragmentation der Spermatozoen unter Verwendung des TUNEL-Tests zwar signifikant negativ mit der klinischen Schwangerschaftsrate nach IVF korreliert, sie aber keinen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate nach ICSI sowie auf die Fertilisationsraten nach IVF und ICSI hat; unter Verwendung des SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) Tests, einer Nachweismethode, die die Suszeptibilität von Spermatozoen gegenüber einer Säuredenaturierung der DNA in situ nach Färbung mit Acridine Orange erfasst, ergeben sich weder nach IVF noch nach ICSI signifikante Zusammenhänge zwischen der DNA-Fragmentation und der klinischen Schwangerschaftsrate [Zhongxiang, 2006]. Hammadeh et al. sehen ebenfalls unter Verwendung des TUNEL-Tests sowie der CMA<sub>3</sub>-Färbung keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Integrität zwischen den Patientenpaaren, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denen, die nicht erfolgreich waren [Hammadeh, 2006].

Im Gegensatz dazu stehen die Resultate zahlreicher anderer Studien, die unter Verwendung des TUNEL-Tests, der CMA<sub>3</sub>- und der AO-Färbung, des SCSA-Tests sowie einiger anderer Nachweismethoden sehr wohl einen Zusammenhang zwischen der DNA-Integrität und der

klinischen Schwangerschaftsrate nach IVF- oder ICSI-Therapie im Sinne einer signifikanten Abnahme der Schwangerschaftsrate bei Patienten mit einem hohen Grad an DNA-geschädigten Spermien sehen [Larson, 2000; Tomlinson, 2001; Benchaib, 2003; Henkel, 2003; Larson-Cook, 2003; Razavi, 2003; Henkel, 2004]. Evenson et al. sind beispielsweise der Meinung, dass mittels Acridine Orange angefärbte Spermatozoen mit nachweislich denaturierter DNA im SCSA-Test den besten Vorhersagewert für das Scheitern einer Schwangerschaft darstellen [Evenson, 1999]. Razavi et al. ziehen dagegen die CMA<sub>3</sub>-Färbung als guten prädiktiven Parameter für den Erfolg einer ICSI-Therapie vor [Razavi, 2003]. Die meisten der oben genannten Autoren bevorzugen allerdings zum Nachweis der DNA-Fragmentation den TUNEL- oder den SCSA-Test. So hat man in einer Kohortenstudie mit Hilfe des TUNEL-Tests ermittelt, dass für eine erfolgreiche Schwangerschaft – hier nach intrauteriner Insemination – die Fragmentationsrate im Mittel unter 7,3 % liegen muss, während bei Fragmentationsraten größer 12 % keine Schwangerschaft eintritt; mit steigenden Fragmentationsraten werden zudem Fehlgeburten häufiger [Duran, 2002]. Greco et al. sehen den klinischen Wert des TUNEL-Tests darin widerspiegelt, dass in ihrer Studie von 2005 bei ICSI-Paaren unter Verwendung von Spermatozoen mit > 15 % TUNEL-Positivität eine 5,6-prozentige Schwangerschaftsrate gemessen wurde, bei den gleichen Paaren in der Wiederholung der ICSI im Falle eines positiven TUNEL-Tests von < 6 % die Schwangerschaftsrate aber auf 44,4 % stieg [Greco, 2005]. Nach Stahl et al. besteht zudem eine gute Vergleichbarkeit des TUNEL-Tests zum ebenfalls häufig angewandten SCSA-Test [Stahl, 2006].

Im Rahmen ihrer Arbeit von 1999, in der Ahmadi et al. eigentlich das Ziel verfolgten, den Zusammenhang zwischen DNA-geschädigten Spermatozoen und verminderter Fertilität aufzuzeigen und deshalb die Spermatozoen-DNA bewusst durch Bestrahlung vorschädigten, fanden sie im Hinblick auf die Fertilisationsraten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mit nicht geschädigter Spermatozoen-DNA, wohl aber bezüglich der Embryonalentwicklung, die bei den mit vorgeschädigter Spermatozoen-DNA fertilisierten Eizellen gestört war und zu einer erhöhten Rate an frühen Aborten geführt hat. Die Folgerung der Autoren aus dieser Beobachtung zielt darauf ab, dass die Oozyte wohl in der Lage sein muss, einen Teil der DNA-Schäden zu reparieren; wenn diese Schäden allerdings zu groß sind, resultiert nach Meinung der Forscher ein Abort. [Ahmadi, 1999]

Diese Auffassung, dass das Vorliegen von DNA-Fragmentationen nicht das Ausbleiben von Fertilisation und die Ausbildung von Vorkernstadien bedeutet, wohl aber mit einer verminderten Schwangerschaftsrate und einer erhöhten Rate an frühen Aborten einhergehen kann, teilen auch mehrere andere Forscher [Jurisicova, 1996; Twigg, 1998a; Henkel, 2003; Henkel,

2004]. Henkel et al. stellen in ihren Studien einen klaren Zusammenhang zwischen der Apoptose- und der Schwangerschaftsrate sowohl nach IVF- als auch nach ICSI-Therapie heraus, während sich zwischen Apoptose- und Fertilisationsrate kein Zusammenhang erkennen lässt [Henkel, 2003; Henkel, 2004]. Die Erkenntnis, dass erhöhte DNA-Fragmentationsraten zu einer Verminderung der Schwangerschaftsrate, nicht aber der Befruchtungsrate führen, erklären sich die Autoren in Anlehnung an die von Ahmadi et al. formulierte Theorie des Reparaturpotentials der Oozyten [Ahmadi, 1999] damit, dass die Spermatozoen trotz erhöhter DNA-Schädigungen weiterhin in der Lage sein müssen, die Eizellen zu befruchten, dass jedoch für die weitere Embryonalentwicklung die Schäden letztlich doch zu gravierend sind und es zum Schwangerschaftsmisserfolg kommt.

Nach Sakkas und Shoukir et al. wird die Embryonalentwicklung durch Schäden der paternalen Spermatozoen-DNA unmittelbar beeinflusst bis zur Blastozyste [Sakkas, 1998; Shoukir, 1998]. Auch Gardiner-Garden ist der Ansicht, dass die im Ejakulat messbare DNA-Fragmentationsrate negativ mit der weiteren Embryonalentwicklung nach IVF und ICSI korreliert [Gardiner-Garden, 1999]. Untersuchungen zufolge wird die an Histone gebundene DNA des männlichen Pronukleus während der frühen Embryonalentwicklung aktiv abgelesen [Haaf, 1995]. Infolge ausgeprägter Störungen kann es dabei zum frühen Tod des Embryos kommen [Sakkas, 1998].

In der vorliegenden Studie kann die oben beschriebene Beziehung zwischen DNA-Fragmentation, Schwangerschafts- und Befruchtungsrate nicht bestätigt werden; es besteht vielmehr ein umgekehrter Zusammenhang derart, dass die DNA-Fragmentation keinen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate hat, wohl aber eine deutliche Tendenz zu einer geringeren Befruchtungsrate zeigt. Von dieser negativen Korrelation zwischen der DNA-Fragmentation und der Fertilisationsrate berichten auch einige andere Autoren in ihren Studien [Sun, 1997; Lopes, 1998a, b; Host, 2000; Huang, 2005; Hammadeh, 2006; Zhongxiang, 2006], während wieder andere Untersuchungen die These von Henkel et al., nach der sich Schädigungen der Spermien-DNA nicht negativ auf die Fertilisationsrate auswirken, bestätigen [Ahmadi, 1999; Tomlinson, 2001; Morris, 2002; Tesarik, 2002; Henkel, 2003; Henkel, 2004].

Ein möglicher Grund dafür, dass sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen den Schädigungen der DNA-Integrität und der Schwangerschaftsrate – weder nach IVF- noch nach ICSI-Therapie – zeigt, kann der insgesamt eher geringe DNA-Schädigungsgrad der untersuchten Ejakulatproben sein. Unter Annahme der These des Oozytenreparaturpotentials wären die Eizellen in den untersuchten Fällen aufgrund der geringen Schädigungen

gerade noch in der Lage, auch in der weiteren Embryonalentwicklung die paternalen DNA-Schäden auszugleichen, so dass diese letztlich kein Hindernis mehr für eine ungestörte Embryonalentwicklung darstellen und damit auch keinen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate ausüben würden. Ungeklärt bleibt weiterhin die negative Korrelation zwischen der DNA-Fragmentation und der Fertilisationsrate, die sich nur im IVF-Kollektiv signifikant darstellt.

Die Untersuchungen zur DNA-Integrität im Rahmen der vorliegenden Dissertation lassen schließlich noch einige Fragen offen, zu deren endgültigen Klärung noch weitere Studien notwendig sind.

Der Nachweis des insgesamt eher geringen Schädigungsgrades der DNA-Integrität bei den untersuchten Ejakulatproben der subfertilen Patienten dieser Studie kann die vielzitierte Behauptung der DNA-Fragmentation als überzeugenden prädiktiven Parameter für die männliche Infertilität nicht bestätigen. Die CMA<sub>3</sub>-Färbung als Nachweisverfahren der DNA-Integrität zeigt unter den verwendeten Färbemethoden die meisten signifikanten Zusammenhänge an, gefolgt vom TUNEL-Test und der AO-Färbung. Die der überwiegenden Literaturmeinung entsprechende positive Korrelation der DNA-Integrität mit normwertigen Spermioogrammparametern lässt sich vor allem für die Parameter Dichte, Motilität und Vitalität, nicht jedoch für die in zahlreichen Studien bestätigte Morphologie nachweisen. Weiterhin ist zu bemerken, dass die Ergebnisse für das ICSI-Therapiekollektiv insgesamt weniger eindeutig sind als dies für das IVF-Kollektiv der Fall ist, was möglicherweise in dem geringeren Stichprobenumfang (n=15) begründet liegt. Bei der Betrachtung der Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnisse nach IVF und ICSI lässt sich im Bezug auf die DNA-Integrität vor allem im Vergleich mit der zu diesem Thema veröffentlichten und teilweise widersprüchlichen Literatur keine klare Tendenz erkennen.

Die Beziehung der DNA-Integrität zu den in dieser Arbeit zusätzlich bestimmten oxidativen und antioxidativen Parametern wird im folgenden Abschnitt näher beleuchtet.

### **5.3 Oxidantien und Antioxidantien im Seminalplasma**

Die unter dem Begriff der Oxidantien zusammengefassten reaktiven Sauerstoffspezies oder reactive oxygen species, im Folgenden mit der Abkürzung ROS bezeichnet, sind – wie in der Einleitung bereits beschrieben – in geringen Konzentrationen für eine normale Spermatozoenfunktion von Bedeutung und werden unter anderem von diesen auch selbst gebildet [De Iulii, 2006]. Bei Überschreiten der noch nicht näher charakterisierten physiologischen

Konzentrationen kann jedoch eine Gefährdung des Spermiums resultieren [Saleh, 2002a]. Padron et al. haben in 25 bis 40 % der Ejakulate von Infertilitätspatienten ROS in hoher Ausprägung gefunden [Padron, 1997]. Dieses Ergebnis wird von anderen Autoren bestätigt [Iwasaki, 1992; Henkel, 1997; Mohammad Reza Moein, 2007].

Der für die Zellen gefährliche oxidative Stress entsteht im Falle einer Dysbalance von ROS-Produktion und der Absorptionskapazität der Antioxidantien [Sikka, 2001]. Die DNA-Basenpaare und das Phosphodiester-Gerüst sowie auch die Plasmamembranen der Spermatozoen mit ihrem hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind außerordentlich anfällig für eine Oxidation durch ROS [Paasch, 2007]. Da es dem relativ kleinen Zytoplasmavolumen der Spermatozoen an antioxidativen Substanzen für eine ausreichende Protektion mangelt [Sharma, 1996], spielt das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Seminalplasma als antioxidatives Schutzmilieu der Spermatozoen eine wichtige Rolle [Ochsendorf, 1999; Garrido, 2004]. In diesem Zusammenhang ist es also von großer Bedeutung, neben der oxidativen Komponente zusätzlich die antioxidative Situation einer Ejakulatprobe, welche in ihrer Gesamtheit vom Totalen Antioxidantienstatus (TAS) erfasst wird, zu untersuchen.

Da im Rahmen dieser Dissertation nicht mit Referenzwerten einer gesunden Vergleichsgruppe gearbeitet wird, die jedoch als essentieller Bestandteil in die Berechnung des von Sharma et al. beschriebenen ROS-TAS-Scores [Sharma, 1999] eingehen, kann dieser hier nicht berücksichtigt werden. Um dennoch eine bessere Darstellung des Verhältnisses zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu erhalten, wird für jede Patientenprobe der Quotient aus in die gleiche Einheit umgerechneter ROS- und TAS-Konzentration gebildet, wobei ein Wert größer 1 ein Überwiegen der Oxidantien und eine Überforderung der antioxidativen Kapazität ausdrückt.

Die Absolutwerte der in dieser Arbeit ausschließlich im Seminalplasma bestimmten ROS sowie auch der verschiedenen Antioxidantien können aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit mit anderen Nachweisverfahren, welche beispielsweise ihr Ergebnis in einer anderen Einheit, nicht als Konzentration oder Enzymaktivität angeben, sowie aufgrund der Tatsache, dass keine gesunde Kontrollgruppe zum Vergleich herangezogen wird, schwerlich mit Normalwerten verglichen werden.

### 5.3.1 Reactive Oxygen Species (ROS)

Die in der vorliegenden Dissertation mit Hilfe einer kolorimetrischen Testmethode indirekt gemessenen ROS werden als Konzentration in  $\mu\text{mol/l}$  angegeben und zeigen im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Therapiekollektiv keine signifikanten Unterschiede (siehe 4.1.3). Auch der zusätzlich berechnete Quotient aus ROS- und TAS-Konzentration lässt keine Signifikanzen erkennen. Zu bemerken ist allerdings, dass die ROS-Konzentration in der IVF-Gruppe – wenn auch nicht signifikant – höher ist als in der ICSI-Gruppe ( $56,22 \pm 28,55 \mu\text{mol/l}$  versus  $45,07 \pm 25,37 \mu\text{mol/l}$ ), wobei der ROS/TAS-Quotient, welcher die tatsächlich resultierende oxidative Belastung besser widerspiegelt als die ROS- oder TAS-Konzentration alleine, in der ICSI-Gruppe im Vergleich zur IVF-Gruppe den höheren Wert erreicht.

In einer Studie von Hammadeh et al. zeigen sich unter Verwendung der auch in dieser Studie angewandten Nachweismethode insgesamt etwas höhere Werte für die ROS-Konzentration als in der vorliegenden Arbeit, wobei für das IVF-Kollektiv im Vergleich zur ICSI-Gruppe ebenfalls die (nicht signifikant) höheren Werte gemessen wurden ( $94,72 \pm 102,84 \mu\text{mol/l}$  versus  $54,78 \pm 39,83 \mu\text{mol/l}$ ) [Hammadeh, 2006]. Die Tatsache, dass der ROS/TAS-Quotient in der ICSI-Gruppe die höheren Werte erreicht und damit in diesem Kollektiv den höheren Grad an oxidativer Belastung anzeigt, entspricht den Ergebnissen für die DNA-Integrität sowie denen der SpermioGrammparameter, die ebenfalls in der ICSI-Gruppe etwas schlechter sind.

Bei der Betrachtung der unter 4.3 aufgeführten Zusammenhänge zwischen der ROS-Konzentration und den SpermioGrammparametern fällt vor allem die im Gesamt- sowie im IVF-Kollektiv hoch signifikante, im ICSI-Kollektiv stark signifikante negative Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert auf. Ochsendorf et al. geben in einer Arbeit von 1999 eine Übersicht der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies und ihrer Hauptreaktionen, bei denen als Reaktionsprodukte zum Teil freie  $\text{H}^+$ -Ionen entstehen [Ochsendorf, 1999]. Diese  $\text{H}^+$ -Ionen könnten eine Erklärung für die beobachtete Beziehung der ROS-Produktion zu einem niedrigeren pH-Wert liefern. Des Weiteren stellt sich ein deutlicher in wiederum allen Kollektiven negativer Zusammenhang zwischen den ROS und der normalen Morphologie dar, welcher im Gesamtkollektiv signifikant ( $p=0,017$ ) erscheint. Die nur für die IVF-Gruppe signifikante ( $p=0,021$ ) negative Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der Progressivmotilität zeigt sich ebenfalls (nicht signifikant) in den beiden anderen Kollektiven.

Für den ROS/TAS-Quotienten ergeben sich weniger eindeutige Ergebnisse außer der im Widerspruch zum Ergebnis der alleinigen ROS-Konzentration stehenden im Gesamt- und im IVF-Kollektiv signifikanten positiven Beziehung des Quotienten zur Progressivmotilität vor Aufbereitung. Bemerkenswert ist hierbei, dass zwischen dem ROS/TAS-Quotienten und der Progressivmotilität nach Aufbereitung in allen Kollektiven ein (nicht signifikantes) negatives Verhältnis besteht. Eine negative Signifikanz zeigt sich zwischen dem ROS/TAS-Quotienten und dem Volumen ( $p=0,025$ ) im IVF-Kollektiv.

Auch die unter 4.4 abgebildeten und bereits beschriebenen Ergebnisse der ROS-Konzentration in Beziehung zur DNA-Integrität (siehe 5.2) lassen auf keine eindeutigen Zusammenhänge schließen. Die signifikante negative Beziehung zwischen der ROS-Konzentration und der Chromatindekondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung lässt sich mit der bereits erwähnten physiologischen ROS-Konzentration, die für die normale Funktionstüchtigkeit eines Spermiums vorhanden sein muss, erklären [Agarwal, 2003b; De Iuliis, 2006]. Da in dieser Studie zudem kein Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe erfolgt, lässt sich auch nur schwerlich beurteilen, inwieweit die erhaltenen Messwerte für die ROS-Konzentration im Seminalplasma Normalwerten entsprechen. Die im ICSI-Kollektiv erkennbare signifikante positive Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und der DNA-Denaturierung in der AO-Färbung stellt sich in den beiden anderen Kollektiven als (nicht signifikante) negative Korrelation dar. Für den ROS/TAS-Quotienten lassen sich keinerlei signifikante Zusammenhänge oder eindeutige Tendenzen herausstellen.

Zur Frage, ob erhöhte ROS-Werte mit schlechten SpermioGrammparametern assoziiert sind, liefert die aktuelle Studienlage breite Zustimmung. Zahlreiche Studien und Untersuchungen weisen den negativen Einfluss einer hohen ROS-Konzentration auf die SpermioGrammparameter, vor allem auf die Motilität [Mortimer, 1991; Aitken, 1992; Agarwal, 1994; Ochsendorf, 1994; Gomez, 1998; Barroso, 2000; Pasqualotto, 2000; Gil-Guzman, 2001; Ollero, 2001; Shang, 2003; Lissak, 2004], die Spermienkonzentration [Aitken, 1992; Ochsendorf, 1994; Whittington, 1999; Zabludovsky, 1999; Pasqualotto, 2000; Lissak, 2004] und die Morphologie [Ochsendorf, 1994; Pasqualotto, 2000; Gil-Guzman, 2001; Ollero, 2001; Aziz, 2004; Mohammad Reza Moein, 2007] nach. Ochsendorf sowie Hammadeh et al. zeigen zudem einen negativen Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und der Membranintegrität im HOS-Test, was nicht erstaunlich ist, da ROS in erster Linie auf dem Wege der Lipidperoxidation die Spermatozoenmembran angreifen [Ochsendorf, 1994; Hammadeh, 2006].

Whittington et al. assoziieren erhöhte ROS-Werte im Seminalplasma mit verminderter Spermiedichte, sehen allerdings keinen Zusammenhang zur Motilität [Whittington, 1999].



Auch Twigg und Hammadah et al. finden keine Veränderungen der Spermienmotilität bei steigender ROS-Konzentration [Twigg, 1998b; Hammadah, 2006].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen den vielfach beschriebenen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen der ROS-Konzentration und der (Progressiv-) Motilität sowie der normalen Morphologie. Des Weiteren stellt sich die hoch signifikante negative Korrelation zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert in allen Kollektiven sehr eindrucksvoll dar. Für die SpermioGrammparameter Dichte und Membranintegrität im HOS-Test lassen sich keine Zusammenhänge zur ROS-Konzentration erkennen.

Es wird heute allgemein davon ausgegangen, dass – wie in der Einleitung bereits erwähnt – sowohl Leukozyten als auch die Spermatozoen selbst ROS produzieren können, wobei die Leukozyten für den Hauptanteil der ROS-Produktion verantwortlich sind [Sharma, 1996; Wang, 1997; De Iuliis, 2006]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass vor allem unreife Spermatozoen mit reduzierten SpermioGrammparametern wie geringer Dichte [Aitken, 1992], Motilität [Zalata, 1995; Gil-Guzman, 2001; Ollero, 2001] oder einem hohen Grad an abnormalen Morphologieformen [Gil-Guzman, 2001; Ollero, 2001] ROS produzieren. Somit führen nicht nur über Leukozyten vermittelte Entzündungsprozesse zu einer Steigerung der ROS-Produktion und damit letztlich verbunden zu einer Verschlechterung der Samenqualität und einer Abnahme des Fertilitätspotentials, sondern auch unreife Spermatozoen in Ejakulaten von ohnehin schon sub- oder infertilen Männern stellen eine wichtige Ursache einer vermehrten oxidativen Belastung mit resultierender Abnahme des Fertilitätspotentials dar. Dem entgegen steht eine Untersuchung von Griveau et al., die in in-vitro-Versuchen zeigen, dass sich ein gewisser Grad an oxidativem Stress bei schon bestehender Oligozoospermie sogar förderlich auf die Qualität der klassischen SpermioGrammparameter auswirken kann [Griveau, 1998].

Betrachtet man die Resultate der Untersuchungen zur Beziehung der ROS zur DNA-Integrität, so können diese die weit verbreitete Literaturmeinung, nach der eine hohe ROS-Produktion mit vermehrter DNA-Schädigung einhergeht [Barroso, 2000; Ollero, 2001; Agarwal, 2002], nicht bestätigen. Verschiedene Studien weisen infolge der Einwirkung von ROS auf Spermatozoen insbesondere bei Infertilitätspatienten eine hohe Frequenz von Einzel- und Doppelstrangbrüchen an der DNA nach [Fraga, 1996; Kodama, 1997; Sun, 1997; Aitken, 2001]. Auch Barroso und Oger et al. finden eine signifikant positive Korrelation der ROS-Konzentration im Ejakulat mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung [Barroso, 2000; Oger, 2003].

Bei Einwirkung des Hydroxylradikals auf die DNA entsteht zunächst eine 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin (8-Oxo-dG)-Verbindung, die später in einen Doppelstrangbruch mündet und vielen Studien zum Nachweis einer oxidativen DNA-Schädigung dient [Ames, 1993; Chen, 1997; Lloyd, 1998; Cui, 2000]. Geneseca sowie Ahmadi et al. gehen in diesem Zusammenhang davon aus, dass eine voll funktionstüchtige Eizelle in der Lage ist, einen solchen Schaden zu reparieren bevor der Doppelstrangbruch entsteht [Geneseca, 1992; Ahmadi, 1999]. Twigg und Kemal et al. zeigen in ihren Forschungsarbeiten, dass bei experimenteller Exposition von Spermatozoen gegenüber ROS zahlreiche Modifikationen und Schädigungen der DNA dosisabhängig induzierbar sind, obwohl die Motilität noch keinerlei Veränderungen zeigt [Twigg, 1998a; Kemal, 2000]. Nach Loft et al. korreliert auch die Wahrscheinlichkeit einer Konzeption signifikant negativ zum 8-Oxo-dG-Spiegel im Ejakulat [Loft, 2003].

Auch Agarwal et al. sind der Ansicht, dass die durch ROS induzierten DNA-Schäden die Befruchtungsfähigkeit der Spermien vermindern und zudem den Prozess der Apoptose beschleunigen können [Agarwal, 2003b]. Signifikant positive Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Apoptoserate und gesteigerter ROS-Produktion zeigen ebenfalls Wang, Barroso und Lopes et al. [Lopes, 1998c; Barroso, 2000; Wang, 2003]. Lopes et al. finden in ihrer in-vitro-Untersuchung nach Inkubation einer Ejakulatprobe mit ROS eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentation, welche sich durch Vorbehandlung mit Antioxidantien verhindern lässt [Lopes, 1998c]. Analysen von Makhlof et al. zufolge sind bei der durch Apoptose induzierten DNA-Fragmentation nur Subpopulationen im Ejakulat betroffen, während sich oxidativer Stress und Bestrahlung auf nahezu alle Spermatozoen auswirken [Makhlof, 2006].

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sehen Hammadeh et al. ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen einer erhöhten ROS-Konzentration und einer gesteigerten Apoptoserate bzw. einer vermehrten DNA-Fragmentation [Hammadeh, 2006].

Die Analyse der Zusammenhänge zwischen der ROS-Konzentration und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen (siehe 4.7) liefert interessanterweise die durchweg signifikante positive Korrelation zwischen ROS und der Befruchtungsrate. Auch der Vergleich der ROS-Konzentration zwischen den Paaren, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denen, die nicht erfolgreich waren, zeigt bei den Männern der Schwangeren höhere, im ICSI-Kollektiv auch signifikant höhere ROS-Werte ( $p=0,050$ ). Somit gewinnt die These der physiologischen ROS-Konzentration, die in einem gewissen Grad also auch förderlich für die Befruchtung und den Eintritt einer Schwangerschaft zu sein scheint, zunehmend an Bedeutung. Relativiert wird dieses Ergebnis allerdings unter Betrachtung des ROS/TAS-

Quotienten, der diese deutlich positive Beziehung der ROS-Konzentration zur Befruchtungsrate nicht nur nicht bestätigt, sondern durch die deutlich negative Korrelation mit der Befruchtungsrate im ICSI-Kollektiv ein gegenteiliges Ergebnis präsentiert. Im Hinblick auf den Vergleich der schwangeren mit den nicht schwangeren Paaren lassen sich für den ROS/TAS-Quotienten keine Tendenzen herausstellen.

Zahlreiche Studien stellen eine exzessive ROS-Produktion als einen der besten Vorhersagewerte für ein schlechtes Ergebnis, d.h. für niedrige Befruchtungs- und/oder Schwangerschaftsraten nach IVF heraus [Krausz, 1994; Sukcharoen, 1995; Sukcharoen, 1996; Loft, 2003; Saleh, 2003; Zorn, 2003]. Für die Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate nach ICSI ist im Hinblick auf die Beeinflussung durch ROS bisher noch wenig bekannt. Zorn et al. können für die Therapie mit ICSI keinen negativen Einfluss hoher ROS-Konzentrationen auf die Fertilisation, wohl aber eine negative Assoziation mit der frühen Embryonalentwicklung feststellen [Zorn, 2003]. Hammadeh et al. beschreiben eine schwach negative Korrelation zwischen der Befruchtungsrate sowohl nach IVF- als auch nach ICSI-Therapie und der ROS-Konzentration im Seminalplasma, bestätigen diese für die Schwangerschaftsrate allerdings nur in der ICSI-Gruppe [Hammadeh, 2006]. Dagegen zeigen Pasqualotto et al. in Übereinstimmung mit den vorliegenden Resultaten, dass erhöhte Lipidperoxidationswerte – hier in der Follikelflüssigkeit gemessen – als Zeichen einer erhöhten ROS-Belastung in positiver Korrelation zur Schwangerschaftsrate nach IVF stehen [Pasqualotto, 2004].

Zusammengefasst decken sich die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Resultate zur ROS-Konzentration im Seminalplasma im Bezug auf die Spermogrammparameter mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage. So bestehen signifikante negative Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert sowie der Progressivmotilität und der normalen Morphologie in allen Kollektiven. Nicht bestätigen lässt sich die der überwiegenden Literaturmeinung entsprechende positive Beziehung einer erhöhten ROS-Konzentration zu vermehrter DNA-Schädigung. Stattdessen zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen ROS und der Chromatinkondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung. Dieser positive Effekt der ROS findet sich auch im Bezug auf die Resultate von Befruchtung und Schwangerschaft nach IVF und ICSI, was den meisten Literaturquellen widerspricht, die These der physiologischen ROS allerdings unterstreicht. Die Berechnung des Quotienten aus ROS- und TAS-Konzentration erweist sich als hilfreich zur besseren Darstellung der tatsächlich resultierenden oxidativen Belastung und führt zur Relativierung der Ergebnisse der alleinigen ROS-Konzentration.

### 5.3.2 Totaler Antioxidantienstatus (TAS)

Die Bestimmungen des die antioxidative Kapazität in ihrer Gesamtheit abbildenden Totalen Antioxidantienstatus (TAS) im Seminalplasma der untersuchten Ejakulatproben liefern für die Unterscheidung zwischen IVF- und ICSI-Gruppe ( $1,32 \pm 0,66$  mmol/l versus  $1,26 \pm 0,73$  mmol/l) nicht signifikante Ergebnisse, wobei die Werte der TAS-Konzentration in der ICSI-Gruppe die niedrigeren sind (siehe 4.1.3).

Hammadeh et al. erreichen im Durchschnitt etwas höhere Werte für die auf ähnliche Weise nachgewiesene TAS-Konzentration, wobei sie im ICSI- im Vergleich zum IVF-Kollektiv die (nicht signifikant) höheren Werte erzielen ( $1,53 \pm 0,22$  mmol/l versus  $1,43 \pm 0,28$  mmol/l) [Hammadeh, 2006].

Die unter 4.3 dargestellten Zusammenhänge zwischen der TAS-Konzentration und den SpermioGrammparametern zeigen wenig eindeutige und zum Teil paradox erscheinende Resultate. Es bestehen lediglich signifikante positive Korrelationen zwischen der TAS-Konzentration und dem Volumen im IVF-Kollektiv ( $p=0,023$ ) sowie der geschädigten Membranintegrität im HOS-Test in der ICSI-Gruppe ( $p=0,007$ ). Im Gesamtkollektiv lassen sich keinerlei signifikante Zusammenhänge oder Tendenzen erkennen.

Die Analyse bestehender Zusammenhänge zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen und der DNA-Integrität liefert für die TAS-Konzentration keinerlei Signifikanzen oder erkennbare Tendenzen (siehe 4.4).

Verschiedene Studien an Infertilitätspatienten mit unterschiedlichen Formen der Infertilität haben gezeigt, dass infertile Männer im Vergleich zu fertilen Kontrollgruppen einen deutlich geringeren Gesamtantioxidantienstatus sowie geringere Konzentrationen der einzelnen Antioxidantien aufweisen [Lewis, 1995; Smith, 1996; Lewis, 1997; Kim, 1998; Barbieri, 1999; Hendin, 1999; Irvine, 2000]. Einige Autoren stellen zudem eindeutige Wechselwirkungen zur ROS-Konzentration dar, wobei eine hohe ROS-Produktion im Seminalplasma niedrige Antioxidantienkonzentrationen bedingt und umgekehrt [Lewis, 1995; Smith, 1996; Sharma, 1999] bzw. eine exzessive ROS-Produktion zur Überwältigung der antioxidativen Abwehr und damit zur oxidativen Zerstörung der Spermatozoen und folgender Infertilität führt [Maiorino, 2002]. Maiorino et al. beschreiben in Übereinstimmung mit Ten et al. darüber hinaus, dass eine exzessive Antioxidantienkonzentration, wie sie durch eine pharmakologische Therapie mit Antioxidantien hervorgerufen werden kann, aufgrund der Elimination der

physiologischen ROS auch schädlich für die männliche Fertilität sein kann [Ten, 1997; Maiorino, 2002].

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zusammenhänge zwischen der TAS-Konzentration und den SpermioGrammparametern sowie der DNA-Integrität zeigt sich die aktuelle Studienlage noch wenig fundiert. Einige Autoren zeigen in ihren Studien signifikant positive Korrelationen zwischen der TAS-Konzentration und verschiedenen SpermioGrammparametern wie der Motilität, der Dichte oder der normalen Morphologie derart, dass geringe Antioxidantienkonzentrationen mit herabgesetzter Motilität [Smith, 1996; Pasqualotto, 2000; Balercia, 2003], verminderter Dichte [Pasqualotto, 2000] und/oder schlechter Spermienmorphologie [Pasqualotto, 2000; Koca, 2003] einhergehen. Keines dieser Resultate kann in der vorliegenden Dissertation bestätigt werden. Lediglich für das Volumen ergibt sich eine durchweg positive, im IVF-Kollektiv auch signifikante Korrelation mit der TAS-Konzentration.

Hammadeh et al. zeigen im Gegensatz dazu negative Signifikanzen zwischen der TAS-Konzentration und der Motilität sowie mit den morphologischen Normalformen im Gesamt- und im IVF-Kollektiv auf, während sie im ICSI-Kollektiv signifikant positive Korrelationen zwischen der TAS-Konzentration und der Membranintegrität sowie der Spermiedichte nachweisen [Hammadeh, 2006]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse liefern im ICSI-Kollektiv ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der TAS-Konzentration und der Membranintegrität, wobei im Gegensatz zu den Resultaten von Hammadeh et al. eine negative Beziehung besteht.

Das Verhältnis der TAS-Konzentration zur DNA-Integrität betreffend lassen weder die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch die Untersuchungen von Hammadeh et al. signifikante Zusammenhänge oder klar ersichtliche Tendenzen erkennen [Hammadeh, 2006]. Sikka geht in diesem Zusammenhang davon aus, dass eine hohe ROS-Produktion die Hauptquelle für Schädigungen der Spermatozoen-DNA darstellt und dass die dem entgegenwirkenden Antioxidantien deshalb eine wichtige Rolle im Schutz vor Infektionen, in der Verbesserung der Spermienqualität und in der Abwehr von DNA-Schäden spielen müssen [Sikka, 2004]. Eine eindeutige Bestätigung dieser Theorie liegt bisher allerdings noch nicht vor.

Einige Studien haben sich bereits mit dem von zunehmendem wissenschaftlichem Interesse erscheinenden Thema der exogenen Antioxidantienzufuhr sowohl in vitro bei der Aufbereitung einer Ejakulatprobe für die Verfahren der assistierten Reproduktion als auch in vivo zur

Therapie der männlichen Infertilität beschäftigt. Die Zugabe von Antioxidantien zu den Kultur- oder Waschmedien bei der Spermienaufbereitung im Rahmen einer IVF- oder ICSI-Therapie erscheint sinnvoll, da die Spermatozoen nach Entfernung des Seminalplasmas einer oxidativen Belastung durch ROS deutlich ungeschützter ausgesetzt sind [Ochsendorf, 1999]. Mehrere Autoren beschreiben die Supplementierung von Kulturmedien mit ROS abfangenden Substanzen als günstig sowohl zur Vermeidung eines ROS-induzierten Motilitätsverlusts der Spermatozoen [Parinaud, 1997] als auch zum besseren Schutz vor einer späteren DNA-Schädigung [Hughes, 1996; Geva, 1998] sowie für eine erfolgreiche in-vitro-Fertilisation [Tarin, 1998]. Geeignete Substanzen hierfür müssen erst noch mit Hilfe prospektiver Studien gefunden werden. Des Weiteren steht auch die Erbringung eines eindeutigen Nachweises des günstigen Einflusses einer in vitro Supplementierung noch aus. Ein erster wichtiger Schritt zur Vermeidung größerer Schäden der Spermatozoen während der Aufbereitung, die sich auch später auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate negativ auswirken können, stellt die Anwendung eines schonenden Verfahrens wie beispielsweise der auch in der vorliegenden Arbeit benutzten Dichtegradientenzentrifugation dar. [Ochsendorf, 1999]

Auch für die diätetische in vivo Supplementierung bei männlichen Infertilitätspatienten können noch keine allgemeingültigen Schlüsse gezogen werden. Erste Therapiestudien bestätigen einen positiven Effekt der Antioxidantien auf die Spermienqualität und eine größere Erfolgswahrscheinlichkeit bei den assistierten Reproduktionsverfahren [Dawson, 1992; Kessopoulou, 1995; Wong, 2000] sowie einen generell besseren Schutz der Spermatozoen vor Schädigungen [Sierens, 2002]. Sikka weist in diesem Zusammenhang allerdings auch darauf hin, dass eine exzessive Zufuhr mancher Antioxidantien, insbesondere in Kombination angewendet, zu anderen schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann, weshalb der therapeutische Einsatz von Antioxidantien sorgsam überwacht werden muss [Sikka, 2004].

Die Betrachtung der Korrelationen zwischen der TAS-Konzentration und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten zeigt schließlich ebenfalls in keinem der untersuchten Kollektive signifikante Zusammenhänge (siehe 4.7). Für die Befruchtungsrate ergibt sich in der ICSI-Gruppe eine leicht positive Beziehung zur TAS-Konzentration. Der Vergleich der TAS-Konzentration zwischen den Paaren, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denen, die diesbezüglich nicht erfolgreich waren, liefert ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Auch Hammadeh et al. können in ihren Untersuchungen keine klaren Aussagen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der TAS-Konzentration und den Schwangerschafts- und/oder Befruchtungsresultaten treffen [Hammadeh, 2006]. Eine Studie von Pasqualotto et al., die den Einfluss von oxidativem Stress, gemessen an der Lipidperoxidati-

on und dem Gesamtantioxidantienstatus in der Follikelflüssigkeit, auf die Ergebnisse einer IVF-Therapie untersucht, zeigt keine Zusammenhänge zwischen der TAS-Konzentration und der Fertilisation sowie der Embryoqualität, wohl aber eine positive Korrelation zwischen der TAS-Konzentration sowie der Lipidperoxidation und der Schwangerschaftsrate [Pasqualotto, 2004].

Insgesamt stellt sich die aktuelle Studienlage zum Thema Antioxidantien noch recht lückenhaft dar. Es existieren kaum eindeutige Quellen, stattdessen mehrere widersprüchliche und unklare Erkenntnisse, die auch durch die Resultate der vorliegenden Dissertation nicht weiter geklärt werden können. Worin sich scheinbar alle einig sind, ist, dass fertile Männer im Vergleich zu infertilen Männern deutlich höhere Antioxidantienkonzentrationen besitzen. Diese mehrfach nachgewiesene Beobachtung kann hier mangels fertiler Kontrollgruppe nicht bestätigt werden. Abschließend bleibt festzustellen, dass auf diesem Themengebiet noch erheblicher Forschungsbedarf besteht, insbesondere auch im Hinblick auf antioxidative Therapiemöglichkeiten.

### **5.3.3 Enzymatische Antioxidantien**

Wie unter 2.2.3 bereits beschrieben, kommt dem die Spermatozoen umgebenden Seminalplasma eine besondere Rolle im Schutz dieser vor ROS zu. Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass einige Enzyme und enzymatische Systeme im Seminalplasma antioxidative Schutzfunktion besitzen und in direkter Verbindung mit der männlichen Fertilität stehen. So haben seit der Erstbeschreibung im Jahr 1980 [Mennella, 1980] verschiedene Studien das Vorkommen der auch in dieser Arbeit im Seminalplasma bestimmten Superoxiddismutase (SOD) sowohl im Seminalplasma als auch in menschlichen Spermatozoen nachgewiesen. Die SOD benötigt für ihre einwandfreie Funktionstüchtigkeit Spurenelemente wie Kupfer, Zink oder Mangan als Cofaktoren und wird dementsprechend klassifiziert in die Cu/Zn-SOD, die vorwiegend im Zytosol vorkommen, und die Mn-SOD der Mitochondrien. Zusammen mit einer extrazellulären SOD stellen diese die Hauptformen dar. Sie sind für die Elimination des Superoxidanions, des ersten toxischen Sauerstoffabkömmlings verantwortlich und bilden damit die erste Verteidigungslinie gegenüber oxidativem Stress. [Garrido, 2004]

Auch die Selen-abhängige Glutathionperoxidase (GPX) findet sich sowohl in den Spermatozoen als auch im Seminalplasma und korreliert mit der männlichen Fertilität [Giannattasio, 2002]. Es existieren mehrere Formen der GPX, deren Aufgabe in der Umwandlung von

Wasserstoffperoxid zu Wasser unter Anwesenheit von reduziertem Glutathion besteht und die so die Zellen vor oxidativer Schädigung schützen. In Verbindung mit dieser Reaktion katalysiert die Glutathionreduktase (GR) die Umwandlung des dabei oxidierten Glutathions wieder in die für die GPX-Reaktion notwendige reduzierte Form und wird deshalb von vielen Autoren immer als Einheit mit der GPX unter der Bezeichnung Glutathion-Peroxidase/Reduktase-System zusammengefasst. [Garrido, 2004]

In der vorliegenden Dissertation werden die neben den Oxidantien und dem Gesamtantioxidantienstatus zusätzlich im Seminalplasma ermittelten Aktivitäten der enzymatischen Antioxidantien GPX, GR und SOD getrennt voneinander betrachtet und sind alle drei entsprechend der TAS-Konzentration in der ICSI-Gruppe im Vergleich zur IVF-Gruppe etwas niedriger (siehe 4.1.3). Für die GPX-Aktivität zeigt sich im ICSI-Kollektiv ein signifikant geringeres Ergebnis als in der IVF-Gruppe ( $p=0,012$ ).

Dass die Enzymaktivitäten von SOD, GPX und GR in der ICSI-Gruppe im Vergleich zum IVF- und Gesamtkollektiv deutlich niedriger sind, entspricht den im Hinblick auf die anderen in dieser Arbeit bestimmten Parameter meist schlechteren Resultaten in der ICSI-Gruppe. Mehrere Autoren finden in ihren Studien für die hier bestimmten Enzyme SOD, GPX und GR sowie für einige andere Antioxidantien im Seminalplasma infertiler Männer, besonders bei vorliegender Oligoasthenozoospermie signifikant geringere Aktivitäten als bei den fertilen Kontrollgruppen [Alkan, 1997; Imai, 2001; Foresta, 2002; Giannattasio, 2002; Maiorino, 2002; Nakamura, 2002], was in der vorliegenden Arbeit mangels Kontrollgruppe wiederum nicht bestätigt werden kann. Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von einigen anderen Autoren, die wie Tramer oder Hsieh et al. keinen Unterschied in der GPX- und der GR-Aktivität bzw. in der SOD-Aktivität zwischen normo- und hypomotilen menschlichen Ejakulatproben erkennen und die die enzymatischen Antioxidantien für insgesamt ungeeignet halten, das männliche Fertilitätspotential anzuzeigen [Hsieh, 2002; Tramer, 2004; Hsieh, 2006].

Unter Betrachtung der Korrelationen zwischen den enzymatischen Antioxidantien und den Spermioigrammparametern fallen einige signifikante Zusammenhänge auf (siehe 4.3). So zeigt sich im Gesamt- sowie im IVF-Kollektiv eine positive stark oder sogar hoch signifikante Korrelation zwischen der SOD-Aktivität und der normalen Morphologie. Des Weiteren findet sich ein in allen Kollektiven positiver, im Gesamt- sowie im IVF-Kollektiv auch signifikanter Zusammenhang zwischen der SOD-Aktivität und der Dichte. Zwischen der GPX-Aktivität und den Spermioigrammparametern besteht eine negative Signifikanz im IVF- und im ICSI-Kollektiv für die geschädigte Membranintegrität im HOS-Test, so dass eine hohe GPX-



Aktivität mit einer geringeren Schädigung der Membranintegrität bzw. einer besseren Vitalität einhergeht. Im Hinblick auf die GR-Aktivität lässt sich ebenfalls eine in allen Kollektiven negative, im ICSI-Kollektiv auch signifikante Beziehung zu der geschädigten Membranintegrität im HOS-Test nachweisen.

Die unter 4.4 dargestellten Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen der DNA-Integrität und speziell den enzymatischen Antioxidantien liefern außer der in allen Kollektiven negativen, in der ICSI-Gruppe auch signifikanten Korrelation zwischen der Chromatindekondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der SOD-Aktivität sonst keine eindeutigen Ergebnisse. Im ICSI-Kollektiv findet sich zwar eine weitere signifikante positive Korrelation zwischen der GPX-Aktivität und der DNA-Denaturierung in der AO-Färbung, diese entspricht in den beiden anderen Kollektiven allerdings einer (nicht signifikanten) negativen Korrelation.

Die Analyse der Beziehung der enzymatischen Antioxidantien zu den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen zeigt wenig aufschlussreiche Zusammenhänge (siehe 4.7). Lediglich zwischen der GPX-Aktivität und der Befruchtungsrate besteht in allen Kollektiven eine negative, allerdings nur im Gesamtkollektiv auch signifikante Korrelation. Für den Vergleich der im Hinblick auf eine eingetretene Schwangerschaft erfolgreich mit den nicht erfolgreich behandelten Patientenpaaren ergeben sich für die einzelnen enzymatischen Antioxidantien keinerlei signifikante Unterschiede. Nur für die GPX-Aktivität lassen sich tendenziell höhere Werte bei den Männern, deren Frauen nicht schwanger geworden sind, erkennen.

Die bisher durchgeführten Studien und Publikationen zum allgemeinen Thema der Interaktionen von oxidativen und antioxidativen Parametern erfassen allesamt nur Teilaspekte und sind nicht selten widersprüchlichen Charakters. Die Resultate im Bezug auf die auch hier bestimmten enzymatischen Antioxidantien stammen oftmals nicht von Messungen des Seminalplasmas, sondern spiegeln Enzymaktivitäten in den Spermatozoen selbst wider. Aus diesem Grund und nicht zuletzt wegen der unterschiedlichen verwendeten Nachweismethoden in den einzelnen Studien ist eine direkte Vergleichbarkeit mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen nicht immer gewährleistet.

In der Literatur finden sich überwiegend Informationen zur Beziehung einzelner enzymatischer Antioxidantien zu verschiedenen Spermioigrammparametern, wobei sich diesbezüglich bisher noch keine einheitliche Meinung herausgebildet hat. Einige Autoren postulieren eine signifikant positive Korrelation zwischen der SOD- und/oder der GPX-Aktivität in den Spermatozoen (allerdings nicht im Seminalplasma) und vor allem der Motilität [Alvarez,

1989; Kobayashi, 1991; Thérond, 1996; Foresta, 2002; Maiorino, 2002], den morphologischen Normalformen [Thérond, 1996; Foresta, 2002; Maiorino, 2002; Garrido, 2004] sowie der Vitalität [Foresta, 2002; Maiorino, 2002]. Kobayashi et al. finden in diesem Zusammenhang bei Zugabe exogener SOD (400 U/ml) zu einer Spermien suspension eine signifikante Abnahme des Anteils immotiler Spermatozoen, was demonstriert, dass die SOD die Lipidperoxidation von humanen Spermatozoen und damit die Ursache ihres Motilitätsverlustes hemmt [Kobayashi, 1991]. Foresta et al. beobachten in isolierten Proben mit motilen Spermatozoen einen schnelleren Abfall der Motilität mit abnehmender GPX-Aktivität [Foresta, 2002]. Eine Studie von Thérond et al. zeigt außerdem in Ejakulatproben mit einer Leukozytenkonzentration  $> 10^6/\text{ml}$ , die als relevante Quelle für eine erhöhte ROS-Produktion angesehen werden muss, sowohl schlechtere Werte für die einzelnen Spermio graphparameter als auch niedrigere Enzymaktivitäten der SOD sowie der GPX [Thérond, 1996].

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen mehrerer anderer Forscher, die keinen Zusammenhang zwischen den Aktivitäten der antioxidativ wirksamen Enzyme im Seminalplasma oder in den Spermatozoen selbst und den Spermio graphparametern erkennen können [Zini, 1993; Miesel, 1997; Yeung, 1998; Hsieh, 2002; Hsieh, 2006]. Kobayashi et al., die eine signifikant positive Korrelation zwischen der SOD-Aktivität in den Spermatozoen und der Motilität nachweisen, zeigen ebenfalls, dass zwischen der SOD-Aktivität im Seminalplasma und der Motilität keine Korrelation besteht [Kobayashi, 1991]. Yeung et al. können in ihren Untersuchungen zur GPX-, GR-, SOD- sowie zur Katalaseaktivität im Seminalplasma fertiler und infertiler Männer keinerlei Korrelation zwischen den verschiedenen Enzymaktivitäten und der normalen Morphologie sowie dem prozentualen Anteil an motilen Spermatozoen erkennen [Yeung, 1998]. Auch die Studien von Hsieh et al. führen nicht zur Darstellung eines signifikanten Zusammenhangs zwischen der sowohl im Seminalplasma als auch in den Spermatozoen bestimmten SOD-Aktivität [Hsieh, 2002] sowie der GPX-Aktivität [Hsieh, 2006] und der Spermienqualität. Eine positive (nicht signifikante) Beziehung zwischen der GPX-Aktivität und der Spermienkonzentration sowie der Motilität ist dennoch beschrieben [Hsieh, 2006].

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse können eine signifikante Beziehung der enzymatischen Antioxidantien zur Motilität ebenfalls nicht bestätigen. Allerdings bestehen signifikante positive Korrelationen zwischen der SOD-Aktivität und der normalen Morphologie sowie der Spermienkonzentration. Die GPX-Aktivität stellt sich in signifikanter Korrelation zur Vitalität dar, wobei die Vitalität in positivem Zusammenhang mit der GPX- sowie auch der GR-Aktivität steht. Insgesamt zeichnet sich die Tendenz eines protektiven Einflusses der enzymatischen Antioxidantien auf die Spermienqualität ab.

Zu dem bislang noch wenig untersuchten Zusammenhang zwischen den verschiedenen enzymatischen Antioxidantien und der DNA-Integrität finden sich kaum Literaturangaben. Chen et al. demonstrieren in einer Studie von 2002, dass es bei geringen Antioxidantienkonzentrationen häufiger zu ausgeprägteren Schädigungen an der Doppelstrang-DNA kommt [Chen, 2002]. Im Rahmen einer weiteren Untersuchung weisen Chen et al. eine signifikant reduzierte Inzidenz von DNA-Schäden bei exogener SOD-Zufuhr nach [Chen, 2003]. In früheren Studien beschreiben Godeas und Twigg et al. bereits eine negative Beziehung der GPX-Aktivität zur DNA-Integrität, wobei sie der GPX eine Schutzfunktion gegenüber oxidativen Angriffen auf die DNA zuweisen [Godeas, 1996; Twigg, 1998b]. Eine Hemmung der GPX-Aktivität geht nach Twigg et al. mit der vermehrten Produktion von Peroxiden einher, die daraufhin die Chromatinstruktur angreifen und so DNA-Strangbrüche initiieren können [Twigg, 1998b]. Auch Nomura et al. gelangen in einer Studie über die Aktivität der GPX zu der Erkenntnis, dass diese als antioxidativer Parameter den Prozess der Apoptose hemmt [Nomura, 2001]. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene signifikante negative Korrelation zwischen der SOD-Aktivität und der gestörten Chromatinkondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung zeigt wiederum einen protektiven Effekt der SOD auf die DNA-Integrität und bestätigt damit die gerade genannten Literaturmeinungen.

Auch im Hinblick auf den Einfluss der enzymatischen Antioxidantien auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnisse nach assistierter Reproduktion besteht zurzeit noch dringlicher Bedarf an klinischen Studien. Die diesbezüglichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen den Untersuchungen einiger Forscher, die keine Zusammenhänge zwischen den Aktivitäten der einzelnen enzymatischen Antioxidantien und einem reproduktiven Erfolg *in vivo* oder *in vitro* nachweisen können [Zini, 1993; Miesel, 1997; Yeung, 1998; Hsieh, 2002]. Dennoch wird vermutet, dass die Applikation von Antioxidantien wie den hier bestimmten Enzymen die Resultate assistierter reproduktiver Therapieverfahren verbessern kann [Zini, 1993; Sikka, 2004]. Eindeutige Ergebnisse aus kontrollierten klinischen Studien stehen bislang allerdings noch aus.

Abschließend bleibt zum Thema der enzymatischen Antioxidantien noch zu erwähnen, dass die einzelnen antioxidativen Parameter nicht ohne Weiters getrennt voneinander betrachtet werden können, da sich die letztlich resultierende antioxidative Abwehr aus einem Komplex aus vielen einzelnen miteinander interagierenden Komponenten zusammensetzt, die in ihrer Gesamtheit für die Wahrung des Gleichgewichts zwischen Oxidantien und Antioxidantien zur Vermeidung von oxidativem Stress verantwortlich sind. So muss z.B. bei der Betrachtung von Enzymaktivitäten die Abhängigkeit der enzymatischen Antioxidantien von ihren Cofakto-

ren mitberücksichtigt werden. Niedrige Enzymkonzentrationen können dabei eventuell auch auf niedrigen Konzentrationen der Spurenelemente beruhen.

Obwohl die in dieser Studie erzielten Ergebnisse keine endgültige Klärung der kontroversen Literaturmeinungen herbeiführen, zeigen sie dennoch die Tendenz eines protektiven Einflusses der enzymatischen Antioxidantien auf die SpermioGrammparameter und die DNA-Integrität der Spermatozoen. Ob die Enzymaktivitäten sich dazu eignen, die männliche Fertilitätskapazität anzuzeigen, bleibt aufgrund zahlreicher widersprüchlicher Aussagen und Ansichten ungeklärt. Auch die Beziehung zu Befruchtung und Schwangerschaft ist bislang noch keineswegs ersichtlich. All diese ungeklärten Fragen und die aktuell sehr lückenhafte Studienlage erfordern also dringend weitere Untersuchungen.

## 5.4 Fazit und Ausblick

Unter Berücksichtigung der im Abschnitt 2.3 formulierten Eigenen Fragestellung der vorliegenden Dissertation, die das Ziel der Identifizierung von entscheidenden Einflussfaktoren für die andrologische Sub- bzw. Infertilität sowie für die assistierten Reproduktionsverfahren und ihre Ergebnisse verfolgt, bietet sich eine entsprechende Gliederung des Fazits nach den dort aufgeführten fünf Gesichtspunkten an.

1. Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der DNA-Integrität einerseits sowie zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma andererseits und den SpermioGrammparametern liefert zunächst im Hinblick auf die mit Hilfe der einzelnen Fluoreszenzfärbungen in den Ejakulatproben der subfertilen Patienten nachgewiesene DNA-Integrität einen insgesamt eher geringen Schädigungsgrad. Aus diesem Grund kann die vielzitierte Behauptung, die DNA-Fragmentation sei ein überzeugender prädiktiver Parameter für die männliche Infertilität, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Unter den verwendeten Nachweisverfahren der DNA-Integrität zeigt die CMA<sub>3</sub>-Färbung, gefolgt vom TUNEL-Test und der AO-Färbung, die meisten signifikanten Zusammenhänge an. Es lässt sich eine der überwiegenden Literaturmeinung entsprechende, generell positive Beziehung der DNA-Integrität zu normwertigen SpermioGrammparametern beobachten. Vor allem für die Parameter Dichte, Motilität und Vitalität ergeben sich signifikante Zusammenhänge, während die in zahlreichen Studien nachgewiesene positive Signifikanz zwischen der DNA-Integrität und der normalen Morphologie hier nicht deutlich wird.

Die Resultate zu der den oxidativen Status einer Probe erfassenden, im Rahmen dieser Arbeit im Seminalplasma bestimmten ROS-Konzentration decken sich im Bezug auf die Spermioigrammparameter mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage. Es finden sich durchweg signifikante negative Korrelationen zwischen der ROS-Konzentration und dem pH-Wert sowie der Progressivmotilität und der normalen Morphologie. Weniger eindeutig zeigen sich die Ergebnisse der Analyse des Gesamtantioxidantienstatus (TAS), bei deren Betrachtung lediglich die generell positive Beziehung der TAS-Konzentration zum Ejakulatvolumen auffällt. Auch die aktuelle Studienlage liefert außer widersprüchlichen Erkenntnissen und ungeklärten Fragen sonst wenig Erhellendes zu diesem Thema. Worin sich aber scheinbar alle einig sind, ist, dass fertile Männer im Vergleich zu infertilen Männern deutlich höhere Antioxidantienkonzentrationen besitzen. Diese in mehreren Studien nachgewiesene Beobachtung kann hier mangels fertiler Kontrollgruppe nicht bestätigt werden. Die im Rahmen dieser Studie zusätzlich durchgeführte Berechnung des Quotienten aus ROS- und TAS-Konzentration erweist sich als hilfreich zur besseren Darstellung der tatsächlich resultierenden oxidativen Belastung und führt häufig zur Relativierung der Ergebnisse der alleinigen ROS- oder TAS-Konzentrationen.

Die Korrelationen zwischen den einzelnen hier bestimmten enzymatischen Antioxidantien und den Spermioigrammparametern lassen eine deutliche Tendenz eines protektiven Einflusses der antioxidativen Parameter erkennen. So zeigen sich positive Signifikanzen zwischen der SOD-Aktivität und der normalen Morphologie sowie der Dichte. Zwischen der GPX-Aktivität und den Spermioigrammparametern besteht zudem ein signifikanter negativer Zusammenhang für die geschädigte Membranintegrität im HOS-Test, so dass eine hohe GPX-Aktivität mit einer geringeren Schädigung der Membranintegrität bzw. einer besseren Vitalität einhergeht. Im Hinblick auf die GR-Aktivität lässt sich ebenfalls eine durchweg negative Beziehung zu der geschädigten Membranintegrität im HOS-Test nachweisen.

2. Betrachtet man die Analyse der Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integritätsbestimmung und den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma, fallen die beiden durchweg negativen Signifikanzen zwischen der Chromatindekondensation in der CMA<sub>3</sub>-Färbung und der ROS-Konzentration sowie der SOD-Aktivität auf. Die negative, im Gegensatz zur mehrheitlichen Literaturmeinung stehende Beziehung der Chromatindekondensation zur ROS-Konzentration stützt die These der physiologischen ROS-Produktion, nach der eine gewisse Menge an ROS für die normalen Funktionen und Abläufe in den Spermatozoen von essentieller Bedeutung ist. Dagegen zeigt der ebenfalls negative Zusammenhang zwischen der Chromatindekon-

denzation und der SOD-Aktivität entsprechend den Annahmen mehrerer Autoren einen protektiven Einfluss dieses antioxidativ wirksamen Parameters auf die DNA-Integrität.

3. Die Untersuchungen zur Auswirkung sämtlicher in der vorliegenden Arbeit bestimmter Parameter auf die Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultate der Patientinnen nach IVF- und ICSI-Therapie ergeben insgesamt wenig eindeutige Ergebnisse. Wie unter 4.1.4 dargestellt, lassen sich unter Betrachtung des Gesamtpatientenkollektivs eine durchschnittliche Befruchtungsrate von  $57,96 \pm 25,22$  % sowie eine klinische Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer von 32,56 %, für den begonnenen Zyklus von 30,43 % feststellen. Im Hinblick auf den Einfluss der SpermioGrammparameter zeigen sich positive Korrelationen zwischen der Dichte sowie der Vitalität und der Befruchtungsrate. Außerdem findet sich eine signifikant höhere Vitalität bei den Männern, deren Frauen schwanger geworden sind. Im Zusammenhang mit der DNA-Integrität lässt sich lediglich für die Befruchtungsrate eine Tendenz dahingegen erkennen, dass unabhängig von der jeweils verwendeten Nachweismethode mit zunehmendem Schädigungsgrad der DNA-Integrität die Befruchtungsrate abnimmt. Auch in der Literatur findet sich diesbezüglich keine klare Linie.

Die Analyse der Zusammenhänge zwischen der ROS-Konzentration und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten liefert der These der physiologischen ROS-Konzentration entsprechend durchweg positive Korrelationen zwischen ROS und der Befruchtungsrate. Auch der Vergleich der ROS-Konzentration zwischen den Paaren, bei denen eine Schwangerschaft eingetreten ist und denen, die nicht erfolgreich waren, zeigt bei den Männern der Schwangeren entgegen der mehrheitlichen Literaturmeinung höhere ROS-Werte. Die Untersuchungen zu den verschiedenen antioxidativ wirksamen Parametern lassen dagegen keine Beziehung zu Befruchtung und Schwangerschaft erkennen.

Insgesamt kann im Rahmen der vorliegenden Dissertation kein Parameter identifiziert werden, mit dessen Hilfe sich der Erfolg einer Therapie mit IVF und/oder ICSI sicher voraussagen ließe. Dementsprechend und aufgrund der ebenfalls unklaren Studienlage besteht zur Beeinflussung der Therapieresultate nach Anwendung assistierter Reproduktionsverfahren noch erheblicher Forschungsbedarf.

4. Die Frage nach bestehenden Unterschieden für die einzelnen hier durchgeführten Untersuchungen im Vergleich der beiden Patientenkollektive, dem IVF- und dem ICSI-Kollektiv führt zu der sich deutlich herausstellenden Tendenz der schlechteren Resultate bzw. eines höheren Schädigungsgrades in der ICSI-Therapiegruppe sowohl im Hinblick auf die SpermioGrammparameter als auch bezüglich der DNA-Integrität. Die ROS-

Konzentration erreicht in der ICSI-Gruppe zwar niedrigere Werte als im IVF-Kollektiv, die über den ROS/TAS-Quotienten ermittelte letztlich resultierende oxidative Belastung ist aber ebenfalls im ICSI-Kollektiv etwas größer. Dementsprechend können auch für die Aktivitäten der enzymatischen Antioxidantien sowie für die TAS-Konzentration in der ICSI-Gruppe die niedrigeren Werte beobachtet werden.

Interessanterweise ergeben sich bei den Patientenpaaren, die im Rahmen dieser Studie mittels ICSI therapiert wurden, trotz des höheren Schädigungsgrades der Spermatozoen im Vergleich zu den mit IVF Behandelten sowohl höhere Befruchtungs- ( $63,78 \pm 27,84$  % versus  $55,14 \pm 23,81$  %) als auch Schwangerschaftsraten (50 % versus 24,14 %) (siehe 4.1.4).

Des Weiteren ist im Bezug auf die untersuchten Korrelationen festzustellen, dass sich die Ergebnisse des ICSI-Therapiekollektivs wohl nicht zuletzt auch wegen des kleineren Stichprobenumfangs ( $n=15$ ) weniger eindeutig darstellen als dies für das Gesamt- oder IVF-Kollektiv der Fall ist.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die zahlreichen zum Teil in jahrzehntelanger Forschungsarbeit erzielten Erkenntnisse bezüglich der auch in der vorliegenden Dissertation untersuchten Parameter und Zusammenhänge noch lange nicht vor ihrer endgültigen Vervollständigung stehen. Stattdessen werden durch aktuellere Studien und Untersuchungen immer noch neue Fragen aufgeworfen, die es zur letztlichen Klärung der Thematik weiter zu analysieren gilt. Die vorliegende Arbeit stellt trotz ihres relativ breiten Untersuchungsspektrums nur einen kleinen Beitrag zur Aufklärung des komplexen Themas der männlichen Infertilität dar. Die hier gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass potentiell schädigende Substanzen wie die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Prozesse wie die Apoptose bis zu einem gewissen Grad auch zur Erfüllung physiologischer Funktionen notwendig zu sein scheinen. Andererseits steht noch in der Diskussion, ob potentielle Schutzstoffe wie die enzymatischen Antioxidantien im Hinblick auf antioxidative Therapieoptionen nicht auch kontraproduktiv sein können. Letztlich stellt sich also die Frage nach optimalen Wertebereichen für die betrachteten Parameter.

Zur Identifizierung entscheidender Einflussfaktoren für die andrologische Sub- bzw. Infertilität sowie für die assistierten Reproduktionsverfahren müssen dringend noch weitere Studien erfolgen. Um die Komplexität dieses Themas besser zu erfassen, scheint es nötig, gleichzeitig mehrere Zusammenhänge zu untersuchen. So stellt sich der Vergleich mit einer gesunden fertilen Kontrollgruppe immer von Vorteil dar. Zudem sollte auf einen möglichst großen Stichprobenumfang und ein ausgewogenes Zahlenverhältnis zwischen den miteinander zu vergleichenden Gruppen geachtet werden. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten

Parameter wäre neben der hier erfolgten Messung im Seminalplasma auch die Bestimmung in den Spermatozoen selbst eine sinnvolle Ergänzung. Auch muss den Interaktionen und Beziehungen der einzelnen Parameter untereinander wie beispielsweise der gegenseitigen Beeinflussung der Antioxidantien verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Einen weiteren interessanten, in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigten Aspekt stellt die Erfassung von Art und Häufigkeit im Vorfeld der Studie erfolgter Behandlungen der Patientenpaare dar.

Bei all diesen Untersuchungen zur männlichen Infertilität darf allerdings nicht vergessen werden, dass auch zahlreiche Störungen von Seiten der Frauen ursächlich am Schwangerschaftsmisserfolg sein können.

Schlussendlich stehen der modernen Reproduktionsmedizin noch Jahre intensiver Forschungsarbeit bevor, in denen nur eine interdisziplinäre Zusammenarbeit der verschiedenen medizinisch theoretischen sowie der klinischen Fachbereiche zum Ziel führen kann.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR (1994) Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *Journal of Urology* 152: 107-10
2. Agarwal A, Saleh RA (2002) Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urologic Clinics of North America* 29: 817-27
3. Agarwal A, Said TM (2003a) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 9: 331-45
4. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003b) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79: 829-43
5. Agarwal A, Allamaneni SSR (2005) Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and Sterility* 84: 850-3
6. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SSR (2006) Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online* 12: 630-3
7. Ahmadi A, Ng SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 284: 696-704
8. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989a) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction* 41: 183-97
9. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC (1989b) Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology* 10: 214-20
10. Aitken RJ, West KM (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology* 13: 433-51
11. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW (1992) Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 451-62

12. Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S (1997) Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Molecular Reproduction and Development* 47: 468-82
13. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59: 1037-46
14. Aitken RJ, Krausz C (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506
15. Aitken RJ, Sawyer D (2003) The human spermatozoa – not waving but drowning. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 518: 85-98
16. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A (1997) Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *Journal of Urology* 157: 140-3
17. Alvarez JG, Storey BT (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research* 23: 77-90
18. Alvarez JG (2005) The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Human Reproduction* 20: 2365-7
19. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)* 90: 7915-22
20. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T, Keiding N, Skakkebaek NE (2000) High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction* 15: 366-72
21. Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC (1998) Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in-vitro-fertilization. *Fertility and Sterility* 69: 740-7

22. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine* 332: 281-5
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. *Fertility and Sterility* 81: 349-54
24. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 28: 587-96
25. Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F (2003) Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 41: 13-9
26. Bals-Pratsch M, Schill T, Diedrich K (1998) Der andrologische Patient in der gynäkologischen Praxis. In: Diedrich K (ed) *Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie*. Springer, Heidelberg, 437-90
27. Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA (1999) Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *Journal of Andrology* 20: 713-7
28. Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID (1990) Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction* 5: 639-48
29. Barratt CLR, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID (1992) The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Human Reproduction* 7: 95-8
30. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 15: 1338-44
31. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction* 18: 1023-8
32. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung (2007) Ungewollt kinderlos – Was kann die moderne Medizin gegen den Kindermangel in Deutschland tun? [http://www.berlin-institut.org/ungewollt\\_kinderlos.html](http://www.berlin-institut.org/ungewollt_kinderlos.html)

33. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biology of Reproduction* 49: 1083-8
34. Bonde JPE, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NHI, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE (1998) Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352: 1172-7
35. Brinsden PR (ed) (1999) In-vitro-fertilization and assisted reproduction. The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2<sup>nd</sup> ed. Parthenon Publishing, New York London, 222; 227; 230
36. Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung (2007) BiB-Mitteilungen 30. April 2007. [http://www.bib-demographie.de/publikat/bib-mit1\\_2007.pdf](http://www.bib-demographie.de/publikat/bib-mit1_2007.pdf)
37. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) (2007) Pränataldiagnostik und unerfüllter Kinderwunsch. <http://www.artemis.bzga.de/pndukw/>, online am 30.12.2007
38. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* 305: 609-13
39. 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. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 49: 49-55
40. Chen CS, Chao HT, Pan RL, Wei YH (1997) Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochemistry and Molecular Biology International* 43: 291-303
41. Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung ALM, Liu W, O WS (2002) Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction* 124: 491-9
42. Chen H, Chow PH, Cheng SK, Cheung ALM, Cheng LYL, O WS (2003) Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology* 24: 704-11
43. Chohan KR, Griffin JT, La Fromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology* 27: 53-9

44. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF (1992) The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Human Reproduction* 7: 242-7
45. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK (2000) Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB Journal* 14: 955-67
46. Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC (1992) Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertility and Sterility* 58: 1034-9
47. De Iuliis GN, Wingate JK, Koppers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ (2006) Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91: 1968-75
48. De Jonge CJ (2002) The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Human Fertility* 5: 51-3
49. De Lamirande E, Gagnon C (1995) Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 487-95
50. Deutsches IVF-Register (2003) Jahrbuch 2002. DIR Bundesgeschäftsstelle bei der Ärztekammer Schleswig Holstein, Bad Segeberg, <http://www.deutsches-ivf-register.de>
51. Donnelly GP, McClure N, Kennedy MS, Lewis SEM (1999) Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. *Andrologia* 31: 43-7
52. Drevius L, Eriksson H (1966) Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42: 136-56
53. Duran EH, Gurgan T, Gunalp S, Enginsu ME, Yarali H, Ayhan A (1998) A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Human Reproduction* 13: 1235-9
54. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 17: 3122-8
55. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, Tilgen W, Runnebaum B (1996) The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Human Reproduction* 11: 784-9

56. Eliasson R, Treschl L (1971) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 22: 134-7
57. Eliasson R (1981) Analysis of semen. In: Burger H, De Kretser D (eds) *The testis*. Raven Press, New York, 381-99
58. El-Masri L (2004) Die Auswirkungen zweier Spermienaufbereitungsmethoden (PureSperm vs. ISolate) auf die Spermienparameter und ihr Einfluss auf die Erfolgsrate nach in-vitro-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Dissertation, Homburg/Saar, 31
59. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A (2006) Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology* 8: 11-29
60. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, Rooyen LH van (2000) Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro-fertilization rates. *Human Reproduction* 15: 657-61
61. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, De Angelis P, Claussen OP (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14: 1039-49
62. Evenson DP, Larson KL, Jost LK (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23: 25-43
63. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH (1996) Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertility and Sterility* 65: 1009-14
64. Ford WCL (1990) The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: implications for IVF. In: Henkel R, Schill WB (2000) *Die Bedeutung funktioneller Spermatozoenparameter für den Fertilisationsprozess*. *Reproduktionsmedizin* 16: 81-9
65. Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M (2002) Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction* 67: 967-71

66. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN (1996) Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research* 351: 199-203
67. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 15: 830-9
68. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction* 19: 1409-17
69. Gardiner-Garden M (1999) Techniques for sorting X and Y spermatozoa may adversely affect histone-associated regions in human spermatozoa. *Human Reproduction* 14: 1403-4
70. 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 Journal of Andrology* 6: 59-65
71. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J (1992) Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetics* 89: 181-6
72. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A (1998) Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Human Reproduction* 13: 1422-4
73. 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 Radical Biology and Medicine* 29: 1106-14
74. Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, Zarrilli S, Cimmino A, Di Rosario B, Ruggiero R, Colao A, Lombardi G (2002) Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *Journal of Endocrinological Investigation* 25: 983-6
75. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr., Agarwal A (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* 16: 1922-30

76. Godeas C, Tramer F, Micali F, Roveri A, Maiorino M, Nisii C, Sandri G, Panfili E (1996) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat testis nuclei is bound to chromatin. *Biochemical and Molecular Medicine* 59: 118-24
77. Goldberg DM, Spooner RJ (1983) Glutathione reductase. In: Bergmeyer HV (ed) *Methods of enzymatic analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. Verlag Chemie, Deerfield Beach, USA, 258-65
78. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998) Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology* 21: 81-94
79. Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, Ahmed T, Gong J, Melamed MR, Darzynkiewicz Z (1993a) Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 7: 659-70
80. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993b) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research* 207: 202-5
81. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J (2005) Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 20: 226-30
82. 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. *Human Reproduction* 13: 3108-13
83. Haaf T, Ward DC (1995) Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Experimental Cell Research* 219: 604-11
84. Haidl G (1999) Ist die Fruchtbarkeit der Männer ernsthaft bedroht? *Reproduktionsmedizin* 15: 1-3



85. 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. *Reproductive BioMedicine Online* 13: 696-706
86. Hashimoto S, Yanagida K, Katayose H, Yamada H, Yamada H, Sato A (2003) Relationship between fertilizing ability of ejaculated human spermatozoa and its chromatin heterogeneity. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 29: 360-1
87. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr., Agarwal A (1999) Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *Journal of Urology* 161: 1831-4
88. Henkel R, Ichikawa T, Sanchez R, Miska W, Ohmari H, Schill WB (1997) Differentiation of ejaculates in which reactive oxygen species are generated by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia* 29: 295-301
89. Henkel R, Schill WB (1998) Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* 30: 91-7
90. Henkel R, Schill WB (2000) Die Bedeutung funktioneller Spermatozoenparameter für den Fertilisationsprozess. *Reproduktionsmedizin* 16: 81-9
91. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive BioMedicine Online* 7: 477-84
92. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* 81: 965-72
93. Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ (1987) Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertility and Sterility* 47: 460-5
94. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A (1996) The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility* 66: 634-9

95. Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F (1999a) DNA strand breaks in human spermatozoa, a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 78: 622-5
96. Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F (1999b) DNA strand breaks in human sperm cells, a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 78: 336-9
97. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S (2000) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 79: 559-63
98. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, Lee YS, Tsai HD, Lin CS (2002) Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16: 127-31
99. Hsieh YY, Chang CC, Lin CS (2006) Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *International Journal of Biological Sciences* 2: 23-9
100. Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 84: 130-40
101. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction* 2: 613-9
102. Hurst KM, Dye L (2000) Stress und männliche Subfertilität. In: Brähler E, Felder H, Strauß B (eds) *Fruchtbarkeitsstörungen. Jahrbuch der Medizinischen Psychologie* 17. Hogrefe, Göttingen, 27-42
103. Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y (2001) Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biology of Reproduction* 64: 674-83

104. 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. *British Medical Journal* 312: 467-71
105. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21: 33-44
106. Iwasaki A, Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 57: 409-16
107. Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-28
108. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular Human Reproduction* 2: 93-8
109. Kemal DN, Morshedi M, Oehninger S (2000) Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 74: 1200-7
110. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL (1995) A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility* 64: 825-31
111. Kim JG, Parthasarathy S (1998) Oxidation and the spermatozoa. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 16: 235-9
112. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S (1991) Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction* 6: 987-91
113. Koca Y, Özdal ÖL, Celik M, Ünal S, Balaban N (2003) Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Archives of Andrology* 49: 355-9
114. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility* 68: 519-24

115. Köhn FM, Haidl G (2006) Andrologische Diagnostik. Gynäkologische Endokrinologie 4: 97-112
116. Kraus RJ, Ganther HE (1980) Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. Biochemical and Biophysical Research Communications 96: 1116-22
117. Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, Aitken RJ (1994) Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationship with motility and fertilization in vitro. Fertility and Sterility 62: 599-605
118. Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP (2000) Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Human Reproduction 15: 1717-22
119. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertility and Sterility 80: 895-902
120. Lewis SEM, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W (1995) Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertility and Sterility 64: 868-70
121. Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS, Thompson W (1997) Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertility and Sterility 67: 142-7
122. Lissak A, Wiener-Megnazi Z, Rezwick AZ, Shnizer S, Ishai D, Grach B, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M (2004) Oxidative stress indices in seminal plasma, as measured by the thermochemiluminescence assay, correlate with sperm parameters. Fertility and Sterility 81: 792-7
123. Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH (1998) Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions. Chemical Research in Toxicology 11: 420-7
124. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gyllemborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP (2003) Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. Human Reproduction 18: 1265-72

125. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998a) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Urology* 160: 1943
126. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF (1998b) Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13: 703-8
127. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998c) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13: 896-900
128. Lorenz MT (2005) Untersuchungen zur Oxidantien- und Antioxidantienkonzentration (Vitamin E, Selen, Zink) im humanen Seminalplasma sowie zur DNA-Integrität und ihre Einflüsse auf die Ergebnisse des IVF- und ICSI-Programms. Dissertation, Homburg/Saar
129. Lübke M (2004) Fertilitätsstörungen und ovarielles Überstimulationssyndrom. In: Bühling KJ, Friedmann W (eds) *Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer, München Jena, 38-47
130. Maiorino M, Ursini F (2002) Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Journal of Biological Chemistry* 383: 591-7
131. Makhlof AA, Niederberger C (2006) DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *Journal of Andrology* 27: 316-23
132. Makler A (1980) The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility* 33: 337-8
133. Mennella MR, Jones R (1980) Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochemical Journal* 191: 289-97
134. Miesel R, Jedrzejczak P, Sanocka D, Kurpisz MK (1997) Severe antioxidant deficiency in human semen samples with pathological spermogram parameters. *Andrologia* 29: 77-83

135. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407-12
136. Mohammad Reza Moein MD, Vali Ollah Dehghani MD, Nasim Tabibnejad MD, Serajadin Vahidi MD (2007) Reactive Oxygen Species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 5: 51-5
137. Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L (2001) Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Human Reproduction* 16: 534-9
138. Morris ID, Iltott S, Dixon L, Brison DR (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 17: 990-8
139. Mortimer D (1991) Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro-fertilization. *Human Reproduction* 6: 173-6
140. Motchnik PA, Podda A (1997) Oxidative damage to sperm DNA. In: Ochsendorf FR, Fuchs J (eds) *Oxidative stress in male infertility*. Gardez, St. Augustin, 129-40
141. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MP, Devroey P, Steirteghem AC van (1995) Andrology: the result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Human Reproduction* 10: 1123-9
142. Nakamura H, Kimura T, Nakajima A, Shimoya K, Takemura M, Hashimoto K, Isaka S, Azuma C, Koyama M, Murata Y (2002) Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *European Journal of Obstetrics and Gynaecology and Reproductive Biology* 105: 155-60
143. Nomura K, Imai H, Koumura T, Nakagawa Y (2001) Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biological Signals and Receptors* 10: 81-92

144. Novero V, Camus M, Tournaye H, Smitz J, Verheyen G, Joris H, Derde MP, Steirteghem AC van, Devroey P (1997) Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12: 59-63
145. O'Brien J, Zini A (2005) Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 65: 16-22
146. Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schüttau H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R (1994) Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 26: 289-93
147. Ochsendorf FR, Fuchs J (eds) (1997) *Oxidative stress in male infertility*. Gardez, St. Augustin
148. Ochsendorf FR, Podda M (1999) Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei männlicher Infertilität. *Reproduktionsmedizin* 15: 393-405
149. Oger I, Da Cruz C, Panteix G, Menezo Y (2003) Evaluating human sperm DNA integrity: relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the sperm chromatin structure assay. *Zygote* 11: 367-71
150. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr., Alvarez JG (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Human Reproduction* 16: 1912-21
151. 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. *Fertility and Sterility* 63: 887-93
152. Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility* 74: 245-50
153. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ (2007) DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 4: 124-39
154. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ Jr., Agarwal A (1997) Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertility and Sterility* 67: 1115-20

155. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70: 158-69
156. Parinaud J, Le Lannou D, Vieitez G, Griveau JF, Milhet P, Richoille G (1997) Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. *Human Reproduction* 12: 2434-6
157. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr., Agarwal A (2000) Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and Sterility* 73: 459-64
158. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI (2004) Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* 81: 973-6
159. Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D, Spano M, Wyrobek AJ (2003) Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 518: 253-68
160. Piasecka M, Laszczynska M, Gaczarzewicz D (2003) Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenoteratozoospermia. *Folia Morphologica (Warsz)* 62: 479-81
161. Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE (1977) Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74: 64-71
162. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A (2003) Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 35: 238-43
163. 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. *Human Reproduction* 17: 2665-72
164. Robert Koch Institut (2004) Heft 20 – Ungewollte Kinderlosigkeit. Aus der Reihe „Gesundheitsberichterstattung des Bundes“. <http://www.rki.de>



165. 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. *Journal of Andrology* 16: 80-7
166. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A (1998) Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 13: 11-9
167. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro 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. *Human Reproduction* 15: 1112-6
168. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66: 1061-7
169. Saleh RA, Agarwal A (2002a) Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23: 737-52
170. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. (2002b) Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78: 491-9
171. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr., Sharma RK (2002c) Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78: 313-8
172. 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. *Fertility and Sterility* 79: 1597-605
173. Schuppe HC, Köhn FM, Haidl G, Schill WB (1999) Umwelteinflüsse auf die männliche Fertilität. *Reproduktionsmedizin* 15: 87-95
174. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D (2004) Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in-vitro-fertilization. *Fertility and Sterility* 82: 378-83

175. Seli E, Sakkas D (2005) Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction Update* 11: 337-49
176. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction* 20: 3446-51
177. Shang XJ, Ye ZQ, Xiong CL, Huang DH, Wang YM (2003) Analysis of the changes of movement function and viability in human spermatozoa induced by reactive oxygen species. *Zhonghua Nan Ke Xue* 9: 439-42
178. Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-50
179. 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. *Human Reproduction* 14: 2801-7
180. Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL, Ong CN (1997) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reproductive Toxicology* 11: 675-80
181. Shen HM, Chia SE, Ong CN (1999) Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *Journal of Andrology* 20: 718-23
182. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction* 17: 1266-73
183. Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D (1998) Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Human Reproduction* 13: 1632-7
184. Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, Leathem AJ, Woodside JV (2002) In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 22: 227-34
185. Sikka SC (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry* 8: 851-62

186. Sikka SC (2004) Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology* 25: 5-18
187. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E (1996) Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction* 11: 1655-60
188. 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. *Fertility and Sterility* 73: 43-50
189. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D (2005) The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynaecology* 17: 255-60
190. Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman A (2006) Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Human Reproduction* 21: 3199-205
191. Stauber M, Weyerstahl T (eds) (2001) *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme, Stuttgart, 423-48
192. Steck T (ed) (2001) *Praxis der Fortpflanzungsmedizin*. Schattauer, Stuttgart New York
193. Sterzik K, Rosenbusch B, Sasse V, Wild E, Hütter W, Wolf A (1989) Der Acridine-Orange-Test: ein neuer Parameter zur Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen. *Zentralblatt für Gynäkologie* 111: 1361-7
194. Strowitzki T (ed) (1996) *Ungewollte Kinderlosigkeit. Diagnostik und Therapie von Fertilitätsstörungen*. Fischer, Stuttgart
195. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ (1995) Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertility and Sterility* 63: 1293-300
196. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ (1996) Prediction of the in-vitro-fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF. *Human Reproduction* 11: 1030-4

197. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 56: 602-7
198. Swan SH, Ekin EP, Fenster L (1997) Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environmental Health Perspectives* 105: 1228-32
199. Tarin JJ, Brines J, Cano A (1998) Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidants may protect against infertility. *Human Reproduction* 13: 1415-6
200. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and Sterility* 42: 87-91
201. Ten J, Vendrell FJ, Cano A, Tarin JJ (1997) Dietary antioxidant supplementation did not affect declining sperm function with age in the mouse but did increase head abnormalities and reduced sperm production. *Reproduction, Nutrition, Development* 37: 481-92
202. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C (1998) Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular Human Reproduction* 4: 757-62
203. Tesarik J, Mendoza C, Greco E (2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction* 17: 184-9
204. Théron P, Auger J, Legrand A, Jouannet P (1996)  $\alpha$ -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction* 2: 739-44
205. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* 16: 2160-5

206. Tramer F, Caponecchia L, Sgro P, Martinelli M, Sandri G, Panfili E, Lenzi A, Gandini L (2004) Native specific activity of glutathione peroxidase (GPx-1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and glutathione reductase (GR) does not differ between normo- and hypomotile human sperm samples. *International Journal of Andrology* 27: 88-93
207. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ (1998a) Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Molecular Human Reproduction* 4: 439-45
208. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998b) 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. *Human Reproduction* 13: 1429-36
209. Waeleghem K van, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F (1996) Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Human Reproduction* 11: 325-9
210. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR (1997) Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-5
211. 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. *Fertility and Sterility* 80: 531-5
212. Weidner W, Diedrich K, Diemer T, Kliesch S, Sperling H (2006) Infertilität – Diagnostik und Therapie. *Urologe* 45: 150-6
213. Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MGR, Ford WCL (1999) Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *International Journal of Andrology* 22: 236-42
214. Wolff H, Anderson DJ (1988a) Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertility and Sterility* 49: 497-504
215. Wolff H, Anderson DJ (1988b) Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. *Fertility and Sterility* 50: 129-32

216. Wong WY, Groenen PMW, Merkus J, Wetzels A, Braat D, Steegers-Theunissen R (1998) Evaluation of nutritional, environmental and lifestyle factors on sperm density. *Andrology in the nineties (Genk)* 4: 46
217. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2000) Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility* 73: 435-42
218. World Health Organization (1992) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York
219. World Health Organization (1999) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York
220. Yeung CH, Cooper TG, De Geyter M, De Geyter C, Rolf C, Kamischke A, Nieschlag E (1998) Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro-fertilization. *Molecular Human Reproduction* 4: 835-9
221. Zabludovsky N, Eltes F, Geva E, Berkovitz E, Amit A, Barak Y, Har-Even D, Bartoov B (1999) Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrologia* 31: 91-8
222. Zalata A, Hafez T, Comhaire F (1995) Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction* 10: 1444-51
223. Zhongxiang L, Liquan W, Jie C, Hefeng H (2006) Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 23: 367-76
224. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C (1993) Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology* 16: 183-8
225. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility* 75: 674-7

- 
226. Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K (2002) Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 60: 1069-72
227. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H (2003) Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in-vitro-fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology* 26: 279-85





# 7 Anhang

## 7.1 Standardisierte Auswertungsbögen

### 7.1.1 Spermogrammprotokoll

Name des Patienten: ..... Vorname: ..... ID.: .....

[Name der Ehefrau: ..... Vorname: .....]

Untersuchung / Datum					
Volumen [>2ml]					
pH [7,2-7,8]					
Viskosität					
Spermatozoendichte [>20 Mio/ml]					
Motilität [%]	glob. [>50]				
	progr. [>25]				
Vitalität	Eosin				
	HOS				
Morphologie [%]	normal				
	Fehlform				
	Rundzellen				
Cyturtest					
MAR-Test [+/-]					
Aufbereitungsmethode					
Dichte					
Motilität					

©KIP Seyfried

Abbildung 7-1: Standardisiertes Spermogrammprotokoll

## 7.1.2 Beurteilungsbogen zur Spermienmorphologie

Name des Patienten: ..... Vorname: ..... ID: .....

### Sperma-Morphologie





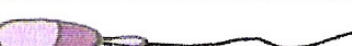
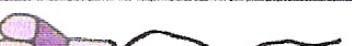




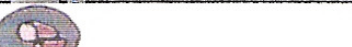
Form	Anzahl	Auswertung [%]	
vollständig normal			
K o p f a b n o r m a l i t ä t e n	amorph		
	hyper		
	hypo		
	elongiert		
	doppelt		
Kopf normal, sonst abnorm.			
Nacken und Mittelstück			
A n d e r e A b n o r m	Schwanz		
	'loose heads'		
	cytoplasm. Abnorm.		
	Präkurso-ren		

Abbildung 7-2: Standardisierter Beurteilungsbogen zur Spermienmorphologie

## 7.2 Häufig verwendete Lösungen

### 7.2.1 Phosphate Buffered Saline (PBS)

Zur Herstellung von 10 Liter 1 molarer PBS-Lösung benötigt man die folgenden in Tabelle 7-1 mit ihren zugehörigen Mengenangaben aufgeführten Reagenzien.

Tabelle 7-1: PBS-Lösung

Reagenz	Menge [g]	Zubereitung
Natriumchlorid (NaCl)	80	Die einzelnen Reagenzien werden in 10 l destilliertem Wasser gelöst.  Die PBS-Lösung ist dann im Kühlschrank bei 4 °C einige Wochen haltbar.
Kaliumchlorid (KCl)	2	
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11,5	
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2	
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O)	1,32	
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> bzw. MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O)	0,59 bzw. 1,21	

### 7.2.2 HAM'S F10

Die Herstellung eines Liters HAM'S F10-Lösung erfolgt nach der in Tabelle 7-2 beschriebenen Anleitung.

Tabelle 7-2: HAM'S F10-Lösung

Reagenz	Menge [g]	Zubereitung
HAM'S F10 (Seromed Berlin)	9,88	Die Substanzen werden in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Die gebrauchsfertige HAM'S F10-Lösung ist dann bei 4 °C circa 4 Wochen haltbar.  Zur Spermienaufbereitung werden 45 ml der HAM'S F10-Lösung mit 5 ml Humanalbumin gemischt.
Kalziumlactat (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> CaO <sub>6</sub> × 5 H <sub>2</sub> O)	0,308	
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	2,108	
Penicillin	0,075	
Streptomycin	0,075	



## Abkürzungsverzeichnis

AO	Acridine Orange
ASA	Spermienantikörper (antisperm antibodies)
CMA <sub>3</sub>	Chromomycin A <sub>3</sub>
DIR	Deutsches IVF-Register
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GMG	Gesundheitsmodernisierungsgesetz
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GV	Germinal vesicle
Hb	Hämoglobin
hCG	humanes Choriongonadotropin
hMG	humanes Menopausengonadotropin
HOP-Test	Hamsteroovum-Penetrationstest
HOS-Test	Hypoosmotischer Schwelltest
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon

M	Mittelwert
MAR-Test	Mixed Antiglobulin Reaction Test
n	Anzahl
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
OHSS	Ovarhyperstimulationssyndrom
p	Signifikanzkoeffizient
PBS	Phosphate Buffered Saline
r	Korrelationskoeffizient
ROS	Reactive Oxygen Species
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
TAS	Total Antioxidant Status
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
XOD	Xanthinoxidase

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Schematische Darstellung typischer morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen nach Kontakt mit hypoosmotischer Lösung [WHO, 1999] .....	25
Abbildung 3-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CMA <sub>3</sub> -gefärbten Spermien.....	32
Abbildung 3-3: AO-gefärbte Spermien [El-Masri, 2004] .....	34
Abbildung 3-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von TUNEL-gefärbten Spermien .....	37
Abbildung 3-5: Standardgerade zur Auswertung der SOD-Messergebnisse .....	62
Abbildung 3-6: Eizelle im Germinalstadium [Brinsden, 1999].....	66
Abbildung 3-7: Eizelle in der Metaphase I [Brinsden, 1999].....	66
Abbildung 3-8: Eizelle in der Metaphase II [Brinsden, 1999].....	67
Abbildung 3-9: Embryo im Vierzellstadium [Brinsden, 1999].....	68
Abbildung 3-10: ICSI-Prozedur [Brinsden, 1999] .....	71
Abbildung 4-1: Boxplotdarstellung der Globalmotilität nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv.....	78
Abbildung 4-2: Boxplotdarstellung der geschädigten Spermien im HOS-Test nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	78
Abbildung 4-3: Boxplotdarstellung der dekondensierten Spermien-DNA in der CMA <sub>3</sub> -Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv.....	80
Abbildung 4-4: Boxplotdarstellung der Glutathionperoxidaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	82
Abbildung 4-5: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der CMA <sub>3</sub> -Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	89
Abbildung 4-6: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte und der TUNEL-Färbung nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	90
Abbildung 4-7: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv .....	95
Abbildung 4-8: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der CMA <sub>3</sub> -Färbung nach Aufbereitung und der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	99
Abbildung 4-9: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der CMA <sub>3</sub> -Färbung nach Aufbereitung und der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	99

Abbildung 4-10: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und den geschädigten Spermien im HOS-Test nach Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	104
Abbildung 4-11: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der CMA <sub>3</sub> -Färbung vor Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	107
Abbildung 4-12: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der TUNEL-Färbung vor Aufbereitung im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	108
Abbildung 4-13: Boxplotdarstellung der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren .....	111
Abbildung 4-14: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv .....	112
Abbildung 4-15: Boxplotdarstellung der ROS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren gruppiert nach Therapieverfahren.....	113
Abbildung 4-16: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	113
Abbildung 4-17: Boxplotdarstellung der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren .....	114
Abbildung 4-18: Boxplotdarstellung der TAS-Konzentration im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren gruppiert nach Therapieverfahren.....	114
Abbildung 4-19: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und dem ROS/TAS-Quotienten im Vergleich zwischen Gesamt-, IVF- und ICSI-Kollektiv.....	115
Abbildung 4-20: Boxplotdarstellung des ROS/TAS-Quotienten im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren.....	115
Abbildung 4-21: Boxplotdarstellung der Glutathionperoxidaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren gruppiert nach Therapieverfahren .....	116
Abbildung 4-22: Boxplotdarstellung der Glutathionreduktaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren gruppiert nach Therapieverfahren.....	116
Abbildung 4-23: Boxplotdarstellung der Superoxiddismutaseaktivität im Seminalplasma im Vergleich zwischen Schwangeren und Nicht-Schwangeren gruppiert nach Therapieverfahren.....	117



---

Abbildung 7-1: Standardisiertes Spermiogrammprotokoll .....	171
Abbildung 7-2: Standardisierter Beurteilungsbogen zur Spermienmorphologie .....	172

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Nomenklatur zur Beurteilung eines Spermioogramms [nach WHO, 1999] .....	11
Tabelle 2-2: Klassifikation der Oligoasthenoteratozoospermie [nach Steck, 2001] .....	11
Tabelle 3-1: Für Spermien modifizierte Färbung nach Papanicolaou [nach WHO, 1999].....	28
Tabelle 3-2: WHO-Kriterien für die Morphologie eines normal geformten Spermiums [nach WHO, 1999].....	29
Tabelle 3-3: WHO-Kriterien für morphologische Spermiendefekte [nach WHO, 1999].....	29
Tabelle 3-4: Versuchsbedingungen am Photometer zur TAS-Messung.....	44
Tabelle 3-5: Pipettierschema und Testanleitung zur TAS-Messung.....	45
Tabelle 3-6: Zeitplan zur TAS-Messung .....	46
Tabelle 3-7: Messwerte für $\Delta A_{\text{Blank}}$ und $\Delta A_{\text{Standard}}$ .....	47
Tabelle 3-8: TAS-Ergebnis für die Kontrolle.....	47
Tabelle 3-9: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Glutathionperoxidase.....	50
Tabelle 3-10: Pipettierschema und Testanleitung zur Messung der Glutathionperoxidase.....	50
Tabelle 3-11: Zeitplan zur Messung der Glutathionperoxidase .....	51
Tabelle 3-12: GPX-Ergebnisse für den Reagent Blank und die Kontrolle .....	52
Tabelle 3-13: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Glutathionreduktase .....	54
Tabelle 3-14: Testanleitung zur Messung der Glutathionreduktase .....	54
Tabelle 3-15: Zeitplan zur Messung der Glutathionreduktase.....	55
Tabelle 3-16: GR-Ergebnisse für die Kontrollmessung .....	56
Tabelle 3-17: Standardverdünnungen zur Messung der Superoxiddismutase .....	58
Tabelle 3-18: Versuchsbedingungen am Photometer zur Messung der Superoxiddismutase.....	59
Tabelle 3-19: Testanleitung zur Messung der Superoxiddismutase.....	59
Tabelle 3-20: Erster und zweiter Messblock zur Bestimmung der Superoxiddismutase.....	60
Tabelle 3-21: Ergebnisse für die Standards im Rahmen der SOD-Messung.....	62
Tabelle 3-22: Absolute und relative Indikationen der ICSI [nach Steck, 2001] .....	69

---

Tabelle 4-1: Spermogrammparameter im Gesamtkollektiv .....	76
Tabelle 4-2: Spermogrammparameter im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	77
Tabelle 4-3: DNA-Integrität im Gesamtkollektiv .....	79
Tabelle 4-4: DNA-Integrität im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	79
Tabelle 4-5: Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma im Gesamtkollektiv .....	81
Tabelle 4-6: Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	81
Tabelle 4-7: Parameter zu Befruchtung und Transfer im Gesamtkollektiv .....	83
Tabelle 4-8: Parameter zu Befruchtung und Transfer im Vergleich zwischen IVF- und ICSI-Kollektiv .....	84
Tabelle 4-9: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermogrammparametern im Gesamtkollektiv .....	85
Tabelle 4-10: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermogrammparametern im IVF-Kollektiv .....	87
Tabelle 4-11: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Spermogrammparametern im ICSI-Kollektiv .....	88
Tabelle 4-12: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermogrammparametern im Gesamtkollektiv .....	91
Tabelle 4-13: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermogrammparametern im IVF-Kollektiv .....	93
Tabelle 4-14: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Spermogrammparametern im ICSI-Kollektiv .....	94
Tabelle 4-15: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im Gesamtkollektiv .....	96
Tabelle 4-16: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im IVF-Kollektiv .....	97
Tabelle 4-17: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Parametern der DNA-Integrität im ICSI-Kollektiv .....	98
Tabelle 4-18: Korrelationen zwischen den Spermogrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsresultaten im Gesamtkollektiv .....	101

---

Tabelle 4-19: Korrelationen zwischen den Spermogrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im IVF-Kollektiv .....	102
Tabelle 4-20: Korrelationen zwischen den Spermogrammparametern und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im ICSI-Kollektiv .....	103
Tabelle 4-21: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im Gesamtkollektiv .....	105
Tabelle 4-22: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im IVF-Kollektiv .....	106
Tabelle 4-23: Korrelationen zwischen den Parametern der DNA-Integrität und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im ICSI-Kollektiv .....	106
Tabelle 4-24: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im Gesamtkollektiv .....	109
Tabelle 4-25: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im IVF-Kollektiv .....	110
Tabelle 4-26: Korrelationen zwischen den Oxidantien- und Antioxidantienkonzentrationen im Seminalplasma und den Befruchtungs- und Schwangerschaftsergebnissen im ICSI-Kollektiv .....	111
Tabelle 7-1: PBS-Lösung .....	173
Tabelle 7-2: HAM'S F10-Lösung .....	173

## **Nachwort**

Da das Gelingen einer solchen Dissertation immer auch den Beitrag und die Unterstützung anderer erfordert, möchte ich an dieser Stelle einigen Personen meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Mohamad Eid Hammadeh, Leiter des IVF-Labors der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Themenstellung und stetige Unterstützung.

Für die Nutzung der Räumlichkeiten, sämtlicher Gerätschaften und Arbeitsmaterialien des IVF-Labors sowie die Hilfe von Seiten des Personals der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar bedanke ich mich bei dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Werner Schmidt.

Weiterhin bin ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des IVF-Labors, Frau Stefanie Seyfried und Frau Ellen Maurer, die wesentlich zum Gelingen der praktischen Untersuchungen beigetragen haben, zu Dank verpflichtet.

Dem Personal des Labors der Universitätsklinik des Saarlandes für Dermatologie, Venerologie und Allergologie unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Tilgen, insbesondere Frau Heike Palm sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums des Saarlandes unter Leitung von Prof. Dr. Eckart Meese, insbesondere Frau PD Dr. Yasmin Mehraein danke ich für die Nutzung und die freundliche Beratung im Umgang mit den dort befindlichen Arbeitsmaterialien und Geräten, im Speziellen dem Photometer sowie dem Fluoreszenzmikroskop.

Großer Dank gebührt auch meinem Kommilitonen Kai Eltges für die fachkundige Unterstützung bei den photometrischen Messungen sowie meiner Kommilitonin Veronika Koch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinem Freund Michael Friedrich für ihre Geduld, die stetige sowohl finanzielle als auch moralisch aufbauende Unterstützung während des gesamten Studiums sowie für die tatkräftige Hilfe auch im Rahmen der vorliegenden Dissertation danken.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Stephanie Zenner
Geburtsdatum	11. Oktober 1982
Geburtsort	Saarburg
Familienstand	ledig

## Schulbildung

08/89 – 07/93	Grundschule Mettlach
08/93 – 07/02	Gymnasium am Stefansberg Merzig mit Abschluss der „Allgemeinen Hochschulreife“

## Studium

10/02 – heute	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar, Ärztliche Vorprüfung am 13.09.2004
08/07 – 12/07	1. Tertial des praktischen Jahres in der Anästhesie, SHG-Klinik Merzig
12/07 – 03/08	2. Tertial des praktischen Jahres in der Inneren Medizin, SHG-Klinik Merzig
03/08 – 07/08	3. Tertial des praktischen Jahres in der Chirurgie, Stadtspital Waid Zürich, Schweiz