

Fertilität bei Chronischer Prostatitis/Chronischem Beckenschmerzsyndrom:
Untersuchungen zu Spermienqualität und Spermien-DNA-Integrität

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Berg, Elena Katharina
aus München

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

AG „Epigenetik des Urogenitalsystems“

Gutachter: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner

Gutachter: PD Dr. med. Winfried Vahlensieck

Tag der Disputation: 21.04.2022

Meinen Eltern
und Sally

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Prostatitis-Syndrom und Chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS)	1
1.2	Männliche Infertilität	6
1.3	Fertilität und urogenitale Infektionen	9
1.4	Spermien-DNA-Fragmentierung	11
1.5	Protamine und Protamin-Ratio	16
1.6	Zielsetzung und Fragestellung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Untersuchungskollektiv	21
2.1.2	Geräte	22
2.1.3	Chemikalien	23
2.1.4	Reagenzien und Puffer	24
2.1.5	Enzyme und Enzympuffer	26
2.1.6	RNA	26
2.1.7	Kits	26
2.1.8	Gebrauchsmaterialien	26
2.1.9	Software	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Probengewinnung und Transport	28
2.2.2	Aufbereitung des Ejakulats	28
2.2.3	Ejakulatdiagnostik	28
2.2.4	Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)	29
2.2.5	RNA Isolation	32
2.2.6	DNase I Verdau	33
2.2.7	Reverse Transkription	33
2.2.8	Aufreinigung der cDNA	34
2.2.9	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.10	Positiv-Kontrolle	36
2.2.11	Agarose Gelelektrophorese	37
2.2.12	Auswertung	37
2.2.13	Hormonmessungen	37
2.2.14	Fragebögen	37
2.2.15	Statistische Auswertung	37

3	Ergebnisse	39
3.1	Ejakulatanalyse.....	40
3.1.1	Ejakulatvolumen und pH.....	40
3.1.2	Spermiengesamtzahl und –konzentration	41
3.1.3	Spermienmotilität.....	42
3.1.4	Spermienmorphologie.....	44
3.1.5	Spermien Vitalität.....	45
3.1.6	Peroxidase-positive Leukozyten und unreife Spermatogenesezellen.....	46
3.1.7	Biochemische Parameter.....	47
3.2	Spermien-DNA-Fragmentierung	49
3.2.1	Patienten vs. Kontrollen.....	50
3.2.2	Assoziation zwischen DFI und weiteren Spermienparametern in der Patientengruppe	52
3.2.3	Alters-Adjustierung	53
3.3	High DNA Stainability	54
3.3.1	Patienten vs. Kontrollen.....	54
3.3.2	Assoziation zwischen HDS und weiteren Spermienparametern in der Patientengruppe	56
3.4	Protamin 1/2 mRNA Ratio.....	57
3.4.1	Patienten vs. Kontrollen.....	57
3.4.2	Assoziation zwischen der Protamin 1/2 mRNA Ratio und weiteren SpermioGrammparametern in der Patientengruppe.....	59
3.5	DFI, HDS, Protamin 1/2 mRNA Ratio in Abhängigkeit von Entzündungsparametern	59
3.6	Hormone in der Patientengruppe	61
3.7	Klinisch – andrologische Charakteristika	61
3.8	Übersicht über Zusammenhänge von DFI, HDS, Protamin 1/2 mRNA Ratio mit weiteren Parametern in der Patientengruppe.....	64
4	Diskussion.....	65
4.1	Patientenkollektiv	65
4.2	Auswirkungen von CP/CPPS auf SpermioGrammparameter	65
4.3	Auswirkungen von CP/CPPS auf Spermien-DNA-Fragmentation.....	71
4.4	Auswirkungen von CP/CPPS auf High DNA Stainability	75
4.5	Auswirkungen von CP/CPPS auf die Protamin 1/2 mRNA Ratio	76
4.6	Klinische Aspekte	79

4.7	Auswirkungen von CP/PPS auf Spermienqualität und Spermien-DNA-Integrität und Ausblicke.....	79
5	Zusammenfassung	81
6	Summary English.....	82
7	Abkürzungsverzeichnis.....	83
8	Abbildungsverzeichnis.....	85
9	Tabellenverzeichnis.....	88
10	Literaturverzeichnis	90
11	Publikationsverzeichnis.....	100
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	101
13	Danksagung.....	102

1 Einleitung

1.1 Prostatitis-Syndrom und Chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS)

Erkrankungen der Prostata stellen einen bedeutsamen Ursprung männlicher Morbidität dar und nehmen eine zentrale Stellung im Fachgebiet Urologie ein. Neben dem Prostatakarzinom als häufigstem Malignom des Mannes sowie der einen Großteil der Männer im Alter betreffenden benignen Prostatahyperplasie (BPH) stellt das Prostatitis-Syndrom eine weitere, klinisch relevante Entität dar. Das Prostatitis-Syndrom umfasst verschiedene Erkrankungsformen unterschiedlicher Ätiologie und vielseitiger klinischer Präsentation. Es wird von einer Prävalenz von etwa 8,2 % für Prostatitis-Syndrom assoziierte Symptome ausgegangen, vergleichbar mit der Prävalenz von „Volkserkrankungen“ wie Diabetes mellitus oder der koronaren Herzkrankheit (Krieger et al., 2008). Auch ist das Prostatitis-Syndrom Grund für etwa 8 % der Vorstellungen bei Urologen und 1 % der Vorstellungen bei Allgemeinmedizinem (Collins et al., 1998). Die Erkrankung kann bei Männern aller Altersgruppen auftreten, wobei die Prävalenz zwischen 36 und 50 Jahren am höchsten ist (Schaeffer, 2008).

Eine Klassifikation in verschiedene Kategorien erfolgt nach den National Institutes of Health (NIH; Tab. 1) und unterscheidet die akute bakterielle Prostatitis (NIH Kategorie I, ABP), die chronische bakterielle Prostatitis (NIH Kategorie II, CBP), die chronische Prostatitis/chronisches Beckenschmerzsyndrom (NIH Kategorie III, CP/CPPS; Unterkategorien IIIA: entzündliches CPPS und IIIB: nicht-entzündliches CPPS) sowie die asymptomatische Prostatitis (NIH Kategorie IV) (Krieger, Nyberg und Nickel, 1999). Während bei der akuten und chronischen bakteriellen Prostatitis ein erregerbedingtes Geschehen zugrunde liegt, findet sich beim CP/CPPS bislang kein mikrobiologisches Korrelat. Die asymptomatische Prostatitis ist durch das Bestehen einer Entzündung der Prostata ohne klinische Symptomatik definiert. Bakterielle Formen liegen bei unter 10 % der Patienten vor, während bei über 90 % ein CP/CPPS besteht (Wagenlehner et al., 2009). Studienabhängig wird sogar von einer Prävalenz allein des CP/CPPS von 10-16 % berichtet (Schaeffer, 2008). Ein Übergang einer akuten bakteriellen Prostatitis in eine chronisch bakterielle Prostatitis oder ein CP/CPPS ist möglich. So zeigt sich in etwa 10 % der Fälle der Übergang einer ABP in ein CP/CPPS IIIA (Yoon et al., 2012).

Tabelle 1 NIH Klassifikation (Krieger, Nyberg und Nickel, 1999) und Häufigkeit der Kategorien

NIH Klassifikation des Prostatitis-Syndroms		Häufigkeit (Schneider <i>et al.</i> , 2003)
I	akute bakterielle Prostatitis	nicht bekannt
II	chronische bakterielle Prostatitis	5-10 %
III	chronische Prostatitis/ chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS)	
III A	entzündliches CP/CPPS	30-40 %
III B	nicht-entzündliches CP/CPPS	60-70 %
IV	asymptomatische Prostatitis	nicht bekannt

Die akute bakterielle Prostatitis entsteht in der Mehrzahl der Fälle spontan, sowie nach Manipulation, wie z.B. einer transrektalen Prostatastanzbiopsie. Dabei stellt die intrakanalikuläre Aszension den Hauptinfektionsweg dar. Sie präsentiert sich durch obstruktive und irritative Symptome mit systemischer Beteiligung und dem Risiko der Entwicklung von Komplikationen wie Urosepsis oder eines Prostataabszesses. Die chronische bakterielle Prostatitis entsteht typischerweise auf dem Boden einer Harnwegsinfektion, das Erregerspektrum entspricht dem komplizierter Harnwegsinfektionen. Die klinische Präsentation ähnelt der des CP/CPPS, weshalb zu deren Differenzierung die 4- oder 2-Gläser-Probe zur Anwendung kommt. Hierbei soll die Keimzahl im Prostataexprimat beziehungsweise Exprimaturin um ein 10-faches höher als im Mittelstrahlurin liegen, sowie Leukozyten und weitere Entzündungsparameter nachweisbar sein. Bei beiden bakteriell bedingten Formen kommen therapeutisch Antibiotika zum Einsatz, Komplikationen sollen entsprechend therapiert werden (Krause et al., 2011; Wagenlehner et al., 2009).

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Formen besteht bei CP/CPPS kein unmittelbarer Nachweis einer bakteriellen Ursache. Die Ätiologie ist somit nicht abschließend geklärt, und es werden unterschiedliche pathogenetisch bedeutsame Mechanismen diskutiert. Zum einen wird eine stattgehabte Infektion als mögliche Ursache diskutiert. Hier wird von der Möglichkeit einer Infektion mit nichtkultivierbaren Organismen berichtet (Wagenlehner et al., 2009). Des Weiteren wird beschrieben, dass eine initiale Infektion den Auslöser für die Entstehung einer chronischen Entzündung bilden kann (Breser et al., 2017). Dieser chronischen Entzündung könnten auch (Auto-)Immunprozesse zugrunde liegen. So konnten sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten immunologische Dysbalancen mit autoreaktiven Komponenten, erhöhten inflammatorischen Zytokinen und Immunglobulinen, Mastzellmediatoren und weiteren immunologischen Komponenten nachgewiesen werden (Breser et al., 2017). Weiterhin konnten Parallelen zur interstitiellen Zystitis festgestellt

werden, sodass auch uroepitheliale Dysfunktionen als pathogenetisch relevant diskutiert werden. Auch mechanische Einflüsse, wie eine funktionelle subvesikale Obstruktion mit konsekutivem Reflux von Urin in die Prostatagänge oder eine muskuläre Dysfunktion des Beckenbodens mit Muskelspasmen werden ursächlich beziehungsweise als Folge der Erkrankung in Betracht gezogen (Wagenlehner et al., 2009). Darüber hinaus stellen neuropathischer Schmerz, neuroendokrine Assoziationen sowie psychosomatische Merkmale weitere bedeutsame Komponenten dar (Shoskes und Nickel, 2013). Interessanterweise wiesen neue Erkenntnisse bei der Untersuchung des Mikrobioms von CP/CPPS Patienten in einer Studie mitunter auf ein verändertes, weniger diverses Mikrobiom des Darms bei CP/CPPS hin. Die Autoren schlossen hier eine Rolle dessen in der Ätiologie nicht aus (Arora, Eng und Shoskes, 2017).

Insgesamt konnte kein einzelner, entscheidender Faktor ausgemacht werden, weshalb am ehesten von einer multifaktoriellen Genese durch Kombination mehrerer der genannten Faktoren ausgegangen wird (Shoskes und Nickel, 2013). Eine Übersicht über Mechanismen und mögliche Zusammenhänge gibt Abbildung 1.

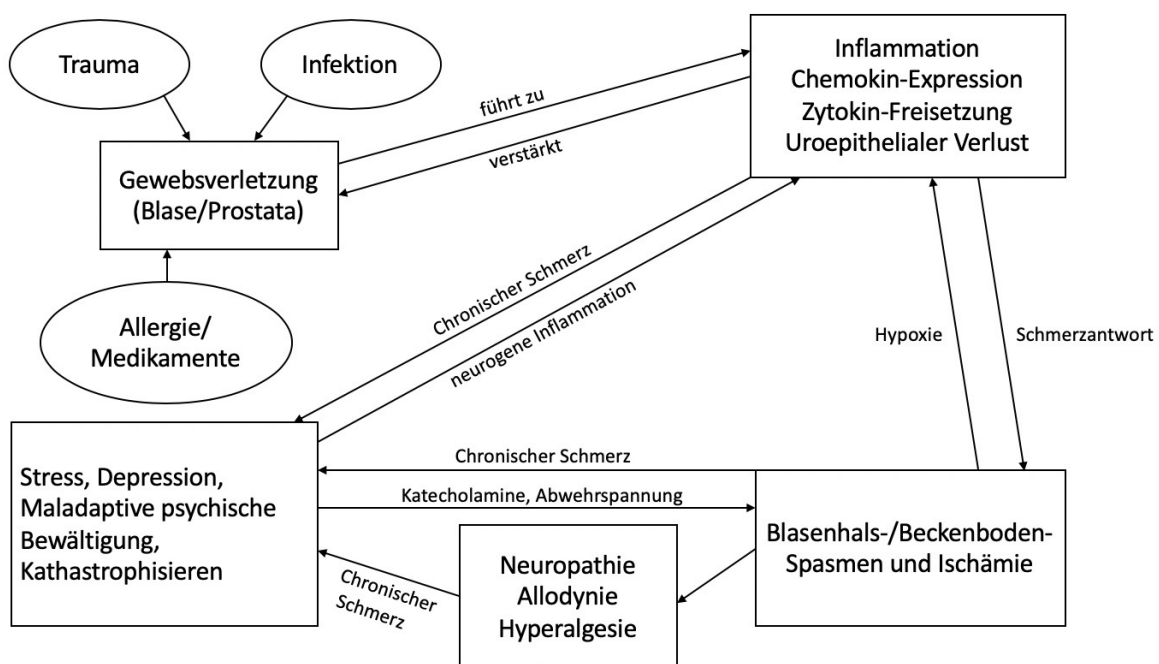


Abbildung 1: Multifaktorielle Pathogenese bei CP/CPPS (modifiziert nach Shoskes und Nickel, 2013).

Die klinische Präsentation des CP/CPPS umfasst eine große Bandbreite an Symptomen in unterschiedlicher Ausprägung. Gefordert ist ein Bestehen der Symptomatik über mindestens drei Monate innerhalb der letzten sechs Monate (Krause et al., 2011). Hierbei stellt der Schmerz im Urogenital-, Anorektal- und Beckenbereich zumeist ein Hauptsymptom dar. Die häufigste Schmerzlokalisation ist das Perineum, gefolgt von

Schmerz im Hodenbereich, Schmerz bei Ejakulation, Dysurie, Schmerzen im Schambereich sowie im Bereich der Penisspitze (Wagenlehner et al., 2012). Des Weiteren bestehen häufig Lower-Urinary Tract Symptoms (LUTS) im Sinne obstruktiver und irritativer Miktions Symptome. Bei etwa 39-68 % der Patienten besteht ≥ 1 LUTS Symptom (Rees et al., 2015). Auch sexuelle Dysfunktion, insbesondere Ejaculatio praecox, erektile Dysfunktion und verminderte Libido können Teil der Symptomatik sein und werden von 46-92 % der Patienten berichtet. Es besteht zudem eine Assoziation zu psychosozialen Symptomen wie Depression, Angst- und Panikstörungen, sowie einer subjektiv verminderten Lebensqualität (Rees et al., 2015). Berichtet wird sogar von einer vergleichbar eingeschränkten Lebensqualität wie in fortgeschrittenen Stadien bei Herzinsuffizienz oder Diabetes mellitus (McNaughton Collins et al., 2004).

Diagnostisch sind die körperliche Untersuchung sowie der differentialdiagnostische Ausschluss anderer Erkrankungen unumgänglich. Differentialdiagnostische Überlegungen schließen mitunter Harnwegsinfektionen, Malignome, Prostataabszesse, Epididymo-Orchitis, BPS, Urethrastrikturen, neurologische Erkrankungen oder Urogenitaltuberkulose ein (Rees et al., 2015). Im Rahmen der Diagnostik kommt der NIH-Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) zur Anwendung, welcher sowohl initial einen Überblick über die bestehende Symptomatik und deren Ausprägung gibt, als auch als Verlaufsparemeter im Rahmen der Therapie von Bedeutung ist. Der Fragebogen gibt die Symptomausprägung in den drei Kategorien Schmerz, Miktions und Lebensqualität wieder, wobei die Kategorie „Schmerz“ am besten zwischen der Diagnose CP/PPS und anderen Erkrankungen unterscheidet (Wagenlehner et al., 2009). Zudem haben die Schmerzintensität und -häufigkeit den größten Einfluss auf die Domäne Lebensqualität (Wagenlehner et al., 2012). Zur Klärung weiterer Symptome kommen zudem andere standardisierte Fragebögen zur Anwendung, so beispielsweise der International Prostate Symptom Score (IPSS) zur Evaluation prostatisch bedingter Miktionsbeschwerden, oder der International Index of Erectile Function (IIEF-5) zur Erfassung des Symptoms sexuelle Dysfunktion (Magistro et al., 2016; Rees et al., 2015). Ein maßgebliches Element der CP/PPS Diagnostik ist weiterhin die 4- oder 2-Gläser-Probe. Hierbei werden Erst- und Mittelstrahlurin sowie Prostataexpressat und Expressaturin nach Prostatamassage, beziehungsweise Erst- und Expressaturin untersucht. Es erfolgt zudem die Klassifizierung in ein entzündliches und nicht-entzündliches Beckenschmerzsyndrom, je nach Vorhandensein von Leukozyten im Expressaturin. Weitere diagnostische Instrumente stellen die Uroflowmetrie sowie gegebenenfalls weitere urodynamische und bildgebende Verfahren, bakterielle Kultur, Ejakulatuntersuchung, Hormonbestimmungen und psychosomatische Evaluation dar (Magistro et al., 2016).

Aufgrund seiner Heterogenität und der nicht abschließend geklärten Ätiologie ist das Krankheitsbild therapeutisch schwer fassbar und es hat bisher kein monotherapeutischer Ansatz eindeutige Vorteile zeigen können (Shoskes und Nickel, 2013). Vielmehr wird daher ein individuelles und multimodales Therapiekonzept angestrebt (Magistro *et al.*, 2016). Therapieoptionen umfassen die Gabe von α -Rezeptor-Antagonisten, antimikrobielle Therapien, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), hormontherapeutische und neuromodulierende Verfahren, Phytotherapie, physikalische Therapie und psychosomatische Ansätze (Wagenlehner *et al.*, 2009; Nickel, Shoskes und Wagenlehner, 2013; Magistro *et al.*, 2016). Um Therapieoptionen zielgerichteter nutzen zu können und die heterogene Patientengruppe in Symptomschwerpunkte stratifizieren zu können, ist die UPOINTS-Phänotypisierung sinnvoll, welche in Tabelle 2 dargestellt ist (Shoskes *et al.*, 2009; Shoskes und Nickel, 2013). UPOINTS umfasst sieben Symptomkomplex-Domänen: Urinary, Psychosocial, Organ specific, Infection, Neurologic/Systemic, Tenderness, Sexual Dysfunction. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl an positiven Domänen sowohl mit der Symptomintensität in Form eines höheren NIH-CPSI Gesamtscores, als auch mit der Dauer der Symptomatik positiv korreliert (Shoskes *et al.*, 2009). Im Rahmen der Diagnostik können somit positive Domänen ermittelt und auf diese ausgerichtete Therapiestrategien angewandt werden (Shoskes und Nickel, 2013).

Tabelle 2 UPOINTS-Phänotypisierung (modifiziert nach Magistro *et al.*, 2016)

Domäne	Symptomatik	Therapiemöglichkeit
Urinary	Obstruktive/ irritative Symptome, signifikante Restharmengen	α -Blocker, anti-muskarinerge Substanzen
Psychosocial	Depression, Angststörungen	Verhaltenstherapie, psychologische Mitbehandlung, Antidepressiva, Anxiolyse
Organ specific	Druckempfindlichkeit der Prostata, Leukozyten im Prostatasekret, Hämatospermie, Kalzifizierung, Obstruktion	Quercetin, Pollenextrakt

Infection	Positive Prostatasekret-Bakterienkulturen, vorangegangene Harnwegsinfektionen	Antibiotika
Neurologic/Systemic	Beckenübergreifende Schmerzen, Reizdarmsyndrom, Fibromyalgie, Chronisches Fatigue Syndrom	Gabapentin, Trizyklische Antidepressiva, Akupunktur
Tenderness	Beckenbodendysfunktion, Muskel-Trigger-Punkte	Physiotherapie, Beckenbodenrelaxation, Muskelrelaxantien, Wärmetherapie
Sexual Dysfunction	Erektile Dysfunktion, Ejakulations- und Orgasmusstörungen, Libidoverlust	PDE-5-Inhibitoren, Schwellkörperinjektionen, intraurethrale Agentien, Verhaltenstherapie, SSRI, topische Agentien

Insgesamt machen die hohe Prävalenz des CP/CPPS, die bislang nicht vollständig geklärte Ätiologie und Pathogenese, die Heterogenität der Patientengruppe, die Komplexität von Symptomatik und Diagnostik sowie die Notwendigkeit zu individuell angepassten Therapieschemata das Krankheitsbild zu einem relevanten Gegenstand urologischer Forschung.

1.2 Männliche Infertilität

Definitionsgemäß besteht ein unerfüllter Kinderwunsch, wenn bei einem Paar nach einem Jahr ungeschützten, regelmäßigen Geschlechtsverkehrs keine Schwangerschaft eingetreten ist (Rowe und World Health Organization, 1993). Die Dauer des Kinderwunsches ist auch prognostisch von Bedeutung, so liegt die Spontanschwangerschaftsrate bei ungeschütztem Geschlechtsverkehr im ersten Jahr noch bei 84 %, im zweiten Jahr bei 49 % und im dritten Jahr nur noch bei 14 % (Te Velde, Eijkemans und Habbema, 2000). Um eine primäre Infertilität handelt es sich, wenn noch zu keinem Zeitpunkt eine Schwangerschaft eingetreten ist, um eine sekundäre Infertilität, wenn

es vormals bereits zu einer Schwangerschaft kam (Rowe und World Health Organization, 1993). Die Prävalenz von unerfülltem Kinderwunsch wird mit etwa 15 % angegeben (Weidner *et al.*, 2002; aktualisierte Version von Junwirth *et al.*, 2018). Die Ätiologie ist vielfältig und bei beiden Geschlechtern zu suchen. Schätzungsweise liegen die Gründe zu je 50 % ursächlich oder als Kofaktor auf weiblicher beziehungsweise männlicher Seite. Bei etwa einem Drittel der Paare besteht eine idiopathische Infertilität bei normwertigen Befunden (Kliesch, 2017). Nicht zuletzt aus diesem Grund ist eine interdisziplinäre Betreuung infertiler Paare von großer Bedeutung. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die möglichen Ursachen männlicher Infertilität.

Tabelle 3 Ursachen männlicher Infertilität (modifiziert nach Harth, Brähler, Schuppe, 2012)

Hypothalamisch-hypophysäre Störungen	• Hypogonadotroper Hypogonadismus • Hypopituitarismus • Hyperprolaktinämie
Androgen-Resistenz	• Androgenrezeptor-Mutationen • 5α-Reduktase-Mangel
Testeschäden	• Genetische Störungen • Malescensus testis • Infektionen/Entzündungen • Varikozele • Stoffwechselerkrankungen und systemische Erkrankungen • Spermatogenese-schädigende Umweltfaktoren (Hitze, Strahlung etc.) • Medikamente • Onkologische Therapien • Hodentumor • Idiopathische Störungen
Posttestikuläre Faktoren	• Obstruktion • Infektionen/Entzündungen • Nebenhodenfunktionsstörungen • Spermatozoen-Antikörper

	Erektions- und Ejakulationsstörungen, anatomische Fehlbildungen
--	---

Neben (Paar-)Anamnese und andrologischer Anamnese, körperlicher sowie gegebenenfalls apparativer Untersuchung(en) und endokrinologischer Diagnostik stellt nach wie vor das Spermogramm nach WHO-Kriterien den Kern der Diagnostik dar (Kliesch, 2017). Bei speziellen Fragestellungen oder entsprechenden Hinweisen können zusätzlich Spermienfunktionstests oder eine mikrobiologische Diagnostik erfolgen. Im Folgenden sind die Parameter und Referenzwerte eines Basis-Spermogramms sowie von biochemischen Ejakulatparametern dargestellt (Tab. 4).

Tabelle 4 Parameter des Basis-Spermogramms mit Referenzwerten und 95 % Konfidenzintervall (modifiziert nach World Health Organization and Department of Reproductive Health and Research, 2010)

Ejakulatvariable	(Unterer) Referenzwert (95 % CI)
Volumen (ml)	1,5 (1,4-1,7)
pH	7,2
Verflüssigungszeit (min)	15-60
Gesamtspermatozoenzahl ($\times 10^6$ /Ejakulat)	39 (33-46)
Spermatozoenkonzentration ($\times 10^6$ /ml)	15 (12-16)
Gesamtmotilität (PR+NP; %)	40 (38-42)
Progressive Motilität (PR; %)	32 (31-34)
Morphologie (%)	4 (3,0-4,0)
Vitalität (%)	58 (55-63)
Weitere Grenzwerte	
Peroxidase-positive Leukozyten ($\times 10^6$ /ml)	$\leq 1,0$
Fruktose (μmol /Ejakulat)	≥ 13
α -Glukosidase (mU/Ejakulat)	≥ 20
Zink (μmol /Ejakulat)	$\geq 2,4$

Die Therapie beziehungsweise das Management bei Infertilität richtet sich zunächst nach den auslösenden Faktoren, insofern diese identifiziert werden können. Neben präventiven

oder kausalen Therapiemöglichkeiten wie Kryokonservierung, medikamentöser (Substitutions-)Therapie und operativen Verfahren stehen bei entsprechender Indikation nicht-kausale Therapieoptionen in Form von Methoden der assistierten Reproduktion (ART) zur Verfügung. Eine Übersicht (nach Kliesch, 2017) über mögliche Verfahren je nach Befund ist in Abbildung 2 dargestellt.

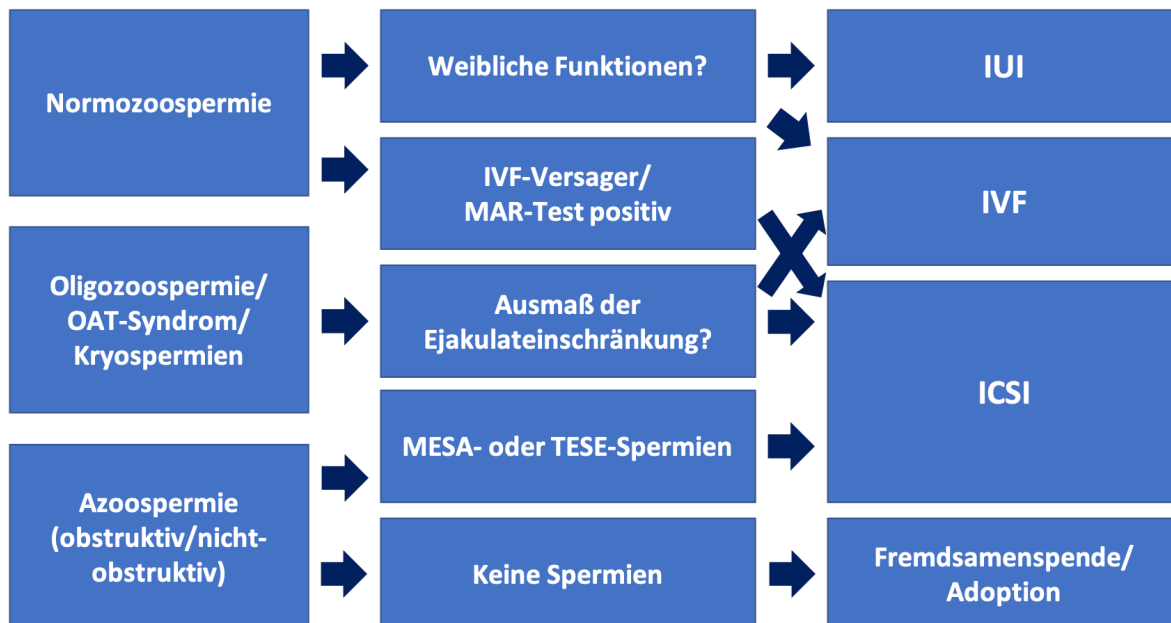


Abbildung 2: Möglichkeiten der assistierten Reproduktion in Abhängigkeit von der männlichen Indikation (modifiziert nach Kliesch, 2017).

1.3 Fertilität und urogenitale Infektionen

Wie oben beschrieben sind auch urogenitale Infektionen in der Lage, die Fertilität zu beeinflussen und stellen eine gegebenenfalls reversible Ursache dar. So wird für infektionsbedingte männliche Fertilitätsstörungen eine Prävalenz von 6-10 % angegeben (Tüttelmann und Nieschlag, 2009). Die Beeinflussung der Fertilität durch Infektionen kann über unterschiedliche Mechanismen zustande kommen. So ist eine direkte Beeinflussung der Spermatogenese, Spermienintegrität beziehungsweise Spermienfunktion durch Erreger oder Erregerbestandteile möglich. Zudem sind Immunantworten, welche die spezifische Immunregulation des Hodens negativ beeinflussen, Entzündungsmediatoren, unter anderem reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), sowie Anti-Spermatozoen-Antikörper (ASA) in der Lage, eine direkte oder indirekte Schädigung zu verursachen. Weitere Mechanismen schließen infektionsbedingte Fehlfunktionen der akzessorischen Drüsen sowie anatomische oder funktionelle Störungen der Samenwege ein (Schuppe *et al.*, 2017). Bei Patienten mit Epididymitis beziehungsweise Epididymo-Orchitis konnte im akuten Krankheitsstadium ein deutlicher Abfall der Spermienkonzentration, -motilität und -

morphologie beobachtet werden. Als ursächlich werden eine direkte Spermatogeneseschädigung durch ein Übergreifen der Inflammation auf den Hoden beziehungsweise eine konsekutive Obstruktion der Samenwege diskutiert. Die Befunde zeigen sich im Verlauf innerhalb von drei bis sechs Monaten größtenteils regredient, jedoch resultiert bei 10 % der Patienten eine Azoospermie, bei weiteren 30 % eine Oligozoospermie, und bedeutet daher in der Summe bei 40 % eine potenzielle Subbeziehungsweise Infertilität (Rusz, Pilatz, Wagenlehner, Linn, Diemer, *et al.*, 2012; Pilatz *et al.*, 2016). In einer weiteren Studie zeigten sich qualitative Veränderungen der Spermien auf Proteinebene, welche auch bei Patienten mit regelrechten SpermioGrammparametern auftraten und ebenfalls zum Entstehen einer Sub- oder Infertilität beitragen könnten (Pilatz *et al.*, 2014). In Bezug auf die isolierte Orchitis, ätiologisch zumeist im Rahmen einer systemischen, viralen Infektion, berichten Studien ebenfalls von Einschränkungen der Ejakulatqualität ähnlich des akuten Stadiums der Epididymo-Orchitis. Allerdings ist die Studienlage durch die Seltenheit von primär akuten, symptomatischen, isolierten Orchitiden recht heterogen (Pilatz *et al.*, 2016; Schuppe *et al.*, 2017).

Eine uneinheitliche Studienlage zeigt sich auch in Bezug auf die Fertilität bei chronischer Prostatitis. Für die chronisch bakterielle Prostatitis existieren bislang nur wenige Studien, welche die Auswirkungen auf die einzelnen Spermienparameter untersuchten. Zum Teil wurden hier negative Einflüsse, insbesondere auf Spermienmotilität und Spermienmorphologie, beschrieben (Pilatz *et al.*, 2016). Eine Metaanalyse von Condorelli *et al.* berichtete zudem von einer verminderten Spermienvitalität, totaler sowie progressiver Motilität (Condorelli *et al.*, 2017). Insgesamt vermuteten Pilatz *et al.* in Anbetracht der schwachen Studienlage allerdings einen höchstens geringen negativen Effekt auf Spermienparameter (Pilatz *et al.*, 2016).

Auch die Studienlage zum Einfluss von CP/CPPS auf die Fertilität bleibt uneinheitlich. So konnten Studien zum Teil keinen Einfluss auf die Standard-Spermienparameter nachweisen, zugleich berichteten andere Studien von signifikanten Einflüssen, häufig insbesondere die Spermienmotilität und -morphologie betreffend (Rusz, Pilatz, Wagenlehner, Linn, Diemer, *et al.*, 2012). Auch eine Metaanalyse von Fu *et al.* konnte zeigen, dass insbesondere Spermienmorphologie, progressive Motilität sowie zusätzlich die Spermienkonzentration bei CP/CPPS signifikant reduziert sind (Fu *et al.*, 2014). Obengenannte Metaanalyse von Condorelli *et al.* zeigte zudem ein vermindertes Ejakulatvolumen, sowie ebenfalls eine verminderte Spermienkonzentration, progressive Motilität und eingeschränkte Spermienmorphologie bei CP/CPPS. Bemerkenswerterweise wurde hier auch von einer geringeren Zink-Konzentration im Seminalplasma sowie einem erhöhten Vorkommen von Spermienantikörpern bei Patienten mit CP/CPPS berichtet (Condorelli *et al.*, 2017). Bei Schagdarsurengin *et al.* zeigte sich eine signifikante

Assoziation von CP/CPPS mit reduzierter progressiver Spermienmotilität und Gesamtmotilität, Spermienmorphologie und einem niedrigeren pH des Ejakulats. Die Studie berichtete zudem von einem erhöhten Anteil an unreifen Spermatozoen sowie signifikant erhöhten Leukozytenzahlen im Ejakulat (Schagdarsurengin et al., 2017). Eine Arbeit von Henkel et al. untersuchte, ob die Akrosomreaktion bei CP/CPPS beeinflusst ist, wobei sich eine geringere Induzierbarkeit und erhöhte spontane Akrosomreaktion zeigten (Henkel et al., 2006).

1.4 Spermien-DNA-Fragmentierung

Im Zentrum der Evaluation männlicher Fertilität steht diagnostisch die Ejakulatuntersuchung mittels Basis-Spermiogramm. Trotz der hierbei ermittelten, häufig wegweisenden Befunde bietet das Spermiogramm keine endgültige Sicherheit bei der Diskriminierung zwischen fertil und infertil. So zeigen etwa 15 % der Patienten mit „male factor infertility“ ein unauffälliges Ergebnis. Auch kann das Spermiogramm alleine keine prädiktiven Informationen über mögliche Erfolge bei Durchführung einer assistierten Reproduktion liefern (Schulte et al., 2010). Daher hat sich neben dieser Standard-Diagnostik in den letzten Jahren der Fokus auf weitere fertilitätsrelevante Aspekte, mitunter auch auf die Untersuchung von Spermien auf molekularer Ebene ausgeweitet. Hierzu zählt auch die Bestimmung der DNA-Integrität in Spermien. Ein Hauptparameter ist die Spermien-DNA-Fragmentierung (SDF), definiert als Einzel- und Doppelstrangbrüche in nukleärer DNA (Evenson, 2016).

Die Ätiologie dieser Strangbrüche kann multifaktoriell bedingt sein und auf unterschiedlichen Ebenen im Reifungsprozess oder bei ausdifferenzierten Spermien entstehen, wobei ein gewisses Maß an Strangbrüchen physiologisch besteht (González-Marín, Gosálvez und Roy, 2012). Ätiologisch sind sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren von Bedeutung. Zu den intrinsischen Faktoren werden insbesondere eine fehlerhafte Spermien-Reifung bzw. Chromatin-Verpackung sowie die abortive Apoptose gezählt.

Bei der Spermienreifung sind temporäre DNA-Strangbrüche notwendig, um die Torsionsspannung bei Kompaktierungsvorgängen zu reduzieren und Chromatin im Rahmen der Histon-Protamin-Transition zu lockern. Dies erfolgt durch Histon-Hyperacetylierung und das Einführen von Strangbrüchen durch die DNA Topoisomerase II, welche im weiteren Verlauf auch für die Reparatur der Strangbrüche verantwortlich ist. Bleibt der Reparaturvorgang aus, bestehen die Strangbrüche weiterhin und es kommt vermehrt zu DNA-Fragmentierung (Paasch, Grunwald und Glander, 2007; Schulte et al., 2010; González-Marín, Gosálvez und Roy, 2012).

Eine weitere Theorie zur Entstehung von DNA-Schäden in Spermien ist die der abortiven Apoptose. Im Hoden dient die Apoptose der Beschränkung der Zellzahl, Steuerung der Betreuungskapazität der Sertoli-Zellen und zur selektiven Elimination von nicht reifungsfähigen Zellen. Reguliert wird dies vermutlich mitunter über den Fas-Rezeptor auf Keimzellen und den Liganden FasL, welcher von Sertoli-Zellen exprimiert wird. Da Infertilitätspatienten häufig einen erhöhten Anteil an Fas+ Spermien, sowie vermehrt weitere Apoptosemarker zeigen, wird vermutet, dass bei diesen eine unvollständige Form der Apoptose mit konsekutiven DNA-Schäden stattfindet (Paasch, Grunwald und Glander, 2007; Schulte *et al.*, 2010; González-Marín, Gosálvez und Roy, 2012; Aitken und Baker, 2013).

Neben diesen intrinsischen Faktoren besteht Anhalt dafür, dass in epididymalen und ejakulierten Spermien mehr DNA-Schäden vorkommen als in testikulären. Daher scheinen zudem extrinsische Faktoren und hierbei insbesondere oxidativer Stress durch vermehrtes Vorkommen von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von Bedeutung zu sein. So waren unter infertilen Männern bei etwa 25 % erhöhte ROS-Level im Ejakulat nachweisbar (Schulte *et al.*, 2010). Reaktive Sauerstoffspezies sind oxidativ wirksame, hochreaktive freie Radikale. Sie spielen eine Rolle in der normalen Spermatozoenfunktion, mitunter bei Kapazitation und Akrosomreaktion, und werden hier von Spermatozoen selbst gebildet. (Paasch, Grunwald und Glander, 2007). Oxidativer Stress entsteht, wenn ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Substanzen vorherrscht. Ursächlich für eine überhöhte ROS-Produktion sind insbesondere Leukozyten sowie - in geringerem Maße - unreife Spermatozoen (Schulte *et al.*, 2010). Die Plasmamembran eines Spermiums ist besonders vulnerabel gegenüber ROS. Dies liegt darin begründet, dass sie einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren enthält. Durch deren Oxidation kann es zum Verlust der Membranintegrität, zu Permeabilitätsungleichgewichten und konsekutiven Schäden von zellulären Komponenten, sowohl nukleärer als auch mitochondrialer DNA sowie Apoptose kommen (Gharagozloo und Aitken, 2011; Walczak-Jedrzejowska, Wolski und Slowikowska-Hilczer, 2013). Zu hohe ROS-Level begünstigen daher DNA-Schäden in Form von Basenaddukten, Einzel- und Doppelstrangbrüchen. So zeichnet sich eine positive Korrelation zwischen ROS und DNA-Fragmentation ab (Schulte *et al.*, 2010). Da Spermatozoen oxidativem Stress insbesondere im Nebenhoden sowie beim Transport im Seminalplasma ausgesetzt sind, greifen Reparaturmechanismen häufig nicht mehr. Eine letzte Möglichkeit zur DNA-Reparatur besteht durch die Oozyte, wobei auch diese nur in eingeschränktem Maße hierzu fähig ist. Bei ejakulierten Spermatozoen bieten daher die kompakte Verpackung der DNA sowie antioxidative Komponenten des Seminalplasmas Schutz vor ROS. Es besteht somit eine enge Verbindung zwischen der effektiven

Protamination und durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden (Cho und Agarwal, 2018).

Neben den genannten molekularen Mechanismen gibt es multiple extrinsische Gründe, welche in Zusammenhang mit diesen stehen und kausal oder beeinflussend mit einwirken. Eine Übersicht ist in Abbildung 3 gezeigt. Zudem ist zu beachten, dass in den meisten Fällen nicht ein einzelner Mechanismus für die Entstehung von erhöhter Spermien-DNA-Fragmentation verantwortlich ist, sondern am ehesten eine Kombination aus obengenannten Mechanismen (Aitken und De Iuliis, 2009).

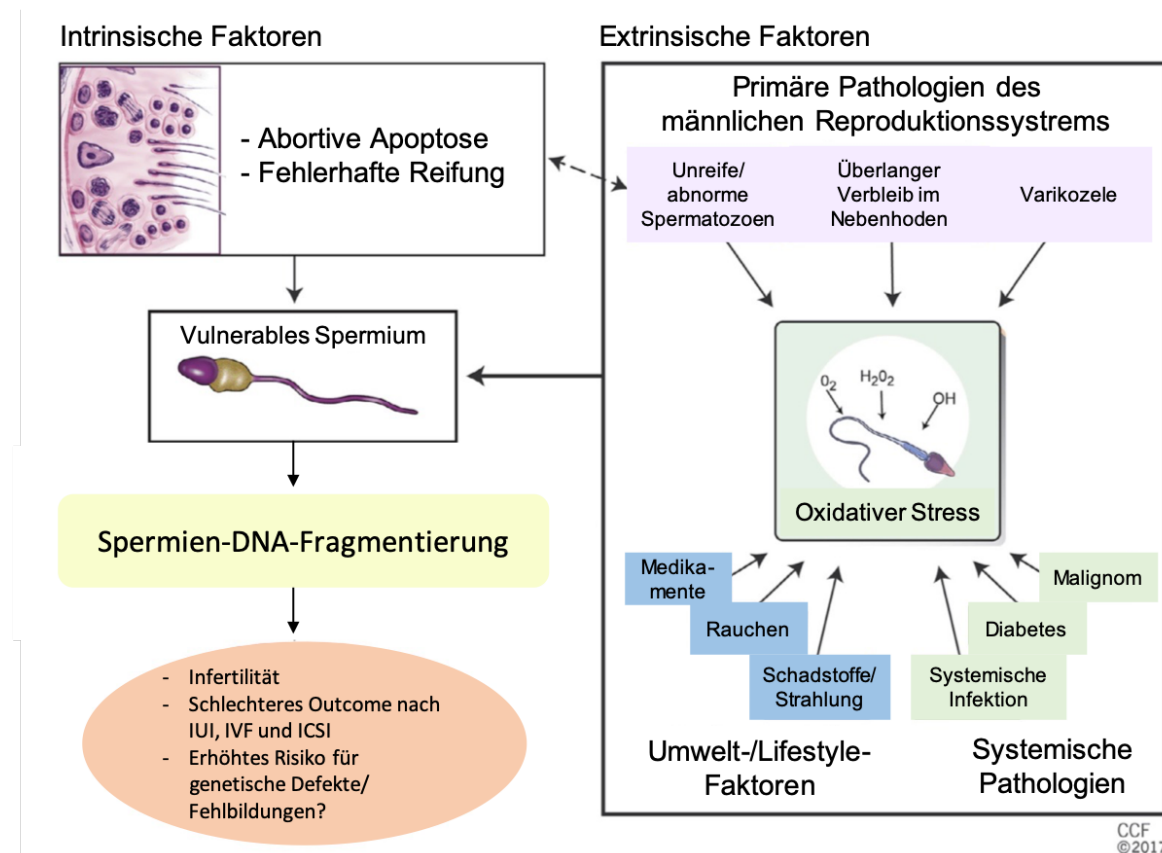


Abbildung 3: Mechanismen und Faktoren der Entstehung von DNA-Fragmentation (modifiziert nach Cho und Agarwal, 2018).

Um Spermien-DNA-Fragmentation zu messen, wurden in der Vergangenheit mehrere Methoden etabliert. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist der Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). Etabliert vor über 35 Jahren von Evenson et al. basiert der Test auf der durchflusszytometrischen Messung von Akridinorange-gefärbter Spermien DNA nach Säuredenaturierung. Durch unterschiedliche Emissionsmaxima nach Akridinorange Färbung doppelsträngiger (grün) oder einzelsträngiger (rot) DNA kann durch die Quantifizierung des metachromatischen Shifts der prozentuale Wert an Spermien mit DNA-Fragmentierung an der Spermiengesamtzahl ermittelt werden. Er wird als Hauptparameter DNA Fragmentation Index (DFI) angegeben (Evenson et al., 1999;

Evenson, 2016). Stärken des SCSA stellen die langjährige Erfahrung mit der Methode, das standardisierte Protokoll und die daher geringe Variabilität zwischen unterschiedlichen einzelnen Messungen, Untersuchern und Laboren dar. Zudem ist es möglich, in kurzer Zeit eine hohe Zellzahl zu messen. Nachteile bestehen in verhältnismäßig hohen Kosten und erhöhtem technischem Aufwand (Evenson, 2016; Raheem und Walsh, 2017).

Eine vereinfachte Version der Methode ist der AO-Test, bei welchem ebenfalls mit Akridinorange gearbeitet wird, jedoch keine durchflusszytometrische Messung, sondern eine fluoreszenzmikroskopische Evaluation erfolgt. Aufgrund der subjektiven Befundung, der nicht immer eindeutigen Fluoreszenzausprägung von Akridinorange, dem heterogenen Färbemuster und schnellen Abblassen der Färbung wird der AO-Test aktuell nicht in der klinischen Diagnostik empfohlen (Krause et al., 2011; Schulte et al., 2010).

Eine weitere häufig genutzte Methode ist der TUNEL-Assay (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling assay). Er quantifiziert direkt Einzel- und Doppelstrangbrüche durch die Inkorporation von markiertem dUTP, gefolgt von fluoreszenzmikroskopischer oder durchflusszytometrischer Messung. Vorteile stellen auch hier die geringe Interobserver-Variabilität dar, sowie die Möglichkeit der mikroskopischen oder durchflusszytometrischen Messung. Nachteilig ist die fehlende Standardisierung des Protokolls und die damit einhergehende eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren (Krause et al., 2011; Sharif, 2013; Raheem und Walsh, 2017).

Ein in Teilen ähnlicher Test ist der In-situ-Nick-Translation-Assay, welcher ebenfalls an Strangbrüchen inkorporierte dUTPs quantifiziert, hierbei allerdings nur Einzelstrangbrüche erfasst. Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist sein klinischer Wert eingeschränkt und anderen Tests unterlegen.

Auch der COMET Assay misst Strangbrüche direkt und individuell für jedes Spermium. Durch Fluoreszenzfärbung und gelelektrophoretische Auftrennung entstehen kometenförmige Formationen, wobei DNA Fragmente den charakteristischen „Kometenschweif“ bilden und DNA-Schäden quantifiziert werden können. Bei diesem Test ist von Vorteil, dass eine niedrige Spermienzahl zur Messung ausreicht.

Zuletzt gehört der Sperm Chromatin Dispersion Test (Halo-Test) zu den geläufigsten Messmethoden. Er wird als einfacher und kostengünstiger Test beschrieben, welcher weniger DNA-Schäden, als vielmehr Spermien mit weitestgehend intakter DNA erfasst. Hierbei sind nur diese in der Lage, in wässriger Agarose nach Säuredenaturierung und Entfernung der nukleären Proteine entstehende charakteristische Halos zu formen. Vorteil ist die Einfachheit des Tests, Nachteil wiederum die hohe Interobserver-Variabilität (Schulte et al., 2010; Krause et al., 2011; Evenson, 2016; Raheem und Walsh, 2017). Des Weiteren gibt es verschiedene Färbemöglichkeiten, wie Toluidinblau, Chromomycin A3 (CMA3) oder Anilinblau, welche an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden sollen.

Zahlreiche Studien haben von einer Assoziation von DNA-Schäden in Spermien und männlicher Infertilität berichtet. Dadurch können DNA-Schäden mittlerweile als zusätzlicher, aussagekräftiger Marker zur Evaluation des Fertilitätsstatus bewertet werden. Eine Beeinflussung der Fertilität durch DNA-Schäden ist auf vielen Ebenen möglich und reicht bis hin zu erhöhten Raten an Fehlgeburten (Baldi und Muratori, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass infertile Männer im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung und Männern mit nachgewiesener Fertilität signifikant vermehrt DNA-Schäden in Spermien aufweisen (Baldi und Muratori, 2014; Schulte et al., 2010). In der Literatur wird berichtet, dass bei einem im SCSA gemessenen DFI von ≥ 20 % die Chance auf eine spontane Konzeption auch bei sonst normwertigem Spermioogramm erheblich reduziert ist und bei Werten von $\geq 30 - 40$ % gegen Null geht (Baldi und Muratori, 2014; Evenson et al., 1999). Evenson et al. schlugen daher einen klinischen Grenzwert des DFI von ≥ 25 % vor (Evenson, 2017). Gleichzeitig werden bei Männern mit verminderten Spermioogrammparametern bereits DFI-Werte von ≥ 10 % als kritisch angesehen (Baldi und Muratori, 2014). Interessanterweise wies eine Studie bei 80 % der Paare mit diagnostizierter idiopathischer Infertilität erhöhte DNA-Schäden in Spermien (> 25 %) nach (Sharif, 2013).

Auch zeigen sich Auswirkungen von DNA-Schäden im Rahmen der assistierten Reproduktion. So sind bei Intrauteriner Insemination (IUI) bei DFI-Werten von ≥ 30 % deutlich reduzierte Erfolgchancen zu erwarten (Schulte et al., 2010). In einer Metaanalyse von Evenson et al. war die Chance auf eine Schwangerschaft bei Paaren mit IUI 7,3-fach höher bei einem DFI von ≤ 30 % im Vergleich zu > 30 % (Evenson und Wixon, 2006). Kontrovers bleibt die Aussagekraft von Spermien DNA-Integrität im Rahmen von IVF und ICSI. Auch bei IVF wird in einigen Studien von erhöhten Erfolgchancen und besserer Embryonenqualität berichtet, wenn der Anteil an Spermien mit DNA-Schäden unterhalb der Grenzwerte lag (Baldi und Muratori, 2014). In einer Studie unter Verwendung des COMET-Assays lag die Lebendgeburtenrate nach IVF bei einer Spermien-DNA-Fragmentation von < 25 % bei 33 %, während sie bei Werten > 25 % nur noch 13 % betrug (Baldi und Muratori, 2014). Wieder andere Studien konnten keine signifikanten Unterschiede in Schwangerschaftsraten nach IVF oder ICSI bestätigen (Schulte et al., 2010). Insgesamt scheint das Outcome nach ICSI am wenigsten abhängig von Spermien DNA-Schäden zu sein. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass allein durch die Auswahl eines effizient beweglichen und morphologisch adäquaten Spermiums die Wahrscheinlichkeit relevanter DNA-Schäden reduziert ist. So zeigten sich ähnliche Erfolgsraten nach ICSI bei Patienten mit sehr hohem DFI (≥ 50 %) und sehr niedrigem DFI (≤ 15 %) (Wright, Milne und Leeson, 2014).

Insgesamt wird vermutet, dass Männer mit einem hohen Ausmaß an DNA-Schäden in Spermien geringere Chancen haben, eine Schwangerschaft zu erzielen. Es wird geschätzt,

dass DNA-Schäden in Spermien als prädiktives Maß für das Erzielen einer Schwangerschaft von der natürlichen Konzeption bis zur ICSI in seiner Voraussagekraft abnimmt. Gleichzeitig kann keine allgemeingültige Aussage über einen bestimmten Wert getroffen werden, ab welchem keine Schwangerschaft mehr möglich wäre, da DNA-Schäden in den meisten Fällen nur einen Teil der Spermien betreffen (Schulte et al., 2010).

1.5 Protamine und Protamin-Ratio

Grundsätzlich unterscheidet sich die Chromatinstruktur in Spermien in ihrem Aufbau von dem somatischer Zellen. Aufgrund der geringen Größe des Spermiennucleus und um Schutz vor schädigenden Faktoren während Speicherung und Transport im männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt zu gewährleisten, ist die DNA hoch kompakt angeordnet. Gleichzeitig muss eine schnelle Dekondensation in der Oozyte möglich sein, wobei jeder strukturelle Fehler zu Verzögerungen oder Defekten bei der Freisetzung der paternalen Erbinformation führen kann (Paasch, Grunwald und Glander, 2007). Zur Kompaktierung werden im Verlauf der Spermienreifung etwa 85-90 % der Histone durch Protamine ersetzt, welche nur etwa halb so groß sind wie Histone und sich mit der DNA zur Einheit eines Toroids organisieren. Eine weitere Kompaktierung erfolgt im Nebenhoden durch die Ausbildung von Disulfidbrücken auf etwa ein Sechstel des Volumens in somatischen Zellen (González-Marín et al., 2012; Schulte et al., 2010). Der Ersatz des Großteils der Histone erfolgt sukzessive zunächst in runden Spermatiden durch zwei Transitionsproteine (TP 1 und 2) und in einem zweiten Schritt in elongierenden Spermatiden schließlich durch Protamine. Dieser Vorgang wird als Histon-Protamin-Transition bezeichnet (Abb. 4) (Steger et al., 2000).

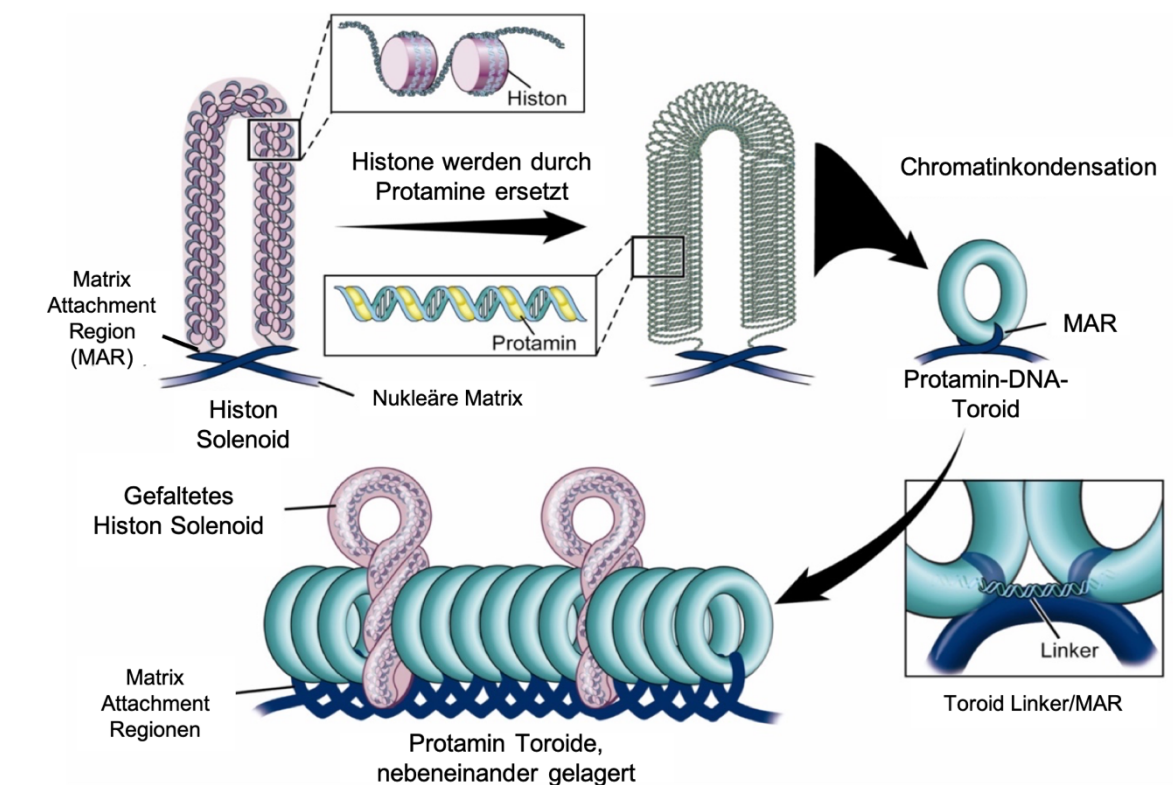


Abbildung 4: Chromatinstruktur in Spermien; nach der Histon-Protamin-Transition formt Protamin-gebundene DNA Toroidstrukturen, Histon-gebundene DNA verbleibt in Solenoidstrukturen (modifiziert nach Agarwal, 2011).

Bei Menschen gibt es zwei verschiedene Protamine, Protamin 1 (P1), welches sich bei fast allen Säugetieren findet und Protamin 2 (P2), welches nur bei wenigen Spezies, beispielsweise Mensch und Maus, vorkommt. Die Gene für Protamin 1 (*PRM 1*) und Protamin 2 (*PRM 2*) liegen beim Menschen auf Chromosom 16. Ihre Expression erfolgt sofort nach der Meiose in runden Spermatiden. Die Translation findet nach Speicherung der Transkripte zeitlich verzögert in elongierenden Spermatiden statt, nachfolgend kommt es zur Kompaktierung des Chromatins und damit zum globalen Transkriptionsstop (Steger und Balhorn, 2018). Protamin 1 besteht aus etwa 50 Aminosäuren und ist in der Lage, lokalisiert an der großen Furche der DNA-Doppelhelix etwa 10-11 bp zu binden. Protamin 2 ist etwas größer und bindet bis zu 15 bp (Balhorn, 2007; Steger und Balhorn, 2018). Protamine bestehen zu großen Anteilen (etwa 48 %) aus Arginin, wobei die positiv-geladenen Arginin-Reste durch die Interaktion mit dem negativ-geladenen DNA-Rückgrat die Formation eines Toroids und damit die starke Kompaktierung erlauben (Agarwal und Allamaneni, 2005; Baldi, 2014). Des Weiteren erfolgt die Ausbildung von Disulfid- und Zinkbrücken an den zahlreichen Zysteinresten (Paasch, Grunwald und Glander, 2007). Multiple Serin- und Threonin-Reste können phosphoryliert werden, was vermutlich einer schnellen Dekondensation in der Oozyte dienlich ist (Baldi und Muratori, 2014).

Das Verhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2, die Protamin-Ratio (P1/P2 Ratio), bleibt innerhalb einer Spezies konstant, variiert hingegen stark zwischen verschiedenen Spezies, vornehmlich aufgrund eines unterschiedlich hohen Protamin 2 Gehaltes (Steger und Balhorn, 2018). Beim Menschen beträgt das Verhältnis etwa 1, als normwertig gelten Werte zwischen etwa 0,8-1,2 (Steger *et al.*, 2008). Abweichungen von der normalen Protamin-Ratio sind mit männlicher Infertilität assoziiert. So konnte im Tiermodell bei Protamin 1 und Protamin 2 haploinsuffizienten Mäusen eine vollständige Infertilität beobachtet werden (Cho *et al.*, 2001). Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Abweichungen von einem normwertigen Verhältnis mit männlicher Subfertilität und reduzierter Embryoqualität assoziiert sind (Steger *et al.*, 2008; Rogenhofer *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2016). Die Protamin-Ratio bei subfertilen Patienten kann erhöht oder erniedrigt sein (Baldi und Muratori, 2014). Neben der Bestimmung der P1/P2 Protein Ratio konnte insbesondere die Bestimmung der P1/P2 mRNA Ratio als Biomarker etabliert werden (Steger *et al.*, 2008; Rogenhofer *et al.*, 2013). Eine Metaanalyse von Ni *et al.* zeigte eine bei subfertilen Männern im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte P1/P2 Protein und mRNA Ratio. In der Mehrheit der Fälle ist dies in einer Protamin 2 Deregulation begründet, wobei ursächlich von einer höheren Variabilität des Protamin 2 Gens ausgegangen wird, welches sich phylogenetisch deutlich später als das Protamin 1 Gen entwickelte (Ni *et al.*, 2016). Eine Überexpression von P1 wurde nur in einem geringen Teil der Fälle beobachtet. Einige Studien zeigen eine Assoziation einer aberranten Protamin-Ratio und DNA-Schäden in Form von DNA-Fragmentation, was die Hypothese unterstützt, dass ein regelrechtes Protamin-Verhältnis zum Schutz der DNA benötigt wird (Baldi und Muratori, 2014; Simon *et al.*, 2011).

Des Weiteren stellt die P1/P2 mRNA Ratio auch einen geeigneten Biomarker für das Fertilisierungspotenzial eines Mannes bei assistierter Reproduktion dar. In einer Studie von Rogenhofer *et al.* wurden Protamin-Ratios von Männern, die Teil einer IVF oder ICSI Behandlung waren, untereinander sowie mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei IVF Patienten und der Kontrollgruppe, hingegen aber eine signifikant veränderte Protamin-Ratio beim Vergleich von ICSI Patienten mit Kontrollen. Bei sowohl IVF als auch ICSI Patienten wurden bei normaler P1/P2 mRNA Ratio signifikant erhöhte Fertilisierungsraten erreicht, wobei der Effekt bei IVF deutlicher war (Rogenhofer *et al.*, 2013). In letzterer Studie konnte keine Korrelation zwischen abnormaler Protamin-Ratio und Schwangerschaftsraten festgestellt werden. In einer Studie von Simon *et al.* waren Fertilisierungsraten nach IVF negativ mit der P1/P2 Ratio assoziiert, während bei ICSI keine signifikante Korrelation zwischen Fertilisierungsrate und Protamin-Ratio bestand (Simon *et al.*, 2011). Auch in dieser Studie konnte keine Korrelation zwischen Protaminen und Schwangerschaftsraten gezeigt werden, andere Studien hingegen berichten von einer solchen Assoziation (Aoki *et al.*,

2006; de Mateo et al., 2009). Weiterhin wurde in einer Studie der Zusammenhang zwischen einer abnormalen P1/P2 mRNA Ratio und wiederholten Fehlgeburten vor der 20. SSW untersucht, wobei sich signifikante Unterschiede mit einer insgesamt bei Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erniedrigten Ratio zeigten (Rogenhofer et al., 2017).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Insgesamt stellt CP/PPS ein Krankheitsbild dar, welches in seiner Ätiopathogenese und seinen Konsequenzen, auch im Hinblick auf die Fertilität der Patienten, noch zu großen Teilen unverstanden bleibt. Gerade aufgrund des nicht selten noch jungen Alters der Patienten ist es jedoch wichtig, potentielle Einflüsse und Komplikationen in Bezug auf Fertilität zu bedenken und entsprechend diagnostisch vorzugehen. Aufgrund in der Vergangenheit häufig uneinheitlicher Ergebnisse im Hinblick auf Spermogrammveränderungen bei CP/PPS Patienten bleibt fraglich, ob allein mithilfe des Spermogramms Aussagen über die Fertilität bei der Erkrankung getroffen werden können. Dies greift in gewissem Maße die aktuelle Fragestellung im Bereich der Andrologie auf, ob zur Evaluation der Fertilität eines Mannes weitere diagnostische Möglichkeiten bestehen, welche eine präzisere Aussage ermöglichen oder auch prädiktiveren Charakter haben. Ein Aspekt, welcher hierfür in der allgemeinen Diagnostik bei männlicher Infertilität wie auch in Bezug auf Fertilität bei urogenitalen Infektionen in den letzten Jahren vermehrt Bedeutung erlangte, ist die Evaluation der DNA-Integrität in Spermien. Unter diesem Aspekt wurden bei der Suche nach einem Marker für Fertilität auch die Messung von Spermien-DNA-Fragmentation sowie der Protamin-Ratio evaluiert. Da dies in der Routinediagnostik standardmäßig noch nicht erfolgt, ist es von Bedeutung zu wissen, ob bei CP/PPS Patienten hier Beeinträchtigungen bestehen, und ob es hilfreich wäre, die Basisdiagnostik, nicht zuletzt im Hinblick auf ART, hierauf zu erweitern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die Spermienqualität bei CP/PPS Patienten umfassend zu evaluieren. Hierbei sollen die routinemäßig erhobenen Parameter um neuere Untersuchungsansätze erweitert werden, um somit zum tieferen Verständnis der Spermienqualität und Fertilität bei diesem Krankheitsbild beitragen zu können. Hierzu wurden in dieser Arbeit die Spermogrammparameter sowie klinische Befunde von CP/PPS Patienten sowie einer Kontrollgruppe ermittelt, die Spermien-DNA-Fragmentierung sowie die Protamin 1/2 mRNA Ratio untersucht und die erhobenen Befunde miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In dieser Studie wurden Blut-, Urin- und Ejakulatproben von Patienten mit chronischer Prostatitis/chronischem Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS) sowie von einer Kontrollgruppe gesammelt, klinische Befunde erhoben und in einer Datenbank erfasst. Alle Patienten und Probanden wurden anhand eines Aufklärungsbogens über das Forschungsvorhaben und die freiwillige Teilnahme an dieser Studie informiert, und ihre Einwilligung wurde schriftlich festgehalten. Die Studie erfolgte auf Grundlage der Zustimmung der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vom 06.06.2013, AZ 55/13.

2.1.1 Untersuchungskollektiv

Das Untersuchungskollektiv der vorliegenden Arbeit umfasste insgesamt 41 Patienten mit CP/CPPS sowie eine Kontrollgruppe von 22 gesunden Probanden (Tab. 5). Die Patienten wurden im Rahmen der Prostatitis Sprechstunde an der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, im Zeitraum von September 2016 bis April 2017 rekrutiert. In der Sprechstunde wurden standardisiert eine Anamnese, urologische körperliche Untersuchung und Blutentnahme durchgeführt. Im Anschluss wurden die Patienten gebeten, Ersturin, Exprimaturin nach Prostatamassage und Ejakulat abzugeben. Die Patientengruppe bestand aus volljährigen Personen mit der klinisch gesicherten Diagnose eines CP/CPPS NIH IIIA und NIH IIIB ohne anderweitige Entzündungen, Infektionen oder Malignome des Urogenitalsystems.

Zur Bildung einer Kontrollgruppe wurden eigenständig gesunde Probanden über die Probandensuche-Funktion des Hochschulrechenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen rekrutiert. Die Probanden wurden an eigens für diese Studie eingerichteten Terminen in gleicher Weise wie die Patientengruppe anamnestiziert, untersucht und gaben Blutproben, Erst- und Exprimaturin sowie Ejakulat ab. In die Kontrollgruppe eingeschlossen wurden volljährige Probanden, bei denen keine Hinweise auf eine Erkrankung des Urogenitaltraktes im Sinne einer Entzündung, Infektion, eines Malignoms oder einer Spermatogenesestörung vorlagen.

Tabelle 5 Untersuchungskollektiv

	Diagnose	Anzahl	Alter (Median; Range)
Patientengruppe	NIH IIIA	2	40 (24-55)
	NIH IIIB	39	40 (22-62)
	NIH IIIA + NIH IIIB	41	40 (22-62)
	(CP/CPPS)		
Kontrollgruppe	Keine	22	29,5 (20-41)
Gesamt		63	34 (20-62)

2.1.2 Geräte

Tabelle 6 Verwendete Laborgeräte

Name	Hersteller
CFX96 Real-Time System	Biorad, München
Durchflusszytometer MACSQuant® Analyzer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Elektrophoresekammer	PeqLab, Erlangen
Feinwaage AE240	Mettler-Toledo, Gießen
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gelkammer	PeqLab, Erlangen
Heizblock LS 2	VLM, Bielefeld
Inkubator (37°C)	Memmert, Schwabach
Kühlschränke (-20°C/4°C)	Bosch, Gerlingen
Kühlzentrifuge MIKRO220R	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer RCT	IKAMAG, Staufen
Mikroskop SC50	Olympus, Tokio, Japan
Mikrowelle Intellowave	LG, Seoul, Südkorea
Mikrozentrifuge AL (0,2 ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrozentrifuge CFUGE2 (1,5 ml)	LLG Labware, Meckenheim
pH Meter InLab Routine Pro	Mettler-Toledo, Gießen
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz

Serological Pipette (25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PeqLab, Erlangen
Stromquelle PowerEase 500	Invitrogen, Darmstadt
Thermocycler C1000 Touch	Biorad, München
Thermocycler MasterCycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Timer	Dostmann, Wertheim
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden
UV Kammer + Kamera BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Vortex 1	IKA, Staufen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage PE400	Mettler-Toledo, Gießen
Zählgerät COUNTER AC-15	Karl Hecht GmbH & CoKG „Assistent“, Sondheim v.d. Rhön

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 7 Chemikalien

Name	Hersteller
Akridinorange	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat EMSURE®	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (>99%)	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (>99%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glykogen (20mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe
HyperLadder™ 100bp	Bioline, Luckenwalde
IQ™ SYBR® Green Supermix	Biorad, München
Isopropanol (>99,8%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

Natriumchlorid (>99,5%)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (>99%)	Carl Roth, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
Tris-Hydrochlorid PUFFERAN®	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.4 Reagenzien und Puffer

Tabelle 8 Reagenzien und Puffer

Name	Hersteller
dNTPs (2,5mM)	Promega, Mannheim
EDTA (50mM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Fremont, USA
Hexamer-Primer	Invitrogen by Thermo Scientific, Waltham, USA
MACSQuant® Bleach Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Storage Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSQuant® Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PeqGold Trifast™	PeqLab, Erlangen
Oligo-dT-Primer	Invitrogen by Thermo Scientific, Waltham, USA
Ribolock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 9 Reagenzien und Puffer

Acid Detergent Solution (pH 1,2)	20 ml 2,0 N HCl 4,39 g NaCl 0,5 ml Triton X-100 H ₂ O auf 500 ml hinzufügen
Acridine Orange Equilibration Buffer	600 µl Acridine Orange Staining Solution 200 µl Acid Detergent Solution
Staining Buffer (pH 6,0)	370 ml Citric Acid Buffer (0,1 M) 630 ml Na ₂ PO ₄ Buffer (0,2 M) 372 g Na ₂ EDTA 8,77 g NaCl
Acridine Orange Stock Solution (1 mg/ml)	5 mg Akridinorange 5 ml Milipore H ₂ O
PBS (1 x) pH 7,4	5 PBS Tabletten in 1 L ddH ₂ O gelöst
TAE Buffer (10 x) pH 8,0	48,8 g Tris 11,42 Glacial Acetic Acid 20 ml 0,5 M EDTA ddH ₂ O auf 1 L hinzufügen
2% Agarosegel	2 g Agarose in 100 ml 1 x TAE gelöst
TNE Buffer (1x) pH 7,4	1,42 g Tris-HCl 7,98 g NaCl 0,33 g Na ₂ EDTA in 900 ml ddH ₂ O gelöst

2.1.5 Enzyme und Enzympuffer

Tabelle 10 Enzyme und Enzympuffer

Enzym	Hersteller
DNase I	Thermo Scientific, Waltham, USA
DNase I Puffer (10x)	Thermo Scientific, Waltham, USA
MMLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
MMLV Puffer (5x)	Promega, Madison, USA

2.1.6 RNA

Tabelle 11 RNA Positivkontrolle

Name	Hersteller
Human Testis Total RNA (1µg/µl)	Clontech, Mountain View, USA

2.1.7 Kits

Tabelle 12 Verwendete Kits

Name	Hersteller
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden

2.1.8 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 13 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäße	Bio-Rad, München
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml/50 ml Gefäße	Greiner, Kremsmünster, Österreich
2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Flow Cytometry Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Glaswaren	Schott, Mainz
Gelelektrophoresekamm und –schlitten	PeqLab, Erlangen
Kryoröhrchen	Sigma-Aldrich, Steinheim

Metallball	Qiagen, Hilden
PCR Gefäße	Biorad, München
Pipettenspitzen	Nerbe plus, Winsen

2.1.9 Software

Tabelle 14 Zu Auswertung und Statistik verwendete Software

Name	Hersteller
BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
BioRad CFX	BioRad, München
Flowing Software 2	Centre of Biotechnology, Turku, Finnland
IBM SPSS Statistics 24	IBM, Armonk, USA
MACSQuant® Analyzer Software	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 1000 V 3.8.1.	PeqLab, Erlangen

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Transport

Die Ejakulatproben wurden durch Masturbation nach einer sexuellen Karenzzeit von zwei bis sieben Tagen gewonnen und in einem sterilen Behälter vollständig aufgefangen. Anschließend wurden sie im Klinisch-andrologischen Labor der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen bei 37°C inkubiert und innerhalb einer Stunde verarbeitet.

2.2.2 Aufbereitung des Ejakulats

Der abgegebenen Probe wurden zur Verwendung für den Sperm Chromatin Structure Assay zunächst 2 Aliquots Nativejakulat à 100 µl entnommen und sofort bei -80°C eingefroren. Von jedem Ejakulat wurde ein Spermogramm nach den Kriterien der WHO von 2010 erstellt (World Health Organization & Department of Reproductive Health and Research, 2010). Im Anschluss wurde die Ejakulatprobe bei 13000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert und der Überstand, das Seminalplasma, abgenommen. Das entstandene Pellet, welches die zellulären Anteile des Ejakulates enthält, wurde mit 100 µl Glycerol vermischt. Ein Teil der Seminalplasmaproben wurde zur Bestimmung der biochemischen Ejakulatparameter genutzt. Das verbleibende Seminalplasma sowie das Ejakutpellet wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3 Ejakulatdiagnostik

Die Ejakulatdiagnostik wurde durch die Mitarbeiter des Klinisch-andrologischen Routinelabors der Klinik für Urologie durchgeführt.

Im Rahmen des Basis-Spermigramms nach WHO 2010 Kriterien wurden nach Verflüssigung des Ejakulats zunächst die Konsistenz sowie Ejakulatmenge bestimmt und das Aussehen beurteilt. Der pH-Wert wurde mithilfe eines Spezialindikators (pH 6,4-8,0 Spezialindikator, Merck) und bei einem pH von über 8,0 mit Indikatorstäbchen (pH 6,5-10 Indikatorstäbchen, Merck) bestimmt.

Nach entsprechender Verdünnung wurde die Spermienkonzentration in einer Zählkammer (Neubauer improved) ermittelt. Zum Erhalt der Gesamtspermienzahl wurde die Konzentration mit der jeweiligen Ejakulatmenge multipliziert.

Die Bestimmung der Spermienvitalität wurde mit dem Eosin-Test durchgeführt. Die Zellmembran lebendiger Spermien ist undurchlässig für den Farbstoff Eosin, während dieser bei avitalen Spermien durch die Membran in das Zellinnere eindringen kann und das Spermium anfärbt. Die Präparate wurden mit Eosin-Lösung (0,5 g Eosin Y in 0,9% NaCl) gefärbt und 2 x 200 Spermien auf ihre Anfärbbarkeit hin beurteilt.

Zur Motilitätsbestimmung wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop in 2 Feldern eines Objektträgers je 2 x 100 Spermien beurteilt und als beweglich oder immotil (IM) kategorisiert. Nach der Bestimmung der Gesamtmotilität erfolgte die weitere Einteilung in progressiv (PR) und nicht-progressiv (NP) bewegliche Spermien. Gegebenenfalls vorhandene Aggregationen und Agglutinationen wurden registriert.

Die Morphologie der Spermien wurde im Ausstrichpräparat beurteilt, bestehende Defekte in Kopf-, Mittelstück- und Schwanzdefekte kategorisiert und in Prozent angegeben. Miterfasst wurde zudem die Zahl an unreifen Spermatogenezellen.

Zur Quantifizierung der Leukozyten im Ejakulat wurde der Peroxidase-Test angewandt (LeucoScreen, FertiPro). Hierbei wird die im Ejakulat prädominante Leukozytenform der Peroxidase-positiven Granulozyten erfasst.

Zusätzlich zum Basis-Spermiogramm wurde eine biochemische Ejakulatdiagnostik durchgeführt. Als Marker der Samenblasenfunktion wurde die Fruktosekonzentration sowie als Marker der Nebenhodenfunktion die α -Glukosidase spektrophotometrisch gemessen. Als Markersubstanz der Prostata wurde Zink (Zinc Assay, Wako Chemicals) erfasst. Bestimmt wurden zudem als weitere Entzündungsmarker Granulozyten-Elastase (PMN Elastase ELISA, Demeditec Diagnostics) und Interleukin-8 (Human IL-8 ELISA Kit, BD Biosciences).

2.2.4 Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der Spermien-DNA-Fragmentation und Chromatinbeschaffenheit der adaptierte Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) verwendet. Der SCSA erfasst 2 Hauptparameter. Zum einen ist dies der Parameter %DFI (% DNA Fragmentation Index), welcher den prozentualen Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen des Phosphodiester-Rückgrats der DNA angibt. Die Methode misst bestehende Strangbrüche durch eine an diesen Stellen vermehrte Suszeptibilität der DNA gegenüber einer Säuredenaturierung (Evenson, 2016). Als weiterer Parameter werden Spermien mit einer verminderten Chromatinkondensation erfasst (%HDS, % High DNA Stainability). Diese Spermien weisen einen erhöhten Anteil an verbliebenen Histonen aufgrund einer unvollständigen Histon-Protamin-Transition auf. Infolgedessen ist die DNA für den verwendeten Farbstoff zugänglicher, woraus eine vermehrte Anfärbbarkeit resultiert (Evenson, 2016).

Bei der Methode wird zunächst durch Zugabe eines Säuredetergens die Spermien DNA an Einzel- und Doppelstrangbrüchen denaturiert. Die Denaturierung erfolgt dabei an Protamin-assoziiierter DNA in Spermien, die darin den Großteil ausmacht, nicht jedoch an der DNA

somatischer Zellen, welche Histon-assoziiert ist (Evenson und Jost, 2000). Im Anschluss folgt eine Färbung mit Akridinorange (AO; Abb. 5). Akridinorange ist ein kleines Molekül, welches zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet werden kann. Es interkaliert mit doppelsträngiger DNA und emittiert in diesem Zustand grüne Fluoreszenz unter blauem Laserlicht (488 nm). Bindet Akridinorange an einzelsträngige DNA, hat dies einen metachromatischen Wechsel von grüner (515-530 nm) hin zu roter (>630nm) Fluoreszenz zur Folge. Nach der Färbung erfolgt die durchflusszytometrische Messung der Spermien. Hierbei passieren die Spermien einzeln eine Kapillare, werden durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt, und das von ihnen emittierte rote und grüne Fluoreszenzlicht sowie Streulicht wird detektiert. Alle Spermien werden gemäß ihrem Fluoreszenzmuster charakterisiert und in einem Dot Plot eingeordnet. Anhand dessen lassen sich verschiedene Spermienpopulationen entsprechend der Höhe ihrer DNA-Fragmentierung differenzieren sowie die HDS-Zellen darstellen (Abb. 6).

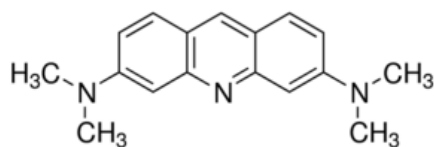


Abbildung 5: Akridinorange (AO).

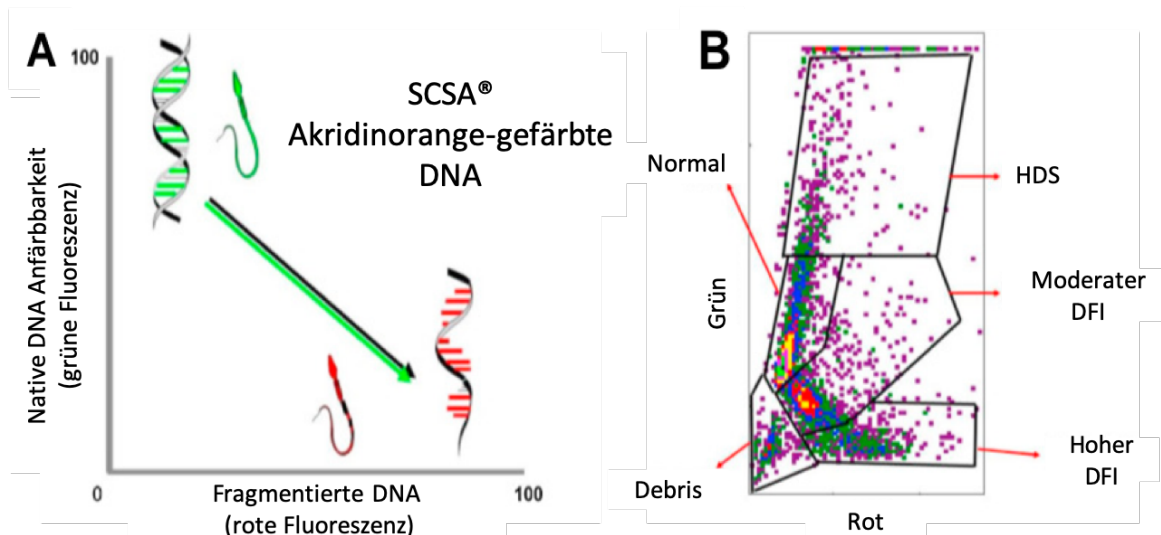


Abbildung 6: (A) Prinzip der Akridinorange-Färbung: Emission grüner Fluoreszenz bei Bindung an dsDNA, Emission roter Fluoreszenz bei Bindung an ssDNA; (B) Schematischer Dot Plot nach durchflusszytometrischer Messung: Jeder Punkt entspricht einem Spermium; umrandet sind die verschiedenen Populationen. Abbildungen modifiziert nach Evenson, 2016.

Protokoll Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Die Acridine Orange (AO) Staining Solution wurde vor jedem Versuch neu angesetzt. Der Ansatz bestand aus 25 ml Staining Buffer vermischt mit 150 µl der AO Stock Solution. Neben den Proben wurde stets auch eine Referenzprobe gemessen. Eine geeignete Referenz-Ejakulatprobe mit einem definierten, moderat erhöhten %DFI (ca. 15 %) wurde im Vorfeld ausgewählt, um bei jeder Messung reproduzierbare Versuchsbedingungen zu garantieren. Die Referenzprobe wurde initial nach entsprechender Verdünnung in multiple Aliquots aufgeteilt und im Rahmen jeder Messung Aliquots ausschließlich dieser Probe als Referenz verwendet. Alle Proben wurden auf Eis aufgetaut, auf 2 Mio Spermien pro ml mit TNE Puffer verdünnt und bis zur Messung am Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Herstellung des Acridine Orange Equilibration Buffers, bestehend aus 200 µl Acid Detergent Solution und 600 µl AO Staining Solution. Vor Beginn eines Versuchs wurde das Durchflusszytometer zur Äquilibration für 8 Minuten mit Acridine Orange (AO) Equilibration Buffer gespült. Im Verlauf des Versuchs wurde zwischen unterschiedlichen Proben für jeweils 2 Minuten mit diesem Puffer gespült, um die Versuchsbedingungen beizubehalten und sicherzustellen, dass Zellreste der vorhergehenden Probe entfernt wurden.

Vor jeder Messung sowie nach jeweils 5 verschiedenen Proben bzw. 10 Messungen wurde die Referenzprobe im Duplikat gemessen. Hierzu wurden pro Einzelmessung je 100 µl der mit TNE Puffer verdünnten Probe (Verdünnung auf 2 Mio Spermien pro ml) in ein Flow Cytometry Tube abgefüllt. Zu den 100 µl wurden 200 µl Acid Detergent Solution hinzugefügt und gleichzeitig eine Stoppuhr gestartet. Nach leichtem Schwenken des Gefäßes wurden nach exakt 30 Sekunden 600 µl der AO Staining Solution hinzupipettiert. Nach wiederum leichtem Schwenken wurde die Probe weiter auf Eis gelagert, nach weiteren 30 Sekunden in das Durchflusszytometer gestellt und die Messung bei 1:30 Minuten auf der Stoppuhr gestartet. Bei der Messung wurde die bekannte Fluoreszenzintensität der Referenzprobe überprüft und bei Bedarf Geräteeinstellungen zur Konstanthaltung der Versuchsbedingungen angepasst. Bei der Referenzprobe wurde wie im Verlauf auch bei allen weiteren Proben stets darauf geachtet, dass der maximale Zellfluss durch das Gerät 300 Zellen pro Sekunde nicht überstieg. Proben, die einen höheren Zellfluss aufwiesen, wurden entsprechend mit TNE Puffer verdünnt und erneut gemessen bis der gewünschte Zellfluss vorlag.

Im Anschluss an die Referenzprobe erfolgte analog die Messung der Proben, ebenfalls im Duplikat. Hierbei wurden pro Einzelmessung 100 µl der Probe in ein Flow Cytometer Tube abgefüllt und bei gleichzeitigem Start der Stoppuhr 200 µl Acid Detergent Solution zugegeben. Nach leichtem Schwenken wurden 600 µl AO Staining Solution hinzugefügt und die Probe bis zur Messung ab 1:30 Minuten auf Eis gelagert. Bei exakt 3 Minuten auf

der Stoppuhr wurde die Probe genullt und es wurden im Anschluss mindestens 5000 Spermien gemessen.

Die Auswertung der Daten der durchflusszytometrischen Messung erfolgte mit der Flowing Software 2 (Centre of Biotechnology, Turku). Mithilfe des Programmes wurden zunächst der Zelldebris sowie sogenannte Far-Green Zellen, welche am ehesten Leukozyten der Ejakulatprobe darstellen, von der Analyse ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden aus den Rohdaten der DNA Fragmentation Index jedes einzelnen Spermiums über die Formel $DFI = \text{rote Fluoreszenz} / \text{Gesamtfluoreszenz (rot+grün)}$ bestimmt und ein Verteilungshistogramm der gesamten Spermienpopulation in Abhängigkeit von der DFI-Höhe erstellt. Der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhtem DFI (%DFI) wurde im Anschluss durch Abtrennung der Population mit erhöhtem DFI von der Spermien-Hauptpopulation im Histogramm errechnet (Abb. 7). Um den Wert der High DNA Stainability Zellen (%HDS) zu erhalten, wurde eine auf alle Proben angewandte Grenze zur Markierung dieser Zellpopulation eingerichtet und ebenfalls der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Spermiengesamtzahl errechnet.

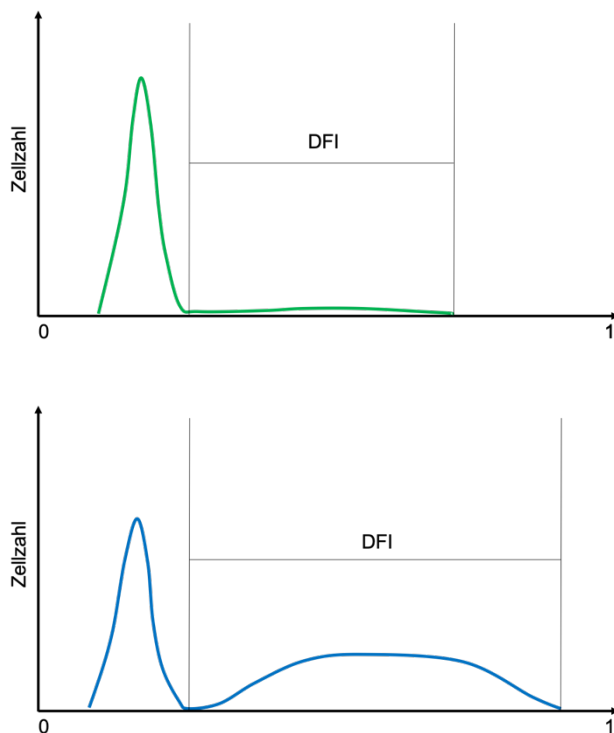


Abbildung 7: Schematische DFI-Häufigkeits-Histogramme mit Darstellung der Spermienhauptpopulation und Markierung des Bereiches der Spermien mit erhöhtem DFI. Im oberen Fall befände sich ein geringer Anteil, in der unteren Grafik ein hoher Anteil an Spermien im DFI-Bereich.

2.2.5 RNA Isolation

Zur Verwendung für die quantitative Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wurde RNA aus Ejakulat-Pellets isoliert, welche durch

Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten und Raumtemperatur (RT) aus Nativejakulat gewonnen wurden. Das Pellet wurde, wie bereits beschrieben, in 100 µl Glycerol resuspendiert und bis zur RNA Isolation bei -80°C gelagert.

Vor Beginn der RNA Isolation wurde zunächst die Spermiedichte des resuspendierten Pellets bestimmt und 2 Mio Spermien aus jedem Pellet eingesetzt. Die Spermien wurden zweimal mit 500 µl PBS in DEPC H₂O für 5 Minuten gewaschen und im Anschluss bei 13000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Zum Aufschluss der Zellen und für die Freisetzung der RNA wurde zunächst eine kleine Metallkugel in das Tube überführt und es wurden 150 µl peqGOLD Trifast™ hinzugefügt. Mithilfe des TissueLyser LT wurden die Zellen bei 50 Oszillationen/s für 5 Minuten aufgebrochen. Der Inhalt wurde im Anschluss in ein neues Tube überführt. Um einen Materialverlust zu verhindern wurde das vorherige Tube mit weiteren 350 µl peqGOLD Trifast™ gespült und diese anschließend ebenfalls dem neuen Tube zugeführt. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Chloroform zugegeben und das Tube manuell kräftig geschüttelt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei RT bevor die Probe für 10 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation ergaben sich drei Phasen in der Probe, von denen die obere, die RNA enthaltende, wässrige Phase separat abgenommen und in ein neues Tube überführt wurde. Hinzugefügt wurden nun die gleiche Menge Isopropanol und 5 µl Glycogen, die Probe wurde gemischt und über Nacht zur RNA Präzipitation bei -20°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte zunächst die Zentrifugation der Probe bei 13000 rpm und 4°C für 30 Minuten. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet zweimal mit 500 µl Ethanol (75% in DEPC H₂O) gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in 17 µl DEPC H₂O gelöst. Zuletzt erfolgte die photometrische Messung der RNA Konzentration mit dem NanoDrop 1000 Spektrophotometer.

2.2.6 DNase I Verdau

Zur Verbesserung der Reinheit der RNA durch Entfernung von in der Probe verbliebenen DNA wurde im Anschluss an jede RNA Isolation ein enzymatischer Verdau durch DNase I durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl 10x DNase I Buffer sowie 2 µl DNase I zur Probe hinzugefügt und die Probe für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 2 µl EDTA (50 mM) und die Erhitzung bei 65 °C für 10 Minuten zur Inaktivierung des Enzyms. Im Anschluss wurde wiederum die RNA Konzentration photometrisch bestimmt. Aus 2 Mio Spermien konnten zwischen 33,48 ng/µl und 1024,61 ng/µl RNA isoliert werden mit einer 260/280 Ratio von 1,41 – 1,81.

2.2.7 Reverse Transkription

Der Vorgang der reversen Transkription umfasst die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) zur Verwendung für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Da RNA nicht direkt amplifiziert werden kann, wird hierbei eine Reverse Transkriptase genutzt, um RNA in cDNA umzuschreiben. Diese wird im Anschluss als Matrize für die PCR verwendet. Umgeschrieben wurden je 500 ng der zuvor isolierten RNA.

Tabelle 15 RT-Ansatz (40 µl)

Reagenz	Menge
MMLV-Puffer	8 µl
dNTPs (2,5 mM)	16 µl
Oligo-dT-Primer (10 pmol)	2 µl
Hexamer-Primer (10 pmol)	2 µl
RNA Template + DEPC H ₂ O	12 µl

Zunächst wurde ein Sammelansatz für alle Proben hergestellt und in 28 µl pro Tube aufgeteilt. Dem Ansatz wurden 500 ng der RNA zugegeben. Der Ansatz wurde mit DEPC H₂O auf 40 µl aufgefüllt und die Probe gemischt. Im Anschluss wurden alle Proben in den Thermocycler gegeben und folgendes Programm eingestellt:

Tabelle 16 RT-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	62 °C	10 min
2.	42 °C	1 h
3.	90 °C	5 min
4.	10 °C	∞

Nach 10 Minuten bei 62°C wurden die Proben entnommen und auf Eis gelagert. Zu jeder Probe wurden 1 µl MMLV Reverse Transkriptase sowie 1µl Ribolock RNase-Inhibitor hinzugefügt und die Probe gemischt. Im Anschluss wurden die Proben wieder in den Thermocycler gestellt und das Programm weitergeführt. Nach Ende des Programmes wurden die Proben entweder direkt der Aufreinigung zugeführt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.8 Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte gemäß dem Protokoll des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen). Hierbei wurden 20 µl der cDNA und 200 µl PNI Puffer in ein Filter-

Sammelröhrchen gegeben und 1 Minute bei RT und 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 700 µl PE Puffer zugegeben. Im nächsten Schritt erfolgten wieder eine Zentrifugation für 1 Minute bei RT und 6000 rpm und die anschließende Entfernung des Überstandes. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Minute. Hiernach wurden der Filter in ein neues Gefäß überführt und 25 µl EB Puffer hinzugefügt. Die Probe wurde für 1 Minute bei RT und 13000 rpm zentrifugiert und das Eluat noch einmal über die Säule gegeben, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei RT und 13000 rpm für 1 Minute. Abschließend wurde der cDNA-Gehalt der Probe durch photometrische Messung bestimmt und jede Probe mit ddH₂O auf eine Konzentration von 10 ng cDNA pro µl eingestellt.

2.2.9 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der in-vitro Vervielfältigung eines bestimmten DNA Abschnitts. Hierfür wird die DNA-Matrize zunächst bei hohen Temperaturen denaturiert. Im Anschluss erfolgt die Anlagerung der für den zu vervielfältigenden DNA Abschnitt spezifischen Primer, und eine DNA Polymerase synthetisiert im Folgenden den komplementären DNA Strang. Kombiniert mit einer Reversen Transkription ermöglicht sie über den Nachweis von mRNA die Untersuchung der Expression bestimmter Gene. Bei der quantitativen Real-Time PCR wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal detektiert, welches die Messung und Quantifizierung des entstehenden PCR-Produktes in Echtzeit ermöglicht. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green I), welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und dessen detektierte Fluoreszenzintensität sich proportional zur gebildeten DNA Menge verhält.

Jede Probe, sowie Positiv- und no-template-Kontrolle wurden im Duplikat bestimmt. Für die Durchführung wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 17 qPCR Ansatz (25 µl)

Reagenz	Menge
Primer Forward (1:10)	0,5 µl
Primer Reverse (1:10)	0,5 µl
IQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µl
ddH ₂ O	6,5 µl
cDNA Template	5 µl (50 ng)

Tabelle 18 Verwendete Primer

Gen	Primer Sequenz	Annealing Temp. (°C)	PCR Produkt (bp)
PRM 1	F: 5'AAGTCGCAGACGAAGGAGG3'	58,8	80
	R: 5'ATCTCGGTCTGTACCTGGGG3'	61,4	
PRM 2	F: 5'AAGACGCTCCTGCAGGCAC3'	61,0	71
	R: 5'GCCTTCTGCATGTTCTCTTCCT3'	60,3	

Tabelle 19 qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95°C	5 min
2.	95°C	30 s
3.	40 Zyklen	60°C
4.		72°C
5.	72°C	5 min
6.	55°C	5 s
7.	95°C	30 s

2.2.10 Positiv-Kontrolle

Als Positiv-Kontrolle für die durchgeführten RT-qPCR diente humane Hoden cDNA. Hierzu erfolgte die Umschreibung von humaner Hoden RNA (Human Testis Total RNA (1 µg/µl, Clontech) in komplementäre cDNA mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad). Die Umschreibung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 20 RT-Ansatz Positiv-Kontrolle (20µl)

Reagenz	Menge
5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
DEPC H ₂ O	10 µl
Human Testis Total RNA Template	5 µl

2.2.11 Agarose Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe und Reinheit der PCR Produkte wurde zusätzlich eine Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden 5 µl der Probe mit 1 µl OrangeDye gemischt und anschließend in die Geltaschen eines 2% Agarosegels gegeben. Als Größenstandard wurde HyperLadder™ (Bioline) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 171 V und 400 mA für 30 min. Im Anschluss wurde das Gel durch Biodoc Analyze analysiert.

2.2.12 Auswertung

Als Negativ-Kontrolle wurden „no-template Kontrollen“ mit ddH₂O anstelle der cDNA verwendet. Die Effizienz der RT-qPCR wurde anhand zweier Standardkurven mit bekannten Protamin 1 und Protamin 2 Konzentrationen überprüft. Die Standardkurven entstanden durch Proben aus einer im Vorfeld erstellten Verdünnungsreihe von Protamin 1- und Protamin 2- DNA (nach Gel-Extraktion aus Plasmid-DNA, mit 5 mM Tris-HCl auf 1ng/µl eingestellt, Verdünnungsreihen 1-14). Der zur Quantifizierung gemessene Wert war der „cycle threshold“ (Ct-Wert), welcher den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals den Hintergrundwert überschreitet. Für weitere Berechnungen wurde der gemittelte Ct-Wert der Doppelbestimmungen verwendet. Die Protamin 1/2 Ratio wurde mithilfe des im Rahmen von FertiCert® etablierten Programmes ermittelt (Rogenhofer et al., 2013).

2.2.13 Hormonmessungen

Routinemäßig wurden bei CP/CPPS Patienten auch Hormonkonzentrationen im Blut bestimmt. Die Messung des Gesamt-Testosterons erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen (ADIVA, Siemens Health Care, Erlangen), die Bestimmung von Östradiol am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, UKGM Standort Gießen.

2.2.14 Fragebögen

Patienten und Probanden füllten zudem eine Reihe von Fragebögen aus. Für diese Arbeit verwendet wurden der International Prostate Symptom Score (IPSS), der NIH Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) der International Index of Erectile Function (IIEF), sowie Aspekte aus dem andrologischen Aufnahmebogen der Klinik für Urologie.

2.2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS Statistics 24.0 (IBM). Für Patientenalter, Spermiogrammparameter, SCSA Daten, Protamin 1/2 mRNA Ratio, IPSS, CPSI und IIEF wurden der Median sowie Minimum und Maximum angegeben. Nicht-

normalverteilte Variablen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test (zweiseitig) verglichen. Korrelationen zwischen Variablen wurden mithilfe der Rangkorrelation nach Spearman berechnet. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen, als hochsignifikant galt $p \leq 0,01$. In Abbildungen entspricht *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ und n.s.: nicht signifikant.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von für die Fertilität relevanten Ejakulat- und Spermienparametern bei Patienten mit chronischer Prostatitis/chronischem Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Wie im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik bei Männern etabliert, wurde bei allen Patienten und Kontrollen eine standardisierte Ejakulatanalyse nach WHO 2010 durchgeführt. Zur Feststellung etwaiger entzündlicher Prozesse wurden Leukozyten, Granulozytenelastase und Interleukin-8 im Ejakulat erfasst. Für weitere Auskünfte über die Funktion verschiedener Komponenten des reproduktiven Systems wurden biochemische Ejakulatparameter bestimmt.

Da die DNA-Integrität in Spermien einen zusätzlichen, die Fertilität beeinflussenden Faktor darstellt, wurden insbesondere Parameter, die über diese eine Aussage treffen, untersucht. Hierzu wurde zum einen die DNA-Fragmentierung in Spermien aus nativem Ejakulat bestimmt. Als weiterer Wert wurden die High DNA Stainability-Zellen erfasst, welche Informationen über die Beschaffenheit des Chromatins in Spermien geben. Ebenfalls zur Charakterisierung des DNA- und Chromatin-Zustandes in einer Spermienprobe und als ein weiterer Marker für das Fertilisierungspotenzial wurde die Protamin 1/Protamin 2 mRNA Ratio bestimmt. Zudem wurde erörtert, ob ein Zusammenhang dieser Werte mit erhöhten Entzündungsmarkern besteht und ob Korrelationen zu anderen Parametern bestehen. Darüber hinaus wurden zur Erfassung von klinischer Symptomatik und andrologischen Aspekten hierzu etablierte Fragebögen ausgewertet. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

3.1 Ejakulatanalyse

Sämtliche Referenzwerte sind den WHO-Kriterien von 2010 entnommen (World Health Organization & Department of Reproductive Health and Research, 2010).

3.1.1 Ejakulatvolumen und pH

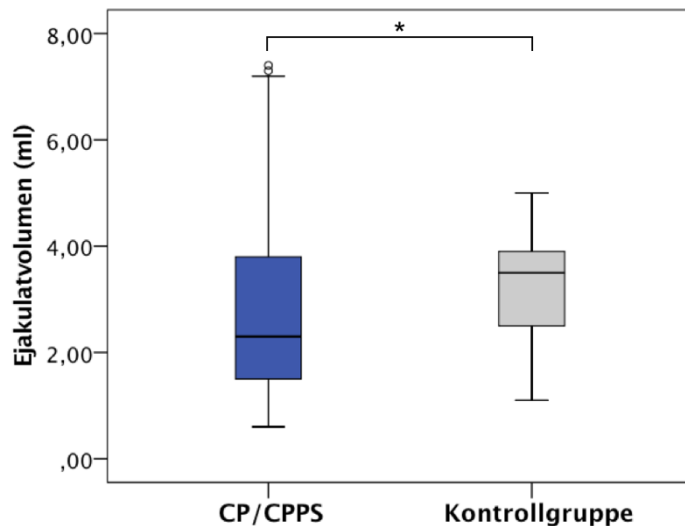


Abbildung 8: Ejakulatvolumen CP/CPPS Patienten vs. Kontrollen.

Für das Ejakulatvolumen wird ein unterer Referenzwert von 1,5 ml angegeben. Mit medianen Ejakulatvolumina von 2,3 ml (Patienten) und 3,5 ml (Kontrollgruppe) lag der Großteil des Untersuchungskollektivs innerhalb dieses Referenzbereiches. In beiden Gruppen gab es Fälle, welche ein vermindertes Ejakulatvolumen unterhalb des Referenzwertes aufwiesen. In der Patientengruppe war dies bei 12,2 % (n=5) der Fall, in der Kontrollgruppe bei 4,5 % (n=1). Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des Ejakulatvolumens bei CP/CPPS Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($p \leq 0,05$) (Tab. 21; Abb. 8).

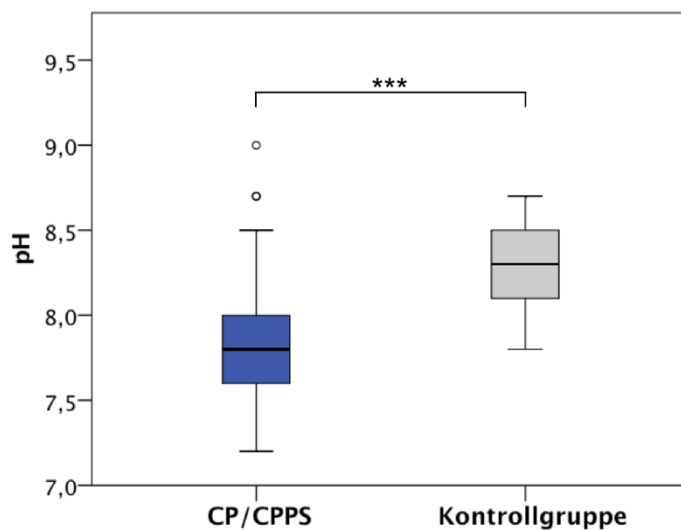


Abbildung 9: pH-Wert des Ejakulats CP/CPPS Patienten vs. Kontrollen.

Der pH-Wert des Ejakulates soll mehr als 7,2 betragen. Alle gemessenen Werte beider Gruppen lagen über diesem Wert. Dennoch ließ sich in der Gruppe der CP/CPPS Patienten mit einem medianen pH-Wert von 7,8 ein im Vergleich zum Median der Kontrollgruppe von 8,3 signifikant niedrigerer pH-Wert feststellen ($p \leq 0,001$) (Tab. 21, Abb. 9).

Tabelle 21 Ejakulatvolumen und -pH

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Volumen (ml)	2,3	0,6-7,4	3,5	1,1-5,0	0,046
pH	7,8	7,2-9,0	8,3	7,8-8,7	<0,001

3.1.2 Spermiengesamtzahl und -konzentration

Tabelle 22 gibt einen Überblick über die Spermiengesamtzahl und die Spermienkonzentration bei CP/CPPS Patienten und gesunden Probanden. Der Referenzwert für die Spermiengesamtzahl beträgt $\geq 39 \times 10^6$ Spermien pro Ejakulat, die Spermienkonzentration soll bei $\geq 15 \times 10^6$ Spermien pro ml Ejakulat liegen. Während sich in der Patientengruppe 17,1 % (n=7) unterhalb des Referenzwertes für die Spermiengesamtzahl befanden, konnten bei keiner Kontrollperson Werte unterhalb des Referenzwertes festgestellt werden. Bei Betrachtung der Spermienkonzentration wiesen 19,5 % (n=8) der Patientengruppe Werte unterhalb des Referenzwertes und damit eine Oligozoospermie auf. In der Kontrollgruppe war dies bei 9,1 % (n=2) der Personen der Fall. Insgesamt wies im Vergleich die Kontrollgruppe besonders in Bezug auf die

Gesamtspermatozoenzahl (81,2 vs. 132,1 Mio) einen deutlich höheren medianen Wert auf, der Unterschied war allerdings bei beiden Parametern nicht signifikant.

Tabelle 22 Spermiengesamtzahl und -konzentration

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Gesamtspermatozoenzahl (Mio/Ejakulat)	81,2	4,3-896,0	132,1	42,0-725,2	0,139
Spermatozoenkonzentration (Mio/ml)	38,3	2,4-280,0	44,8	12,0-148,0	0,545

3.1.3 Spermienmotilität

Bei Betrachtung der Spermienmotilität wird zwischen progressiv beweglichen (PR), nicht-progressiv beweglichen (NP) und unbeweglichen Spermien (IM) unterschieden. Die Gesamtbeweglichkeit setzt sich zusammen aus progressiv beweglich und nicht progressiv beweglichen Spermien (PR+NP). Der Referenzwert für die Gesamtmotilität liegt bei mindestens 40 % der Spermien, progressiv beweglich sollen ≥ 32 % der Spermien sein.

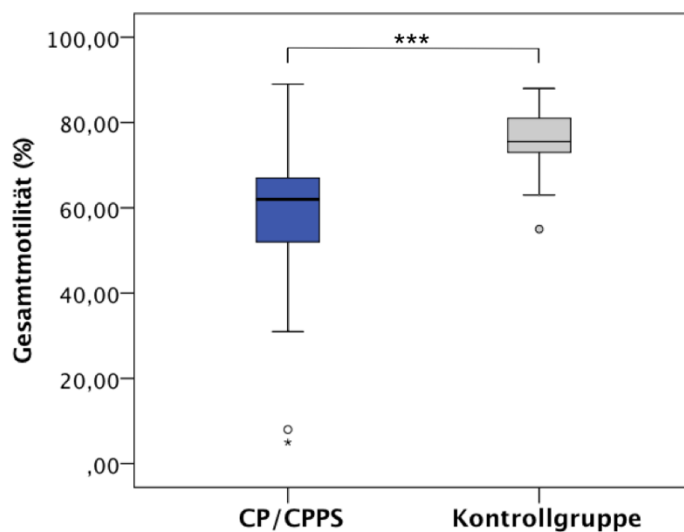


Abbildung 10: Gesamtmotilität CP/CPPS vs. Kontrollen.

Die mediane Gesamtbeweglichkeit zeigte sich mit 62,0 % in der Patienten- und 75,5 % in der Kontrollgruppe insgesamt normwertig. In der Patientengruppe lagen 9,8 % (n=4) der Werte im Sinne einer Asthenozoospermie unterhalb des Referenzwertes. Alle Werte der Kontrollgruppe befanden sich oberhalb des Referenzwertes. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Gesamtmotilität bei CP/CPPS Patienten ($p \leq 0,001$) (Tab. 23; Abb. 10).

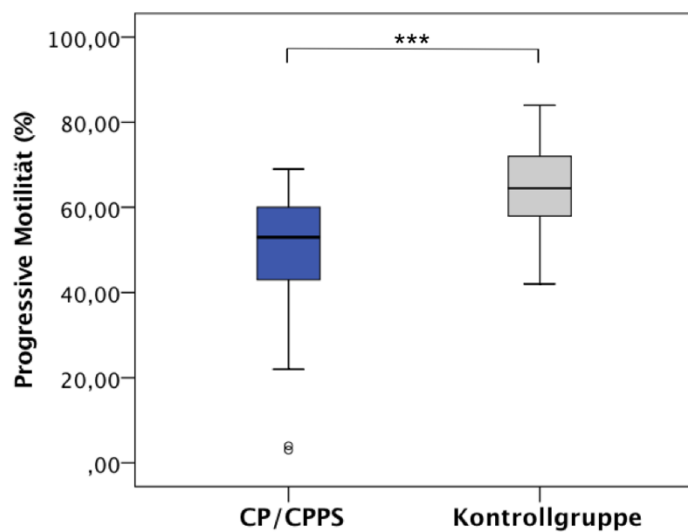


Abbildung 11: Progressive Spermienmotilität CP/CPPS vs. Kontrollen.

Auch in Bezug auf die progressive Beweglichkeit wiesen beide Gruppen mit Medianen von 53,0 % in der Patientengruppe sowie 64,5 % in der Kontrollgruppe überwiegend Werte oberhalb des Referenzwertes auf. Eine Verminderung der Beweglichkeit von unter 32 % trat bei 14,6 % (n=6) der Patienten auf, in der Kontrollgruppe lag keine Person unterhalb dieses Wertes. Entsprechend konnte eine signifikante Erniedrigung der progressiven Motilität beim Vergleich beider Gruppen festgestellt werden ($p \leq 0,001$) (Tab. 23, Abb. 11).

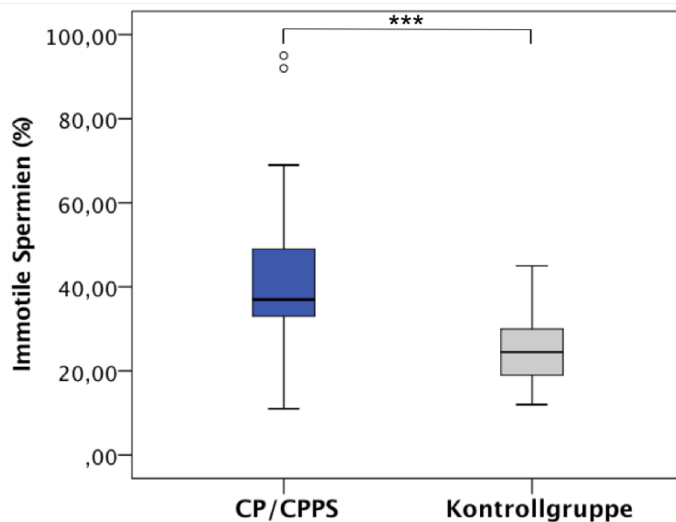


Abbildung 12: Immotile Spermien CP/CPPS vs. Kontrollen.

Die medianen Werte des Anteils an immotilen Spermien betrugen 37,0 % in der Patientengruppe und 24,5 % in der Kontrollgruppe. Infolge der verminderten Gesamtmotilität zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg an immotilen Spermien bei CP/CPPS Patienten ($p \leq 0,001$) (Tab. 23, Abb. 12).

Tabelle 23 Motilität

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Gesamtmotilität (%)	62,0	5,0-89,0	75,5	55,0-88,0	<0,001
Progressive Motilität (%)	53,0	3,0-69,0	64,5	42,0-84,0	<0,001
Immotile Spermien (%)	37,0	11,0-95,0	24,5	12,0-45,0	<0,001

3.1.4 Spermienmorphologie

Im Hinblick auf die Spermienmorphologie wurde der Anteil an Spermien mit normaler Morphologie sowie Kopf-, Mittelstück- und Schwanzdefekte bestimmt. Der Anteil an normal geformten Spermien soll mindestens 4 % betragen.

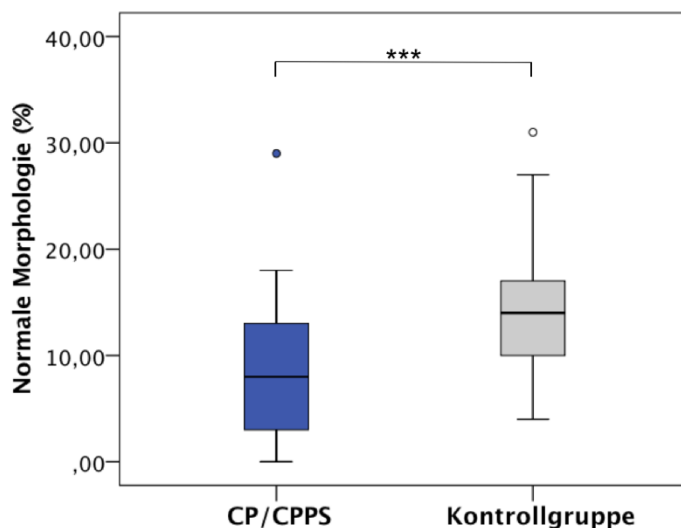


Abbildung 13: Normale Spermienmorphologie CP/CPPS vs. Kontrollen.

Die Mediane beider untersuchter Gruppen befanden sich mit 8,0 % bei Patienten und 14,0 % bei Kontrollen im Referenzbereich. Eine Verminderung unterhalb dieses Wertes und somit eine Teratozoospermie lag bei 19,5 % (n=8) der Patienten vor. 7,3 % (n=3) der Patienten wiesen keine normal geformten Spermien auf. Eine Teratozoospermie lag bei keiner Kontrollperson vor. Vergleichend zeigte sich ein signifikant erniedrigter Anteil an Spermien mit normaler Morphologie in der Gruppe der Patienten ($p \leq 0,001$) (Tab. 24, Abb. 13).

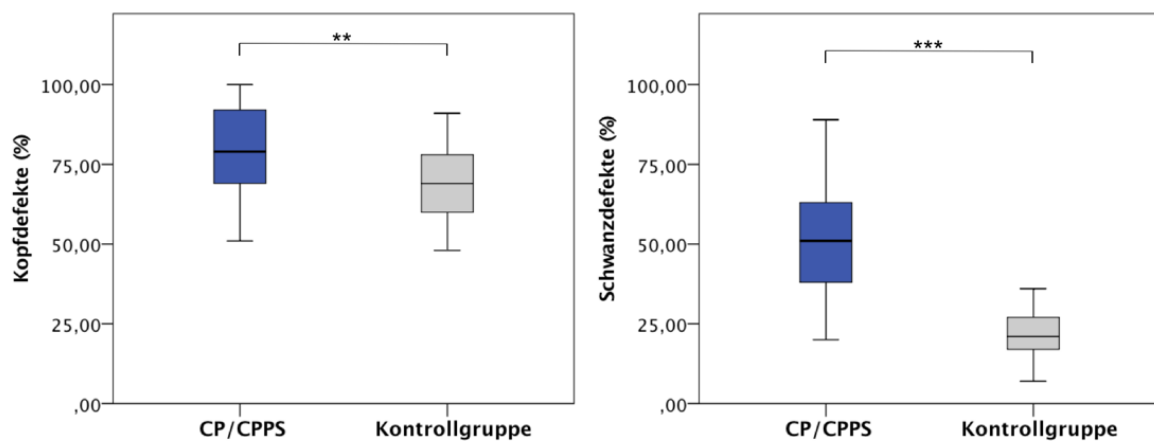


Abbildung 14: Spermienkopf- und Schwanzdefekte CP/CPPS vs. Kontrollen.

In Bezug auf Spermien mit Kopfdefekten zeigte sich eine signifikante Erhöhung in der Patientengruppe (79,0 % vs. 69,0 %, $p \leq 0,01$). Ebenfalls traten in der Gruppe der Patienten signifikant vermehrt Schwanzdefekte auf (51,0 % vs. 21,0 %, $p \leq 0,001$) (Abb. 14). Bei Betrachtung der Mittelstückdefekte hingegen fand sich eine signifikante Erhöhung in der Kontrollgruppe (4,0 % vs. 53,0 %, $p \leq 0,001$) (Tab. 24).

Tabelle 24 Morphologie

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Normale Morphologie (%)	8,0	0,0-29,0	14,0	4,0-31,0	0,001
Kopfdefekte (%)	79,0	51,0-100,0	69,0	48,0-91,0	0,003
Mittelstückdefekte (%)	4,0	1,0-22,0	53,0	33,0-74,0	<0,001
Schwanzdefekte (%)	51,0	20,0-89,0	21,0	7,0-36,0	<0,001

3.1.5 Spermien Vitalität

Die Bestimmung des Anteils an vitalen Spermien erfolgt durch die Färbung mit Eosin. Der Anteil an lebendigen Spermien, welche keinen Farbstoff aufnehmen, soll hierbei ≥ 58 % betragen. In der Gruppe der Patienten lagen 36,4 % (n=4) unterhalb dieses Wertes, alle Kontrollpersonen befanden sich im Normbereich. Es zeigte sich daher insgesamt eine signifikant erniedrigte Vitalität der Spermien bei CP/CPPS Patienten ($p \leq 0,001$) (Tab. 25, Abb. 15).

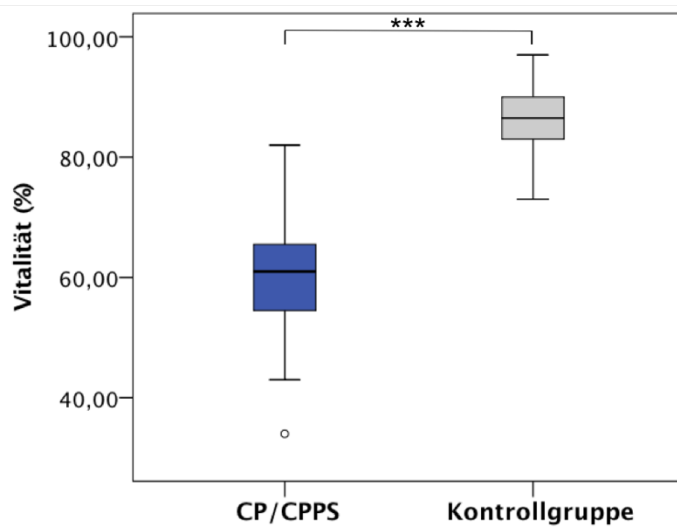


Abbildung 15: Spermiovitalität CP/CPPS vs. Kontrollen.

Tabelle 25 Spermiovitalität

	CP/CPPS (n= 11)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Vitalität (%)	61,0	34,0-82,0	86,5	73,0-97,0	<0,001

3.1.6 Peroxidase-positive Leukozyten und unreife Spermatogenesenzellen

Im Rahmen der Entzündungsdiagnostik wird die Zahl an Leukozyten im Ejakulat durch Peroxidase-Färbung bestimmt. Als Grenzwert gelten hierbei 1×10^6 Peroxidase-positive Leukozyten pro ml Ejakulat.

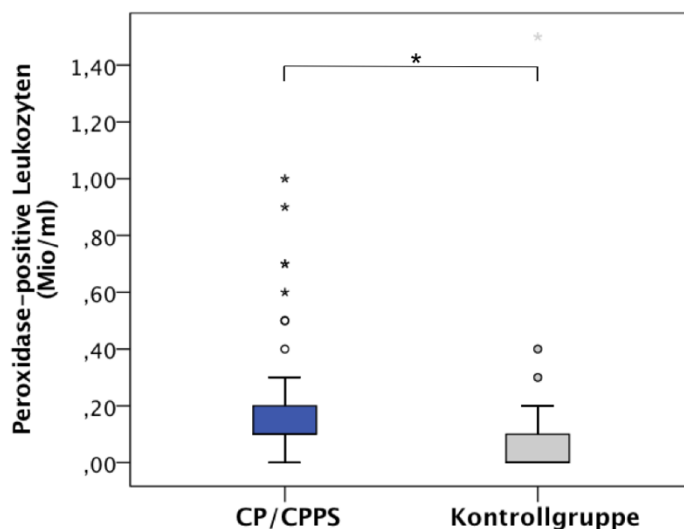


Abbildung 16: Peroxidase-positive Zellen CP/CPPS vs. Kontrollen.

In beiden Gruppen konnte bei je einem Teilnehmer ein Wert oberhalb des Normbereiches festgestellt werden. Insgesamt zeigte sich eine größtenteils im Referenzbereich befindliche, signifikante Erhöhung an Peroxidase-positiven Leukozyten in der Patientengruppe ($p \leq 0,05$) (Tab. 26, Abb. 16).

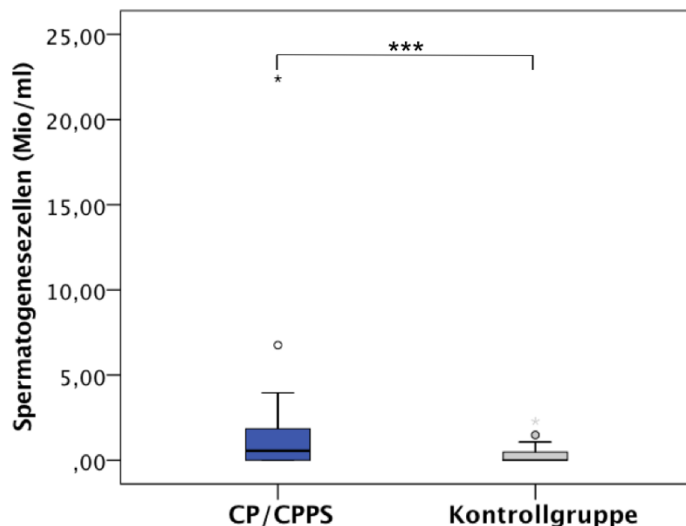


Abbildung 17: Unreife Spermatogenesezellen CP/CPPS vs. Kontrollen.

Im Rahmen der weiteren zytomorphologischen Ejakulatbeurteilung wurden auch unreife Spermatogenesezellen miterfasst. Hierbei zeichnete sich in der Patienten- gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Zahl an unreifen Spermatogenesezellen bei Patienten ab ($p \leq 0,01$) (Tab. 26, Abb. 17).

Tabelle 26 Zelluläre Ejakulatkomponenten

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Peroxidase-positive Leukozyten (Mio/ml)	0,1	0,0-1,0	0,0	0,0-1,5	0,011
Unreife Spermatogenesezellen (Mio/ml)	0,56	0,0-22,4	0,0	0,0-2,29	0,005

3.1.7 Biochemische Parameter

Fruktose, α -Glukosidase, Zink

Für die Fruktose, als Marker für die Funktion der Samenblasen, wird ein Normwert von $\geq 13 \mu\text{mol/Ejakulat}$ angegeben. Sowohl unter Patienten, wie auch Kontrollen gab es Personen, deren Werte darunter lagen (10 % bei Patienten (n=4); 4,5 % in der Kontrollgruppe (n=1)). Ein Großteil der Untersuchten befand sich jedoch oberhalb des unteren Referenzwertes und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS

Patienten und Kontrollpersonen im Hinblick auf den Fruktosegehalt des Ejakulates gezeigt werden (Tab. 27).

Bei Untersuchung der sekretorischen Funktion des Nebenhodens mithilfe der Leitsubstanz α -Glukosidase zeigten sich ebenfalls ähnliche Werte bei Patienten und Kontrollen. Auch hier befand sich ein Großteil der Untersuchten oberhalb des unteren Referenzwertes von ≥ 20 mU/Ejakulat. In der Patientengruppe zeigte sich bei 19,5 % (n=8) eine Verminderung unter 20 mU/Ejakulat, in der Kontrollgruppe war dies bei 4,5 % (n=1) der Fall. Insgesamt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen (Tab. 27).

Als Parameter für die sekretorische Leistung der Prostata wurde der Zinkgehalt des Ejakulates bestimmt. 9,8 % (n=4) der Patientenproben wiesen Werte unter dem entsprechenden Referenzwert von $\geq 2,4$ μ mol/Ejakulat auf, die gesamte Kontrollgruppe befand sich hingegen im Referenzbereich. Im direkten Vergleich wies die Patientengruppe eine deutliche, aber nicht signifikante Verminderung des Zinkgehalts auf (6,6 μ mol/Ejakulat vs. 10,3 μ mol/Ejakulat) (Tab. 27).

Tabelle 27 Biochemische Markersubstanzen

	n	CP/CPPS		Kontrollgruppe		n	p-Wert
		Median	Range	Median	Range		
Fruktose (μmol/Ejakulat)	40	42,2	9,1-158,0	45,8	9,8-116,6	22	0,462
α-Glukosidase (mU/Ejakulat)	41	40,6	4,1-242,0	40,4	19,6-134,8	22	0,713
Zink (μmol/Ejakulat)	41	6,6	1,3-40,8	10,3	4,0-24,5	22	0,066

Elastase, Interleukin-8

Zusätzlich zur Leukozytenzahl im Ejakulat lassen die Parameter Elastase und das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-8 Rückschlüsse auf entzündliche Aktivität im Bereich der Samenwege zu. Für die von polymorphkernigen Leukozyten stammende Elastase werden Werte bis 250 ng/ml als normwertig angesehen, Werte zwischen 250-1000 ng/ml geben Hinweise auf eine mäßige Entzündungsaktivität, Werte von > 1000 ng/ml auf eine massive Entzündung. In der Patientengruppe befanden sich 7,3 % (n=3) der gemessenen Werte im Bereich von 250-1000 ng/ml, 2,4 % (n=1) über 1000 ng/ml. In der Kontrollgruppe befanden sich 13,6 % (n=3) der Werte im Bereich zwischen 250-1000 ng/ml, keiner der Werte lag > 1000 ng/ml. Im Vergleich beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Elastasekonzentration gezeigt werden (Tab. 28).

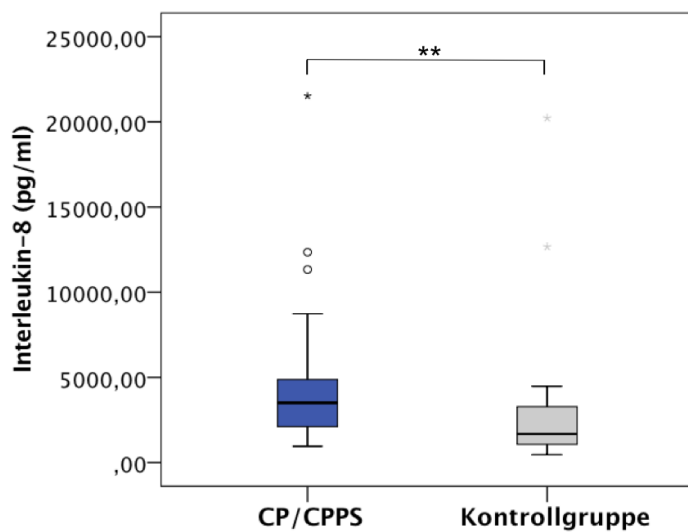


Abbildung 18: Interleukin-8 CP/CPPS vs. Kontrollen.

Bei Analyse der Interleukin-8 Konzentration hingegen wies die Gruppe der Patienten mit einem Median von 3503 pg/ml im Gegensatz zu 1679,5 pg/ml in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung des Zytokins auf ($p \leq 0,01$) (Tab. 28, Abb. 18).

Tabelle 28 Entzündungsdiagnostisch relevante Parameter

	n	CP/CPPS		n	Kontrollgruppe		p-Wert
		Median	Range		Median	Range	
Granulozyten-Elastase (ng/ml)	41	37	10-1191	22	31,5	10-415	0,674
Interleukin-8 (pg/ml)	40	3503	956-21524	22	1679,5	458-20226	0,004

3.2 Spermien-DNA-Fragmentierung

Zur Beurteilung der DNA-Integrität in Spermien wurde der DNA Fragmentation Index (%DFI, im Folgenden: DFI) bestimmt. Wie bereits beschrieben, existieren für diesen Parameter keine festgesetzten Referenzwerte. In der Literatur werden studienabhängig DFI Grenzwerte von 25-30% für die Differenzierung zwischen fertilen und subfertilen Männern diskutiert (Schulte et al., 2010). Im Folgenden wurden die DFIs von Patienten und Kontrollen verglichen. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen DFI und SpermioGrammparametern in der Patientengruppe analysiert, um potentielle Korrelationen der Parameter bei CP/CPPS zu erkennen. Um den Einfluss des Alters auf diesen Wert zu erörtern, wurden Alters-adjustierte Gruppen der Kohorte gebildet, und der DFI innerhalb dieser verglichen. Darüber hinaus wurde der Bezug zwischen DNA-Fragmentierung und Entzündungsparametern bei CP/CPPS Patienten untersucht.

3.2.1 Patienten vs. Kontrollen

In beiden Gruppen, insbesondere in der Patientengruppe, zeigten sich heterogene Verteilungsmuster des DFI. So betrug die Varianz des Parameters in der Patientengruppe 312,42 und 21,93 in der Kontrollgruppe. Die folgenden Abbildungen (Abb. 19; Abb. 20) geben exemplarisch einen Überblick über unterschiedliche DFI in beiden Gruppen.

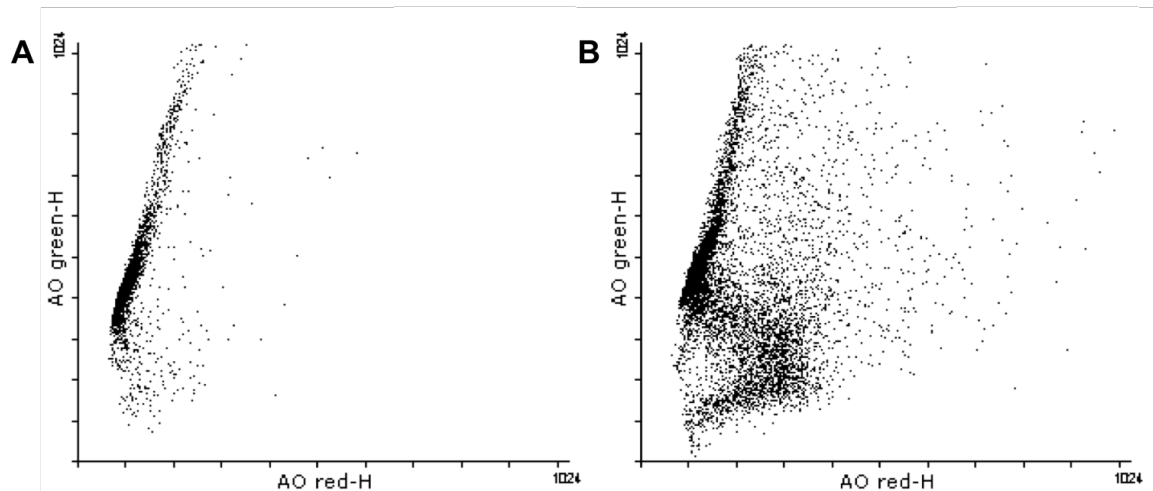


Abbildung 19: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zweier Patientenproben. Auf der x-Achse ist die Detektion der roten Fluoreszenz angezeigt, auf der y-Achse die der grünen Fluoreszenz. Abbildung A zeigt eine Probe mit niedrigem DFI (DFI: 5,9 %), Abbildung B eine Probe mit hohem DFI (DFI: 63,4 %).

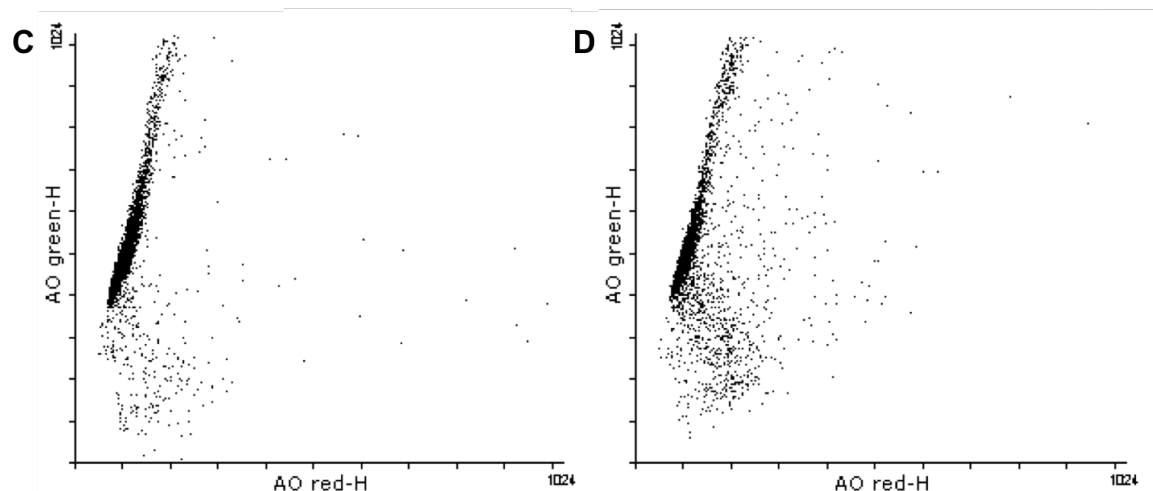


Abbildung 20: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zweier Proben der Kontrollgruppe. Entsprechend Abbildung 19 zeigt Abbildung C eine Probe mit niedrigem DFI (DFI: 4,7 %), Abbildung D eine Probe mit einem der höchsten DFI innerhalb der Kontrollgruppe (DFI: 18,0 %).

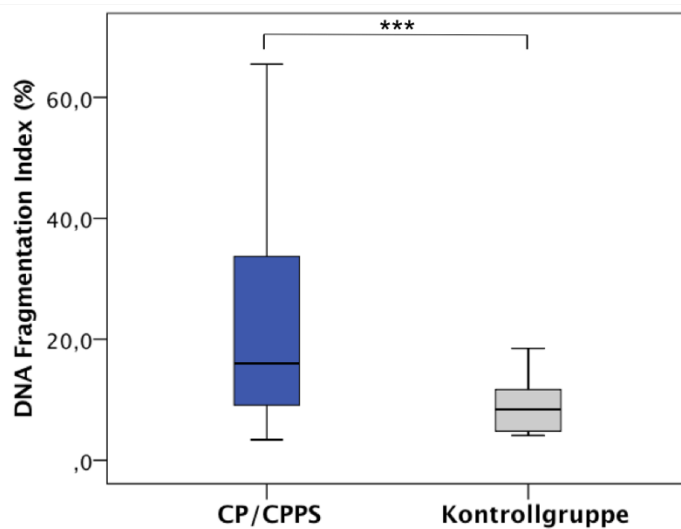


Abbildung 21: DFI CP/CPPS vs. Kontrollen.

In der Patientengruppe ergab sich für den DFI ein medianer Wert von 16,0 %. In Bezug zu den in der Literatur diskutierten Grenzwerten für den DFI gesetzt, befanden sich 36,6 % (n= 15) der Patientenproben im Bereich DFI > 25% und 29,3 % (n=12) befanden sich im Bereich DFI > 30%. In der Kontrollgruppe betrug der mediane Wert 8,4 %, dabei wies keine Probe einen DFI von über 25 bzw. 30 % auf. Bei CP/CPPS Patienten zeigte sich insgesamt eine signifikante Erhöhung des DFI im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$) (Tab. 29, Abb. 21).

Tabelle 29: DNA-Fragmentierung

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
DNA Fragmentation Index (%)	16,0	3,4-65,5	8,4	4,1-18,5	0,001

3.2.2 Assoziation zwischen DFI und weiteren Spermienparametern in der Patientengruppe

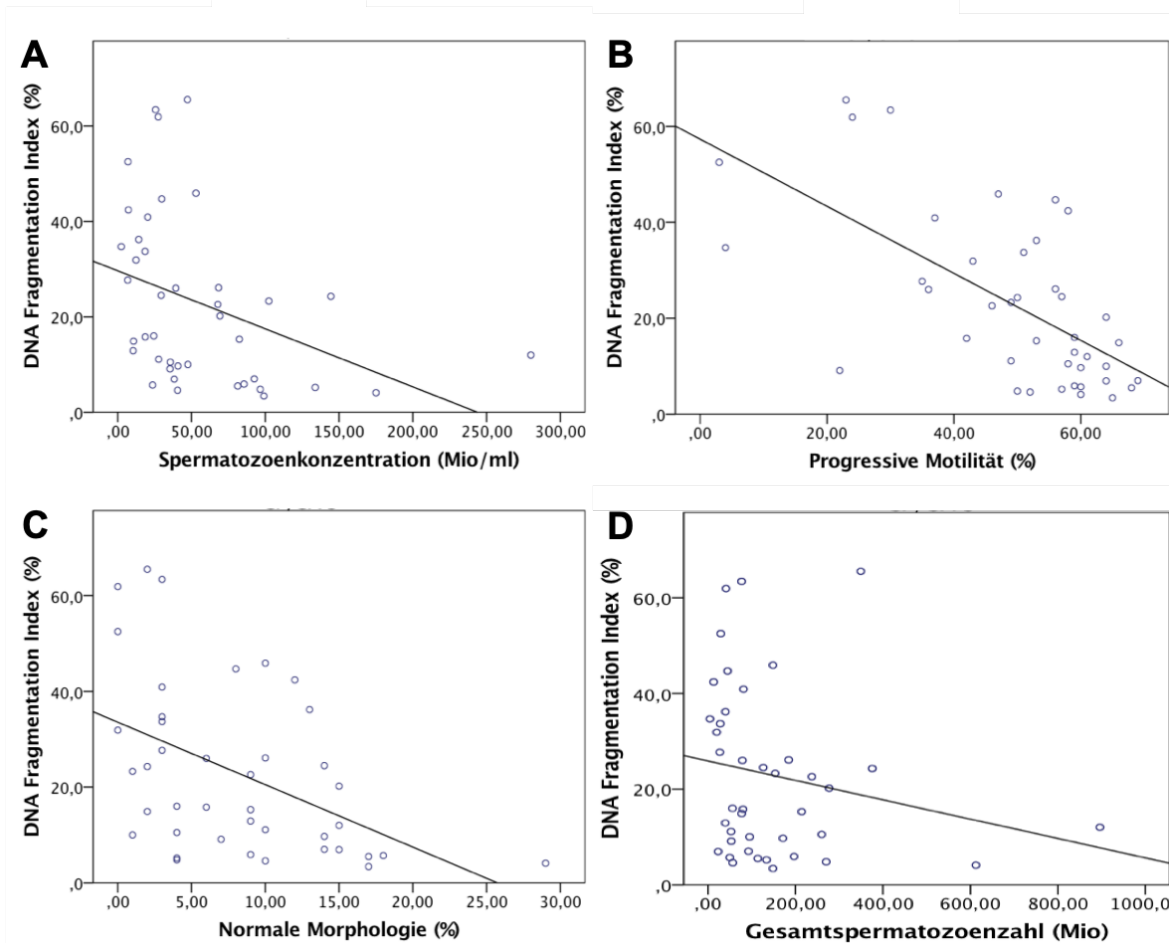


Abbildung 22: Korrelationen des DFI mit der Spermatozoenkonzentration (A), der progressiven Motilität (B), der normalen Morphologie (C) sowie Gesamtspermatozoenzahl (D).

In der Patientengruppe korrelierte der DFI signifikant mit einer Reihe weiterer Parameter. So zeigte sich eine signifikante negative Korrelation mit der Gesamtspermatozoenzahl ($r=-0,320$; $p\leq 0,05$), der Spermatozoenkonzentration ($r=-0,508$; $p\leq 0,001$; Abb. 22 A), der Gesamtmotilität ($r=-0,636$; $p\leq 0,001$), der progressiven Motilität ($r=-0,626$; $p\leq 0,001$, Abb. 22 B), der normalen Morphologie ($r=-0,511$; $p\leq 0,001$; Abb. 22 C) sowie der Protamin 1/2 mRNA Ratio ($r=-0,494$; $p\leq 0,001$; Abb. 31 A). Eine signifikante positive Korrelation ergab sich in Bezug auf Kopfdefekte ($r=0,345$; $p\leq 0,05$) und Schwanzdefekte ($r=0,621$; $p\leq 0,001$). Ein Überblick über den Zusammenhang des DFI mit SpermioGrammparametern, biochemischen Parametern und Auswertungen der Fragebögen wird an späterer Stelle dargestellt (Tab. 36).

3.2.3 Alters-Adjustierung

Um den in der Literatur diskutierten Einfluss des Alters auf den DFI in dieser Studie zu untersuchen, wurden die Patienten sowie die Kontrollgruppe in Gruppen größer-gleich sowie unterhalb des Alters-Medians des gesamten Kollektivs, 34 Jahre, eingeordnet.

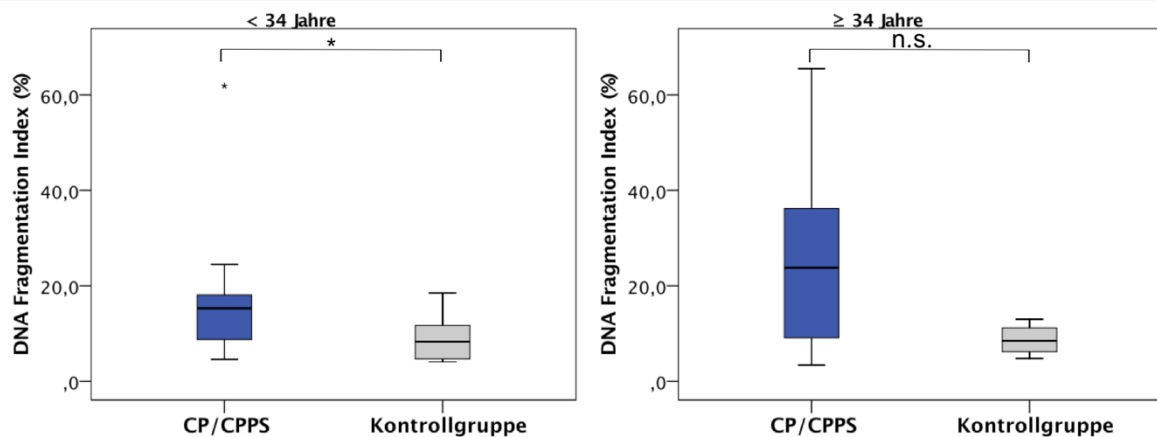


Abbildung 23: Vergleich des DFI von Patienten und Kontrollgruppe in alters-adjustierten Gruppen von < 34 Jahren und ≥ 34 Jahre.

Im Vergleich der Untergruppen < 34 Jahre konnte eine signifikante Erhöhung des DFI in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe (15,3 % vs. 8,3 %) nachgewiesen werden. In der Untergruppe ≥ 34 Jahre zeigte sich ebenfalls eine deutliche, jedoch nicht signifikante Erhöhung des DFI in der Patientengruppe. Innerhalb der Patientengruppe bestand beim Vergleich zwischen < 34- und ≥ 34-Jährigen kein signifikanter Unterschied des DFI, in der Kontrollgruppe wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied des DFI bei < 34- und ≥ 34-jährigen Probanden nachgewiesen (Tab. 30).

Tabelle 30 Altersadjustierung des DFI

	CP/CPPS			Kontrollgruppe			p-Wert
	n	Median	Range	n	Median	Range	
< 34 Jahre	11	15,3	4,6-61,9	17	8,3	4,1-18,5	0,041
≥ 34 Jahre	30	23,8	3,4-65,5	5	8,5	4,8-13,0	0,094
p-Wert	0,362			0,754			

3.3 High DNA Stainability

3.3.1 Patienten vs. Kontrollen

Die Bestimmung der Zellen mit High DNA Stainability (%HDS, im Folgenden: HDS) kann Hinweise auf die Beschaffenheit des Chromatins in Spermien geben. Die vermehrte Anfärbbarkeit resultiert am ehesten aus einer geringeren Chromatinkondensation durch einen erhöhten Anteil an verbliebenen Histonen und einer inkompletten Histon-Protamin-Transition (Jerre et al., 2019). Es existiert bislang kein eindeutiger Referenzwert oder -bereich für diesen Parameter. Folgende Abbildungen geben einen Überblick über unterschiedliche HDS-Muster in beiden untersuchten Gruppen (Abb. 24; Abb. 25).

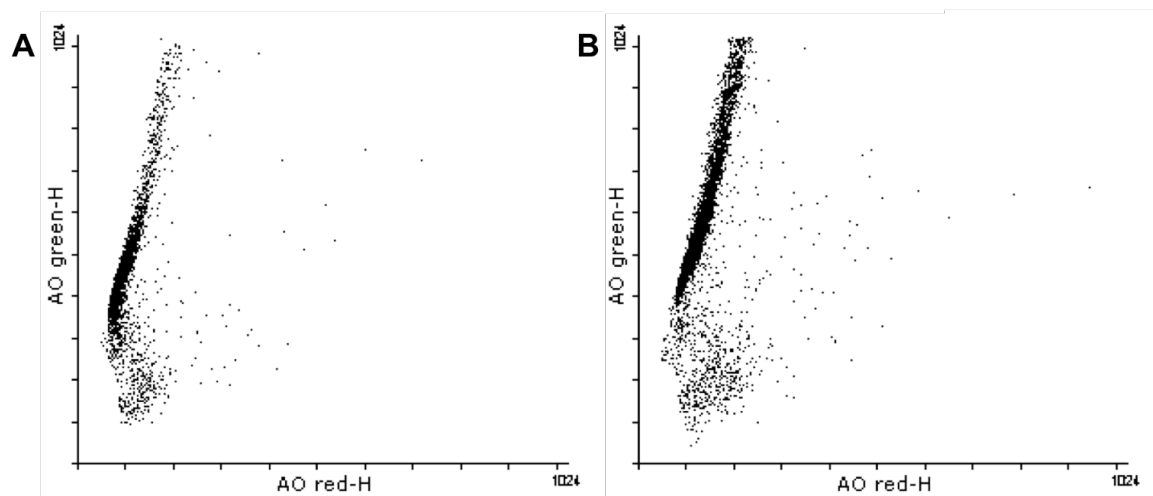


Abbildung 24: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zweier Proben von CP/PPS Patienten. Abbildung **A** zeigt eine Probe mit niedrigem HDS-Anteil (HDS: 6,7 %), Abbildung **B** eine Probe mit höherem HDS-Anteil (HDS: 24,2 %).

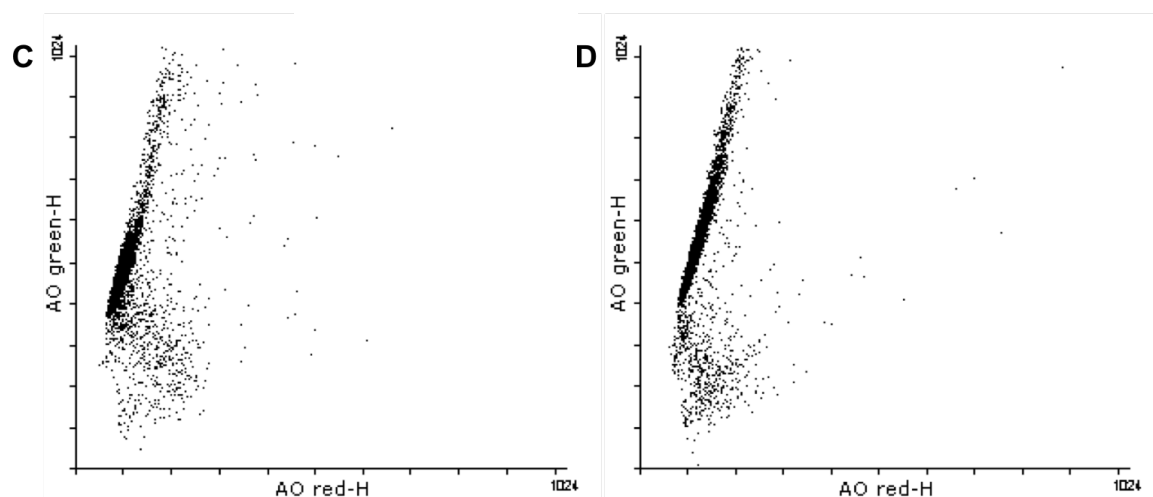


Abbildung 25: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zweier Proben der Kontrollgruppe. Auf Abbildung **C** ist ein niedriger HDS-Anteil zu erkennen (HDS: 6,2 %), Abbildung **D** zeigt eine Probe mit höherem HDS-Anteil (HDS: 23,4 %).

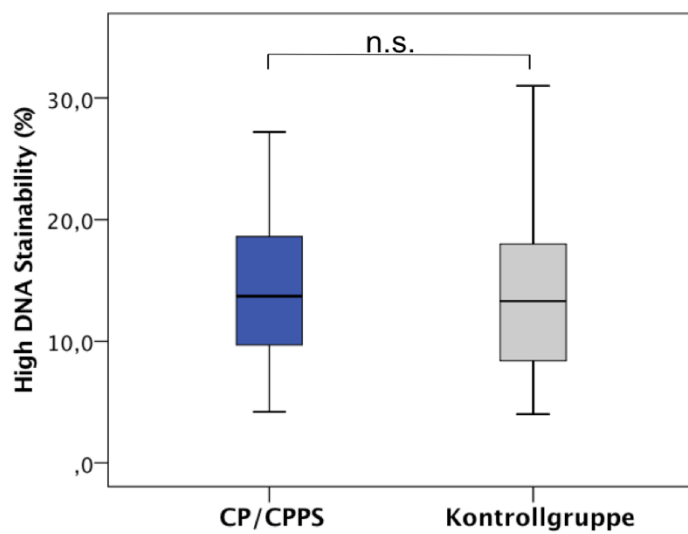


Abbildung 26: HDS CP/CPPS vs. Kontrollen.

Es zeigte sich eine sehr ähnliche Verteilung des Anteils an HDS. So traten in beiden Gruppen sowohl Proben mit einem sehr niedrigen Anteil an HDS auf, als auch Proben mit deutlich höheren Anteilen von maximal 27,2 % beziehungsweise 31,0 %. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied der HDS zwischen CP/CPPS Patienten und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Tab. 31).

Tabelle 31 High DNA Stainability

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
High DNA Stainability (%)	13,7	4,2-27,2	13,3	4,0-31,0	0,751

3.3.2 Assoziation zwischen HDS und weiteren Spermienparametern in der Patientengruppe

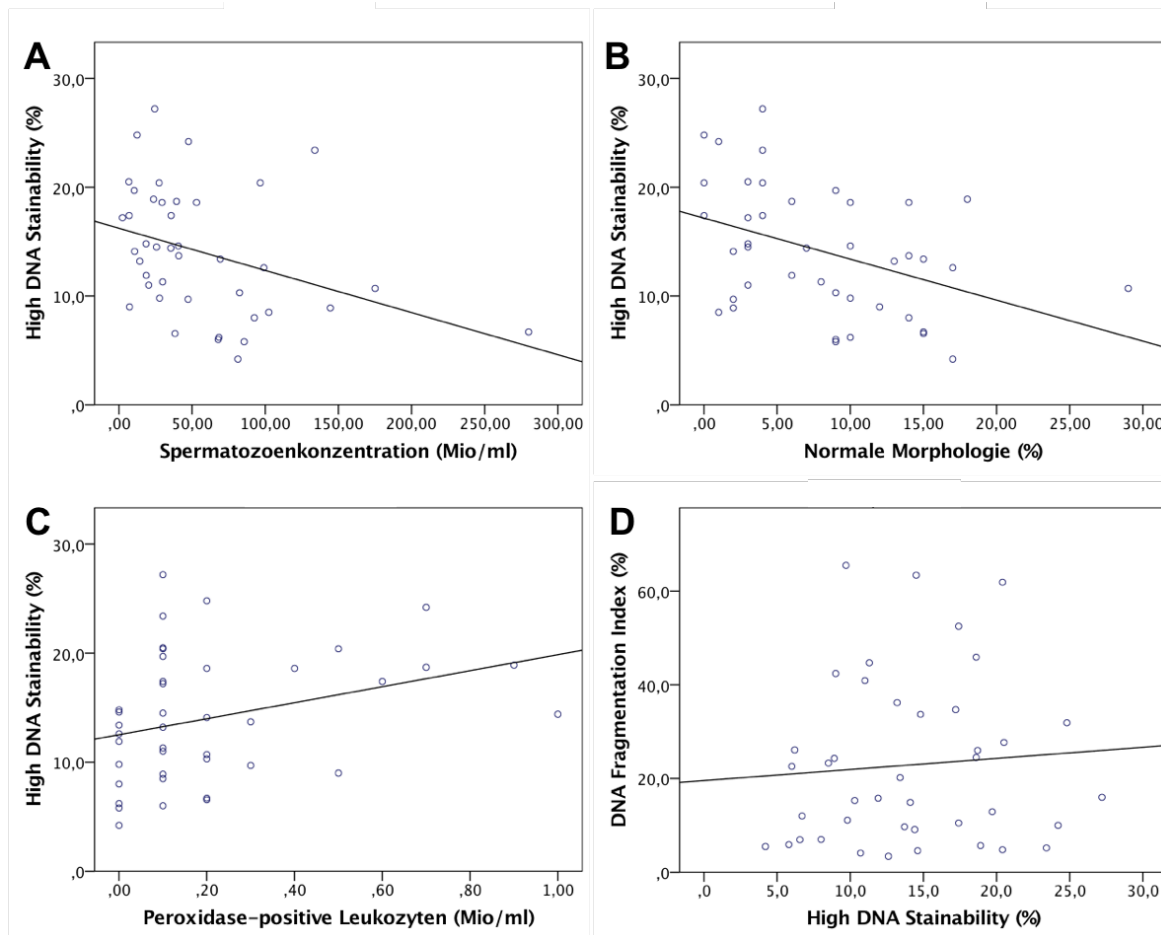


Abbildung 27: Korrelationen von HDS mit der Spermatozoenkonzentration (A), der normalen Morphologie (B), mit Peroxidase-positiven Leukozyten (C) und dem DFI (D) bei CP/CPPS Patienten.

Der Anteil an HDS korrelierte in der Patientengruppe mit mehreren Parametern (Abb. 27). Hierbei zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zu Spermatozoenkonzentration ($r=-0,420$; $p\leq 0,01$) und Gesamtspermatozoenzahl ($r=-0,366$, $p\leq 0,05$) sowie normaler Morphologie ($r=-0,399$; $p\leq 0,01$). Ein signifikanter positiver Zusammenhang bestand im Hinblick auf Kopfdefekte ($r=0,378$; $p\leq 0,05$) und Peroxidase-positive Leukozyten ($r=0,342$; $p\leq 0,05$). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen DFI und HDS nachgewiesen werden. Die Zusammenhänge von HDS mit weiteren SpermioGrammparametern, biochemischen Parametern und den Auswertungen der Fragebögen werden an späterer Stelle dargestellt (Tab. 36).

3.4 Protamin 1/2 mRNA Ratio

Die Protamin 1/2 Ratio beschreibt das Verhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2 in Spermien. Das Verhältnis ist bei regelrechter Fertilität etwa ausgeglichen und befindet sich im Bereich von 0,8 – 1,2. Im Folgenden wurde daher dieser Bereich als Anhaltspunkt ausgewählt.

3.4.1 Patienten vs. Kontrollen

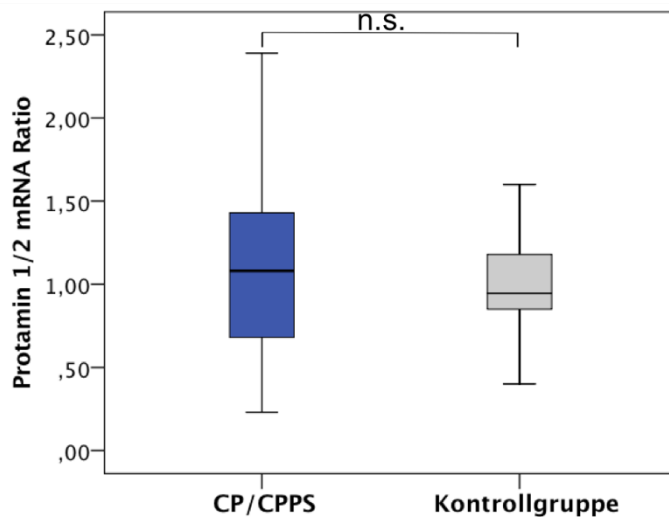


Abbildung 28: Protamin 1/2 mRNA Ratio CP/CPPS vs. Kontrollen.

Im Vergleich der Protamin 1/2 mRNA Ratios beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Höhe der Ratio festgestellt werden. Die Mediane beider Gruppen befanden sich mit 1,08 bei Patienten und 0,95 bei Kontrollen innerhalb des Bereiches von 0,8 – 1,2. In der Patientengruppe zeigten sich jedoch insgesamt mehr und teils deutlicher von diesem Bereich abweichendere Werte (Tab. 32, Abb. 28).

Tabelle 32 Protamin 1/2 mRNA Ratio

	CP/CPPS (n= 41)		Kontrollgruppe (n=22)		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	
Protamin 1/2 mRNA Ratio	1,08	0,23-2,39	0,95	0,40-1,60	0,729

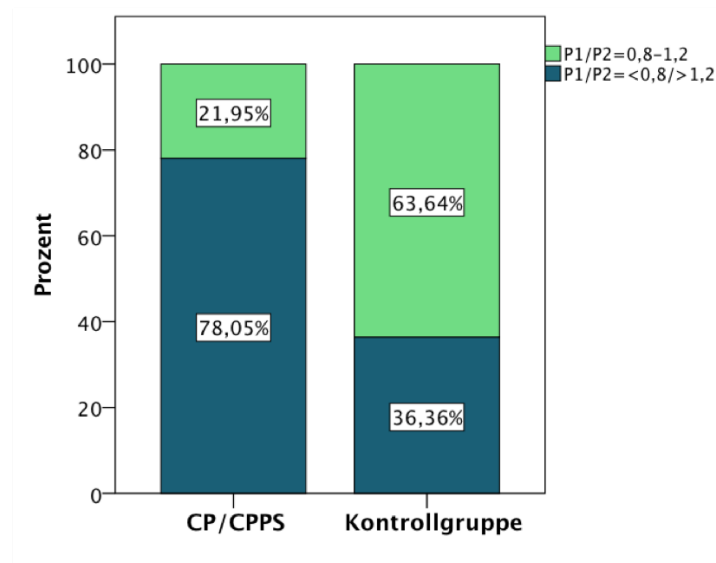


Abbildung 29: Gezeigt ist der Anteil von Protamin 1/2 mRNA Ratio Werten innerhalb sowie außerhalb des Bereiches 0,8 – 1,2 bei Patienten und Kontrollgruppe.

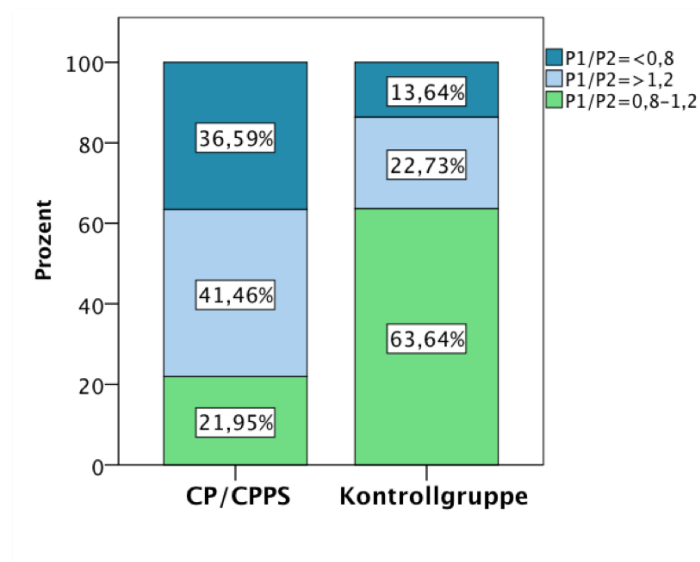


Abbildung 30: Prozentuale Verteilung der Werte bei Patienten und Kontrollgruppe innerhalb sowie ober- und unterhalb des Bereiches 0,8 - 1,2.

In der CP/CPPS Gruppe befanden sich 21,95 % (n=9) der Ratio Werte innerhalb des Bereiches 0,8- 1,2. In der Kontrollgruppe war dies hingegen bei 63,64 % (n=14) der Werte der Fall. Im Gegensatz dazu wichen bei CP/CPPS Patienten 78,05 % (n=32) der Werte von diesem Bereich ab (Abb. 29). Bei genauerer Differenzierung befanden sich hierbei neben den Range-konformen Werten 41,46 % (n=17) oberhalb von 1,2 sowie 36,59 % (n=15) unterhalb von 0,8. In der Kontrollgruppe fanden sich 36,36 % (n=8) der Werte außerhalb des Bereiches wieder, von diesen lagen 22,37 % (n=5) oberhalb von 1,2 sowie 13,64 % (n=3) unterhalb von 0,8 (Abb. 30). Damit zeigte sich insgesamt eine deutlich stärkere Abweichung von der Range in der Patientengruppe.

3.4.2 Assoziation zwischen der Protamin 1/2 mRNA Ratio und weiteren Spermogrammparametern in der Patientengruppe

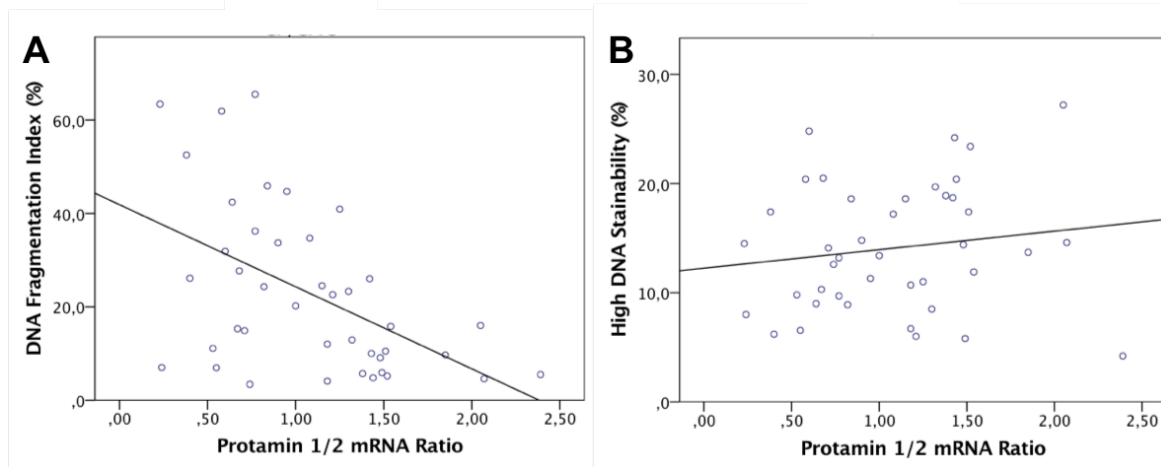


Abbildung 31: Korrelationen der Protamin 1/2 mRNA Ratio mit dem DFI (A) und High DNA Stainability (B).

Bei Betrachtung der Zusammenhänge der Protamin 1/2 mRNA Ratio zeigte sich eine signifikante negative Korrelation mit dem DFI ($r=-0,494$; $p\leq 0,001$) und Schwanzdefekten ($r=-0,357$; $p\leq 0,05$) sowie eine signifikante positive Korrelation mit Testosteron ($r=0,357$; $p\leq 0,05$). Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zu HDS (Abb. 31). Weitere Zusammenhänge sind in Tabelle 36 aufgeführt.

3.5 DFI, HDS, Protamin 1/2 mRNA Ratio in Abhängigkeit von Entzündungsparametern

Um eventuelle Veränderungen von DFI, HDS und Protamin 1/2 mRNA Ratio bei erhöhten Entzündungsparametern zu untersuchen, wurde die Patientengruppe unterteilt in Personen, bei denen kein, ein oder ≥ 2 erhöhte Parameter vorlagen. Hierzu zählten Leukozyten im Exprimaturin, $\geq 1 \times 10^6$ Peroxidase-positive Leukozyten im Ejakulat oder eine Granulozyten-Elastase von ≥ 250 ng/ml. 34,1 % ($n=14$) der Patienten wiesen keinen erhöhten Entzündungsparameter auf, genau ein erhöhter Parameter lag bei 53,7 ($n=22$) der Patienten vor, 12,2 % ($n=5$) wiesen ≥ 2 erhöhte Parameter auf.

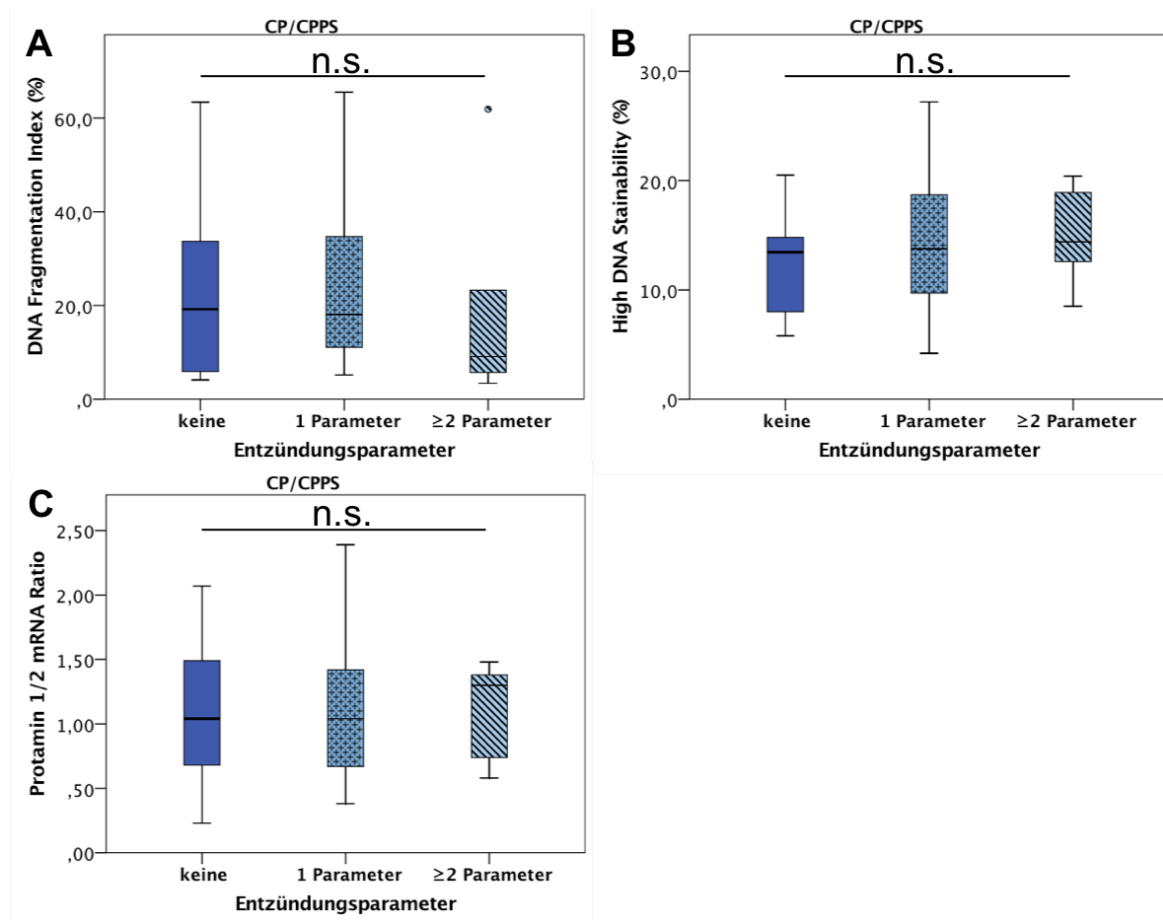


Abbildung 32: Vergleich von DFI (A), HDS (B) und Protamin 1/2 mRNA Ratio (C) bei Vorliegen von erhöhten Entzündungsparametern.

Für keinen der untersuchten Messwerte (DFI, HDS, Protamin 1/2 mRNA Ratio) konnten signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Vorhandenseins der genannten Entzündungsparameter nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei Patienten mit ≥ 2 erhöhten Entzündungsparametern die mediane Protamin 1/2 mRNA Ratio außerhalb der Range 0,8-1,2 (Tab. 33, Abb. 32).

Tabelle 33 DFI, HDS und Protamin 1/2 mRNA Ratio und Entzündungsparameter

	Kein Parameter		1 Parameter		≥ 2 Parameter		p-Wert
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
DFI	19,2	4,1-63,4	18,1	5,2-65,5	9,1	3,4-61,9	0,530
HDS	13,5	5,8-20,5	13,8	4,2-27,2	14,4	8,5-20,4	0,697
Protamin 1/2 mRNA Ratio	1,04	0,23-2,07	1,04	0,38-2,39	1,30	0,58-1,48	0,979

3.6 Hormone in der Patientengruppe

Der Referenzbereich des Gesamt-Testosterons im Serum ist mit 350-1000 ng/dl angegeben. Bei Vergleich der Patienten in Gruppen von über und unter 34 Jahren zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Gesamt-Testosteron in der älteren Gruppe ($p = 0,038$). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Östradiol feststellen (Referenzbereich 12-34 pg/ml). Tabelle 14 gibt einen Überblick über den Testosteron- und Östradiol-Status der Patientengruppe.

Tabelle 34 Hormonmessung CP/CPPS

	CP/CPPS gesamt			CP/CPPS < 34 Jahre			CP/CPPS ≥ 34 Jahre		
	n	Median	Range	n	Median	Range	n	Median	Range
Testosteron (ng/dl)	40	428,5	122,0- 818,0	11	481,0	370,0- 772,0	29	416,0	122,0- 818,0
Östradiol (pg/ml)	37	32,0	19,0- 60,0	10	35,0	22,0- 60,0	27	31,0	19,0- 60,0

3.7 Klinisch – andrologische Charakteristika

Zur Verdeutlichung der Symptomatik von Patienten im Rahmen der klinischen Diagnostik und gegebenenfalls Verlaufsbeobachtung wurde diese anhand der Fragebögen IPSS, CPSI und IIEF erfasst. Zudem wurden alle Patienten mittels UPOINTS klinisch phänotypisiert. Die Auswertung der Fragebögen von sowohl Patienten als auch der Kontrollgruppe ist in Tabelle 35, die UPOINTS-Verteilung der Patienten in Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 35 Auswertung der Fragebögen IPSS, CPSI, IIEF

CP/CPPS				Kontrollgruppe		
Fragebogen	n	Median	Range	n	Median	Range
IPSS	34	10	0-32	2	0	0-7
CPSI Harnsymptome		3	0-10	1	0	0-3
Schmerzsymptomatik		11	2-19	22	0	0-4
Lebensqualität		8,5	2-12	0	0	0-3
Gesamtwert		22,5	5-40	1	0	0-8
IIEF	27	27	1-30	22	29	8-30

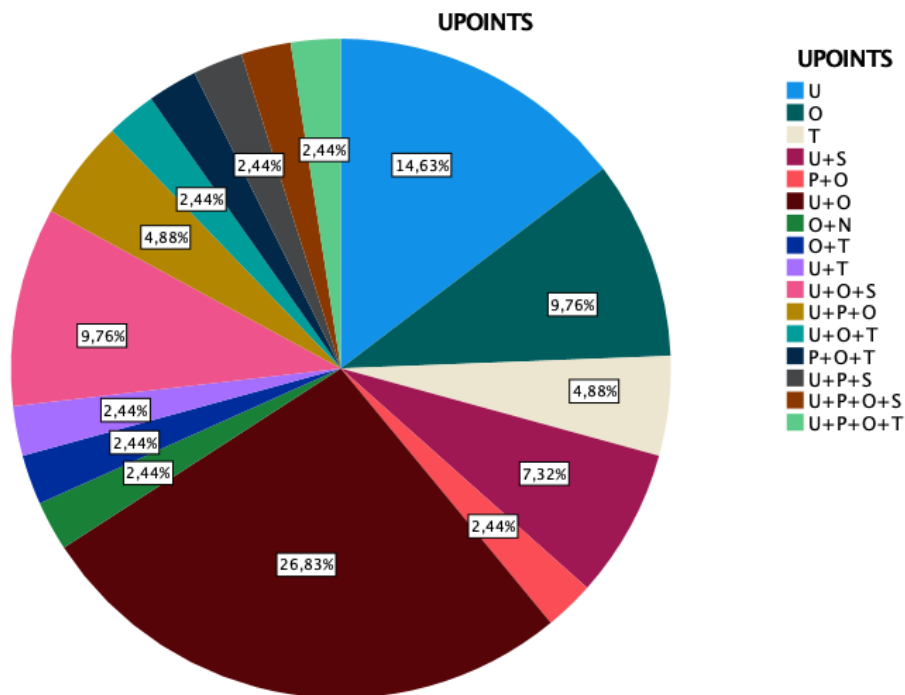


Abbildung 33: Verteilung der UPOINTS-Phänotypisierung in der Patientengruppe (U=Urinary, P=Psychosocial, O=Organ specific, I=Infection, N=Neurologic/Systemic, T=Tenderness, S=Sexual Dysfunction).

In Bezug auf die UPOINTS-Phänotypisierung der Patientengruppe wurde untersucht, ob das Vorliegen einzelner positiver Domänen oder einer bestimmten Kombination mehrerer positiver Domänen mit Unterschieden hinsichtlich DFI, HDS, Protamin-Ratio oder Parametern des Basis-Spermiogramms bzw. biochemischen Ejakulatparametern oder Entzündungsparametern assoziiert ist. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Parameter bei Vorliegen einer bestimmten positiven Domäne (alle $p > 0,05$) beziehungsweise einer bestimmten Kombination positiver Domänen ($p > 0,05$). Weiterhin wurde untersucht, ob sich bezüglich der Anzahl positiver Domänen (1-4) bei Patienten Unterschiede der genannten Parameter ergeben. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede bei Vorliegen von entweder einer, zwei, drei oder vier positiven UPOINTS-Domänen deutlich ($p > 0,05$).

Im Rahmen der andrologischen Anamnese wurde bei einem Teil der Patienten die Kinderzahl sowie ein gegebenenfalls aktuell vorliegender Kinderwunsch erfasst (Abb. 34). Letzteres war bei 11,76 % ($n=2$) der Befragten der Fall, bei einem Großteil lag kein aktueller Kinderwunsch vor. Die Mehrheit der Befragten gab an, bereits Kinder zu haben (61,90%, $n=13$).

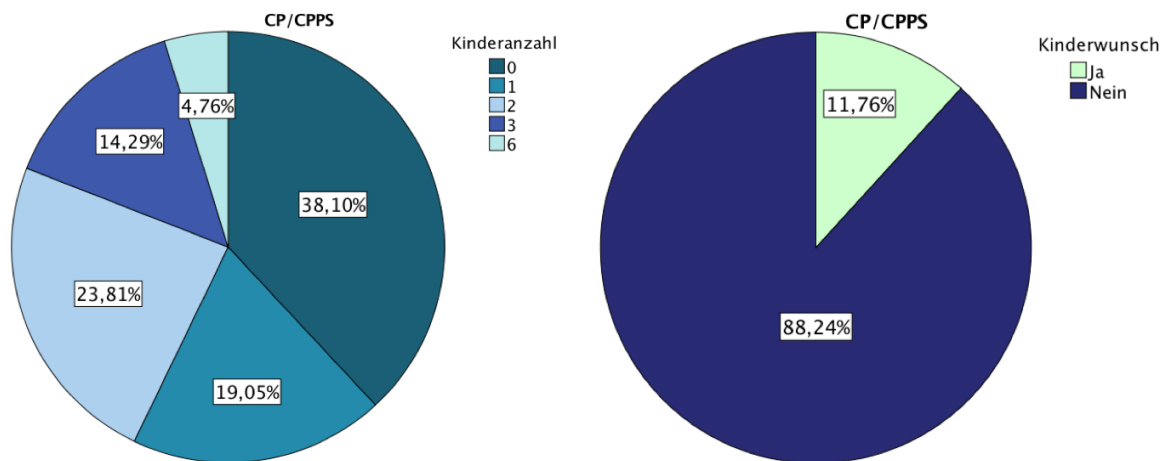


Abbildung 34: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Kinderanzahl (n=21) sowie den aktuell vorliegenden Kinderwunsch (n=17) in der Patientengruppe.

Erfasst wurde außerdem die Libido in Patienten- und Kontrollgruppe in den Kategorien „hoch“, „durchschnittlich“ und „wenig“. Hierbei schätzte ein im Vergleich zur Kontrollgruppe weitaus geringerer Teil der Patienten seine Libido als hoch ein, während ein jeweils deutlich größerer Teil als in der Kontrollgruppe eine durchschnittliche oder geringe Libido angab (Abb. 35).

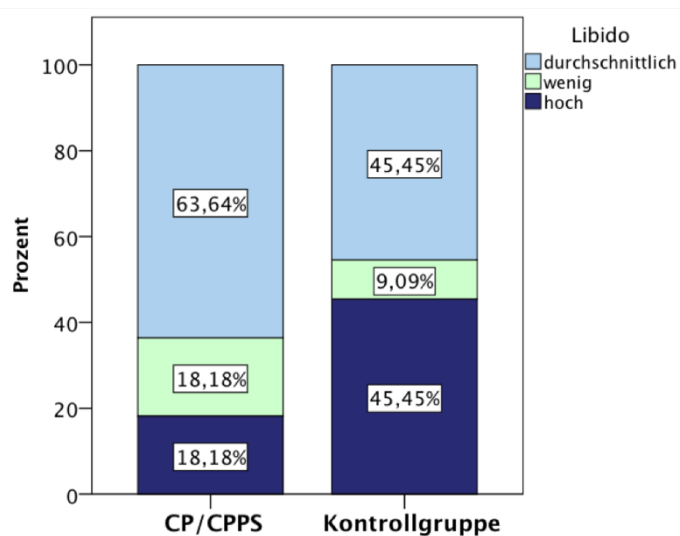


Abbildung 35: Libido bei Patienten (n=11) vs. Kontrollgruppe (n=22).

3.8 Übersicht über Zusammenhänge von DFI, HDS, Protamin 1/2 mRNA Ratio mit weiteren Parametern in der Patientengruppe

Tabelle 36 Korrelationen der Parameter DFI, HDS und Protamin 1/2 mRNA Ratio mit SpermioGrammparametern, biochemischen Parametern, Hormonmessungen sowie Auswertungen der andrologischen Fragebögen.

	DFI		HDS		Protamin 1/2 mRNA Ratio	
	r	p	r	p	r	p
<i>Volumen</i>	0,242	0,127	0,078	0,629	0,038	0,813
<i>ph</i>	-0,022	0,894	-0,059	0,714	-0,101	0,530
<i>Gesamtspermatozoenzahl</i>	-0,320	0,042	-0,366	0,019	0,274	0,083
<i>Spermatozoenkonzentration</i>	-0,508	0,001	-0,420	0,006	0,214	0,178
<i>Gesamtmotilität</i>	-0,636	<0,001	-0,169	0,291	0,245	0,123
<i>Progressive Motilität</i>	-0,626	<0,001	-0,229	0,15	0,174	0,276
<i>Normale Morphologie</i>	-0,511	0,001	-0,399	0,01	0,123	0,443
<i>Kopfdefekte</i>	0,345	0,027	0,378	0,015	0,041	0,800
<i>Mittelstückdefekte</i>	-0,195	0,221	0,192	0,229	-0,021	0,898
<i>Schwanzdefekte</i>	0,621	<0,001	0,208	0,192	-0,357	0,022
<i>Vitalität</i>	-0,543	0,084	0,087	0,800	0,192	0,572
<i>Peroxidase-positive Leukozyten</i>	0,225	0,157	0,342	0,029	-0,064	0,692
<i>Unreife Spermatozoen</i>	-0,056	0,726	0,022	0,891	0,083	0,604
<i>Fruktose</i>	0,256	0,111	0,075	0,646	0,049	0,764
<i>α-Glukosidase</i>	0,164	0,306	-0,155	0,334	-0,064	0,689
<i>Zink</i>	-0,076	0,638	0,113	0,483	0,263	0,097
<i>Granulozyten-Elastase</i>	-0,078	0,629	-0,013	0,937	0,056	0,730
<i>Interleukin-8</i>	0,198	0,220	0,098	0,546	-0,013	0,937
<i>DFI</i>	-	-	0,097	0,546	-0,494	0,001
<i>HDS</i>	0,097	0,546	-	-	0,170	0,289
<i>Protamin 1/2 mRNA Ratio</i>	-0,494	0,001	0,170	0,289	-	-
<i>Testosteron</i>	-0,309	0,052	-0,023	0,887	0,357	0,024
<i>Östradiol</i>	-0,002	0,989	0,126	0,458	0,104	0,540
<i>CPSI Gesamtwert</i>	-0,111	0,533	-0,081	0,650	0,127	0,475
<i>CPSI Harnsymptome</i>	0,050	0,780	-0,027	0,880	-0,004	0,983
<i>CPSI Schmerzen</i>	-0,209	0,235	-0,056	0,755	0,139	0,433
<i>CPSI Lebensqualität</i>	-0,024	0,893	-0,032	0,857	0,247	0,158
<i>IPSS</i>	-0,141	0,427	-0,077	0,665	0,092	0,606
<i>IIEF</i>	0,324	0,099	-0,006	0,974	-0,503	0,007

signifikante Korrelationen sind blau unterlegt

4 Diskussion

4.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende Arbeit umfasst 41 Patienten mit CP/CPPS sowie eine Kontrollgruppe von 22 Personen. Die Studiengröße liegt somit im Hinblick auf die Auswertung von SpermioGrammparametern bei CP/CPPS und die Untersuchung von DNA-Fragmentierung und Protamin mRNA Ratio im Bereich der Kollektivgrößen verwandter Einzelstudien, wie verschiedene Übersichtsarbeiten zeigen (Condorelli et al., 2017; Fu et al., 2014; Ni et al., 2016). Trotz dieser begrenzten Kollektivgröße zeigten sich signifikante Unterschiede, welche sich bei einer Ausweitung der Untersuchungskollektive vermutlich weiterhin bestätigen und noch verdeutlichen würden.

In Bezug auf die Altersverteilung von CP/CPPS Patienten waren der Altersmedian von 40 Jahren und der Altersdurchschnitt von 40,4 Jahren sehr ähnlich zu denen anderer Studien zu diesem Krankheitsbild, welche meist zwischen 30 und 41 Jahren, in einzelnen Fällen bei 27 – 29 bzw. 55 Jahren liegen. Somit befand sich auch in dieser Studie ein Großteil der Patienten im reproduktiven Alter. Auch das Altersspektrum zeigte sich typisch im Vergleich zu anderen Arbeiten (Condorelli et al., 2017; Fu et al., 2014; Ruzs et al., 2012; Wagenlehner et al., 2012). Der Altersmedian von 29,5 Jahren und der Altersdurchschnitt von 30,0 Jahren der Kontrollgruppe unterschieden sich um einige Jahre von der Patientengruppe. Dies ist vermutlich den unterschiedlichen Rekrutierungsverfahren beider Gruppen geschuldet, welche bei der Kontrollgruppe auf rein freiwilliger Basis über das Netzwerk der Universität und bei den Patienten über eine Vorstellung in der Prostatitis-Sprechstunde an der Klinik für Urologie erfolgten. Ähnliche Divergenzen bei Kollektiven sind auch in anderen Studien zu sowohl Fertilität bei CP/CPPS wie auch Untersuchung von Spermienparametern, DNA-Fragmentierung und Protamin mRNA Ratio bei anderen Erkrankungen zu beobachten (Condorelli et al., 2017; Rogenhöfer et al., 2017). Letztendlich lässt sich daher eine Beeinflussung der bestimmten Parameter durch den Altersunterschied nicht ausschließen.

Mit einem Median des NIH-CPSI Gesamtwertes von 22,5 lag in der untersuchten Patientengruppe eine typische Symptomschwere vor (Wagenlehner et al., 2012). Auch der Median des IPSS-Gesamtscores der Patientengruppe war mit einem Wert von 10 vergleichbar mit anderen Studien (Schneider et al., 2003).

4.2 Auswirkungen von CP/CPPS auf SpermioGrammparameter

In dieser Studie wurde unter anderem der Einfluss von CP/CPPS auf die im Rahmen der Ejakulatanalyse bestimmten Spermienparameter untersucht.

Ejakulatvolumen und pH-Wert

Das Ejakulatvolumen ist ein multifaktoriell beeinflusster Parameter und auch bei normwertigen Befunden kein Garant für eine ausreichende Spermienqualität. Im Hinblick auf das Ejakulatvolumen zeigte sich ein signifikant geringeres Volumen bei CP/CPPS Patienten. Hier bleibt zu erwähnen, dass beide Mediane trotzdem innerhalb des vorgesehenen Referenzbereiches lagen und in der Patientengruppe sich nur ein geringer Teil unterhalb des Referenzwertes befand. Insgesamt ist daher anzunehmen, dass die beobachtete Verminderung nicht zwingend von großer Bedeutung für die Fertilität der Patienten ist. Die Ergebnisse stehen größtenteils in Einklang mit vorherigen Arbeiten, so zeigten Condorelli et al. ebenfalls eine signifikante Verminderung des Ejakulatvolumens in der CP/CPPS Untergruppe verglichen mit einer Kontrollgruppe, während dies interessanterweise in der CBP Untergruppe dieser Übersichtsarbeit nicht der Fall war (Condorelli et al., 2017).

Der ideale pH-Wert des Ejakulates liegt im schwach alkalischen Bereich. Bei Betrachtung des Ejakulat pH-Wertes zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit niedrigeren pH-Werten in der Patientengruppe, wobei sich jedoch alle gemessenen Werte oberhalb des unteren Grenzwertes befanden. Dies deutet darauf hin, dass aus diesem Parameter nicht in besonderem Maße eine Beeinflussung der Spermienqualität bei CP/CPPS hervorgeht. Im Hinblick auf vorhergehende Studien ist der Ejakulat-pH häufig nicht evaluiert worden. Während in Studien zu bakteriellen Infektionen wie Epididymitis, CBP oder der chronischen Urethritis von signifikant erhöhten pH-Werten in der Patientengruppe berichtet wurde (Marconi et al., 2009), stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit der Arbeit von Schagdarsurengin et al. zu CP/CPPS, in der sich ebenfalls ein signifikant niedrigerer pH-Wert in der Patientengruppe zeigte. Auch hier lag der Median oberhalb des unteren Grenzwertes, bei Einzelwerten kam es zu Unterschreitungen (Schagdarsurengin et al., 2017).

Spermiengesamtzahl, -konzentration, -motilität, -morphologie und -vitalität

Insbesondere die Spermienkonzentration stellt neben progressiver Motilität und Spermienmorphologie einen der drei relevantesten Parameter des Basis-Spermiogramms dar. Bezüglich der Spermiengesamtzahl und Spermienkonzentration bestand in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Arbeit von Rusz. et al., in welcher die Autoren bei kontroverser Studienlage insgesamt von keiner Beeinflussung der Spermienkonzentration durch CP/CPPS ausgehen (Rusz, Pilatz, Wagenlehner, Linn, Diemer, et al., 2012). Im Gegensatz hierzu stehen Metaanalysen von Condorelli et al. sowie Fu et. al., in denen sich eine Assoziation von CP/CPPS und einer verminderten Spermienkonzentration zeigte, wobei in

letzterer Arbeit ebenfalls kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Spermiengesamtzahl erfasst wurde. Es ist jedoch anzumerken, dass in Bezug auf die Spermienkonzentration in dieser Arbeit fast jeder fünfte Patient einen Wert unterhalb der WHO-Referenz aufwies. Ergebnisse von Schagdarsurengin et al. bestätigen diese Zahl. In der genannten Arbeit lag bei 21,9 % der Patienten eine Oligozoospermie vor (Schagdarsurengin et al., 2017). Es kann daher, auch wenn in dieser Arbeit keine statistische Signifikanz vorlag, eine Beeinflussung der Spermienkonzentration bei CP/CPPS nicht ausgeschlossen werden.

Einen weiteren, für eine regelrechte Fertilität essentiellen Faktor stellt die Spermienmotilität dar. Die mediane Gesamtbeweglichkeit zeigte sich in beiden Gruppen normwertig, wobei bemerkenswerterweise bei etwa jedem zehnten Patienten eine Asthenozoospermie vorlag. Ähnlich verhält es sich in Bezug auf den entscheidenden Parameter der progressiven Motilität, wobei auch hier die Mediane innerhalb der Referenz lagen, es jedoch bei einem nicht geringen Teil der Patienten zu Unterschreitungen kam. Entsprechend konnte insgesamt eine signifikant verminderte Gesamtmotilität und progressive Motilität mit einem erhöhten Anteil an immotilen Spermien festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen zum größten Teil in Einklang mit bisherigen Studien, wobei bei Condorelli et al. sowie Fu et al. in der CP/CPPS Gruppe ausschließlich die progressive Motilität signifikant eingeschränkt war (Condorelli et al., 2017; Fu et al., 2014). Bei Schagdarsurengin et al. zeigten sich sowohl die Gesamtmotilität als auch die progressive Motilität signifikant vermindert (Schagdarsurengin et al., 2017). Aufgrund der Abhängigkeit der Spermienmotilität von multiplen Faktoren, insbesondere auch Veränderungen des Seminalplasmas, kann sie bei Entzündungen des Urogenitaltraktes vermindert sein (Diemer et al., 2003). Mitunter spielen hierbei das Vorhandensein von Leukozyten sowie pro-inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle. Da Leukozyten einen bedeutsamen Ursprung von ROS darstellen, wird vermutet, dass es durch den erhöhten oxidativen Stress beziehungsweise durch Überschreitung der antioxidativen Kapazität des Seminalplasmas und Spermiums zu Veränderungen der Fettsäuren-Zusammensetzung der Spermienplasmamembran sowie mitochondrialen Schäden kommt, welche Motilitätsveränderungen bewirken können (Diemer et al., 2003; Shi et al., 2012). Weiterhin zeigte sich in Studien von Lampiao et. al sowie Kopa et al., dass proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6, Interleukin-8 und TNF- α die Motilität negativ beeinflussen können (Eggert-Kruse et al., 2001; Kopa et al., 2005; Lampiao und du Plessis, 2008). Diese Zytokine können bei CP/CPPS erhöht sein (Orhan et al., 2001). Insgesamt spielen daher am ehesten die genannten Mechanismen eine entscheidende Rolle und stellen damit eine mögliche Ursache für die in dieser Arbeit beschriebene Motilitätsminderung von Spermien bei CP/CPPS dar.

Die Evaluation der Spermienmorphologie stellt einen weiteren wichtigen diagnostischen Aspekt reproduktiver Gesundheit sowie einen Indikator von testikulärem Stress dar. Entsprechend ist eine reduzierte normale Morphologie mit Spermiodysfunktion assoziiert (Menkveld, Holleboom und Rhemrev, 2011). Insbesondere wird hierbei von negativen Korrelationen zwischen normaler Spermienmorphologie und Chromatinkondensation, DNA-Integrität und Akrosomreaktion berichtet (Abu Hassan Abu et al., 2012). Im Hinblick auf die Spermienmorphologie zeigte sich bei Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen bei normwertigem Median insgesamt eine signifikante Erniedrigung normalgeformter Spermien, wobei etwa jeder fünfte Patient einen Wert unterhalb der WHO-Referenz aufwies. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Metaanalysen von Fu et al. sowie Condorelli et al., welche ebenfalls von einer signifikant verminderten normalen Morphologie bei CP/CPPS berichten (Condorelli et al., 2017; Fu et al., 2014). Ätiologisch kommen wiederum die bereits genannten Mechanismen analog der Auswirkungen auf die Spermienmotilität in Betracht. Insbesondere stehen eine erhöhte Leukozytenaktivität sowie oxidativer Stress im Vordergrund, welche mitunter durch Verlust der Membranintegrität apoptotische Prozesse begünstigen und mit abnormer Morphologie einhergehen (Walczak-Jedrzejowska, Wolski und Slowikowska-Hilczner, 2013).

Die Spermienvitalität gibt den Anteil an vitalen Spermien an und dient insbesondere der Unterscheidung zwischen immotilen und tatsächlich avitalen Spermien. Sie findet in der Routine Anwendung bei Ejakulatproben mit einem Anteil von $\geq 40\%$ immotilen Spermien im Nativpräparat (Krause et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die Spermienvitalität bei Patienten mit einem Anteil von $\geq 40\%$ immotilen Spermien sowie bei allen Kontrollpersonen bestimmt, wobei in dieser Gruppe nur eine Person $\geq 40\%$ immotile Spermien aufwies. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS Patienten und Kontrollpersonen, mit höheren Vitalitätswerten in letzterer Gruppe, wobei die Mediane beider Gruppen oberhalb des unteren WHO-Referenzwertes lagen. Im Hinblick auf die Studienlage ist eine Aussage bezüglich der Spermienvitalität umstritten. So kommt die Metaanalyse von Fu et al. - trotz einzelner Studien, welche von einer verminderten Spermienvitalität bei CP/CPPS berichten - zu dem Schluss, dass eine Assoziation zu diesem Parameter eher nicht besteht (Fu et al., 2014). Condorelli et al. berichten nach Subgruppenanalyse zwar von einer Assoziation zwischen verminderter Spermienvitalität bei CBP, nicht jedoch bei CP/CPPS (Condorelli et al., 2017).

Biochemische Ejakulatparameter

Zur Beurteilung der sekretorischen Funktion der Drüsen der Samenwege wurden die Fruktose, α -Glukosidase sowie Zink im Ejakulat bestimmt. Im Rahmen urogenitaler

Infektionen kann die Funktion der akzessorischen Drüsen beeinträchtigt sein. In der Vergangenheit konnte dies unter anderem für bakterielle Infektionen wie die CBP, chronische Epididymitis oder chronische Urethritis gezeigt werden, bei welchen ein negativer Einfluss auf die untersuchten Marker Fruktose, α -Glukosidase und Zink deutlich wurde (Marconi et al., 2009). Ludwig et al. untersuchten dies bei Patienten mit CP/CPPS, wobei Fruktose, α -Glukosidase und, hier als Marker für die sekretorische Kapazität der Prostata, γ -Glutamyltransferase bestimmt wurden. Allein letzterer Parameter zeigte sich ausschließlich bei CP/CPPS mit inflammatorischer Komponente signifikant erniedrigt, die Marker der anderen Drüsen erwiesen sich als nicht signifikant verändert (Ludwig et al., 2002). Fruktose wird in der Ejakulatdiagnostik als Marker für die Funktion der Samenblasen verwendet. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Fruktosekonzentration zwischen Patienten und Kontrollpersonen, nur bei Einzelpersonen kam es zu einer Unterschreitung des Referenzwertes. Ähnlich verhielt sich dies im Hinblick auf α -Glukosidase, welche im Ejakulat als Marker der Nebenhodenfunktion bestimmt wurde. Auch hier wurde trotz Unterschreitung des Referenzwertes bei etwa jedem fünften Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen deutlich. Am ehesten können daher die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt werden, dass es, unter Berücksichtigung dieser Marker, durch CP/CPPS nicht zu einer in hohem Maße beeinflussten sekretorischen Kapazität der Samenblasen oder signifikant beeinflussten Nebenhodenfunktion kommt. Im Hinblick auf die sekretorische Funktion der Prostata wurde in dieser Arbeit die Zinkkonzentration im Seminalplasma bestimmt. Zink hat vielfältige Funktionen in der Prostata, darunter die Wahrung der Stabilität des Spermienchromatins im ejakulierten Prostataanteil (Condorelli et al., 2017). Metaanalysen konnten bei CP/CPPS eine signifikante Erniedrigung der Zinkkonzentration im Ejakulat feststellen (Condorelli et al., 2017). Die beschriebene Tendenz zu einer verminderten Zinkkonzentration konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, war allerdings nicht signifikant. Die Werte jedes zehnten Patienten befanden sich unterhalb des Referenzwertes, die Mediane beider Gruppen lagen jedoch im Referenzbereich. Auch wenn sich im Hinblick auf diesen Parameter in den Ergebnissen dieser Arbeit keine Signifikanz herausstellte, weisen die Daten auf die - auch in Metaanalysen gezeigte - Verminderung der Zinkkonzentration bei Patienten mit CP/CPPS hin. Eine Beeinträchtigung der sekretorischen Funktion der Prostata bei CP/CPPS kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Inflammatorische Marker

Im Rahmen der CP/CPPS Diagnostik entscheidet das Vorkommen von Leukozyten im Exprimaturin über das Vorliegen eines entzündlichen (IIIA) oder nicht-entzündlichen (IIIB)

CPPS. In der Ejakulatdiagnostik wird Entzündungsaktivität unter anderem durch die Konzentration Peroxidase-positiver Leukozyten erfasst, mit einem Grenzwert von 1×10^6 Leukozyten/ml. Der diagnostische Wert sowie die Relevanz dieses von der WHO etablierten Wertes bleiben kontrovers. Zwar zeigten einige Studien eine Assoziation zwischen Leukozytospemie und eingeschränkten Ejakulatparametern, hingegen konnte dieser Zusammenhang in anderen Studien nicht bestätigt werden (Yanushpolsky *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 2002; Henkel *et al.*, 2003). In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration an Leukozyten im Ejakulat bei Patienten mit CP/CPPS im Vergleich zu der Kontrollgruppe, wobei es nur in Einzelfällen in beiden Gruppen zur Überschreitung des Referenzwertes kam. Da bei chronischen Entzündungen der Samenwege diese Grenze nicht zwangsläufig überschritten wird, können zusätzliche inflammatorische Marker wie die Granulozyten-Elastase oder Zytokine, in dieser Arbeit Interleukin-8 (IL-8), bestimmt werden (Krause *et al.*, 2011). Die Granulozyten-Elastase stellt einen sensitiven und spezifischen Parameter der Entzündungsevaluation dar, korreliert mit anderen Entzündungsparametern und ist auch zur Therapieüberwachung bei antiinflammatorischer Therapie geeignet. Sie kommt in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten vor und wird bei Phagozytose, Degranulation oder Zelltod freigesetzt. Zudem kann sie als Marker der Granulozyten-Aktivität im Ejakulat dienen (Kopa *et al.*, 2005; Krause *et al.*, 2011). Inflammatorische Zytokine werden von Leukozyten produziert und haben vielfältige Funktionen im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse der Zell-Zell-Kommunikation und Immunreaktion. Bei CP/CPPS wurde insbesondere das Chemokin IL-8 als diagnostisch verwendbarer Entzündungsmarker identifiziert, wobei eine Korrelation zur Symptomschwere besteht und eine Diskrimination zwischen den Subtypen IIIA und IIIB ermöglicht wird (Khadra *et al.*, 2006; Penna *et al.*, 2007). In früheren Studien wurde von einer Korrelation erhöhter Werte von Elastase sowie IL-6 und IL-8 bei chronischen Entzündungen der Samenwege und einer beeinträchtigten Spermienqualität berichtet. Erhöhte Interleukin- und Elastase-Werte fanden sich auch bei infertilen Patienten (Eggert-Kruse *et al.*, 2001; Kopa *et al.*, 2005). Eine Studie von Kopa *et al.* beschrieb außerdem eine negative Korrelation zwischen der Elastasekonzentration im Ejakulat und dem Anteil an Spermien mit intakter DNA (Kopa *et al.*, 2005). In Bezug auf die Granulozyten-Elastase fiel in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied im Vergleich von Patienten zu Kontrollen auf. Die Mediane beider Gruppen befanden sich innerhalb des Normbereiches. Bei Bestimmung der IL-8 Konzentration im Seminalplasma wurde eine signifikante Erhöhung des Chemokins bei Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieses Untersuchungskollektiv unter Einbeziehung der Leukozyten im Ejakulat sowie der Granulozyten-Elastase darauf hin, dass bei einem Großteil der Patienten aktuell keine erhebliche Inflammation vorlag. Dennoch gilt gerade IL-8 als sensitiver und für CPPS recht

spezifischer Entzündungsparameter, sodass bei einer Erhöhung dieses Wertes in der Patientengruppen eine Inflammation nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

4.3 Auswirkungen von CP/CPPS auf Spermien-DNA-Fragmentation

Ein Hauptaspekt dieser Arbeit war die Evaluation des Einflusses von CP/CPPS auf die Spermien DNA-Integrität und hierbei im Speziellen auf das Auftreten von DNA-Fragmentierung in Spermien. Wie bereits erwähnt existieren bisher keine festgesetzten Referenzwerte für den DNA Fragmentation Index. Es wird jedoch von einer reduzierten Wahrscheinlichkeit auf das Erzielen einer Schwangerschaft auf natürlichem Wege ab Werten von $\geq 20\%$ bis 30% berichtet. Bei einem DFI $\geq 30\%$ besteht eine erhebliche Einschränkung (Evenson *et al.*, 1999; Raheem und Walsh, 2017). In Bezug auf IUI zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Abfall der Schwangerschaftsraten bei einem DFI $\geq 30\%$ (Evenson and Wixon, 2006). Insgesamt wurde daher von Evenson *et al.* ein klinischer Grenzwert von $\geq 25\%$ vorgeschlagen (Evenson, 2017). Unter Verwendung von IVF zeigten sich bei einem DFI von $\geq 20\%$ signifikant verminderte Lebendgeburtsraten, im Hinblick auf ICSI wurde keine Assoziation deutlich. Lebendgeburtsraten waren unter Verwendung von ICSI im Gegensatz zu IVF bei einem DFI von $\geq 20\%$ signifikant höher. Zudem war die Odds Ratio für Fehlgeburten ab einem DFI von $\geq 40\%$ signifikant erhöht. Evenson *et al.* schlagen ab einem DFI von $\geq 30\%$ die Verwendung von ICSI vor (Evenson, 2017).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei CP/CPPS Patienten im Vergleich zu Kontrollen ein signifikant erhöhter Anteil an Spermien DNA-Fragmentierung aufweist. Der mediane Wert für den DFI betrug in der Patientengruppe in dieser Arbeit $16,0\%$ im Vergleich zu $8,4\%$ in der Kontrollgruppe. Während Patienten somit einen deutlich höheren medianen DFI aufwiesen, lag der Wert jedoch noch nicht in einem Bereich, der mit einer deutlich reduzierten Fertilität assoziiert ist. Unter Beachtung der zuvor genannten Grenzwerte lag allerdings mehr als ein Drittel der Patienten oberhalb des klinischen Grenzwertes von 25% . In der Patientengruppe wiesen zudem $29,3\%$ einen DFI von $\geq 30\%$ auf und fallen somit in die Gruppe mit erheblich reduzierten Chancen auf das Erzielen einer spontanen Schwangerschaft. Gleichzeitig wiesen ebenfalls $29,3\%$ der Patienten einen DFI von $< 10\%$, und damit eine im alleinigen Hinblick auf diesen Parameter nicht bedeutend beeinträchtigte Spermien DNA-Integrität auf. Insgesamt zeigt sich damit in der Patientengruppe eine heterogene Verteilung des Parameters. Entsprechend kann bei CP/CPPS nicht von einer obligaten Erhöhung von DNA-Fragmentierung in Spermien in fertilitätsrelevante Bereiche ausgegangen werden. Jedoch ist durch die signifikante Erhöhung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und aufgrund der hohen, mit einer reduzierten Fertilität assoziierten Werte bei etwa einem Drittel der Patienten eine

Beeinflussung durch die Erkrankung, ebenso wie im Hinblick auf die Basis-Spermienparameter, denkbar. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen zu anderen Erkrankungen des Urogenitalsystems. Unter anderem konnten in Studien eine Erhöhungen der DNA-Fragmentierung in Spermien bei urogenitalen bakteriellen Infektionen - beispielweise mit *Chlamydia trachomatis* -, sowie eine Erhöhung bei Vorliegen einer Varikozele nachgewiesen werden (Moazenchi et al., 2018; Ni et al., 2014).

Die Studienlage im Hinblick auf Korrelationen von DNA-Fragmentierung mit konventionellen SpermioGrammparametern ist uneinheitlich. Einige Studien konnten negative Korrelationen zwischen der Rate an Spermien-DNA-Fragmentierung und konventionellen SpermioGrammparametern im Sinne von Spermienkonzentration, Motilität und Morphologie zeigen. In anderen Arbeiten konnte dieser Zusammenhang nicht reproduziert werden. So galt auch der mittels SCSA gemessene DFI als eher unabhängiger Parameter (Evgeni, Charalabopoulos und Asimakopoulos, 2014; Raheem und Walsh, 2017). Nach Evgeni et al. sind die kontroversen Ergebnisse der Vielzahl an Möglichkeiten zur Testung von DNA-Integrität, nach wie vor bestehenden Unterschieden bei Anfertigung des Basis-SpermioGramms, fehlender externer Qualitätssicherung und heterogenen Studienpopulationen geschuldet (Evgeni, Charalabopoulos und Asimakopoulos, 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Betrachtung eines Zusammenhangs von DFI und konventionellen SpermioGrammparametern eine signifikante, negative Korrelation mit der Gesamtspermatozoenzahl, Spermatozoenkonzentration, der Gesamtmotilität und der progressiven Motilität sowie der normalen Morphologie. Eine signifikante, positive Korrelation wurde mit Kopf- und Schwanzdefekten beobachtet. Hier erscheint ein gemeinsamer Schädigungsmechanismus wahrscheinlich. Der DFI war somit in dieser Arbeit kein vollkommen unabhängiger Parameter. Es konnte vielmehr der oben genannte Zusammenhang zwischen erhöhten Raten an Spermien-DNA-Fragmentierung und einigen konventionellen SpermioGrammparametern, auch unter Verwendung des SCSA, gezeigt werden.

Die Haupt-Entstehungsmechanismen von DNA-Fragmentierung in Spermien umfassen insuffizientes Chromatin-Remodelling, die Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie abortive Apoptose, beziehungsweise die Kombination mehrerer dieser Mechanismen (Schulte et al., 2010). Bei DNA-Schäden in Spermien scheint hier insbesondere oxidativer Stress im Vordergrund zu stehen. Frühere Studien zeigten eine Assoziation von erhöhten ROS im Ejakulat, sowie einer eingeschränkten antioxidativen Kapazität mit DNA-Schäden. Erhöhte ROS-Level konnten im Ejakulat von ca. 25 % aller subfertilen Männer nachgewiesen werden (Schulte et al., 2010). Zudem konnte in der Vergangenheit eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Strangbrüchen in Spermien und 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8OHdG) als Marker für oxidativen Stress durch ROS gezeigt

werden. Im Vorfeld wurde bei subfertilen Männern im Allgemeinen ein hoher 8OhdG-Gehalt in Spermien beobachtet (Aitken und De Iuliis, 2009). Wie an früherer Stelle beschrieben, stellen besonders aktivierte Leukozyten einen bedeutenden Ursprung von ROS dar und können somit potentiell DNA-Schäden in Spermien bewirken. Im Hinblick auf das Ausmaß der Schädigung durch Leukozyten kommt es jedoch auf die Anzahl und den Leukozytensubtyp, Aktivierungsstatus und -ort, sowie die zur Verfügung stehenden Schutzfaktoren des Seminalplasmas an (Aitken und De Iuliis, 2009). Bei der Entstehung von DNA-Schäden in Spermien durch von Leukozyten produzierte ROS spielen chronische Entzündungen eine bedeutende Rolle. Pasqualotto et al. und Kulisaar et al. fanden erhöhte Level von oxidativem Stress bei einer geringeren antioxidativen Kapazität bei chronischer Prostatitis im Vergleich zu Kontrollen. Erhöhte Level an oxidativem Stress bestanden hier interessanterweise sowohl bei NIH IIIA, als auch IIIB. Besonders hohe ROS Level zeigten sich bei Bestehen einer Leukozytospemie (Potts und Pasqualotto, 2003; Kullisaar *et al.*, 2012). In verschiedenen Studien wurde auch von einem direkten Zusammenhang zwischen Leukozytospemie und DNA-Schäden in Spermien berichtet (Alvarez et al., 2002). Allerdings konnte dieser Zusammenhang an anderer Stelle nicht nachgewiesen werden (Haidl *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich zwar eine signifikante Erhöhung sowohl des DFI als auch der Peroxidase-positiven Leukozyten in der Patientengruppe, dennoch bestand in der Patientengruppe keine signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern. Einschränkenderweise wies nur ein Patient eine Leukozytospemie im Sinne von $\geq 1 \times 10^6$ Leukozyten/ml auf. Aufgrund der uneinheitlichen Studienlage in Bezug auf Leukozytospemie und eingeschränkten Ejakulatparametern war in der Vergangenheit Kritik an Peroxidase-positiven Leukozyten als singulärem Entzündungsmarker im Ejakulat deutlich geworden. Zudem bleibt weiter fraglich, ob dem WHO-Referenzwert eine klinische Relevanz zukommt (Schuppe *et al.*, 2017). Ein weiterer Kritikpunkt besteht in der Nachweismethode mittels Peroxidase-Färbung, welche ausschließlich intakte, nicht hingegen degranulierte Granulozyten erfasst, und damit gerade aktivierte Leukozyten im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses zum Teil nicht detektiert werden können (Henkel et al., 2003; Kopa et al., 2005). Es wird daher davon ausgegangen, dass auch unterhalb des WHO-Referenzwertes bereits eine Schädigung von Spermienfunktionen möglich ist (Schuppe *et al.*, 2017). Zur Evaluation, ob neben der Leukozytospemie eine Assoziation zwischen DNA-Schäden und anderen Entzündungsparametern bestand, wurden Patientengruppen verglichen, welche keinen, einen oder über zwei Entzündungsparameter aufwiesen. Als solche definiert wurden $\geq 1 \times 10^6$ Peroxidase-positive Leukozyten/ml Ejakulat, ≥ 250 ng/ml Granulozyten-Elastase im Ejakulat oder Leukozyten im Exprimaturin. Insgesamt konnte hier kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden, wobei einschränkenderweise nur eine geringe Patientenzahl

mehrere, beziehungsweise stark erhöhte Entzündungsparameter aufwies. Zudem unterschieden sich die klassischerweise definierten NIH Subgruppen IIIA und IIIB im Hinblick auf DNA-Schäden in dieser Arbeit nicht voneinander, was im Einklang mit früheren Studien steht, welche keine Unterschiede bezüglich Spermiogrammparametern zwischen beiden Subtypen feststellen konnten (Ludwig et al., 2003). Der DFI schien somit als von Referenzwerten konventioneller Entzündungsparameter relativ unabhängiger Wert. Aufgrund der vorher genannten Kritik an letzteren Grenzwerten kann jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es bei CP/CPPS als chronischem Entzündungsgeschehen bereits unterhalb dieser Referenzwerte durch obengenannte Mechanismen zu relevanten DNA-Schäden in Spermien kommen kann. Insgesamt stellen interindividuelle Unterschiede in der antioxidativen Kapazität des Seminalplasmas und der daraus folgenden unterschiedlichen Suszeptibilität durch ROS eine mögliche Erklärung der heterogenen Präsentation des DFI in der Patientengruppe dar (Wright, Milne und Leeson, 2014).

Aufgrund der multifaktoriellen Entstehung von Spermien DNA-Fragmentierung durch mitunter altersassoziierte Veränderungen (Wright, Milne und Leeson, 2014) wurden aufgrund des Altersunterschiedes zwischen Patienten und Kontrollgruppe alters-adjustierte Gruppen gebildet und verglichen. Hier zeigte sich interessanterweise insbesondere in der jüngeren Alterskohorte < 34 Jahren ein signifikant erhöhter, etwa doppelt so hoher DFI bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Einschränkend muss gesagt werden, dass der mediane Wert der Gruppe den klinischen Grenzwert von etwa 25 % nicht überschritt, und auch an dieser Stelle die heterogene Verteilung des DFI deutlich wird. In der Gruppe der ≥ 34-Jährigen zeigte sich ebenfalls bei Patienten eine deutliche, jedoch möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl an Kontrollpersonen in diesem Altersbereich nicht signifikante Erhöhung des medianen DFI, welcher sich im Bereich des klinischen Grenzwertes befand. Hieraus wird deutlich, dass auch bei jüngeren CP/CPPS Patienten bereits DNA-Schäden auftreten können und nicht auszuschließen ist, dass es in dieser Altersgruppe zu besonders relevanten Fertilitätseinschränkungen kommen kann. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit bleibt einschränkend zu erwähnen, dass es neben altersassoziierten Einflüssen möglicherweise auch zu anderen umweltbedingten Einflüssen auf die Spermien-DNA-Integrität kommen kann (Wright, Milne und Leeson, 2014).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmalig eine Erhöhung von Spermien-DNA-Fragmentierung mit heterogenem Verteilungsmuster in zum Teil fertilitätsrelevanten Bereichen bei CP/CPPS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen beobachtet. Diese zeigte sich mitunter bereits bei jüngeren Patienten und korrelierte mit weiteren Spermienparametern. Es wurde daher deutlich, dass es auch auf molekularer Ebene zu teils gravierenden Spermien-Veränderungen kommen kann. Dennoch scheint eine

Generalisierung in Bezug auf diesen Parameter aktuell weder möglich noch sinnvoll. In Anbetracht der Heterogenität des DFI bei Patienten stellt sich die Frage, ob Patientensubgruppen identifiziert werden können, bei denen die DNA-Schäden besonders ausgeprägt sind. Durch das alleinige Vorkommen von erhöhten Entzündungsparametern im Ejakulat oder Urin kann nicht auf vermehrte DNA-Schäden in Spermien geschlossen werden. Vielmehr legen diese Ergebnisse nahe, dass bei unerfülltem Kinderwunsch bei CP/CPPS neben Evaluation der konventionellen Spermienparameter die Untersuchung von Spermien-DNA-Fragmentierung mittels beispielsweise des SCSA zusätzliche, bedeutsame Information über das Bestehen einer eingeschränkten Spermienqualität liefern kann, um gegebenenfalls entsprechende diagnostische oder therapeutische Schritte einzuleiten.

4.4 Auswirkungen von CP/CPPS auf High DNA Stainability

Neben dem DFI als Marker für DNA-Fragmentierung wird mithilfe des SCSA der Anteil an High DNA Stainability (HDS) Spermien gemessen. Die HDS Messung detektiert am ehesten unreife Spermatozoen, deren DNA durch verminderte Chromatinkondensation weniger kompakt ist und im Rahmen des SCSA für Akridinorange zugänglicher und somit verstärkt anfärbbar ist. Grund für die erhöhte Zugänglichkeit sind ein erhöhter Anteil irregulärer Proteine oder verbliebener Histone infolge einer unvollständigen Histon-Protamin-Transition. Zudem färbt Akridinorange Histon-gebundene DNA 2,3-fach stärker als Protamin-gebundene DNA (Evenson und Wixon, 2006; Lewis *et al.*, 2013; Evenson, 2017; Rex, Aagaard und Fedder, 2017). Die Studienlage zu HDS ist im Gegensatz zum DFI deutlich limitierter, ein festgesetzter Referenzwert existiert bislang nicht. Evenson spricht von einem HDS-assoziierten Embryo-Versagen bei 20-25 % HDS (Evenson, 2017). Eine Übersichtsarbeit beschrieb, dass keine Schwangerschaften erzielt werden konnten, wenn der HDS-Anteil über 35 % lag (Lewis *et al.*, 2013). Erhöhte Raten an HDS korrelieren mit reduzierten Fertilisierungsraten *in vivo* sowie unter Anwendung von IUI oder IVF, nicht hingegen bei Anwendung von ICSI (Evenson und Wixon, 2006). Eine große Studie berichtete allerdings von einem erhöhten Risiko für Frühaborte nach ICSI bei > 15 % HDS (Jerre *et al.*, 2019). Zu Veränderungen von HDS bei urogenitalen Infektionen oder Infektionen im Allgemeinen existieren bisher keine großen Studien. Ein Case Report zeigte die temporäre Erhöhung von HDS sowie DFI nach Bestehen eines zweitägigen Fiebers bei einem bislang fertilen Probanden (Sergerie *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit präsentierte sich in Bezug auf den Anteil an HDS-Spermien kein signifikanter Unterschied zwischen CP/CPPS Patienten und Kontrollgruppe. Die medianen Werte befanden sich mit 13,7 % bei Patienten und 13,3 % in eher moderaten Bereichen. Auch die Spannweite präsentierte sich bei Patienten und Kontrollen ähnlich, wobei in beiden Gruppen hohe Anteile an HDS-Spermien von bis zu 27 % bzw. 30 % vorkamen.

Der HDS-Anteil korrelierte signifikant negativ mit der Spermienkonzentration und Gesamtspermienzahl sowie normaler Morphologie. Dies entspricht Untersuchungen von Virro et al., wobei hier Untergruppen mit $> 15\%$ HDS und $< 15\%$ HDS gebildet wurden. In Bezug auf die konventionellen Spermienparameter waren in der Gruppe mit $> 15\%$ HDS die Gesamtspermienzahl, Motilität und Morphologie signifikant vermindert (Virro, Larson-Cook und Evenson, 2004). Gleichzeitig bestand in der vorliegenden Arbeit eine signifikante, positive Korrelation mit Peroxidase-positiven Leukozyten und Kopfdefekten. Letzteres sowie die Assoziation mit verminderter normaler Morphologie stehen im Einklang damit, dass es sich bei HDS-Spermien um unreife Spermatozoen mit einer runderen Kopfform handelt (Evenson, 2016). Im Hinblick auf mittels Basis-Spermiogramm erfasste, unreife Spermatogenesezellen, welche bei CP/CPPS Patienten signifikant erhöht waren, konnte keine Assoziation zu HDS festgestellt werden. Dies deutet am ehesten auf das Erfassen zweier unterschiedlicher Gruppen unreifer Spermatozoen durch beide Methoden hin. Auch HDS- und DFI-Spermien stellen zwei unabhängige Subpopulationen dar (Krause et al., 2011), was in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht, da hier keine signifikante Korrelation der Parameter vorlag.

HDS wurden ebenfalls im Hinblick auf das Vorliegen keines, eines oder mehrerer Entzündungsparameter bei CP/CPPS Patienten im Sinne von Leukozyten im Exprimaturin, erhöhten Peroxidase-positiven Leukozyten und/oder erhöhter Granulozyten-Elastase untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen, was am ehesten verdeutlicht, dass Entzündungsaktivität den Anteil dieser Subpopulation nicht maßgeblich beeinflusst.

Aufgrund der heterogenen Verteilung scheint die Aussagekraft von HDS bei CP/CPPS im Hinblick auf die Fertilität, nicht zuletzt aufgrund der aktuell noch stark eingeschränkten Studienlage und unklarem diagnostischen Wert des Parameters begrenzt und eher deskriptiv zu sein. Die Ergebnisse können Hinweise darauf geben, dass bei CP/CPPS in Spermien keine gravierend beeinträchtigte Chromatinkondensation vorliegt, und keine krankheitsspezifisch vermehrten, unreifen Spermatogenesezellen mit verbliebenen Histonen vorkommen. An dieser Stelle sind weitere Studien zur Bedeutung des Parameters und seiner klinischen Konsequenz erforderlich.

4.5 Auswirkungen von CP/CPPS auf die Protamin 1/2 mRNA Ratio

Nachdem in den vergangenen Jahren vermehrt nach Ursachen männlicher Infertilität gesucht wurde, welche sich nicht im Basis-Spermiogramm abbilden, wurde ein Missverhältnis der Spermienproteine Protamin 1 und Protamin 2 als mögliche Ursache verminderter Spermienqualität identifiziert (Ni et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob es auch im Rahmen von CP/CPPS zu Veränderungen dieser

Spermienproteine im Sinne eines veränderten Protamin 1/ Protamin 2 Verhältnisses kommt. Eine etablierte Methode, um dies zu erfassen, stellt die Bestimmung der P1/P2 mRNA Ratio mittels RT-qPCR dar. Protamin-kodierende Gene werden in runden Spermatiden exprimiert und die Transkripte gespeichert. Die Translation erfolgt zeitlich verzögert in elongierenden Spermatiden. Infolge kommt es zur globalen Terminierung der Transkription, sodass die Bestimmung der P1/P2 mRNA Ratio auch im Hinblick auf Proteinlevel zulässig erscheint und ihre Bestimmung aus dem Gesamt-Ejakulatpellet möglich ist (Rogenhofer et al., 2013; Steger et al.; Steger und Balhorn, 2018).

In der Literatur wird eine Ratio von 0,8 bis 1,2 als normwertig beschrieben und wurde daher hier als Referenzbereich verwendet (Steger et al., 2008).

Die mediane P1/P2 mRNA Ratio sowohl der Patienten- als auch der Kontrollgruppe lag mit 1,08 und 0,95 innerhalb des obengenannten Bereiches normaler Fertilität. Im Vergleich der Gruppen kam es hier zu keinem signifikanten Unterschied und somit zu keiner bedeutenden Abweichung in eine bestimmte Richtung. Hier bleibt jedoch zu erwähnen, dass aufgrund möglicher Abweichungen in beide Richtungen der Median nicht zwangsläufig den entscheidenden Parameter darstellt. Bei Untersuchung der Untergruppen eingeteilt in P1/P2 mRNA Ratio $>1,2$, $0,8-1,2$ sowie $<0,8$ wurde jedoch deutlich, dass mit 21,95 % nur ein sehr geringer Anteil an Patienten Werte im normalen Fertilitätsbereich aufwies. Die restlichen 78,05 % befanden sich außerhalb des obengenannten Bereiches und wiesen entsprechend ein Missverhältnis der Proteine auf. Im Vergleich lag die Mehrheit der Kontrollgruppe innerhalb der normalen Range, wobei sich hier lediglich bei 36,36 % Abweichungen im Bereich von $>1,2$ oder $<0,8$ zeigten. Dies deutet darauf hin, dass bei CP/CPPS Patienten eine fehlerhafte Protamination vorliegt. In früheren Studien wurde die Assoziation einer aberranten - bei Ni et al. explizit erhöhten - Protamin-Ratio mit männlicher Infertilität, reduzierten Schwangerschaftsraten sowie einer eingeschränkten Embryoqualität deutlich. Zudem wurde die Protamin-Ratio auch zu einem Marker für das Fertilisierungspotenzial eines Mannes bei assistierter Reproduktion erklärt (Ni et al., 2016; Rogenhofer et al., 2013; Rogenhofer et al., 2017; Simon et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben daher Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Fertilität von CP/CPPS Patienten durch aberrante Protamin-Ratios.

In Zusammenschau mit anderen Arbeiten ist die Studienlage zu P1/P2 mRNA Ratio und urogenitalen Pathologien limitiert. Ni et al. konnten beispielsweise eine signifikante Erhöhung der P1/P2 mRNA Ratio bei Vorliegen einer Varikozele zeigen (Ni et al., 2014). Eine weitere Arbeit beschrieb eine signifikant erhöhte Rate an aberranten Protamin-Ratios bei bakterieller Infektion (Zeyad, Hamad und Hammadeh, 2018). Wie in der letztgenannten Studie kam es auch in der vorliegenden Arbeit zu Abweichungen der Ratio in beide Richtungen.

Einer erhöhten P1/P2 Ratio kann entweder eine P2-Unterexpression oder P1-Überexpression zugrunde liegen, einer erniedrigten Ratio entsprechend eine P2-Überexpression oder P1-Unterexpression (Zeyad, Hamad und Hammadeh, 2018). Bei subfertilen Patienten liegt hierbei am ehesten eine P2-Deregulation vor, da das P2-Gen phylogenetisch jünger ist als das P1-Gen, eine hohe Variabilität bei Säugetieren aufweist und die Expression regulierenden Mechanismen inkonsistenter sind (Ni et al., 2016).

Eine Schwäche der in dieser Arbeit verwendeten Methode der RT-qPCR zur P1/P2 mRNA Bestimmung liegt darin begründet, dass nicht erfasst werden kann, ob eine P1 oder P2 Deregulation vorliegt. Am ehesten ist aus ebengenannten Gründen auch hier von einer P2-Deregulation auszugehen. Zum Beweis dessen sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Die Hauptaufgaben der Protamine schließen die Kompaktierung des Chromatins und somit den Schutz des paternalen Genoms mit ein (Simon et al., 2011). Gelingt diese Kompaktierung nicht vollständig, bleibt die DNA anfälliger gegenüber schädlichen Einflüssen, und es kann zu DNA-Schäden kommen. In früheren Studien wurde infolgedessen von einer Assoziation von aberranten Protamin-Ratios mit DNA-Schäden in Spermien in Form von DNA-Fragmentierung berichtet (Ni et al., 2016; Simon et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit korrelierte die Protamin 1/2 mRNA Ratio bei Patienten unter anderem signifikant negativ mit dem DFI. Im Gegensatz hierzu fand sich in Arbeiten von Ni et al. sowie Amor et al. eine positive Korrelation (Amor et al., 2019; Ni et al., 2014). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse lässt sich am ehesten auf unterschiedliche Messmethoden beider Parameter oder die unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathologien der Arbeiten zurückführen.

Evaluert wurde zudem wiederum die Abhängigkeit der P1/P2 mRNA Ratio vom Vorliegen keines, eines oder mehrerer Entzündungsparameter im Sinne von Leukozyten im Exprimaturin, erhöhten Peroxidase-positiven Leukozyten oder erhöhter Granulozyten-Elastase. Bei gleichzeitigem Vorliegen von über 2 Parametern zeigte sich eine oberhalb des Normbereiches liegende mediane P1/P2 mRNA Ratio von 1,3, die Unterschiede zu beiden anderen Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Es kann daher am ehesten davon ausgegangen werden, dass die Protamin-Ratio bei CP/CPPS Patienten einen durch Entzündungsaktivität nicht maßgeblich beeinflussten Parameter darstellt.

Insgesamt wies ein Großteil der CP/CPPS Patienten P1/P2 Ratios außerhalb des normalen Bereiches auf. Dies liefert erstmals Hinweise dafür, dass es bei dieser Erkrankung auch auf Ebene der Protamine beziehungsweise Spermienproteine im Allgemeinen zu Veränderungen kommen kann, und hierdurch die Fertilität potentiell negativ beeinflusst wird. Pathogenetisch sind weitere Untersuchungen, so beispielsweise zur Rolle der Epigenetik und der Histon-Protamin-Transition, von Interesse. Zusammenfassend stellt die

Evaluation der Protamin-Ratio bei CP/CPPS Patienten eine Möglichkeit dar, bei entsprechenden Fragestellungen im Rahmen von unerfülltem Kinderwunsch weiterführende Informationen über den Fertilitätsstatus des Mannes zu liefern, um diagnostische und therapeutische Maßnahmen einzuleiten.

4.6 Klinische Aspekte

Im Hinblick auf Korrelationen mit der klinischen Symptomatik von Patienten konnte anhand der UPOINTS-Phänotypisierung keine bestimmte Domäne, Domänen-Anzahl oder -Kombination ausgemacht werden, welche mit signifikanten Veränderungen des Basis-Spermiogramms, biochemischer Ejakulatparameter, Entzündungsparameter, DFI, HDS oder Protamin-Ratio assoziiert ist. Dies liefert Hinweise darauf, dass nicht automatisch bei besonders ausgeprägter, vielschichtiger oder einer bestimmten Symptomatik auf eine Verschlechterung der verschiedenen Spermien- und Ejakulatparameter geschlossen werden kann. Auch bei Patienten mit milder Symptomatik können somit potentiell fertilitätseinschränkende Veränderungen vorliegen, während Patienten mit starker Symptomatik regelrechte Parameter aufweisen können.

4.7 Auswirkungen von CP/CPPS auf Spermienqualität und Spermien-DNA-Integrität und Ausblicke

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Vielzahl von Spermiogrammparametern sowie Parametern, welche Aussagen über die Spermien-DNA-Integrität liefern können, bei CP/CPPS Patienten signifikant verändert sind. Bei den meisten Parametern lagen diese Veränderungen innerhalb des Normbereiches, dennoch wurden bei individuellen Patienten teils massive Verschlechterungen diverser Spermienparameter deutlich. Die Einbeziehung von zusätzlichen Untersuchungen zu Spermien-DNA-Schäden und -Proteinveränderungen liefert erste Hinweise darauf, dass es bei der Erkrankung auch auf dieser Ebene zu potentiell fertilitätsbeeinflussenden Veränderungen kommen kann.

Eine routinemäßige Untersuchung der zuletzt genannten Parameter bei allen CP/CPPS Patienten kann aufgrund der Heterogenität der Patientengruppe zum aktuellen Zeitpunkt nicht empfohlen werden. Vielmehr können CP/CPPS Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch über einen möglichen Zusammenhang mit der Erkrankung aufgeklärt werden, auch unabhängig von Symptomschwere oder -ausprägung. Die Evaluation von DNA-Fragmentierung und Protamin 1/ Protamin 2 mRNA Ratio kann dann zusätzliche wertvolle Information liefern, und in Zusammenschau mit der Routine-Diagnostik gegebenenfalls therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

In Zukunft wäre eine longitudinale Evaluation der Spermienqualität im zeitlichen Verlauf einer Therapie lohnenswert. Da bei CP/CPPS erhöhter oxidativer Stress festgestellt wurde, stellt sich außerdem die Frage nach der Wirksamkeit einer antioxidativen und/oder antiinflammatorischen Therapie zur Verbesserung der Spermienqualität. Wie oben erwähnt wäre es zudem hilfreich, dezidiert Patientensubgruppen identifizieren zu können, welche sich mit einer in besonders hohem Maße eingeschränkten Spermienqualität präsentieren. Letztendlich spiegelt sich die Heterogenität der Ätiologie und Präsentation der Erkrankung auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider. Insgesamt scheint ein ebenso individuelles und symptomstratifiziertes Vorgehen analog der Therapiestrategien bei CP/CPPS auch in Bezug auf fertilitätsassoziierte Fragestellungen sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Das chronische Beckenschmerzsyndrom (NIH III, CP/CPPS) stellt eine häufige Erkrankung des Mannes mit ungünstigem Einfluss auf die Lebensqualität dar, ist Grund für eine Vielzahl von Behandlungsanlässen bei Urologen und kann Männer aller Altersgruppen betreffen. Bei bislang unzureichend geklärter Ätiologie beschrieben frühere Studien mögliche Einflüsse der Erkrankung auf die Fertilität. In dieser Arbeit wurden daher 41 CP/CPPS Patienten mit 22 Kontrollpersonen im Hinblick auf fertilitätsrelevante Parameter verglichen. Hierzu wurden die Parameter des Basis-Spermiogramms, biochemische Ejakulatparameter und Entzündungsparameter im Ejakulat analysiert. Nachdem konventionellen Spermienparametern alleine zwar eine wichtige, aber dennoch eingeschränkte Aussagekraft zukommt, konnte in den letzten Jahren vermehrt gezeigt werden, dass auch Parameter wie die Spermien-DNA-Integrität und/oder Proteinveränderungen eine grundlegende Rolle hinsichtlich Fertilität, natürlicher Schwangerschaftsraten sowie Schwangerschaftsraten nach assistierter Reproduktion, Fehlgeburten und Embryoentwicklung spielen können. Um die Bedeutung dieser Parameter bei CP/CPPS zu evaluieren, wurden in dieser Arbeit erstmals Spermien-DNA-Fragmentierung und High DNA Stainability-Zellen mithilfe des Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) sowie die Protamin 1/Protamin 2 mRNA Ratio in Spermien mittels RT-qPCR in Patientenproben bestimmt. Weiterhin wurden mögliche Zusammenhänge der Parameter untersucht. Es fanden sich signifikante Unterschiede der untersuchten Gruppen im Hinblick auf konventionelle Spermienparameter. CP/CPPS Patienten wiesen ein geringeres Ejakulatvolumen, einen niedrigeren pH-Wert, eine verminderte Spermienmotilität, weniger Spermien mit normaler Morphologie und weniger vitale Spermien als die Kontrollgruppe auf, wobei die medianen Werte der Patientengruppe dennoch meist normwertig waren. Zudem zeigten sich bei Patienten signifikant vermehrte unreife Spermatogenezellen und Peroxidase-positive Leukozyten sowie eine Erhöhung von Interleukin-8 im Ejakulat. Bei der Untersuchung von DNA-Fragmentierung wies die Patientengruppe einen signifikant erhöhten Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentierung auf, und es bestanden signifikante Korrelationen mit weiteren Spermiogrammparametern. Hinsichtlich der P1/P2 mRNA Ratio war kein Unterschied der medianen Ratio erkennbar, doch wies bei Patienten ein deutlich höherer Anteil abnormale Ratios außerhalb des normalen Fertilitätsbereiches auf. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch CP/CPPS negative Einflüsse auf die Spermienqualität möglich sind. Es wurde erstmals deutlich, dass es vermehrt zu DNA-Schäden in Spermien und Veränderungen der Spermien-Protein-Verhältnisse kommen kann, wobei insgesamt erhöhtem oxidativen Stress eine bedeutende Rolle zuzukommen scheint. Zur Klärung letzteren pathogenetischen Zusammenhanges,

der Identifizierung von besonders betroffenen Patientengruppen sowie möglichen Auswirkungen einer Therapie sind weitere Studien erforderlich.

6 Summary English

Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome (NIH III CP/CPPS) is a highly prevalent disease, affecting men of every age and accounting for a considerable number of consultations at urology departments. While the etiology of this disease remains still mostly unknown, previous studies suggested a negative impact of CP/CPPS on fertility. In this study we therefore aimed to further characterize the fertility status in these patients. For this purpose, we analyzed routine semen parameters, biochemical and inflammatory markers in ejaculate within 41 CP/CPPS patients compared to 22 healthy volunteers. Recently, increasing focus has been attributed to additional aspects and parameters such as sperm DNA-integrity and sperm protein alterations besides the WHO standard semen analysis when assessing male fertility. We therefore aimed to evaluate sperm DNA fragmentation and high DNA Stainability Cells by Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and the protamine 1 to protamine 2 mRNA ratio by RT-qPCR, as it has been shown that these parameters can have significant unfavourable effects on fertility, natural pregnancy rates as well as pregnancy rates after assisted reproduction, miscarriages and early embryo development. Furthermore, we analyzed possible associations between these parameters. We found significant differences in patients concerning ejaculate parameters, such as decreased volume, pH, sperm motility, normal morphology and sperm vitality compared to controls. Patients exhibited larger amounts of immature germ cells, peroxidase-positive leukocytes and higher levels of interleukin-8. When analyzing sperm DNA-fragmentation we found a significant increase among CP/CPPS patients with an association to other sperm parameters. Even though the median protamine mRNA ratio did not differ between the groups, the majority of CP/CPPS patients exhibited ratios out of the range of normal fertility. Taken together, the results of this study underline that CP/CPPS can have an unfavourable impact on fertility. The data reveal for the first time, that patients show increased sperm DNA damage and changes in sperm protamine levels. As oxidative stress seems to play a major role in the pathogenesis, further research is needed to clarify this association. Further studies are also needed to identify patient subgroups affected by detrimental impairments in particular as well as possible effects of therapeutical approaches on fertility.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABP	Akute bakterielle Prostatitis
AO	Akridinorange
ART	Assisted Reproductive Technologies
ASA	Antisperm antibodies
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BPS	Benignes Prostatasyndrom
CBP	Chronische bakterielle Prostatitis
cDNA	complementary DNA
CP/CPPS	Chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom
ddH ₂ O	double-distilled Water
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFI	DNA Fragmentation Index
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase I	Deoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCl	Salzsäure
HDS	High DNA Stainability
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IIEF	International Index of Erectile Function
IL	Interleukin
IPSS	International Prostate Symptom Score
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
LUTS	Lower Urinary Tract Symptoms
mA	Miliampere
mg	Miligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
min	Minute

Mio	Millionen
ml	Mililiter
mRNA	Messenger RNA
mU	Mili-Unit
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
NIH-CPSI	NIH-Chronic Prostatitis Symptom Index
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OR	Odds Ratio
PBS	Phosphate buffered saline
PDE-5	Phosphodiesterase 5
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SDF	Sperm DNA fragmentation
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling
V	Volt
WHO	World Health Organisation

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Multifaktorielle Pathogenese bei CP/CPPS (modifiziert nach Shoskes und Nickel, 2013).....	3
Abbildung 2: Möglichkeiten der assistierten Reproduktion in Abhängigkeit von der männlichen Indikation (modifiziert nach Kliesch, 2017).....	9
Abbildung 3: Mechanismen und Faktoren der Entstehung von DNA-Fragmentation (modifiziert nach Cho und Agarwal, 2018).	13
Abbildung 4: Chromatinstruktur in Spermien; nach der Histon-Protamin-Transition formt Protamin-gebundene DNA Toroidstrukturen, Histon-gebundene DNA verbleibt in Solenoidstrukturen (modifiziert nach Agarwal, 2011).	17
Abbildung 5: Akridinorange (AO).....	30
Abbildung 6: (A) Prinzip der Akridinorange-Färbung: Emission grüner Fluoreszenz bei Bindung an dsDNA, Emission roter Fluoreszenz bei Bindung an ssDNA; (B) Schematischer Dot Plot nach durchflusszytometrischer Messung: Jeder Punkt entspricht einem Spermium; umrandet sind die verschiedenen Populationen. Abbildungen modifiziert nach Evenson, 2016.....	30
Abbildung 7: Schematische DFI-Häufigkeits-Histogramme mit Darstellung der Spermienhauptpopulation und Markierung des Bereiches der Spermien mit erhöhtem DFI. Im oberen Fall befände sich ein geringer Anteil, in der unteren Grafik ein hoher Anteil an Spermien im DFI-Bereich.	32
Abbildung 8: Ejakulatvolumen CP/CPPS Patienten vs. Kontrollen.	40
Abbildung 9: pH-Wert des Ejakulats CP/CPPS Patienten vs. Kontrollen.	41
Abbildung 10: Gesamtmotilität CP/CPPS vs. Kontrollen.....	42
Abbildung 11: Progressive Spermienmotilität CP/CPPS vs. Kontrollen.	43
Abbildung 12: Immotile Spermien CP/CPPS vs. Kontrollen.....	43
Abbildung 13: Normale Spermienmorphologie CP/CPPS vs. Kontrollen.	44
Abbildung 14: Spermienkopf- und Schwanzdefekte CP/CPPS vs. Kontrollen.....	45
Abbildung 15: Spermienvitalität CP/CPPS vs. Kontrollen.	46
Abbildung 16: Peroxidase-positive Zellen CP/CPPS vs. Kontrollen.....	46

Abbildung 17: Unreife Spermatogenesezellen CP/CPPS vs. Kontrollen.....	47
Abbildung 18: Interleukin-8 CP/CPPS vs. Kontrollen.....	49
Abbildung 19: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zweier Patientenproben. Auf der x-Achse ist die Detektion der roten Fluoreszenz angezeigt, auf der y-Achse die der grünen Fluoreszenz. Abbildung A zeigt eine Probe mit niedrigem DFI (DFI: 5,9 %), Abbildung B eine Probe mit hohem DFI (DFI: 63,4 %).	50
Abbildung 20: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zweier Proben der Kontrollgruppe. Entsprechend Abbildung 19 zeigt Abbildung C eine Probe mit niedrigem DFI (DFI: 4,7 %), Abbildung D eine Probe mit einem der höchsten DFIs innerhalb der Kontrollgruppe (DFI: 18,0 %).	50
Abbildung 21: DFI CP/CPPS vs. Kontrollen.	51
Abbildung 22: Korrelationen des DFI mit der Spermatozoenkonzentration (A), der progressiven Motilität (B), der normalen Morphologie (C) sowie Gesamtspermatozoenzahl (D).	52
Abbildung 23: Vergleich des DFI von Patienten und Kontrollgruppe in alters-adjustierten Gruppen von < 34 Jahren und ≥ 34 Jahre.....	53
Abbildung 24: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zweier Proben von CP/CPPS Patienten. Abbildung A zeigt eine Probe mit niedrigem HDS-Anteil (HDS: 6,7 %), Abbildung B eine Probe mit höherem HDS-Anteil (HDS: 24,2 %).	54
Abbildung 25: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zweier Proben der Kontrollgruppe. Auf Abbildung C ist ein niedriger HDS-Anteil zu erkennen (HDS: 6,2 %), Abbildung D zeigt eine Probe mit höherem HDS-Anteil (HDS: 23,4 %).	54
Abbildung 26: HDS CP/CPPS vs. Kontrollen.....	55
Abbildung 27: Korrelationen von HDS mit der Spermatozoenkonzentration (A), der normalen Morphologie (B), mit Peroxidase-positiven Leukozyten (C) und dem DFI (D) bei CP/CPPS Patienten.	56
Abbildung 28: Protamin 1/2 mRNA Ratio CP/CPPS vs. Kontrollen.....	57
Abbildung 29: Gezeigt ist der Anteil von Protamin 1/2 mRNA Ratio Werten innerhalb sowie außerhalb des Bereiches 0,8 – 1,2 bei Patienten und Kontrollgruppe.	58

Abbildung 30: Prozentuale Verteilung der Werte bei Patienten und Kontrollgruppe innerhalb sowie ober- und unterhalb des Bereiches 0,8 - 1,2.....	58
Abbildung 31: Korrelationen der Protamin 1/2 mRNA Ratio mit dem DFI (A) und High DNA Stainability (B).....	59
Abbildung 32: Vergleich von DFI (A), HDS (B) und Protamin 1/2 mRNA Ratio (C) bei Vorliegen von erhöhten Entzündungsparametern.	60
Abbildung 33: Verteilung der UPOINTS-Phänotypisierung in der Patientengruppe (U=Urinary, P=Psychosocial, O=Organ specific, I=Infection, N=Neurologic/Systemic, T=Tenderness, S=Sexual Dysfunction).....	62
Abbildung 35: Übersicht über die prozentuale Verteilung der Kinderanzahl (n=21) sowie den aktuell vorliegenden Kinderwunsch (n=17) in der Patientengruppe.....	63
Abbildung 36: Libido bei Patienten (n=11) vs. Kontrollgruppe (n=22).	63

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 NIH Klassifikation (Krieger, Nyberg und Nickel, 1999) und Häufigkeit der Kategorien	2
Tabelle 2 UPOINTS-Phänotypisierung (modifiziert nach Magistro <i>et al.</i> , 2016).....	5
Tabelle 3 Ursachen männlicher Infertilität (modifiziert nach Harth, Brähler, Schuppe, 2012)	7
Tabelle 4 Parameter des Basis-Spermiogramms mit Referenzwerten und 95 % Konfidenzintervall (modifiziert nach World Health Organization and Department of Reproductive Health and Research, 2010)	8
Tabelle 5 Untersuchungskollektiv.....	22
Tabelle 6 Verwendete Laborgeräte	22
Tabelle 7 Chemikalien.....	23
Tabelle 8 Reagenzien und Puffer.....	24
Tabelle 9 Reagenzien und Puffer.....	25
Tabelle 10 Enzyme und Enzympuffer.....	26
Tabelle 11 RNA Positivkontrolle	26
Tabelle 12 Verwendete Kits	26
Tabelle 13 Gebrauchsmaterialien	26
Tabelle 14 Zu Auswertung und Statistik verwendete Software	27
Tabelle 15 RT-Ansatz (40 µl)	34
Tabelle 16 RT-Programm.....	34
Tabelle 17 qPCR Ansatz (25 µl).....	35
Tabelle 18 Verwendete Primer.....	36
Tabelle 19 qPCR-Programm.....	36
Tabelle 20 RT-Ansatz Positiv-Kontrolle (20µl).....	36
Tabelle 21 Ejakulatvolumen und -pH.....	41

Tabelle 22 Spermiengesamtzahl und -konzentration.....	42
Tabelle 23 Motilität.....	44
Tabelle 24 Morphologie.....	45
Tabelle 25 Spermienvitalität.....	46
Tabelle 26 Zelluläre Ejakulatkomponenten.....	47
Tabelle 27 Biochemische Markersubstanzen.....	48
Tabelle 28 Entzündungsdiagnostisch relevante Parameter.....	49
Tabelle 29: DNA-Fragmentierung	51
Tabelle 30 Altersadjustierung des DFI	53
Tabelle 31 High DNA Stainability	55
Tabelle 32 Protamin 1/2 mRNA Ratio	57
Tabelle 33 DFI, HDS und Protamin 1/2 mRNA Ratio und Entzündungsparameter	60
Tabelle 34 Hormonmessung CP/PPS.....	61
Tabelle 35 Auswertung der Fragebögen IPSS, CPSI, IIEF.....	61
Tabelle 36 Korrelationen der Parameter DFI, HDS und Protamin 1/2 mRNA Ratio mit Spermiogrammparametern, biochemischen Parametern, Hormonmessungen sowie Auswertungen der andrologischen Fragebögen.....	64

10 Literaturverzeichnis

- Abu Hassan Abu, D., Franken, D. R., Hoffman, B., & Henkel, R. (2012). Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), S. 571–577. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01229.x
- Agarwal, A. (2011). The Role of Sperm Chromatin Integrity and DNA Damage on Male Infertility. *The Open Reproductive Science Journal*, 3(1), S. 65–71. DOI: 10.2174/1874255601103010065
- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. R. (2005). Sperm DNA damage assessment: A test whose time has come. *Fertility and Sterility*, 84(4), S. 850–853. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.03.080
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2009). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), S. 3–13. DOI: 10.1093/molehr/gap059
- Aitken, R. John, & Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, 57(2–4), S. 265–272. DOI: 10.1387/ijdb.130146ja
- Alvarez, J. G., Sharma, R. K., Ollero, M., Saleh, R. A., Lopez, M. C., Thomas, A. J., Evenson, D. P., & Agarwal, A. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, 78(2), S. 319–329. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)03201-6
- Amor, H., Shelko, N., Hamad, M. F., Zeyad, A., & Hammadeh, M. E. (2019). An additional marker for sperm DNA quality evaluation in spermatozoa of male partners of couples undergoing assisted reproduction technique (IVF/ICSI): Protamine ratio. *Andrologia*, 51(10), S. 1–14. DOI: 10.1111/and.13400
- Aoki, V. W., Liu, L., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Gibson, M., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2006). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*, 86(5), S. 1408–1415. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.04.024
- Arora, H. C., Eng, C., & Shoskes, D. A. (2017). Gut microbiome and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Annals of Translational Medicine*, 5(2), S. 1–10. DOI: 10.21037/atm.2016.12.32

- Baldi, E., & Muratori, M. (2014). *Genetic Damage in Human Spermatozoa. In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8(9). DOI: 10.1186/gb-2007-8-9-227
- Breser, M. L., Salazar, F. C., Rivero, V. E., & Motrich, R. D. (2017). Immunological mechanisms underlying chronic pelvic pain and prostate inflammation in chronic pelvic pain syndrome. *Frontiers in Immunology*, 8(JUL), S. 1–11. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00898
- Cho, C. L., & Agarwal, A. (2018). Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, 16(1), S. 21–34. DOI: 10.1016/j.aju.2017.11.002
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y. C., Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature Genetics*, 28(1), S. 82–86. DOI: 10.1038/88313
- Collins, M. M., Stafford, R. S., O’Leary, M. P., & Barry, M. J. (1998). How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *The Journal of Urology*, 159(4), S. 1224–1228.
- Condorelli, R. A., Russo, G. I., Calogero, A. E., Morgia, G., & La Vignera, S. (2017). Chronic prostatitis and its detrimental impact on sperm parameters: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(11), S. 1209–1218. DOI: 10.1007/s40618-017-0684-0
- de Mateo, S., Gázquez, C., Guimerà, M., Balasch, J., Meistrich, M. L., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2009). Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertility and Sterility*, 91(3), S. 715–722. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.12.047
- Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Hauck, E. W., & Weidner, W. (2003). Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia*, 35(5), S. 283–287. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2003.tb00858.x
- Eggert-Kruse, W., Boit, R., Rohr, G., Aufenanger, J., Hund, M., & Strowitzki, T. (2001). Relationship of seminal plasma interleukin (IL) -8 and IL-6 with semen quality. *Human Reproduction*, 16(3), S. 517–528. DOI: 10.1093/humrep/16.3.517

- Evenson, D., & Jost, L. (2000). Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science*, 22, S. 169–189. DOI: 10.1023/A:1009844109023
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, S. 56–75. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.017
- Evenson, D. P. (2017). Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), S. S495–S500. DOI: 10.21037/tau.2017.07.20
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., & Angelis, P. De. (1999). *Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic*. 14(4), S. 1039–1049. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006a). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5), S. 979–991. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.011
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006b). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), S. 466–472. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)62000-7
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of Reproduction and Infertility*, 15(1), S. 2–14.
- Fu, W., Zhou, Z., Liu, S., Li, Q., Yao, J., Li, W., & Yan, J. (2014). The effect of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) on semen parameters in human males: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(4), S. 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0094991
- Gharagozloo, P., & Aitken, R. J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, 26(7), S. 1628–1640. DOI: 10.1093/humrep/der132
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 13(11), S. 14026–14052. DOI: 10.3390/ijms131114026
- Haidl, F., Haidl, G., Oltermann, I., & Allam, J. P. (2015). Seminal parameters of chronic male genital inflammation are associated with disturbed sperm DNA integrity. *Andrologia*, 47(4), S. 464–469. DOI: 10.1111/and.12408
- Henkel, R., Maaß, G., Hajimohammad, M., Menkveld, R., Stalf, T., Villegas, J., Sánchez, R., Kruger, T. F., & Schull, W. B. (2003). Urogenital inflammation: Changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*, 35(5), S. 309–313. DOI: 10.1046/j.1439-0272.2003.00585.x
- Henkel, Ralf, Ludwig, M., Schuppe, H.-C., Diemer, T., Schill, W.-B., & Weidner, W. (2006). Chronic pelvic pain syndrome/chronic prostatitis affect the acrosome reaction in human spermatozoa. *World Journal of Urology*, 24(1), S. 39–44. DOI: 10.1007/s00345-005-0038-y
- Il Yoon, B., Kim, S., Han, D.-S., Ha, U.-S., Lee, S.-J., Woo Kim, H., Han, C.-H., & Cho, Y.-H. (2012). Acute bacterial prostatitis: how to prevent and manage chronic infection? *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18, S. 444–450. DOI: 10.1007/s10156-011-0350-y
- Jerre, E., Bungum, M., Evenson, D., & Giwercman, A. (2019). Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 112(1), S. 46- 53.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.013
- Khadra, A., Fletcher, P., Luzzi, G., Shattock, R., & Hay, P. (2006). Interleukin-8 levels in seminal plasma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and nonspecific urethritis. *BJU International*, 97(5), S. 1043–1046. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06133.x
- Kliesch, S. (2017). Rational diagnosis and treatment of male infertility. *Urologe*, 56(9), S. 1116–1128. DOI: 10.1007/s00120-017-0455-8
- Kopa, Z., Wenzel, J., Papp, G. K., & Haidl, G. (2005). Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia*, 37(5), S. 188–194. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2005.00676.x
- Krause, W., Weidner, W., Sperling, H., & Diemer, T. (2011). *Andrologie* (4. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- Krieger, J. N., Lee, S. W. H., Jeon, J., Cheah, P. Y., Liong, M. L., & Riley, D. E. (2008). Epidemiology of prostatitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 Suppl 1(Suppl 1), S. S85-90. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.028
- Krieger, J. N., Nyberg, L., & Nickel, J. C. (1999). NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA*, 282(3), S. 236–237.
- Kullisaar, T., Türk, S., Punab, M., & Mändar, R. (2012). Oxidative stress-cause or consequence of male genital tract disorders? *Prostate*, 72(9), S. 977–983. DOI: 10.1002/pros.21502
- Lampiao, F., & du Plessis, S. S. (2008). TNF- α and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(5), S. 628–631. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60309-4
- Lewis, S. E. M., Aitken, R. J., Conner, S. J., De Iuliis, G., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman G, A., & Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: Recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(4), S. 325–337. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.06.014
- Ludwig, M., Vidal, A., Diemer, T., Pabst, W., Failing, K., & Weidner, W. (2002). Seminal secretory capacity of the male accessory sex glands in chronic pelvic pain syndrome (CPPS)/chronic prostatitis with special focus on the new prostatitis classification. *European Urology*, 42(1), S. 24–28. DOI: 10.1016/S0302-2838(02)00224-5
- Ludwig, M., Vidal, A., Huwe, P., Diemer, T., Pabst, W., & Weidner, W. (2003). Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Andrologia*, 35(3), S. 152–156. DOI: 10.1046/j.1439-0272.2003.00553.x
- Magistro, G., Wagenlehner, F. M. E., Grabe, M., Weidner, W., Stief, C. G., & Nickel, J. C. (2016). Contemporary Management of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *European Urology*, 69(2), S. 286–297. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.08.061
- Marconi, M., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Diemer, T., & Weidner, W. (2009). Impact of infection on the secretory capacity of the male accessory glands. *International Braz J Urol*, 35(3), S. 299–308. DOI: 10.1590/S1677-55382009000300006
- McNaughton Collins, M., Pontari, M. A., O’Leary, M. P., Calhoun, E. A., Santanna, J., Landis, J. R., Kusek, J. W., & Litwin, M. S. (2004). Quality of life is impaired in men

- with chronic prostatitis. *Journal of General Internal Medicine*, 16(10), S. 656–662.
DOI: 10.1111/j.1525-1497.2001.01223.x
- Menkveld, R., Holleboom, C. A. G., & Rhemrev, J. P. T. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), S. 59–68. DOI: 10.1038/aja.2010.67
- Moazenchi, M., Totonchi, M., Salman Yazdi, R., Hratian, K., Mohseni Meybodi, M. A., Ahmadi Panah, M., Chehrizi, M., & Mohseni Meybodi, A. (2018). The impact of Chlamydia trachomatis infection on sperm parameters and male fertility: A comprehensive study. *International Journal of STD and AIDS*, 29(5), S. 466–473. DOI: 10.1177/0956462417735245
- Ni, K., Spiess, A.-N., Schuppe, H.-C., & Steger, K. (2016). The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 4(5), S. 789–799. DOI: 10.1111/andr.12216
- Ni, K., Steger, K., Yang, H., Wang, H., Hu, K., & Chen, B. (2014). Sperm Protamine mRNA Ratio and DNA Fragmentation Index Represent Reliable Clinical Biomarkers for Men with Varicocele after Microsurgical Varicocele Ligation. *Journal of Urology*, 192(1), S. 170–176. DOI: 10.1016/j.juro.2014.02.046
- Nickel, J. C., Shoskes, D. A., & Wagenlehner, F. M. E. (2013). Management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): The studies, the evidence, and the impact. *World Journal of Urology*, 31(4), S. 747–753. DOI: 10.1007/s00345-013-1062-y
- Orhan, I., Onur, R., Ilhan, N., & Ardiçoglu, A. (2001). Seminal plasma cytokine levels in the diagnosis of chronic pelvic pain syndrome. *International Journal of Urology*, 8(9), S. 495–499. DOI: 10.1046/j.1442-2042.2001.00358.x
- Paasch, U., Grunwald, S., & Glander, H.-J. (2007). DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität. *Journal Für Reproduktionsmedizin Und Endokrinologie*, 4(3), S. 124–139.
- Penna, G., Mondaini, N., Amuchastegui, S., Degli Innocenti, S., Carini, M., Giubilei, G., Fibbi, B., Colli, E., Maggi, M., & Adorini, L. (2007). Seminal Plasma Cytokines and Chemokines in Prostate Inflammation: Interleukin 8 as a Predictive Biomarker in Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome and Benign Prostatic Hyperplasia. *European Urology*, 51(2), S. 524–533. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.07.016

- Pilatz, A., Boecker, M., Schuppe, H. C., Diemer, T., & Wagenlehner, F. (2016). Infektionen und Infertilität. *Urologe*, 55(7), S. 883–889. DOI: 10.1007/s00120-016-0151-0
- Pilatz, A., Lochnit, G., Karnati, S., Paradowska-Dogan, A., Lang, T., Schultheiss, D., Schuppe, H. C., Hossain, H., Baumgart-Vogt, E., Weidner, W., & Wagenlehner, F. (2014). Acute epididymitis induces alterations in sperm protein composition. *Fertility and Sterility*, 101(6), S. 1609–1617.e5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.011
- Potts, J. M., & Pasqualotto, F. F. (2003). Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia*, 35(5), S. 304–308. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2003.tb00862.x
- Raheem, O. A., & Walsh, T. J. (2017). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), S. S322–S323. DOI: 10.21037/tau.2017.08.14
- Rees, J., Abrahams, M., Doble, A., Cooper, A., & Prostatitis Expert Reference Group (PERG), the P. E. R. G. (2015). Diagnosis and treatment of chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a consensus guideline. *BJU International*, 116(4), S. 509–525. DOI: 10.1111/bju.13101
- Rex, A. S., Aagaard, J., & Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology*, 5(4), S. 622–630. DOI: 10.1111/andr.12381
- Rogenhofer, N., Ott, J., Pilatz, A., Wolf, J., Thaler, C. J., Windischbauer, L., Schagdarsurengin, U., Steger, K., & Von Schönfeldt, V. (2017). Unexplained recurrent miscarriages are associated with an aberrant sperm protamine mRNA content. *Human Reproduction*, 32(8), S. 1574–1582. DOI: 10.1093/humrep/dex224
- Rogenhofer, N., Dansranjavin, T., Schorsch, M., Spiess, A., Wang, H., von Schönfeldt, V., Cappallo-Obermann, H., Baukloh, V., Yang, H., Paradowska, A., Chen, B., Thaler, C. J., Weidner, W., Schuppe, H.-C., & Steger, K. (2013). The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Human Reproduction*, 28(4), S. 969–978. DOI: 10.1093/humrep/des471
- Rowe, P. J., & World Health Organization. (1993). *WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple*. World Health Organization by Cambridge University Press.
- Rusz, A., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Linn, T., Diemer, T., Schuppe, H. C., Lohmeyer, J., Hossain, H., & Weidner, W. (2012). Influence of urogenital infections and

- inflammation on semen quality and male fertility. *World Journal of Urology*, 30(1), S. 23–30. DOI: 10.1007/s00345-011-0726-8
- Schaeffer, A. J. (2008). Epidemiology and evaluation of chronic pelvic pain syndrome in men. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(SUPPL. 1), S. 108–111. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.027
- Schagdarsurengin, U., Teuchert, L. M., Hagenkötter, C., Nesheim, N., Dansranjavin, T., Schuppe, H. C., Gies, S., Pilatz, A., Weidner, W., & Wagenlehner, F. M. E. (2017). Chronic Prostatitis Affects Male Reproductive Health and Is Associated with Systemic and Local Epigenetic Inactivation of C-X-C Motif Chemokine 12 Receptor C-X-C Chemokine Receptor Type 4. *Urologia Internationalis*, 98(1), S. 89–101. DOI: 10.1159/000452251
- Schneider, H., Ludwig, M., Weidner, W., & Brähler, E. (2003). Experience with different questionnaires in the management of patients with CP/CPPS: GPSS, IPSS and NIH-CPSI. *World Journal of Urology*, 21(3), S. 116–118. DOI: 10.1007/s00345-003-0338-z
- Schulte, R. T., Ohl, D. A., Sigman, M., & Smith, G. D. (2010). Sperm DNA damage in male infertility: Etiologies, assays, and outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(1), S. 3–12. DOI: 10.1007/s10815-009-9359-x
- Schuppe, H.-C., Pilatz, A., Hossain, H., Diemer, T., Wagenlehner, F., & Weidner, W. (2017). Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Deutsches Arzteblatt Online*, 114, S. 339–346. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339
- Sergerie, M., Miesusset, R., Croute, F., Daudin, M., & Bujan, L. (2007). High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertility and Sterility*, 88(4), S. 970.e1-970.e7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.045
- Sharif, K. (2013). Sperm DNA fragmentation testing: To do or not to do? *Middle East Fertility Society Journal*, 18(2), S. 78. DOI: 10.1016/j.mefs.2013.02.001
- Shi, T. Y., Chen, G., Huang, X., Yuan, Y., Wu, X., Wu, B., Li, Z., Shun, F., Chen, H., & Shi, H. (2012). Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), S. 696–703. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01252.x
- Shoskes, D. A., & Nickel, J. C. (2013a). Classification and treatment of men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome using the UPOINT system. *World Journal of*

- Urology*, 31(4), S. 755–760. DOI: 10.1007/s00345-013-1075-6
- Shoskes, D. A., & Nickel, J. C. (2013b). Classification and treatment of men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome using the UPOINT system. *World Journal of Urology*, 31(4), S. 755–760. DOI: 10.1007/s00345-013-1075-6
- Shoskes, D. A., Nickel, J. C., Dolinga, R., & Prots, D. (2009). Clinical Phenotyping of Patients With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome and Correlation With Symptom Severity. *Urology*, 73(3), S. 538–542. DOI: 10.1016/j.urology.2008.09.074
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(6), S. 724–734. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 47(4), S. 273–279. DOI: 10.1111/ahe.12361
- Steger, K., Pauls, K., Klonisch, T., Franke, F. E., & Bergmann, M. (2000). Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 6(3), S. 219–225. DOI: 10.1093/molehr/6.3.219
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., Kliesch, S., Bergmann, M., & Weidner, W. (n.d.). *Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men*. DOI: 10.1093/humrep/dem363
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., Kliesch, S., Bergmann, M., & Weidner, W. (2008). Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction*, 23(1), S. 11–16. DOI: 10.1093/humrep/dem363
- Te Velde, E. R., Eijkemans, R., & Habbema, H. D. F. (2000). Variation in couple fecundity and time to pregnancy, an essential concept in human reproduction. *Lancet*, 355(9219), S. 1928–1929. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02320-5
- Tüttelmann, F., & Nieschlag, E. (2009). Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In *Andrologie - Grundlagen und Therapie der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3rd editio). Heidelberg: Springer.

- Virro, M. R., Larson-Cook, K. L., & Evenson, D. P. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 81(5), S. 1289–1295. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.063
- Wagenlehner, F. M. E., Naber, K. G., Bschleipfer, T., Brähler, E., & Weidner, W. (2009). Prostatitis and Male Pelvic Pain Syndrome. *Deutsches Ärzteblatt Online*, 106, S. 175–184. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0175
- Wagenlehner, F., van Till, O., Magri, V., Perletti, G., Houbiers, J., Weidner, W., & Nickel, C. (2012). 1082 National Institute of Health Chronic Prostatitis Symptom Index (Cpsi) Symptom Evaluation in Patients With Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome – a Multinational Study in 1,563 Patients. *Journal of Urology*, 187(4S), S. 953–959. DOI: 10.1016/j.juro.2012.02.1189
- Walczak-Jedrejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska-Hilczner, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 66(1), S. 60–67. DOI: 10.5173/ceju.2013.01.art19
- Weidner, W., Colpi, G. M., Hargreave, T. B., Papp, G. K., & Pomerol, J. M. (2002). EAU guidelines on male infertility. *European Urology*, 42(4), S. 313–322. DOI: 10.1016/S0302-2838(02)00367-6
- World Health Organization, & Department of Reproductive Health and Research. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human sperm* (Fifth edit). World Health Organization.
- Wright, C., Milne, S., & Leeson, H. (2014). Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(6), S. 684–703. DOI: 10.1016/j.rbmo.2014.02.004
- Yanushpolsky, E. H., Politch, J. A., Hill, J. A., & Anderson, D. J. (1996). Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertility and Sterility*, 66(5), S. 822–825. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)58643-9
- Zeyad, A., Hamad, M. F., & Hammadeh, M. E. (2018). The effects of bacterial infection on human sperm nuclear protamine P1/P2 ratio and DNA integrity. *Andrologia*, 50(2), S. 1–9. DOI: 10.1111/and.12841

11 Publikationsverzeichnis

Fachzeitschrift

E. Berg, P. Houska, N. Nesheim, H.-C. Schuppe, A. Pilatz, M. Fijak, M. Manthey, K. Steger, F. Wagenlehner und U. Schagdarsurengin (2021). Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome leads to impaired semen parameters, increased sperm DNA fragmentation and unfavorable changes of sperm protamine mRNA ratio. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):7854. DOI: 10.3390/ijms22157854

Kongressbeiträge/Präsentationen

E. Berg, P. Houska, H.-C. Schuppe, A. Pilatz, M. Fijak, K. Steger, F. Wagenlehner und U. Schagdarsurengin (2017). Chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom ist assoziiert mit eingeschränkten Spermienparametern und erhöhter Spermien-DNA-Fragmentierung. *Vortrag; 69. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU), Dresden*

E. Berg, P. Houska, H.-C. Schuppe, A. Pilatz, M. Fijak, K. Steger, F. Wagenlehner und U. Schagdarsurengin (2017). Sperm quality in Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome (CP/CPPS): Analysis of DNA fragmentation and Protamine 1 / 2 Ratio (2017). *Poster; DFG Onsite Review des IRTG 1871 "Molecular pathogenesis of male reproductive disorders", Gießen*

E. Berg, P. Houska, H.-C. Schuppe, A. Pilatz, M. Fijak, K. Steger, F. Wagenlehner und U. Schagdarsurengin (2017). Chronische Prostatitis/Chronisches Beckenschmerzsyndrom ist assoziiert mit eingeschränkten Spermienparametern und erhöhter Spermien-DNA-Fragmentierung. *Poster; 1. Science Day der Justus-Liebig-Universität, Gießen*

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner, möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit, unter seiner Leitung zu promovieren, die Überlassung des Themas sowie die großartige Betreuung danken. Seine wertvollen Anregungen und Korrekturen, stetige Erreichbarkeit und persönliches Engagement waren maßgeblich für das Gelingen dieser Arbeit und trugen sehr zu meiner Begeisterung für das Fach Urologie bei.

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Undraga Schagdarsurengin für die exzellente Betreuung dieser Arbeit, die freundschaftliche Integration in das Laborteam sowie ihre wertvollen Ideen, Vorschläge und Korrekturen. Ich bin sehr dankbar, dass ich unter ihrer motivierenden Führung und großen fachlichen Expertise die Arbeit im Labor durchführen, erste Schritte in der Wissenschaft gehen und die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Christian Schuppe und PD Dr. med. Adrian Pilatz sowie den Mitarbeiterinnen des andrologischen Routinelabors möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung von klinischer Seite im Rahmen der Untersuchung von Patienten und Probanden bedanken.

Herrn Dr. med. Petr Houska danke ich herzlich für die Einführung in die Methode des SCSA, sowie Frau Dr. rer. nat. Monika Fijak für die Möglichkeit der Nutzung des MACSQuant®. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Steger für die Beratung im Rahmen der Protamin 1/2 Ratio Bestimmung danken.

Für die engagierte und geduldige Einarbeitung in die Labormethoden, die technische Unterstützung sowie die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit im Labor danke ich Tania Bloch, Barbara Fröhlich, Kerstin Wilhelm sowie meinen Mitdoktoranden ganz herzlich.

Mein besonderer Dank gebührt allen Patienten und Probanden, die diese Studie durch ihre Teilnahme ermöglicht haben.

Für die wissenschaftliche Förderung und Gewährung eines Stipendiums zur Durchführung dieser Arbeit gilt mein großer Dank dem DFG-geförderten Internationalen Graduiertenkolleg 1871 „Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders“ (Projekt 5).

Zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern Dr. rer. nat. Ulrike Berg und Prof. Dr. med. Dieter Berg danken, die mir nicht nur große Vorbilder im Hinblick auf wissenschaftliches Engagement sind, sondern auch durch ihre fortwährende, uneingeschränkte Unterstützung und Motivation zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Fabian Horné danke ich für die stets bedingungslose Unterstützung in jeder Hinsicht auf diesem gemeinsamen Weg.