

# **Stimulation kryokonservierter Spermatozoen mit Pentoxifyllin**

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

vorgelegt von  
Biber, Franz Stefan  
aus Ulm

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Gf. Direktor: Herr Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Schill

Gutachter: Prof Dr. Weidner

Tag der Disputation: 24.05.2004

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
<b>1.1 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Geschichte der Kryospermakonservierung.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Kryophysikalische Grundlagen.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Technische Durchführung der Kryokonservierung.....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Kryoprotektiva.....	10
1.4.2 Konfektionierung des Kryospermas.....	12
1.4.3 Einfrierverfahren.....	13
1.4.3.1 Manuell.....	13
1.4.3.2 Semiautomatisch (z.B. Nicool LM-10 <sup>TM</sup> ).....	13
1.4.3.3 Computergesteuert ( z.B. Kryoplaner <sup>TM</sup> ).....	13
1.4.4 Auftauverfahren.....	14
<b>1.5 Schädigung der Spermatozoen durch den Gefrier-/Auftauvorgang.....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Morphologische Veränderungen.....	14
1.5.2 Funktionelle Veränderungen.....	15
1.5.3 Biochemische Veränderungen.....	16
<b>1.6 Die Motilität menschlicher Spermatozoen.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Physiologische Grundlagen.....	17
1.6.2 Meßmethoden der Spermatozoenmotilität.....	17
1.6.2.1 WHO-Kriterien (Laborhandbuch 1999).....	18
1.6.2.2 CASA (z. B. Cell Trak/S <sup>TM</sup> , Hamilton-Thorn 2030 Analyzer <sup>TM</sup> , Strömberg-Mika CMA <sup>TM</sup> ).....	18
1.6.3 Stimulation der Spermatozoenmotilität in vitro.....	18
1.6.3.1 Pentoxifyllin.....	19
1.6.3.1.1 Anwendung.....	20
1.6.3.1.2 Wirkung auf Spermatozoen.....	21
1.6.3.1.2.1 Ansprechen der Zellen.....	21
1.6.3.1.2.2 Wirkungseintritt.....	21
1.6.3.1.2.3 Wirkungsdauer.....	21

<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Patienten.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Ausgangsqualität der Ejakulate .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Ejakulatgewinnung.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Spermioogramme.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Spermatozoenkonzentration (WHO, 1993) .....	23
2.4.2.1 Manuelle Bestimmung der Motilität nach WHO-Kriterien (WHO, 1993) .....	24
2.4.2.2 CASA (Computer-assistierte Samenanalyse) .....	24
2.4.2.2.1 Durchführung der Messung .....	24
<b>2.5 Konservierungs- und Auftauvorgang .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Kryokonservierung der Ejakulate .....	24
2.5.2 Lagerung .....	25
2.5.3 Auftauvorgang .....	25
<b>2.6 Stimulationsprotokoll.....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Pentoxifyllin und verwendete Chemikalien .....	25
2.6.2 Stimulation vor Kryokonservierung .....	26
2.6.3 Stimulation nach dem Auftauen .....	26
2.6.4 Messprotokoll .....	26
<b>2.7 Meßparameter .....</b>	<b>28</b>
2.7.1 CASA .....	28
2.7.1.1 Geräteeinstellungen .....	28
2.7.1.2 Motilitätsparameter.....	28
2.7.1.2.1 Motilität .....	28
2.7.1.2.2 Geschwindigkeiten .....	29
2.7.1.2.2.1 VSL.....	29
2.7.1.2.2.2 VCL .....	29
2.7.1.2.2.3 VAP .....	30
2.7.1.2.3 Bewegungscharakteristika .....	30
2.7.1.2.3.1 Linearität.....	30
2.7.1.2.3.2 LHD/ALH.....	30
<b>2.8 Statistik.....</b>	<b>31</b>
2.8.1 Vergleichene Gruppen und Werte .....	31
2.8.2 Signifikanzniveau .....	31

3 Ergebnisse..... 32

**3.1 Einfluss von Pentoxifyllin auf einzelne Parameter bei Stimulation von Spermatozoen bei**

**Normozoospermie..... 32**

3.1.1 Globalmotilität bei Normozoospermie ..... 32

3.1.2 Motilität bei Normozoospermie..... 34

3.1.3 Linear motile Spermatozoen bei Normozoospermie ..... 36

3.1.4 Linearität bei Normozoospermie ..... 38

3.1.5 LHD (lateral head displacement) bei Normozoospermie..... 40

3.1.6 VAP der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie..... 42

3.1.7 VAP der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie..... 44

3.1.8 VCL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie..... 46

3.1.9 VCL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie..... 48

3.1.10 VSL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie ..... 50

3.1.11 VSL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie ..... 52

**3.2 Einfluss von Pentoxifyllin auf einzelne Parameter bei Stimulation von Spermatozoen bei**

**Oligozoospermie..... 54**

3.2.1 Globalmotilität bei Oligozoospermie..... 54

3.2.2 Motilität bei Oligozoospermie ..... 56

3.2.3 Linear motile Spermatozoen bei Oligozoospermie..... 58

3.2.4 Linearität bei Oligozoospermie ..... 60

3.2.5 LHD (lateral head displacement) bei Oligozoospermie..... 62

3.2.6 VAP der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie ..... 64

3.2.7 VAP der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie ..... 66

3.2.8 VCL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie ..... 68

3.2.9 VCL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie ..... 70

3.2.10 VSL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie..... 72

3.2.11 VSL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie ..... 74

4 Diskussion..... 76

**4.1 Der Einfluss von Ptx auf die mit CASA erfassten Parameter bei Normozoospermie und**

**Oligozoospermie nach Kryokonservierung ..... 76**

4.1.1 Einfluss von Ptx auf die Motilität - Einleitung ..... 76

    4.1.1.1 Der Einfluss von Ptx auf die Globalmotilität bei Normo- und Oligozoospermie ..... 76

    4.1.1.2 Der Einfluss von Ptx auf die motilen Spermatozoen bei Normo- und Oligozoospermie..... 78

    4.1.1.3 Der Einfluss von Ptx auf die linear motilen Spermatozoen bei Normo- und Oligozoospermie ..... 78

4.1.2 Einfluss von Ptx auf die verschiedenen Geschwindigkeiten - Einleitung..... 79

    4.1.2.1 Der Einfluss von Ptx auf die VCL bei Normo- und Oligozoospermie ..... 80

4.1.2.2 Der Einfluss von Ptx auf die VAP bei Normo- und Oligozoospermie .....	81
4.1.2.3 Der Einfluss von Ptx auf die VSL bei Normo- und Oligozoospermie .....	82
4.1.3 Einfluss von Ptx auf die Linearität und das LHD .....	82
4.1.3.1 Der Einfluss von Ptx auf die Linearität bei Normo- und Oligozoospermie .....	82
4.1.3.2 Der Einfluss von Ptx auf das LHD/ALH bei Normo- und Oligozoospermie .....	84
<b>4.2 Mögliche Fehlerquellen der Studie .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3 Weitere Effekte von Ptx .....</b>	<b>86</b>
4.3.1 Toxischer Einfluss von Ptx .....	86
4.3.1.1 Zytotoxische Effekte von Ptx .....	87
4.3.1.2 Mutagener Effekt von Ptx.....	87
4.3.1.3 Einfluss auf Oozyten und Embryo.....	87
4.3.1.4 Bedeutung der Toxizität von Ptx bei Insemination und der assistierten Fertilisation.....	88
4.3.2 Protektive Effekte von Pentoxifyllin .....	88
4.3.3 „Burn out-Phänomen“ durch Ptx .....	90
4.3.5 Der Einfluss von Ptx auf die akrosomale Reaktion (AR) .....	91
4.3.6 Einfluss von Ptx auf physiologische Funktionen der Spermatozoen .....	92
4.3.6.1 Die Wirkung von Ptx auf Spermatozoen im Hamster-Ovum-Penetrations-Test .....	92
4.3.6.2 Die Wirkung von Ptx auf Spermatozoen im Sperm-Binding- und beim Hemi-Zona-Binding-Assay .....	93
4.3.7 Die Wirkung von Ptx bei intrauteriner Insemination und Methoden der assistierten Fertilisation.....	94
4.3.7.1 Die Wirkung von Ptx bei IUI.....	94
4.3.7.2 Die Wirkung von Ptx bei IVF-ET.....	95
4.3.7.3 Die Wirkung von Ptx bei der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI).....	95
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>5.1 Zusammenfassung (deutsch).....</b>	<b>97</b>
<b>5.2 Zusammenfassung (englisch).....</b>	<b>98</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>99</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>120</b>
<b>8 Lebenslauf.....</b>	<b>120</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Kryokonservierung werden menschliche Spermatozoen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und gelagert. Zur assistierten Reproduktion werden die Spermatozoen wieder aufgetaut. Indikation kann die Fertilitätsprophylaxe vor Tumortherapie oder die Lagerung von Donorspermatozoen sein (Beck & Silverstein, 1975, Keck & Nieschlag, 1992, Köhn et al., 1993, Sharma & Agarwal, 1997, Sharma et al., 1997).

Nach Kryokonservierung zeigt sich ein Qualitätsverlust des Ejakulates mit eingeschränkter Beweglichkeit und Funktion der Spermatozoen (Serafini et al., 1986, Crister et al., 1987, Centola et al., 1992, Verheyen et al., 1993, Brennan & Holden, 1995). Zur Besserung der Qualität nach dem Gefrier-/ Auftauprozess kann durch mechanische Aufbereitung und durch Zugabe metabolisch stimulierend wirkender Substanzen eine Optimierung erreicht werden (Tournaye et al., 1995). Zu den häufig eingesetzten Stimulanzen gehört Pentoxifyllin (Ptx) (Hammit et al., 1989). Pentoxifyllin ist ein Methylxanthinderivat, welches durch Hemmung der intrazellulären Phosphodiesterase (PDE) den Abbau des zyklischen Adenosin 3,5-monophosphats (cAMP) verringert. cAMP hat eine Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion mit Wirkung auf die Motilität und akrosomale Reaktion der Spermatozoen.

Die nachfolgende Arbeit soll den Effekt von Pentoxifyllin auf die Motilitätsparameter kryokonservierter Spermatozoen untersuchen. Hierbei wurden verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet:

- Zugabe von Ptx vor dem Einfrieren,
- Zugabe von Ptx nach dem Auftauen.

Die erhöhte metabolische Aktivität von Spermatozoen nach Stimulation könnte zu einem vorzeitigen Aufbrauchen der zellulären Energiereserven führen. Daher wurden die Bewegungsmuster der stimulierten Proben über den Verlauf einer Stunde mit denen der nicht stimulierten Proben verglichen.

Der schädigende Effekt der Kryokonservierung wirkt sich bei Spermatozoen aus Ejakulaten mit reduzierter Qualität stärker als bei Ejakulaten mit unauffälligen Parametern aus (Beck &



Silverstein, 1975, Glassman & Bennett, 1980, Mc Laughlin et al.,1992a). Die Wirkung von Ptx erscheint gerade bei reduzierten Parametern zur Verbesserung der Spermaqualität nach dem Gefrier-/Auftau-Vorgang interessant. Daher wurden in dieser Arbeit auch Ejakulate mit Oligozoospermie untersucht.

## **1.2 Geschichte der Kryospermakonservierung**

Das Überleben von menschlichen Samenzellen, welche in Schnee eingefroren waren, wurde zum ersten Mal 1776 von Lazzaro Spellazani erwähnt. Er formulierte die Idee, Spermatozoen für eine spätere Reproduktion zu lagern. 1866 beschrieb Mantegazza das Phänomen, den Gefrier- und Auftauvorgang überstehen zu können für Spermatozoen, welche über einen längeren Zeitraum bei  $-15^{\circ}\text{C}$  konserviert waren. Er schlug vor, eine Samenbank für in den Krieg ziehende Soldaten zu errichten.

Jahnel berichtete 1937 von überlebenden Spermatozoen bei Versuchen an Kaninchenhoden im Tieftemperaturbereich. Diese hatten den Gefrier- und Auftauvorgang unter Erhalt ihrer Motilität überstanden. Bei späteren Testreihen, bei denen humane Spermatozoen in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) eingelagert wurden, ließen sich gleiche Eigenschaften für menschliche Samenzellen bestätigen. Der kryoprotektive Effekt des Glycerins wurde von Polge, Smith und Parks 1949 entdeckt.

Erstmals konnte 1953 von der erfolgreichen Geburt eines Babys nach Insemination mit kryokonservierten Spermatozoen berichtet werden (Sherman, 1978, Brotherton, 1990).

## **1.3 Kryophysikalische Grundlagen**

Beim Einfrierprozess kristallisiert Wasser. Da Salze und Proteine hiervon nicht betroffen sind, nimmt deren Konzentration in den noch verbliebenen flüssigen Kompartimenten zu. Der Gefrierpunkt wird in dieser Lösung gesenkt. Mit zunehmender Konzentration der Lösung steigen deren toxische Effekte auf die Zelle.

Befinden sich Zellen im einzufrierendem Medium, müssen deren Zytoplasma und Plasmamembranen auf die verschiedenen Phasen des Einfrier- und Auftauprozesses reagieren.

Ein langsamer Temperaturabfall in einem Medium mit Spermatozoen führt aufgrund der intrazellulären höheren Salzkonzentration zunächst zur extrazellulären, später auch zur intrazellulären Bildung von Eiskristallen. Die extrazelluläre Salzkonzentration steigt im nicht gefrorenen Flüssigkeitskompartiment durch den bereits weiter oben beschriebenen Mechanismus an. Wasser tritt osmotisch aus der Zelle aus. Die Zelle schrumpft, und die intrazelluläre Konzentration der Lösung nimmt zu. Ist eine bestimmte Temperatur unterschritten, so kristallisiert die verbliebene Flüssigkeit innerhalb und außerhalb der Zellen. Bei einer zügigen Änderung der Temperatur kann das intrazelluläre Wasser nicht schnell genug durch die Zellmembran diffundieren und kristallisiert sofort in der Zelle.

Beim Auftauvorgang verhalten sich die Vorgänge umgekehrt. Ein langsames Auftauen führt aufgrund der höheren intrazellulären Salzkonzentration zum osmotischen Eintritt von extrazellulärem, flüssigem Wasser in die Zelle. Das extern kristallisierte Wasser geht aufgrund des absinkenden Gefrierpunktes durch die steigende Konzentrierung der dort verbliebenen Salze zunehmend in den flüssigen Zustand über.

Innerhalb der Zelle kann es durch den Verdünnungseffekt des einströmenden Wassers zur Rekristallisation mit Mikrokristallbildung kommen. Der Einstrom kann eine enorme intrazelluläre Volumenzunahme bedingen.

Die Schädigung kommt durch intrazelluläre und extrazelluläre Kristallisation, Schrumpfung und Expansion der Zelle, sowie durch den toxischen Effekt der steigenden Salzkonzentration in der Lösung zustande (Hammerstedt et al., 1990, Mc Laughlin et al., 1992b).

## **1.4 Technische Durchführung der Kryokonservierung**

### **1.4.1 Kryoprotektiva**

Nach dem Einfrier- und Auftauvorgang weisen Spermatozoen eine Vitalitäts- und Funktionseinschränkung auf. Es wurden verschiedene Additive als Protektiva eingeführt. Durch Zugabe dieser Substanzen lassen sich die intra- und extrazelluläre Änderung der Osmolarität und die intrazelluläre Kristallisation beeinflussen und somit die Schädigung zellulärer Strukturen beim Einfrier- und Auftauprozess reduzieren.

Es kann zwischen den die Zellmembran penetrierenden und nicht penetrierenden Kryoprotektiva unterschieden werden. Zu den penetrierenden Substanzen gehören Dimethylsulphoxid (DMSO)

und Glycerol. Das extrazelluläre Kryoprotektivum bewirkt eine höhere Osmolarität. Dadurch kommt es zum Ausstrom des intrazellulären Wassers. Gleichzeitig diffundiert das Kryoprotektivum langsam in die Zelle. Die Geschwindigkeit der Penetration hängt von der Struktur der Lipidmembran der Zelle ab. Es kommt zur osmotischen Dehydration.

Zu den nicht penetrierenden Substanzen werden z.B. Laktose, Trehalose und Saccharose gezählt. Der extrazellulär höhere osmolare Gradient dieser Disaccharide bewirkt den Wasserausstrom aus der Zelle (Hammerstedt et al., 1990).

Die anfängliche Konservierung mit DMSO wurde aufgrund seiner Toxizität zugunsten des Glycerols verlassen. Im heutigen Gebrauch sind Glycerol, Glycerol-Gemische und glycerolfreie Gemische (z.B. TESTCY). TESTCY ist ein Gemisch aus Zitrat, Hühnereiweiß und einem Zwitterionenpuffer.

Zu den Glycerol enthaltenden Gemischen gehört GEYC (Glycerol - egg yolk- citrate), welches in verschiedenen Modifikationen beschrieben wurde. Das Eiweiß aus Hühnereiern soll Nährstoffe bereitstellen. Ejakulate sind Bikarbonat-Zitrat-Puffer, weshalb Zitrat dem Gemisch beigelegt werden kann. Anstelle von Bikarbonat kann zur Pufferung HEPES verwendet werden.

Das Gemisch wird 1:1 mit dem Ejakulat versetzt (Serafini et al., 1986, Hammerstedt et al., 1990, Centola et al., 1992).

Glycerol wird im Volumenanteil von 5 bis zu 10 % eingetropfelt. Es bildet Komplexe mit Salzen, so dass deren toxische Konzentration im einfrierenden Medium sinkt. Anstelle zu kristallisieren, erstarrt Wasser unter dem Einfluss von Glycerol intrazellulär amorph. Man spricht von der sogenannten Vitrifikation (Brotherton, 1990).

Aufgrund der langsameren Penetration des Glycerols im Vergleich zu Wasser muss die Geschwindigkeit des Einfrier- und Auftauprotokolls angepasst werden. Nach Zugabe schrumpft die Zelle durch den osmotischen Wasseraustritt. Die Zelle nimmt ihr Ausgangsvolumen durch den langsameren Eintritt des Kryoprotektivums wieder ein. Beim Einfriervorgang schrumpft die Zelle erneut durch den unter Absatz 1.3 beschriebenen Effekt des extrazellulär kristallisierenden Wassers mit steigender Salzkonzentration.

Beim Auftauvorgang verhält sich der Vorgang umgekehrt. Extrazelluläres Wasser wird frei und tritt in die Zelle ein, während das Protektivum nur langsam heraus diffundiert, so dass eine

zelluläre Volumenzunahme bis an das 4,3fache beobachtet werden kann (Hammerstedt et al., 1990).

Die durch Glycerol bedingte hohe Osmolarität bewirkt selbst einen toxischen Effekt mit Veränderungen in Ultrastruktur und Enzymmilieu der Zelle (Mack & Zaneveld, 1987, Mc Laughlin et al., 1992b, Hammerstedt et al., 1990).

Die Initialmotilität eines Ejakulates wird durch Glycerol erhöht, die Penetrationsfähigkeit der Zelle leidet jedoch (Jeyendran et al., 1982).

#### **1.4.2 Konfektionierung des Kryospermas**

Sperma und Medium werden in kleinen Volumina tiefgefroren. Verschiedene Konfektionierungen stehen zur Verfügung.

In sterilen Ampullen aus Plastik können Portionen zu 1 ml versiegelt werden. Das Volumen ist in Relation zur Oberfläche jedoch ungünstig groß, so dass die Temperaturverteilung von innen nach außen ungleichmäßig verläuft und zur Minderung der Samenqualität führen kann. Glasampullen können sowohl beim Ein- und Auftauvorgang zerspringen. Sie werden heute zur Kryokonservierung nicht mehr eingesetzt.

Früher wurden die Ejakulate auch in Tuberkulinspritzen zur Kryokonservierung abgefüllt. Kryophysikalisch haben sie die gleichen Nachteile wie Ampullen und werden ebenfalls nicht mehr verwendet.

Mittels Injektion können Proben in Silikon- oder Gelatinekapseln appliziert werden. Durch eine runde oder ovale Form ist das Verhältnis aus Oberfläche und Volumen wie bei den Ampullen ungünstig. Die Kennzeichnung ist zudem schwierig.

Eine ähnliche Problematik stellt sich für die Einlagerung in Form von Pellets. Das Gemisch aus Ejakulat und Medium kann offen in Formbehältern oder direkt durch Eintropfen in den flüssigen Stickstoff konserviert werden. Der Temperaturabfall findet plötzlich statt, während der Auftauvorgang nur bei Raumtemperatur oder im Inkubator erfolgen kann. Für den Einsatz im Humanbereich ergeben sich hygienische Bedenken.

Zur Anwendung kommen heute Straws oder Pailletten. Es handelt sich um Kunststoffröhrchen, welche versiegelt werden. Die Befüllung erfolgt mit 0,25 ml der Probe. Kryophysikalisch ist das Verhältnis Oberfläche zu Volumen günstiger als bei Ampullen. Die Identifikation der Straws ist gewährleistet.

### **1.4.3 Einfrierverfahren**

Nach Konfektionierung des Ejakulates werden die Proben der Kryokonservierung zugeführt. Dieses kann manuell, semiautomatisch und computergesteuert erfolgen.

#### **1.4.3.1 Manuell**

Es wird ein langsamer Temperaturabfall angestrebt. Die Probe wird nach dem Abkühlen im Kühlschrank in Stickstoffdampf platziert. Der über dem Flüssigkeitsspiegel befindliche Dampf hat abhängig vom Abstand zur Oberfläche eine Temperatur von ca.  $-80^{\circ}\text{C}$  bis  $-120^{\circ}\text{C}$ . In diesem werden die Proben äquilibriert. Nach Einwirken des Dampfes über ca. 30 - 40 Minuten werden die Proben dann in den flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) manuell umgelagert, wo sie bis zur weiteren Verwendung verbleiben.

#### **1.4.3.2 Semiautomatisch (z.B. Nicool LM-10<sup>TM</sup>)**

Beim semiautomatischen Verfahren werden die Proben direkt in Stickstoffdampf eingebracht. Mittels Ventilator erfolgt das kontinuierliche Durchmischen des Dampfes. Das Temperaturgefälle in Abhängigkeit vom Flüssigkeitsspiegel soll hierdurch reduziert werden. Der Kontakt des Dampfes zum Probenbehälter ist erhöht, so dass ein gleichmäßigerer Temperaturabfall in der Probe erreicht wird. Die Proben sind bereits im Dampf gefroren. Die Einlagerung in den flüssigen Stickstoff erfolgt von Hand.

#### **1.4.3.3 Computergesteuert ( z.B. Kryoplaner<sup>TM</sup>)**

Durch ein computerreguliertes Programm wird die Kühlung und Einlagerung in den Stickstoff durchgeführt. Der Temperaturabfall an der Probe soll zunächst langsam erfolgen. Mit zunehmendem Absinken der Temperatur wird die Rate gesteigert. Die Platzierung im flüssigen Stickstoff, nach Erreichen der Bestimmungstemperatur, erfolgt automatisch. Der Vorgang ist

kontrolliert und reproduzierbar. Ein Nachteil ist, dass hohe Anschaffungskosten anfallen, während die Überlebensraten im Vergleich zu den manuellen und semiautomatischen Verfahren nur geringe Unterschiede aufweisen.

#### **1.4.4 Auftauverfahren**

Das Auftauen ist technisch ein einfacher Prozess. Die Proben werden vorzugsweise bei Raumtemperatur, ca. 22°C, im Inkubator oder im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Die Verwendung der Probe sollte möglichst im Anschluss erfolgen, da die Lebensdauer der Zellen im Vergleich zu nativen Zellen deutlich reduziert ist (Graham, 1978).

Die Geschwindigkeit des Temperaturangleichs beim Auftauen sollte am zeitlichen Ablauf des Einfrierverfahrens orientiert werden. Beim langsamen Absenken der Temperatur, wie es im computergesteuerten Verfahren stattfindet, ist ein langsamerer Auftauvorgang vorteilhafter. Wird eine schnellere Kühlungsrate gewählt, wie z.B. im flüssigen Stickstoffdampf, ergaben sich bessere Werte bei der zügigen Erwärmung im Inkubator (Bell et al., 1993, Verheyen et al., 1993).

#### **1.5 Schädigung der Spermatozoen durch den Gefrier-/Auftauvorgang**

Durch den Gefrier- und Auftauprozess kommt es zur Schädigung der Spermatozoen. Hierzu tragen mehrere Faktoren bei. Die Eiskristallbildung inner- und außerhalb der Zellen führt zu einer direkten mechanischen Schädigung. Hinzu kommen eine toxische Eigenwirkung des Kryoprotektivums und osmotisch bedingte Mechanismen. Durch osmotische Volumenverschiebung sind die Spermatozoen drastischen zellulären Volumenänderungen und toxischen Elektrolytkonzentrationen ausgesetzt.

##### **1.5.1 Morphologische Veränderungen**

Die Schädigung der Zellen spiegelt sich auf mikrozellulärer Ebene mit Störung der Zellintegrität wider. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen finden sich Alterationen an Kopf, Mittelstück und Flagella. Besonders betroffen scheint jedoch die akrosomale Region. An dieser lassen sich Schwellungen, Brüche der Membran bis hin zum kompletten Verlust des akrosomalen Inhalts beobachten (Pedersen, 1972, Schill, 1973, 1974, Holt & North, 1984, Mack & Zaneveld, 1987, Hammerstedt et al., 1990, Barthelemey et al., 1990, Check et al., 1991, Brennan & Holden, 1995).

### 1.5.2 Funktionelle Veränderungen

Die Membranintegrität und Motilität der Spermatozoen sind eng zusammenhängende Größen (Jeyendran et al., 1984, Tesarik & Testart, 1989). Gefrier- und Auftauprozess führen zu einer Reduktion der Motilitätsparameter, so dass die Geschwindigkeit und die Motilität der kryokonservierten Spermatozoen zumeist unter der der nativen unbehandelten Probe liegen (Crister et al., 1987, Keel et al., 1987, Centola et al., 1992, Verheyen et al., 1993, Brennan & Holden, 1995). Zudem kann nach dem Auftauvorgang eine beschleunigte Abnahme der Motilität beobachtet werden. Dieses wurde einer subletalen Schädigung der Zelle zugeschrieben (Overstreet & Drobins, 1993). Cross und Hanks stellten 1991 die Motilität als sensitivsten Indikator der Kryoschädigung dar. Nach Konservierung findet sich ein Abfall um 20 - 80% (Richter et al., 1984, Köhn et al., 1993).

Durch die Störung der Zellmembran resultiert ein unkontrollierter Ionenaustausch. Folge ist die Veränderung des internen Zellmilieus. Unter anderem ist die mitochondriale Aktivität betroffen.

Die Schädigung der Mitochondrien kann von einer eingeschränkten Funktion bis zum Untergang durch Ruptur der Organellen reichen (Friberg & Nilsson, 1971, Barthelemy et al., 1990). Neben dem Verlust durch die Zellmembran führt dieses zur ungenügenden Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). Der entstandene Energiemangel bedingt eine verringerte Motilität und erklärt deren ausgeprägte Abnahme nach dem Auftauen (Bell et al., 1993, Bosman et al., 1994).

Als „recovery rate“ oder „Erholungsrate“ wird das Verhältnis der Motilität nach Konservierung im Vergleich zur Motilität vor Kryokonservierung definiert:

$$\text{Erholungsrate (\%)} = \frac{\% \text{ Motilität nach dem Gefrier-/Auftauvorgang}}{\% \text{ Motilität vor dem Gefrier-/Auftauvorgang}} \times 100$$

Die Erholungsrate und Motilität nach Kryokonservierung korrelieren signifikant mit Veränderungen in der Ultrastruktur der Spermatozoenköpfe, sowie der Anzahl der intakten Köpfe. Man muss von einer gleichzeitigen Schädigung im Bereich der Mittelstücke und Flagella ausgehen, so dass sich diese Korrelation erklären ließe (Serafini et al., 1986).

Je schlechter die Qualität des Spermias, desto schlechter ist auch die zu erwartende Erholung. Bei Proben mit Astheno-, Oligo- und Teratozoospermie ist der Kryoeffekt stärkergradig ausgeprägt (Beck & Silverstein, 1975, Mc Laughlin et al., 1992a, Glassman & Bennett, 1980).

Das Ausmaß der Reduktion der Motilität nach Kryokonservierung in der individuellen Probe ist mit der ursprünglichen Motilität und der Lagerungsdauer assoziiert. Die Erholungsrate ist zunächst über die Dauer von ca. 36 Monaten konstant. Danach findet sich ein kontinuierlicher Abfall (Kolodziej et al., 1987, Brotherton, 1990).

Nur 65 - 70% gesunde Spender haben eine Erholungsrate, die für die Kryokonservierung und spätere homologe Inseminationen akzeptabel sind. Zudem treten selbst beim gleichen Spender Schwankungen der Gefrierfähigkeit des Ejakulates auf. Die interindividuelle und intraindividuelle Variabilität, mit welcher der Einfrier- und Auftauvorgang überstanden werden, machten eine Überprüfung vor definitiver Konservierung für eine spätere IVF oder Insemination notwendig (Schill & Bollmann, 1986). Lediglich bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) sind keine gleichartigen Minimalanforderungen an die Erholungsrate mehr notwendig, da die Identifikation einer lebenden Zelle pro Oozyte theoretisch ausreichend ist.

Neben dem Abfall der Motilitätsparameter nach Kryokonservierung resultieren weitere funktionelle Störungen mit Minderung der Penetrationsfähigkeit im Zervikalmukus, Fusionsrate mit der Eizelle und Fertilisierungsfähigkeit (Alfredsson et al., 1983, Richter et al., 1984, Serafini et al., 1986, Crister et al., 1987, Centola et al., 1992).

### **1.5.3 Biochemische Veränderungen**

Neben den morphologischen und funktionellen Veränderungen durch die Kryokonservierung wurden biochemische Schädigungen der Spermatozoen beobachtet. Es konnte eine gesteigerte Peroxidation der Membranlipide mit Zunahme der Membranpermeabilität gezeigt werden. Zu den Membranlipiden gehören Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylcholine, deren Anteil messbar abnahm.

Für die Peroxidation wurden freie Radikale angeschuldigt (Aitken & Clarkson, 1987, Aitken et al., 1989, Gavella et al., 1991, Gavella & Lipovac, 1992, Sikka et al., 1995).

Durch Zugabe von Peroxidationshemmern konnte allerdings kein relevanter protektiver Effekt auf die Vitalitätsparameter (Alvarez & Storey, 1992, Bell et al., 1993) oder Fertilisierungsrate gefunden werden (Nonogaki et al., 1992). Eine Ausnahme stellt das Pentoxifyllin dar (s. protektiver Effekt, Yovich, 1993).



Für die Fertilisierung ist die Akrosinaktivität von Bedeutung. Unter dem Einfluss der Kryokonservierung werden ein Abfall der Akrosinaktivität sowie eine Reduktion der intakten Akrosomen beobachtet (Schill, 1973, Schill, 1975, Mack & Zaneveld, 1987, Cross & Hanks, 1991, Mc Laughlin et al., 1992a).

## **1.6 Die Motilität menschlicher Spermatozoen**

### **1.6.1 Physiologische Grundlagen**

Die Fähigkeit der Spermatozoen zur progressiven Bewegung wird während der epididymalen Reifung erlangt (Fawcett, 1975, Eddy & O'Brien, 1994). Die Bewegung der Spermatozoen ist Ausdruck des Flagellenschlages, welcher durch das aktive und passive Zusammenspiel des Zytoskelettes zustande kommt. Dabei wird ATP als Energielieferant für die Aktivität der Dynein-Arme der äußeren Doppelreihe der Mikrotubuli benötigt (Fawcett, 1975, Eddy & O'Brien, 1994). ATP wird durch eine Adenylatzyklase zu cAMP katalysiert (s.1.8.3.1). Dem intrazellulärem cAMP wird dabei eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Der höchste Anteil der cAMP-Bindungskapazität findet sich im Flagellum der Spermatozoen (Eddy & O'Brien, 1994). Es konnte eine positive Korrelation zwischen Aktivität der Adenylatzyklase, Erhöhung der cAMP-Konzentration und der Samenmotilität gezeigt werden (Ishikawa et al., 1989). Weiterhin hat cAMP eine Funktion als Mediator. Es regelt die Phosphorylierung von Proteinen mit Einfluss auf die Motilität (s.1.8.3.1). Der Abbau von cAMP erfolgt über Phosphodiesterasen, von denen verschiedene Subtypen bekannt sind (Eddy & O'Brien, 1994, Fisch et al., 1999, Richter et al., 1999). Eine Inhibition dieser Phosphodiesterasen und Anhebung des cAMP-Spiegels durch Hemmung des Abbaus kann die Motilität der Spermatozoen beeinflussen.

### **1.6.2 Meßmethoden der Spermatozoenmotilität**

Die Motilität kann lichtmikroskopisch geschätzt und klassifiziert werden. Die Unterteilung erfolgt durch Orientierung an zurückgelegter Strecke in Bezug auf Kopf oder Flagellumlänge.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Erfassung mittels Computer-assistierter-Samen-Analyse (CASA) dar.

### 1.6.2.1 WHO-Kriterien (Laborhandbuch 1999)

Referenzwerte nach WHO (1999):

Volumen	2,0 ml oder mehr
pH	7,2 oder mehr
Spermienkonzentration	20 x 10 <sup>6</sup> /ml Spermien oder mehr
Gesamtspermienzahl	40 x 10 <sup>6</sup> Spermien pro Ejakulat oder mehr
Motilität	50% mit Vorwärtsbeweglichkeit (WHO a + b) oder 25% mit progressiver Beweglichkeit (WHO a, > 25 µm/s) innerhalb von 60 min nach Probengewinnung
Morphologie	s. WHO Handbuch, mindestens 15% normale Formen
Anteil der lebenden Spermien	50% vitale Zellen
Leukozyten	weniger als 1 x 10 <sup>6</sup> /ml

### 1.6.2.2 CASA (z. B. Cell Trak/S<sup>TM</sup>, Hamilton-Thorn 2030 Analyzer<sup>TM</sup>, Strömberg-Mika CMA<sup>TM</sup>)

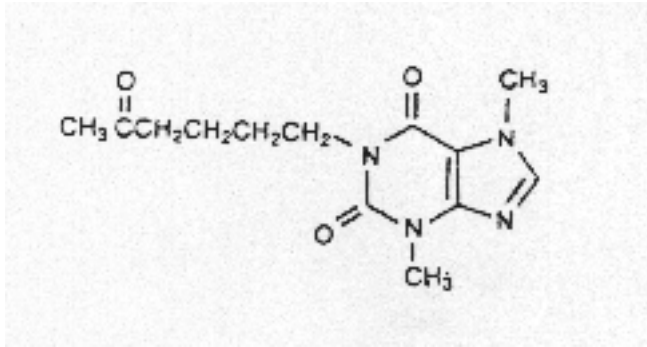
Bei der Computer-assistierten Samen-Analyse werden über eine an einem Mikroskop angebrachte Kamera Bildsequenzen aufgenommen und digitalisiert. Die Auswertung erfolgt durch ein Computerprogramm. Die Methode soll eine höhere Präzision und Reproduzierbarkeit in Erfassung quantitativer und qualitativer Daten zur Spermienmotilität bieten. So können weitere Parameter wie Geschwindigkeiten und Bewegungsmuster erfasst werden. Die eigentliche Analyse ist vom Benutzer unabhängig standardisiert. Der subjektive Einfluss durch den Beurteiler entfällt. Fehler können z.B. durch unterschiedliche Aufarbeitung der Proben, Geräteeinstellungen und Auswahl nicht repräsentativer Blickfelder auftreten (Neuwinger et al., 1990a, b, Köhn et al., 1993, Hinney et al., 1993, Davis et al., 1995, Centola, 1996).

### 1.6.3 Stimulation der Spermatozoenmotilität in vitro

Verschiedene Substanzen sind in vitro zur Stimulation der Spermatozoenmotilität eingesetzt worden.

### 1.6.3.1 Pentoxifyllin

Pentoxifyllin (Ptx), 3,7-dihydro-3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-1H-2,6-dion, ist ein Methylxanthinderivat (Abb.2).

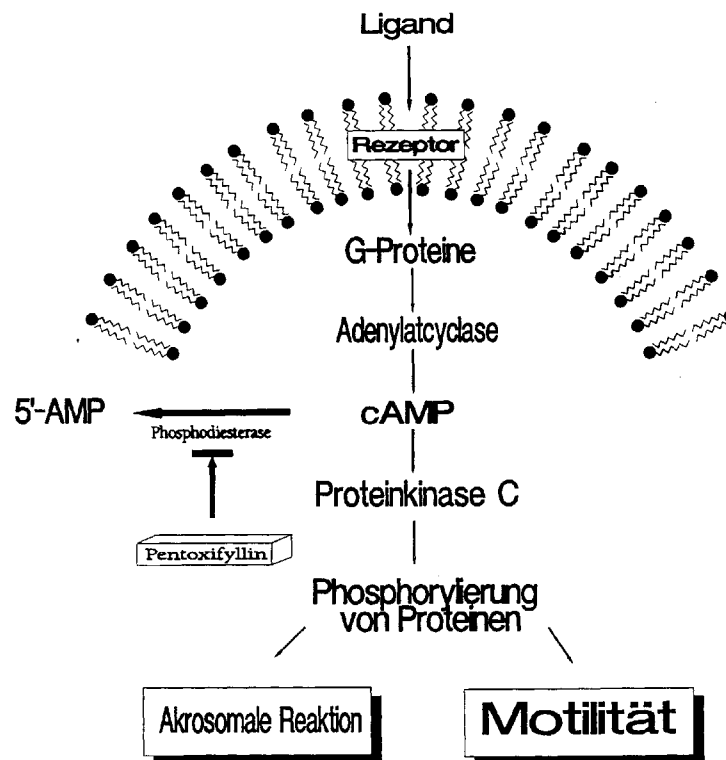


(Abb.2)

Wie Theophyllin und Koffein gehört es in seiner Wirkungsweise in die Gruppe der Phosphodiesterasehemmer, wodurch ein Eingriff auf die durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte zelluläre Signaltransduktion möglich wird.

Nach Bindung eines Liganden an einen membranständigen Rezeptor wird die G-Protein abhängige Adenylatzyklase aktiviert. Diese selbst ist kalziumabhängig (Zaneveld et al., 1991, De Jonge et al., 1991a, b, Eddy & O'Brien, 1994). Hierdurch erfolgt die Katalyse von ATP, Adenosintriphosphat, zu cAMP, zyklischem Adenosin 3,5-monophosphat. cAMP aktiviert die Proteinkinase C und somit die Phosphorylierung von Proteinen (Ward & Clissold, 1987, De Jonge et al., 1991a, b).

Der Abbau des cAMP zu 5-AMP, Adenosin-5-monophosphat, erfolgt durch eine Phosphodiesterase. Aus deren Hemmung durch Pentoxifyllin resultiert ein Anstieg des intrazellulären cAMP (Enginsu et al., 1994) und somit die Aktivierung der Signaltransduktion (Abb.3). Hierdurch wird die Glykolyse gesteigert, so dass die Energiegewinnung der Zellen zunimmt (Hicks et al., 1972, Rees et al., 1990).



(Abb.3, Köhn et al., 1993)

ATP besitzt zwei energiereiche Pyrophosphatverbindungen. Nach Abspaltung kann ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) übergehen. Durch Glykolyse oder Oxidation in den Mitochondrien wird der ATP-Pool durch Phosphorylierung von AMP oder ADP konstant gehalten.

Aus dieser Quelle beziehen auch die Spermatozoen ihre Energie. Der Verlust von ATP aufgrund einer gesteigerten Membranfragilität lässt sich mit der reduzierten Motilität der Spermatozoen nach Kryokonservierung korrelieren (Bosman et al., 1994). Sowohl die Glykolyse, Fruktolyse, als auch in geringerem Ausmaß die mitochondriale Respiration werden durch Ptx in den Spermatozoen gesteigert (Rees et al., 1990).

### 1.6.3.1.1 Anwendung

Pentoxifyllin findet seinen Einsatz unter anderem in der Andrologie. Die Wirkung auf Spermatozoen ist schon länger bekannt. Die Applikation von Ptx kam früher oral und heute noch additiv *in vitro* zur Anwendung. *In vitro* wurde für Ptx nach direkter Zugabe als Stimulans auf Spermatozoen eine Wirkung nachgewiesen (Turner et al., 1978, Rees et al., 1990, Tasdemir et al.,

1993). Einzelne Motilitätsparameter der Spermatozoen, wie z.B. die Geschwindigkeiten VCL und VSL (siehe Material und Methoden), scheinen jedoch unterschiedliche Dosierungen von Ptx als Optimum zu haben (Paul et al., 1995). Faktoren wie Samenqualität, Kryokonservierung, Aufbereitungsprotokoll und spätere Methode der Fertilisierung führten zu differierenden Angaben zwischen 2 und 6 mmol/ml (Sikka & Hellstrom, 1991, Bell et al., 1993, Moohan et al., 1993, Paul et al., 1995, Sharma et al., 1996a).

Zur Zeit der Studie war eine Endkonzentration von 1 mg/ml (3,6 mmol/ml) als Optimum evaluiert (Tesarik et al., 1992a, Kay et al., 1993, Lewis et al., 1993). Die Zugabe des Ptx nach dem Auftauprozess ist im Vergleich zur Zugabe vor der Konservierung vorteilhafter (Köhn et al., 1993).

### **1.6.3.1.2 Wirkung auf Spermatozoen**

#### **1.6.3.1.2.1 Ansprechen der Zellen**

Es bestehen interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede in der Reaktion der Spermatozoen auf Ptx. Das Phänomen von sogenannten „Non-respondern“ ist bekannt (Paul et al., 1995, Moohan et al., 1993, Tesarik et al., 1992a, Mbizov et al., 1993). Spermatozoen mit reduzierten Motilitätsparametern sprechen stärker auf Pentoxifyllin an (Yovich et al., 1988, Morales et al., 1993, Tarlatzis et al., 1995).

#### **1.6.3.1.2.2 Wirkungseintritt**

Nach Zugabe zum nativen, aufbereiteten oder konservierten Ejakulat stellte sich die Wirkung von Ptx zügig ein. Das Maximum wurde nach den ersten 10 Minuten erreicht (Tesarik et al., 1992a). Teilweise wurden aber auch Protokolle mit einer Inkubationszeit bis zu einer Stunde vor Analyse verwendet (Pang et al., 1993b, Check et al., 1995).

#### **1.6.3.1.2.3 Wirkungsdauer**

Die Zeitspanne, für die ein Effekt nachgewiesen werden konnte, war nicht einheitlich.

Wurde Ptx nach Zugabe im Ejakulat belassen, so hielt die Wirkung bei Ejakulaten mit Normozoospermie für ca. 24 Stunden an (Hammitt et al., 1989, Tournaye et al., 1993a, Kolon et al., 1995).

Aufgrund seiner toxischen Komponente (s. toxischer Effekt, Diskussion), wurde Ptx bei Bedarf aus der Probe gewaschen. Die Wirkung dauert jedoch auch dann über einen Zeitraum von ca. 2-4 Stunden an (Lewis et al., 1993, Tesarik et al., 1992a, b, Pang et al., 1993b, Kay et al., 1993). Nach Kryokonservierung scheint der Einfluss weiter verkürzt. Es konnte eine Wirkung unter 1 - 3 Stunden gezeigt werden. Bei reduzierter Motilität ist die Ansprechdauer weiter verringert (Hammit et al., 1989, Kay et al., 1993).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In der Studie wurden Ejakulate von 83 Patienten der andrologischen Ambulanz des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Universitätsklinik Gießen untersucht. Die Auswahl erfolgte zufällig. Das Alter der Patienten lag zwischen 22 - 53 Jahren, durchschnittlich bei 33 Jahren.

### **2.2 Ausgangsqualität der Ejakulate**

In der untersuchten Gruppe wiesen 62 Patienten Normozoospermie und 21 Oligozoospermie auf. Um in die Untersuchung aufgenommen zu werden, musste das Ejakulat nach Abschluss der Routineanalyse ein Mindestvolumen von mehr als 2 ml aufweisen.

### **2.3 Ejakulatgewinnung**

Die Ejakulate wurden unter Beachtung einer Karenz von mindestens fünf Tagen durch Masturbation gewonnen. Die Proben wurden in sterilen verschließbaren Kunststoffbehältern aufgefangen und bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

### **2.4 Spermioogramme**

Nach Berücksichtigung der üblichen Verflüssigungszeit bis zu 60 Minuten erfolgte ein Spermioogramm nach WHO-Kriterien (WHO-Handbuch, 1993). Dabei wurden Aussehen, Menge, Konsistenz, pH-Wert, Morphologie, Konzentration, Globalmotilität und Progressivmotilität beurteilt.

#### **2.4.1 Spermatozoenkonzentration (WHO, 1993)**

Die Spermatozoenkonzentration wurde mittels Zählkammermethode unter dem Mikroskop bestimmt. Bei der Auswertung fand eine auf 37°C temperierte Neubauer-Kammer Verwendung. Ermittelt wurden die Spermatozoenkonzentration in Millionen/ml und die Spermatozoengesamtzahl.

#### **2.4.2.1 Manuelle Bestimmung der Motilität nach WHO-Kriterien (WHO, 1993)**

Mit der Motilität wird der Anteil der beweglichen Spermatozoen eines Ejakulats angegeben.

Diese kann durch Beurteilung unter dem Mikroskop erfasst werden. Dabei werden die in mehreren definierten Gesichtsfeldern befindlichen Spermatozoen unter Zuhilfenahme eines Rasters systematisch auf Ihre Beweglichkeit beurteilt. Die Klassifikation der Motilität erfolgte durch Einteilung der Motilität (s.u.) in vier Kategorien:

- |       |  |
|-------|--|
| WHO a | 1. progressiv motile Spermatozoen in % ( $x \geq 25\mu\text{m/s}$ , entspricht ca. 5 Kopflängen) |
| WHO b | 2. mäßig motile Spermatozoen in % ( $5\mu\text{m/s} \leq x < 25\mu\text{m/s}$ )                  |
| WHO c | 3. lokal motile Spermatozoen in % ( $x < 5\mu\text{m/s}$ )                                       |
| WHO d | 4. immotile Spermatozoen in %  |

Hierzu sollten mindestens 200 Spermatozoen beurteilt werden.

#### **2.4.2.2 CASA (Computer-assistierte Samenanalyse)**

Zur Anwendung kam der Strömberg-Mika Cell Motion Analyser (Strömberg-Mika, Bad Fellnbach, Deutschland).

##### **2.4.2.2.1 Durchführung der Messung**

In eine auf 37°C temperierte Makler-Kammer (Strömberg-Mika, Bad Fellnbach, Deutschland) wurden 10 µl der zu untersuchenden Probe eingebracht. Nach Platzieren und Fokussieren der Kammer auf dem Mikroskoptisch wurden willkürlich Kamerafelder gewählt und ausgewertet. Die Analyse wurde bis zu einer Mindestzellzahl von 100 Spermatozoen fortgesetzt (Geräteeinstellung siehe 2.7.1.1.).

## **2.5 Konservierungs- und Auftauvorgang**

### **2.5.1 Kryokonservierung der Ejakulate**

Jeweils zu einer Fraktion von 200 µl nativem Ejakulat wurden 200 µl Kryoprotektivum Steritec L (SteriPharm, Berlin, Deutschland, s.u.) gegeben. Die so erhaltenen Portionen wurden in 1,8 ml Nunc Inter Med Tubes (Intermed, Roskilde, Dänemark) eingebracht. Unter Verwendung des



Gerätes Nicoool LM 100 (CFPO, Frankreich) erfolgte zuerst eine Abkühlung in Stickstoffdampf für 40 Minuten und die anschließende Einlagerung in flüssigem Stickstoff.

Zusammensetzung Steritec L (lyophilisiert): Natriumchlorid 5,800g/l, Kaliumchlorid 0,400 g/l, Kalziumchlorid 0,400 g/l, Magnesiumchlorid 0,100 g/l, Natriumlaktat 1,441 g/l, Natriumdihydrogenphosphat 0,050 g/l, Natriumbikarbonat 2,600 g/l, Hepes 4,766 g/l, Saccharose 17,180 g/l, Glyzin 10,000 g/l, Glukose 1,000 g/l, Glyzerin 185,000 g/l, Kanamycinsulfat 0,050g/l, Humanserumalbumin (sabilisatorfrei) 4000 g/l, Kallikrein 20,000 E.

### **2.5.2 Lagerung**

Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Die Proben wurden nach frühestens sieben Tagen wieder aufgetaut.

### **2.5.3 Auftauvorgang**

Zum Auftauen wurden die befüllten Tubes eines Spenders bei  $37^{\circ}\text{C}$  für jeweils 5 Minuten im Inkubator erwärmt.

## **2.6 Stimulationsprotokoll**

### **2.6.1 Pentoxifyllin und verwendete Chemikalien**

Es wurden 10.5 mg Pentoxifyllin in 500  $\mu\text{l}$  HTFM (Human Tubular Fluid Medium) (Quinn et al., 1985) in Lösung gebracht, aliquotiert und zu Portionen von 30  $\mu\text{l}$  eingefroren.

Erstellung von HTFM-Medium:

101.60 mM NaCl, 4.69 mM KCl, 2.04 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.20 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.37 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.78 mM Glucose (wasserfr.), 0.33 mM Na-Pyruvat, 21.40 mM Na-Lactat (60% Syr), 20 mM HEPES, 0.005 g/l Phenolrot, 0.06 g/l Penecillin, 0.05 g/l Streptomycinsulfat. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer OM 801 (Vogel, Gießen) auf 280 mOsmol/kg eingestellt und 10 mg/ml humanes Serumalbumin hinzugefügt.

## Verwendete Chemikalien:

Substanz	Art. Nr.	Mol-Gew.	Grad	Firma
Na Cl	6.400	58.44	P.A.	MERCK
K Cl	4.933	147.02	P.A.	MERCK
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2.382			MERCK
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	5.886	246.48		MERCK
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.101	338.38		MERCK
Phenolrot	7.241	354.38	F.W.	MERCK
NAHCO <sub>3</sub>	6.329	84.01	P.A.	MERCK
GLUCOSE;WASSFR.	8.337	180.16	F.B.Z.	MERCK
NA PYRUVAT	15.220	110.0	R.K.	SERVA
NA LACTAT 60% SYRUP	4.263	112.1	F.W.	SIGMA
PENICILLIN G	P-3032	356.4	F.W.	SIGMA
STREPTOMYCINSULFAT	5.711	1457.7		CALBIO-CHEM
HEPES	H9136	238.3	F.W.	SIGMA
HUMAN ABLBUMIN	ORHA 20/21		P.A.	BEHRING
GLUTARALDEHYD	820.603	100.12	Z.S.	MERCK
TRYPANBLAU 37%	T-6146	960.8	F.W.	SIGMA
BISMARCKBRAUN 55%	B-2759	419.3	F.W.	SIGMA
BENGALROSA 90%	R-3877	1017.6	F.W.	SIGMA
PENTOXIFYLLIN	P-1784	278.3	F.W.	SIGMA

### 2.6.2 Stimulation vor Kryokonservierung

Direkt vor der Kryokonservierung wurden zu einem Gemisch aus 200 µl Ejakulat und 200 µl Kryoprotektivum 20 µl gelöstes Pentoxifyllin gegeben. Die Endkonzentration betrug 1 mg/ml (3,6 mmol/ml) Pentoxifyllin in der Probe.

### 2.6.3 Stimulation nach dem Auftauen

Nach dem Auftauen, direkt nach Entnahme der Probe aus dem Inkubator, wurde das Gemisch aus Ejakulat und Kryoprotektivum in zwei Portionen zu 200 µl gesplittet. Die eine Fraktion wurde der Analyse zugeführt. Der anderen Fraktion wurden 10 µl der Pentoxifyllinlösung zugefügt, so dass sich eine Endkonzentration von 1 mg/ml ergab.

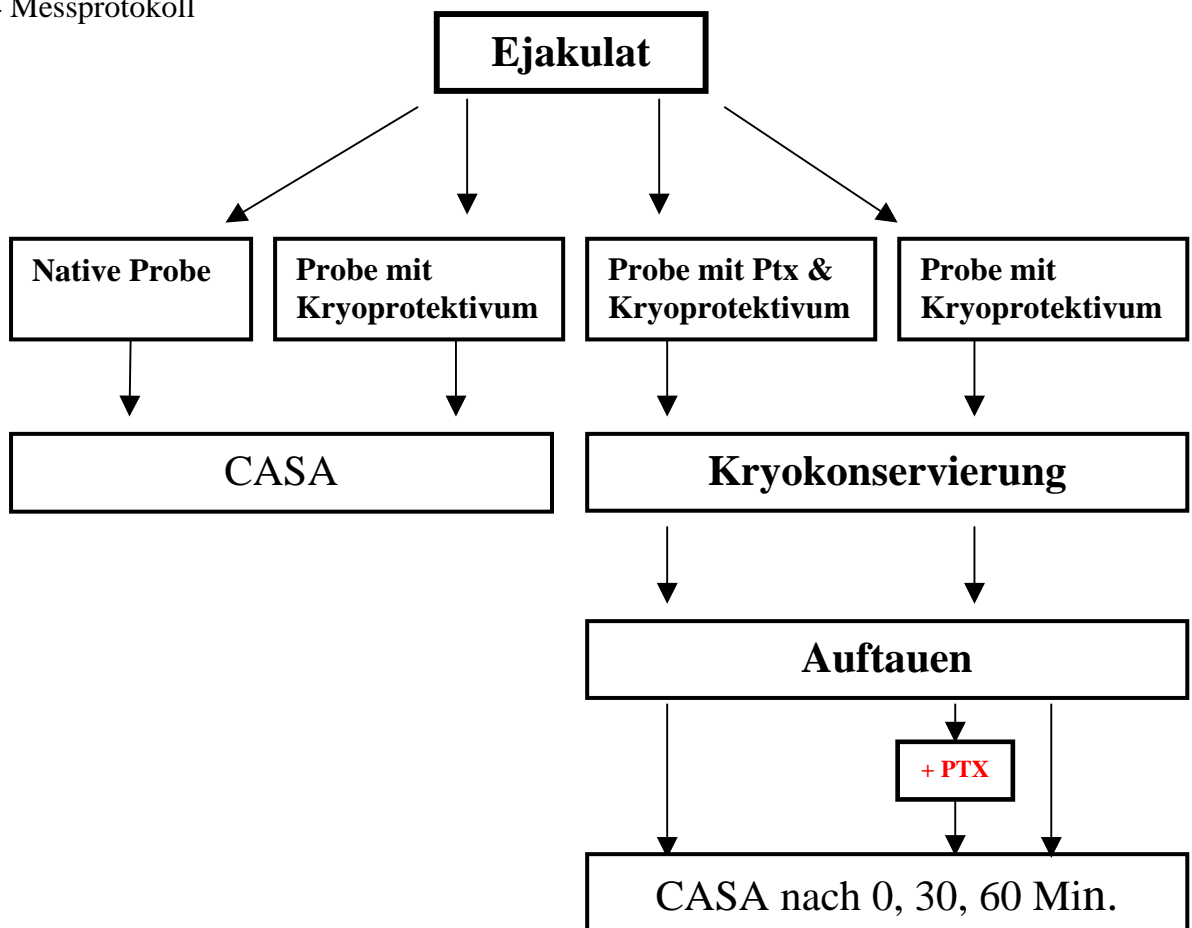
### 2.6.4 Messprotokoll

Vor der Kryokonservierung wurden 10 µl des nativen Ejakulates sowie 10 µl des Gemisches aus Ejakulat und Kryoprotektivum mit dem Strömberg-Mika Cell Motion Analyser (CASA) analysiert. Nach Kryokonservierung und Auftauen (s. 2.5) wurden folgende Gruppen untersucht (Abb.4):

- Ejakulat mit Kryoprotektivum, ohne Pentoxifyllin.
- Ejakulat mit Kryoprotektivum, mit Pentoxifyllin vor der Konservierung zugegeben.
- Ejakulat mit Kryoprotektivum, mit Pentoxifyllin nach dem Auftauvorgang zugegeben.

Die Messungen der jeweiligen Probe fanden direkt, 30 Minuten und 60 Minuten nach dem Auftauvorgang statt.

Abb. 4 Messprotokoll



## **2.7 Meßparameter**

### **2.7.1 CASA**

#### **2.7.1.1 Geräteeinstellungen**

Die Messungen erfolgte unter folgender Geräteeinstellung:

- \* Frmax: 30
- \* Frmin: 15
- \* Time (ms): 20
- \* Areamin (pix): 35
- \* Areamax (pix): 350
- \* Imo ( $\mu\text{m/s}$ ): 5
- \* Loc ( $\mu\text{m/s}$ ): 15

Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Einstellungen verwendet. Durch die Werte werden Anzahl und Häufigkeit der Aufnahmen pro Messvorgang, In- und Exklusionsgröße der Objekte bei der Zellerkennung und die Geschwindigkeitsbereiche der Motilitätsgruppen definiert. Liegt die Geschwindigkeit unter  $5 \mu\text{m/s}$ , so wird die Zelle als immotil, unter  $15 \mu\text{m/s}$  als lokal motil gewertet. Zellen mit einer Geschwindigkeit über  $15 \mu\text{m/s}$  sind als motil klassifiziert.

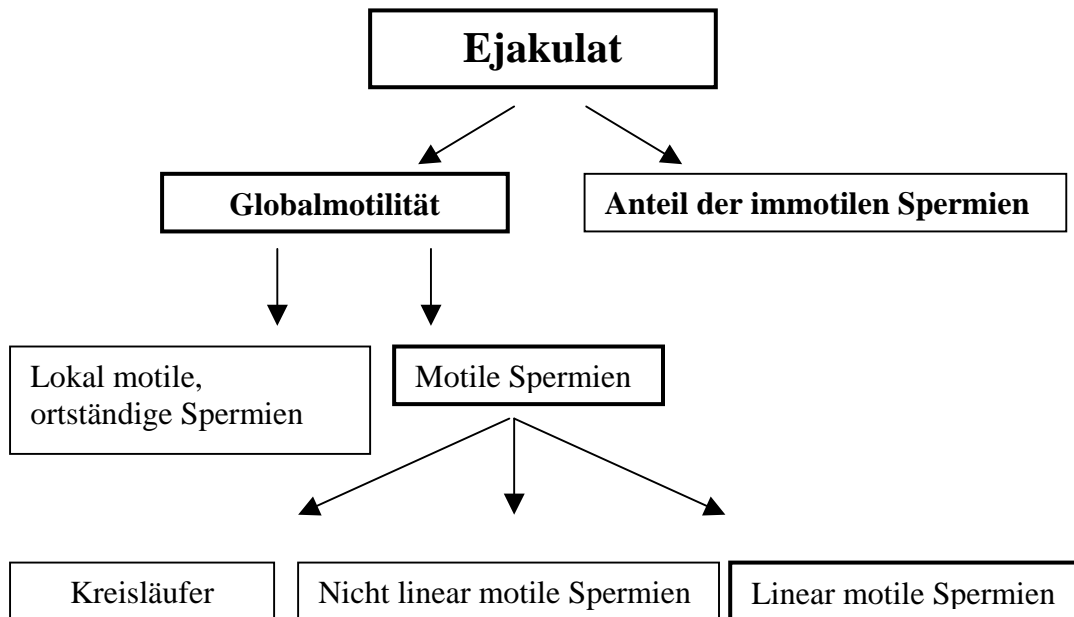
#### **2.7.1.2 Motilitätsparamter**

Es wurden Motilität und Geschwindigkeit mit ihren Untergruppierungen, sowie kinematische Parameter wie Linearität und lateraler Kopfausschlag (LHD) erfasst.

##### **2.7.1.2.1 Motilität**

Die Spermatozoen der gemessenen Probe können in immotile Spermatozoen und motile Spermatozoen (Globalmotilität) unterteilt werden. Die Globalmotilität stellt die Summe der lokal motilen und der motilen Spermatozoen dar. Als Untergruppe der motilen Spermatozoen wurden Kreisläufer, nicht linear motile Spermatozoen und linear (progressiv) motile Spermatozoen erfasst (Abb. 5). Der Anteil wurde in % angegeben, bezogen auf die motilen Spermatozoen.

Abb.5 Differenzierung der Motilität der Spermatozoen



#### 2.7.1.2.2 Geschwindigkeiten

Die Geschwindigkeit der motilen Spermatozoen und deren Gruppierungen (Kreisläufer, nicht linear motile Spermatozoen und linear motile Spermatozoen) kann über verschiedene Wege definiert werden. Sie lässt sich in die drei Geschwindigkeiten VSL, VCL und VAP unterteilen. Die Geschwindigkeit wird in  $\mu\text{m/s}$  angegeben.

##### 2.7.1.2.2.1 VSL

Die VSL (straight line velocity) ist die Geschwindigkeit des Spermienkopfes über eine vom Start- bis zum Endpunkt gelegte direkte Linie (Abb.6). Sie wird als Progressivgeschwindigkeit bezeichnet.

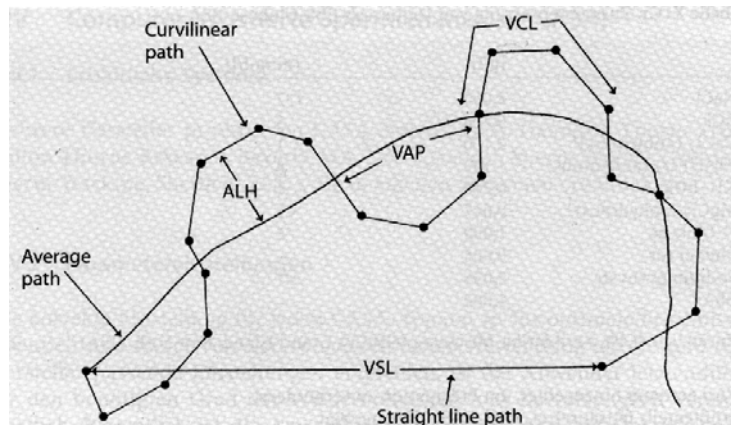
##### 2.7.1.2.2.2 VCL

Die VCL (curvilinear velocity) ist die Spurgeschwindigkeit (Abb.6). Sie stellt die mittlere Geschwindigkeit des Spermienkopfes über den tatsächlich zurückgelegten Weg dar.

### 2.7.1.2.2.3 VAP

Die VAP (average path velocity) gibt die Geschwindigkeit über die approximierte Strecke an (Abb.6). Die Strecke wird algorithmisch berechnet und stellt die mittlere zurückgelegte räumliche Bahn dar. Sie wird als Pfadgeschwindigkeit bezeichnet.

Abb.6 Darstellung von VCL, VSL und VAP



### 2.7.1.2.3 Bewegungscharakteristika

#### 2.7.1.2.3.1 Linearität

Die Linearität gibt die Geradlinigkeit oder auch Gestrecktheit der Bewegung an. Sie ist definiert als:  $VSL/VCL$ . Die Linearität ist dimensionslos. Der Wert  $x$  gegen 0 würde einer Kreisbewegung,  $x = 1$  dem direkten Weg entsprechen.

#### 2.7.1.2.3.2 LHD/ALH

Der Kopfausschlag wird zum momentanen Bewegungsvektor betrachtet und als Abweichung von diesem erfasst. Das LHD (lateral head displacement) oder ALH (amplitude of lateral head displacement) gibt die seitliche Auslenkung des Spermienkopfes an. Es wird vom mittleren Pfad aus berechnet und in  $\mu\text{m}$  angegeben.

## **2.8 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte unter Betreuung und Beratung durch Herrn Wolfgang Pabst, Medizinische Informatik, Institut für Statistik der JLU-Gießen.

### **2.8.1 Vergleichene Gruppen und Werte**

Es wurden die statistischen Signifikanzen jeweils in den Gruppen mit Normozoospermie (62 Patienten) und mit Oligozoospermie (21 Patienten) erfasst.

Dabei wurde der Vergleich zwischen den nicht stimulierten Proben, den mit 1 mg/ml (3,6 mmol/ml) Pentoxifyllin vor dem Einfrieren stimulierten und den nach dem Auftauen stimulierten Proben erhoben. Um den zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurden innerhalb dieser drei Gruppen die Werte direkt, 30 und 60 Minuten nach dem Auftauen miteinander verglichen.

Zur Anwendung kam der Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test. Verglichen wurde über Ränge.

### **2.8.2 Signifikanzniveau**

Ein Unterschied wurde mit  $p < 0.05$  als niedrig, mit  $p < 0.01$  als signifikant und mit  $p < 0.001$  als hoch signifikant bewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Pentoxifyllin auf einzelne Parameter bei Stimulation von Spermatozoen bei Normozoospermie

##### 3.1.1 Globalmotilität bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$  : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$  : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

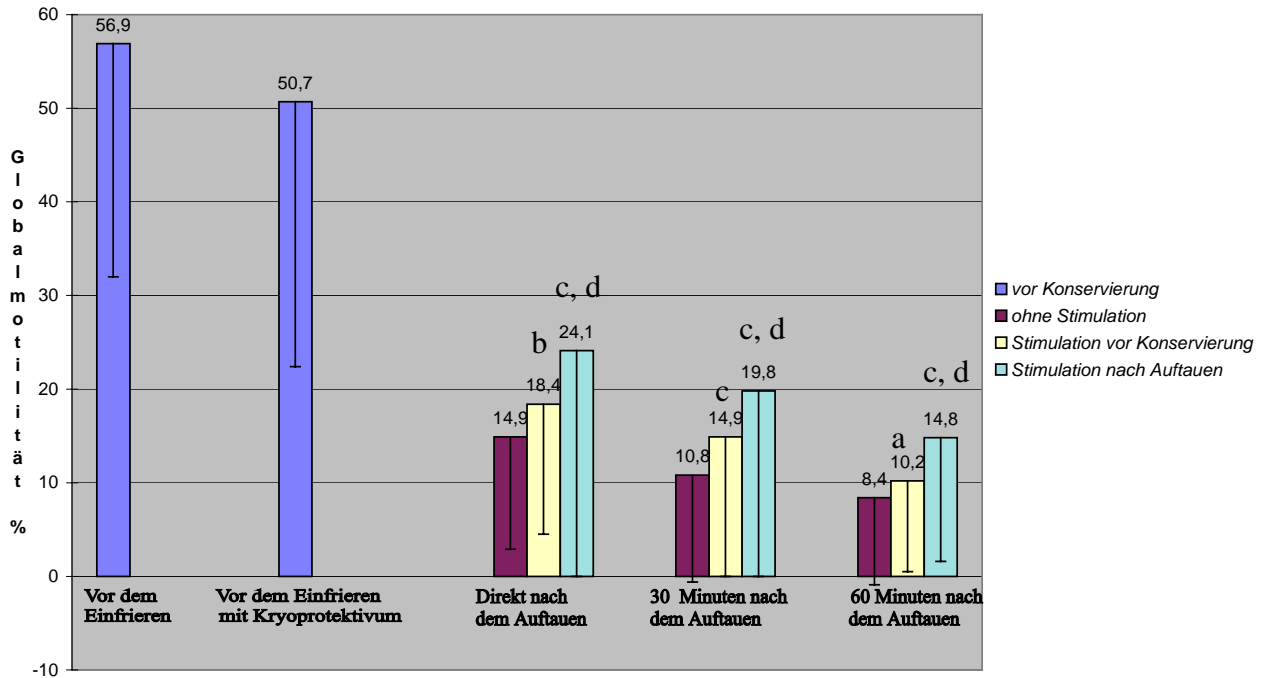
Zeitpunkt  $t_3$  : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die Globalmotilität ist die Summe aller Motilitäten, welche in einer Probe erfasst werden können. Die durchschnittliche Globalmotilität der nativen Proben betrug 56.9% (Abb. 7). Nach Zugabe des Kryoprotektivums fiel diese auf 50.7%. In Gruppe A ergab sich direkt nach dem Auftauvorgang eine Globalmotilität von 15.0%, 30 Minuten danach 10.8% und nach 60 Minuten 8.4%. In Gruppe B wurde zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen 18.4% ( $p = 0.002^*$ ), 30 Minuten später 14.9% ( $p = 0.0001^*$ ) und nach einer Stunde 10.2% ( $p = 0.0229^*$ ) gemessen. Im Vergleich mit Gruppe A lagen die zu allen drei Zeitpunkten erfassten Werte durchschnittlich höher. Zu  $t_1$  war der Unterschied signifikant, zu  $t_2$  hoch und zu  $t_3$  niedrig signifikant. In Gruppe C waren die Messergebnisse zu  $t_1$  24.1% ( $p < 0.0001^*$ ), zu  $t_2$  19.8% ( $p < 0.0001^*$ ) und zu  $t_3$  14.8% ( $p < 0.0001^*$ ). Die Differenz zu der nicht stimulierten Gruppe A war zu jedem Zeitpunkt hoch signifikant. Erfolgte die Stimulation der Probe vor der Kryokonservierung, so fanden sich zu den drei Zeitpunkten direkt nach Auftauen, 30 Minuten und 60 Minuten durchschnittlich niedrigere Werte als bei Stimulation nach dem Auftauvorgang. Die sich ergebende Differenz war für  $t_1 - t_3$  jeweils hoch signifikant ( $p < 0.0001$ ).



Abb. 7 Stimulation der Globalmotilität bei Normozoospermie (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

d  $p < 0.001$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.2 Motilität bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$  : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$  : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

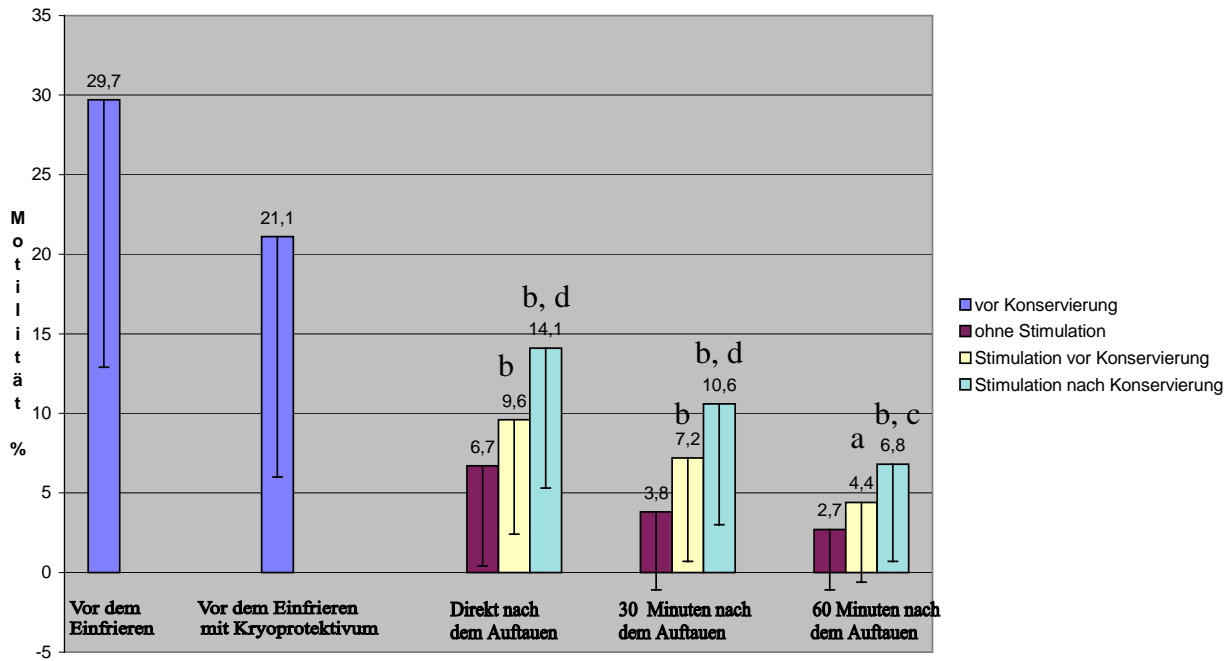
Zeitpunkt  $t_3$  : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die Motilität gibt den Anteil der nicht lokal motilen Spermatozoen wieder.

Die durchschnittliche Motilität der nativen Proben ergab 29.7%, mit zugegebenem Kryoprotektivum 21.2% (Abb. 8). In Gruppe A betrug der durchschnittliche Wert direkt nach dem Auftauvorgang 6.7%, nach 30 Minuten 3.7% und 2.6% nach 60 Minuten. In Gruppe B lagen die Messungen zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen bei 9.6% ( $p < 0.0001^*$ ) und nach 30 Minuten bei 7.2% ( $p < 0.0001^*$ ). Die Differenz der Durchschnittswerte zur nicht stimulierten Gruppe A war hoch signifikant. Nach einer Stunde fand sich eine Motilität von 4.4% ( $p = 0.006$ ), der Unterschied zu A war signifikant. Zu den jeweiligen Zeitpunkten  $t_1 - t_3$  für Gruppe C ergaben sich 14.1% ( $p < 0.0001^*$ ), 10.6% ( $p < 0.0001^*$ ) und 6.8% ( $p < 0.0001^*$ ). Die durchschnittliche Motilität war höher als in Gruppe A und jeweils in der Differenz hoch signifikant unterschiedlich. Im Vergleich von Gruppe B mit Gruppe C war nach dem Auftauen und 30 Minuten später der Unterschied mit  $p < 0.0001$  hoch signifikant, nach 60 Minuten mit  $p = 0.0089$  signifikant.

Abb. 8 Stimulation der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

d  $p < 0.001$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.3 Linear motile Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der linearen Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

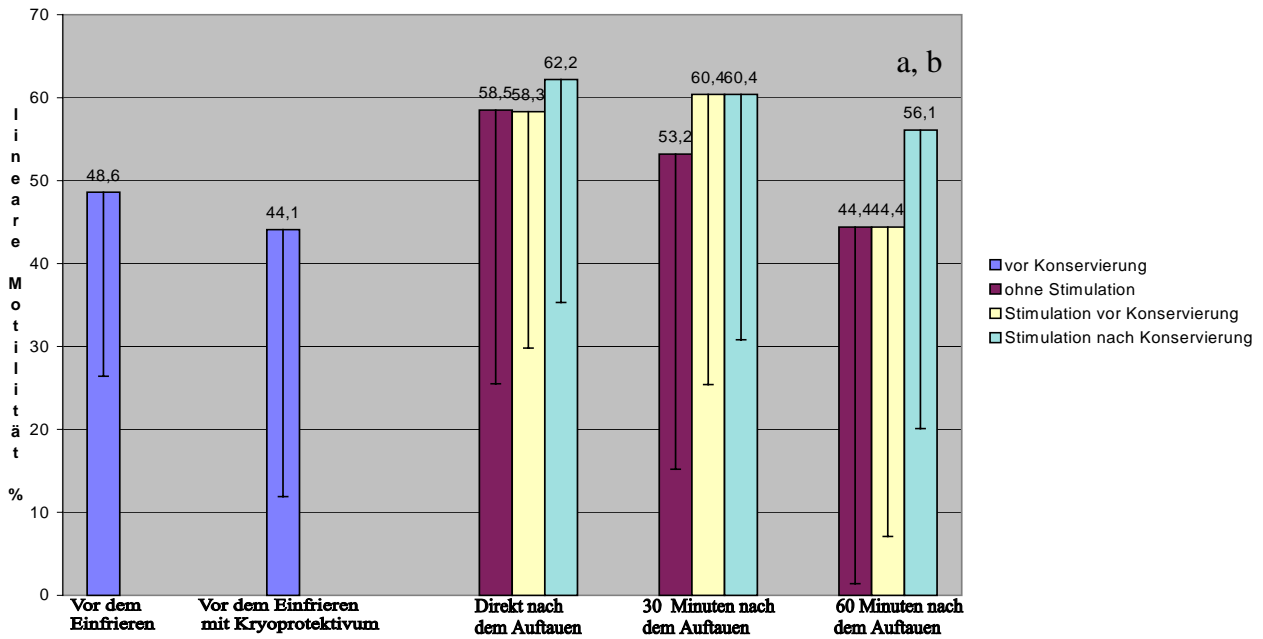
Der Anteil der linear motilen Spermatozoen entspricht dem Anteil progressiv motiler Spermatozoen.

In der nativen Probe betrug der Anteil der linear motilen Spermatozoen 48.6% (Abb. 9). Nach Zugabe des Kryoprotektivums sank er auf 44.1%. Zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen wurden in Gruppe A 58.3%, nach 30 Minuten 53.2% und nach einer Stunde 44.4% ermittelt. Für Gruppe B ergaben sich direkt nach dem Auftauen 58.3% ( $p = 0.4972^*$ ), nach 30 Minuten 60.4% ( $p = 0.0568^*$ ) und nach einer Stunde 44.4% ( $p = 0.2039^*$ ). Im Vergleich mit Gruppe A waren zu allen drei Zeitpunkte die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich.

In Gruppe C lagen die Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten bei 62.2% ( $p = 0.3171^*$ ), nach 30 Minuten bei 60.4% ( $p = 0.1486^*$ ) und nach 60 Minuten bei 56.1% ( $p = 0.0048^*$ ). Die durchschnittlichen Werte lagen höher als in Gruppe A zum entsprechenden Messpunkt. Lediglich zu  $t_3$  war der Unterschied signifikant.

Zum Zeitpunkt  $t_1$ , nach dem Auftauen, lag der Wert der nach Auftauen stimulierten Gruppe C um 3.9% höher als der Wert der vorab stimulierten Gruppe B. Der errechnete Unterschied war mit  $p = 0.078$  nicht signifikant. Nach 30 Minuten ergaben sich jeweils ähnliche Werte ohne signifikante Differenz ( $p = 0.5931$ ). Die Differenz von 12.1% nach 60 Minuten war mit  $p = 0.0089$  signifikant.

Abb. 9 Stimulation der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.4 Linearität bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der Linearität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

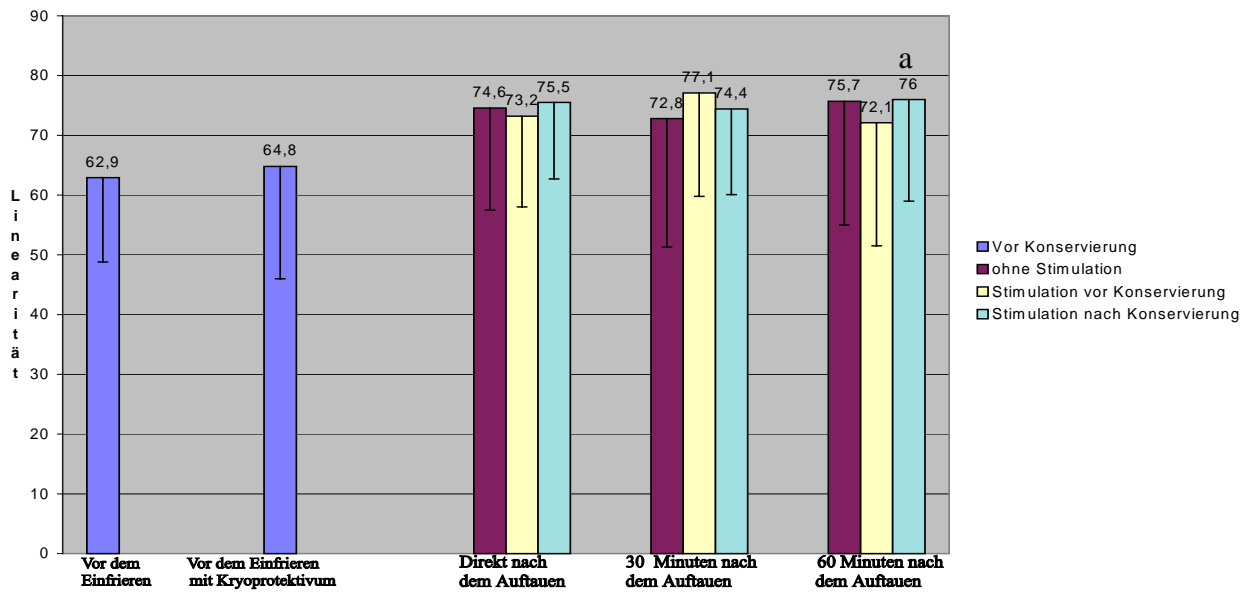
Die Linearität gibt die Geradlinigkeit einer Bewegung an.

Die Linearität der nativen Proben errechnete sich zu 62.9, nach Zugabe des Kryoprotektivums zu 64.7 (Abb. 10). In Gruppe A ergaben sich direkt nach dem Auftauvorgang 74.6, nach 30 Minuten 72.8 und nach einer Stunde 75.7. Bei Gruppe B betrug die Linearität in der Messung nach dem Auftauen 73.2 ( $p = 0.4212^*$ ), nach 30 Minuten 77.1 ( $p = 0.3463^*$ ) und nach 60 Minuten 72.1 ( $p = 0.3449^*$ ). Zu allen drei Messpunkten war der Unterschied nicht signifikant zu Gruppe A.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten  $t_1$  bis  $t_3$  erhielt man für Gruppe C 75.5 ( $p = 0.1819^*$ ), 74.4 ( $p = 0.7239^*$ ) und 76 ( $p = 0.3058^*$ ). Auch für Gruppe C war vergleichend mit Gruppe A kein Ergebnis signifikant unterschiedlich.

Für Gruppe B und C war der Unterschied zu  $t_1$  ( $p = 0.0774$ ) und zu  $t_2$  ( $p = 0.5030$ ) nicht, zu  $t_3$  ( $p = 0.0276$ ) niedrig signifikant.

Abb. 10 Stimulation der Linearität bei Normozoospermie (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.5 LHD (lateral head displacement) bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit dem LHD der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Das LHD gibt den lateralen Kopfausschlag in  $\mu\text{m}$  zum momentanen Bewegungsvektor an.

In der nativen Probe betrug das LHD  $20.9 \mu\text{m}$ , nach Zugabe des Protektivums  $21.3 \mu\text{m}$  (Abb. 11).

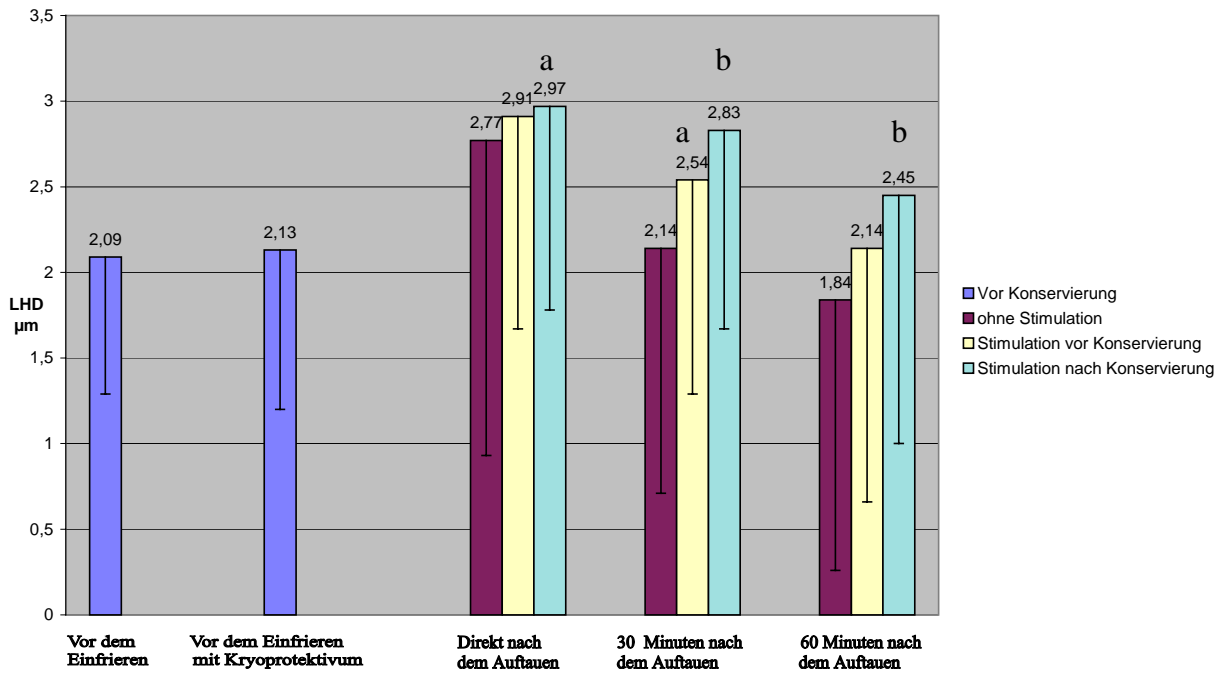
Direkt nach dem Auftauvorgang wurden in der nicht stimulierten Probe  $27.5 \mu\text{m}$ , nach 30 Minuten  $21.4 \mu\text{m}$  und nach einer Stunde  $18.4 \mu\text{m}$  gemessen. In Gruppe B ergaben die gemessenen Werte  $29.0 \mu\text{m}$  ( $p = 0.1223^*$ ), nach 30 Minuten  $25.4 \mu\text{m}$  ( $p = 0.0142^*$ ) und nach 60 Minuten  $21.4 \mu\text{m}$  ( $p = 0.095^*$ ). Vergleicht man die Werte mit den in Gruppe A ermittelten Werten, so war der Unterschied zum Zeitpunkt  $t_2$  niedrig signifikant.

Erfolgte die Stimulation nach dem Auftauvorgang, ergab das LDH direkt nach Zugabe von Ptx  $29.7 \mu\text{m}$  ( $p = 0.0164^*$ ), nach 30 Minuten  $28.3 \mu\text{m}$  ( $p = 0.0006^*$ ) und nach einer Stunde  $24.5 \mu\text{m}$  ( $p = 0.0007^*$ ). Im Vergleich zu Gruppe A fand sich nach 30 und 60 Minuten eine hoch signifikante Differenz. Direkt nach dem Auftauen war diese niedrig signifikant.

Betrachtet man den Unterschied zwischen der Stimulation vor und nach Kryokonservierung, so ergibt sich für die Zeitpunkte  $t_1$  ( $p = 0.6717$ ),  $t_2$  ( $p = 0.192$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.1453$ ) kein signifikanter Unterschied.



Abb. 11 Stimulation des LHD bei Normozoospermie mit Pentoxifyllin (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

### 3.1.6 VAP der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

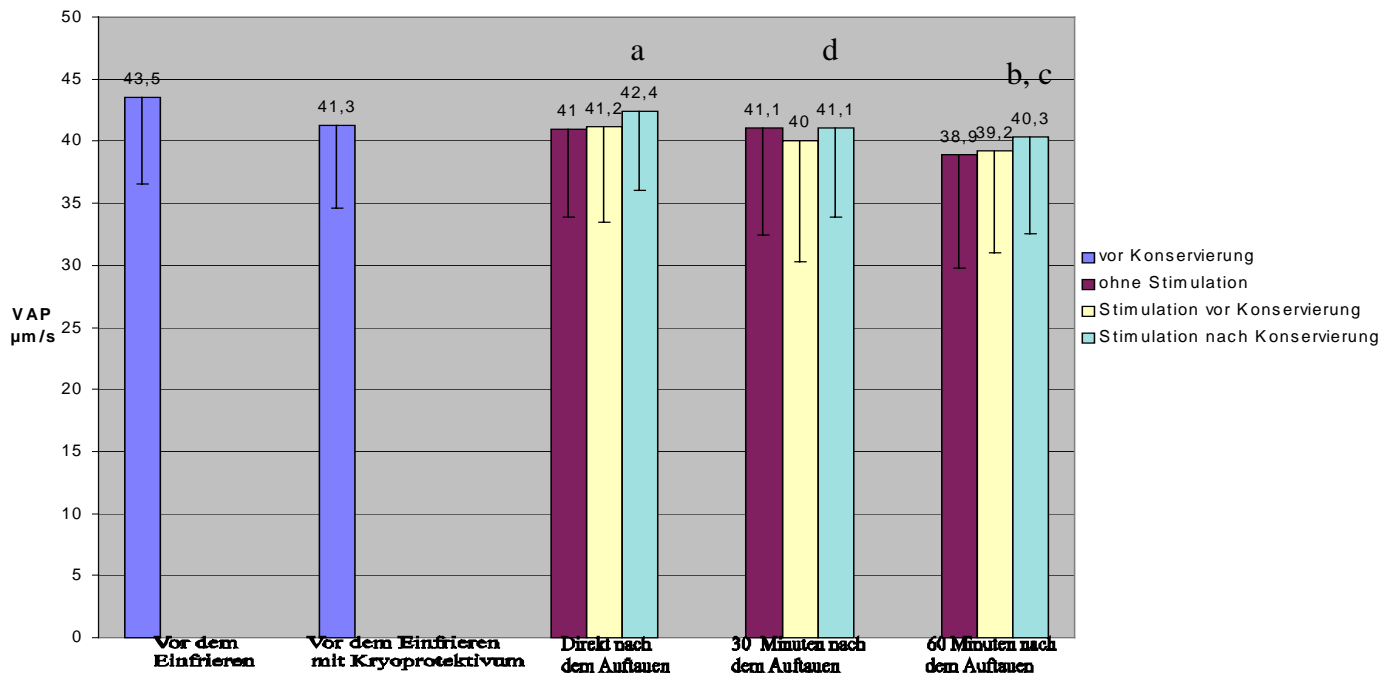
\*: verglichen mit der VAP der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die VAP (average path velocity) gibt die Geschwindigkeit über den approximierten Weg an.

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe nahm der Durchschnittswert der gemessenen VAP der motilen Spermatozoen von 43.5  $\mu\text{m/s}$  auf 41.3  $\mu\text{m/s}$  ab (Abb. 12). Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die Geschwindigkeit bei den nicht stimulierten Proben 41.0  $\mu\text{m/s}$ , in der Messung 30 Minuten später 41.1  $\mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten 38.9  $\mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben ergaben direkt nach dem Auftauen 41.1  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1961^*$ ), 30 Minuten später 40  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0547^*$ ) und nach einer Stunde 39.2  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0630^*$ ). Die Differenz zu Gruppe A war zu allen drei Zeitpunkten nicht signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung betrug der gemessene Wert zu  $t_1$  42.4  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0331^*$ ) und war zu Gruppe A niedrig signifikant unterschiedlich. Nach 30 Minuten betrug er 41.1  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.2888^*$ ) sowie nach 1 Stunde 40.3  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0006^*$ ). Im Vergleich der Gruppe B mit Gruppe C war der Unterschied der ermittelten Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t_1$  nicht signifikant ( $p = 0.3142$ ), zu  $t_2$  signifikant ( $p = 0.0092$ ) und zu  $t_3$  niedrig signifikant ( $p = 0.0333$ ).

Abb. 12 Stimulation der VAP der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie mit Pentoxifyllin (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

d  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.7 VAP der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

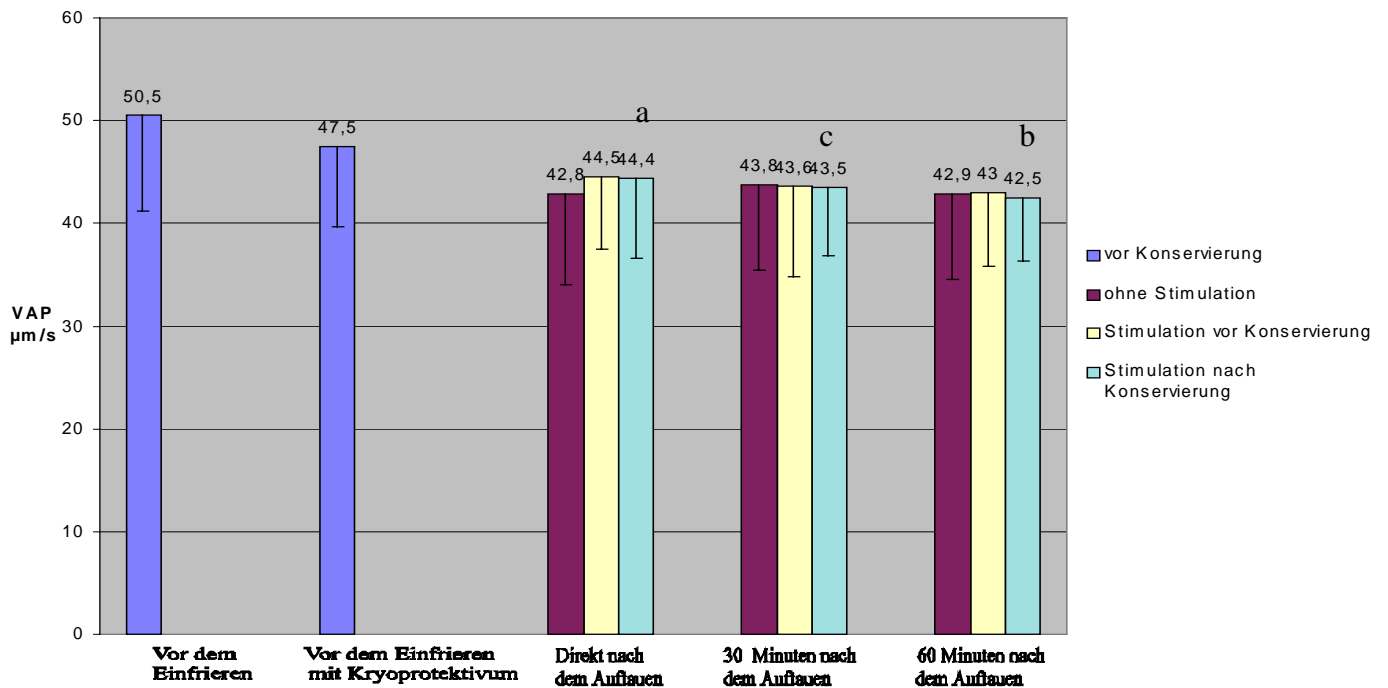
Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VAP der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe nahm der Durchschnittswert der VAP der linear motilen Spermatozoen von 50.5  $\mu\text{m/s}$  auf 47.5  $\mu\text{m/s}$  ab (Abb. 13). Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die Geschwindigkeit bei den nicht stimulierten Proben 42.8  $\mu\text{m/s}$ , in der Messung 30 Minuten später 43.8  $\mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten 42.9  $\mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben ergaben direkt nach dem Auftauen 44.5  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.3082^*$ ), 30 Minuten später 43.6  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1905^*$ ) und nach einer Stunde 43.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1462^*$ ). Die Differenz zu Gruppe A war zu allen drei Zeitpunkten nicht signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung betrug der Wert zu  $t_1$  44.4  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0449^*$ ) und war zu Gruppe A niedrig signifikant unterschiedlich. Nach 30 Minuten betrug er 43.5  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.5481^*$ ) sowie nach 1 Stunde 42.5  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0015^*$ ). Für  $t_2$  war der Unterschied nicht, für  $t_3$  war er signifikant. Im Vergleich der Gruppe B mit Gruppe C war der Unterschied der ermittelten Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t_1$  nicht signifikant ( $p = 0.4312$ ), zu  $t_2$  niedrig signifikant ( $p = 0.0224$ ) und zu  $t_3$  nicht signifikant ( $p = 0.1701$ ).

Abb. 13 Stimulation der VAP der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie  
(n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.8 VCL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

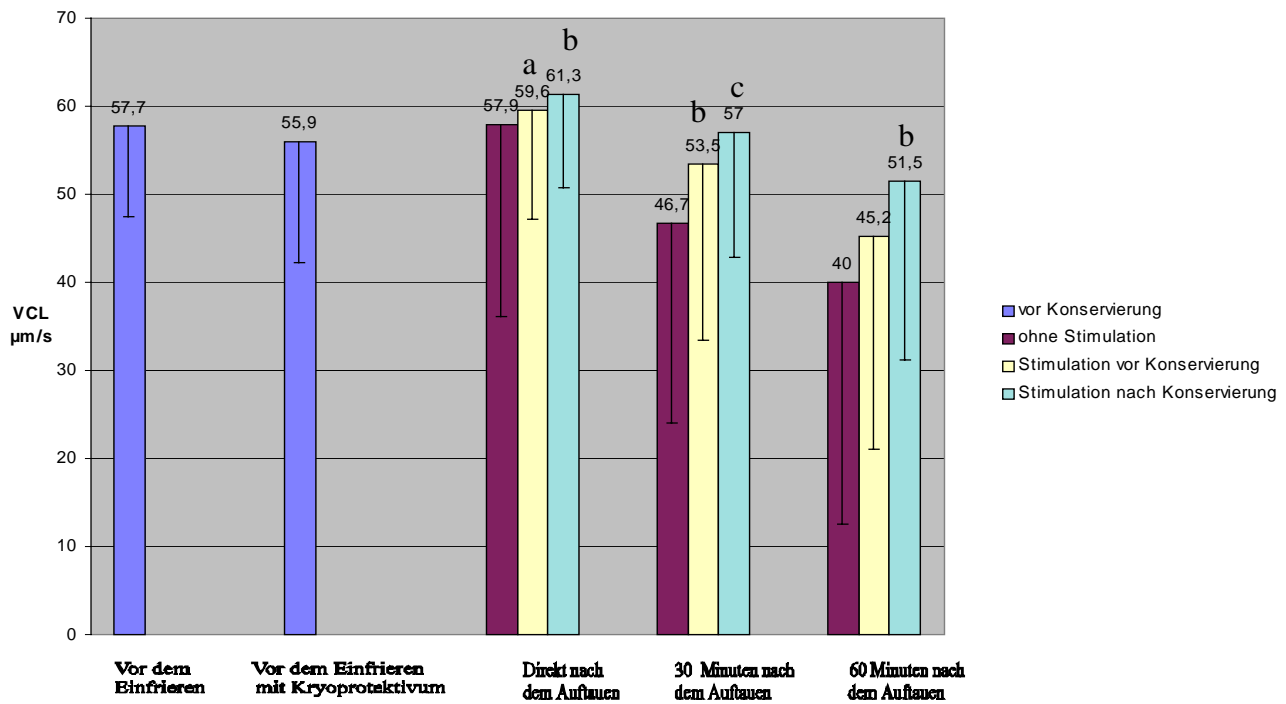
Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VCL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die VCL (curvilinear velocity) gibt die Geschwindigkeit über den realen zurückgelegten Weg an. Der Durchschnittswert der VCL der nativen Probe betrug  $57.7 \mu\text{m/s}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums  $55.9 \mu\text{m/s}$  (Abb. 14). Direkt nach dem Auftauvorgang wurden für die nicht stimulierte Gruppe A die Geschwindigkeit  $57.9 \mu\text{m/s}$ , zu  $t_2$   $46.7 \mu\text{m/s}$  und zu  $t_3$   $40.0 \mu\text{m/s}$  gemessen. Für die vor Konservierung stimulierte Gruppe B ergab sich für die direkt nach dem Auftauen erfasste Geschwindigkeit  $59.6 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0471^*$ ). Nach 30 Minuten betrug sie  $53.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0022^*$ ) und nach 60 Minuten  $45.2 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1727^*$ ). Die Durchschnittswerte der Gruppe B waren zu allen drei Zeitpunkten höher als die der Gruppe A. Der Unterschied war zu  $t_1$  niedrig signifikant, zu  $t_2$  signifikant und zu  $t_3$  nicht signifikant im Vergleich zu Gruppe A. Bei Stimulation nach dem Auftauvorgang fiel die VCL der motilen Spermatozoen zu  $t_1$  von  $61.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0045^*$ ), über  $57.0 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0006^*$ ) zu  $t_2$ , auf  $51.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0011^*$ ) zu  $t_3$ . Im Vergleich zu Gruppe A waren die Werte zu allen Zeitpunkten durchschnittlich höher. Zu  $t_1$  und  $t_3$  waren sie signifikant, zu  $t_2$  hoch signifikant unterschiedlich. Im Vergleich von Gruppe B mit C waren die Unterschiede zu den drei Zeitpunkten  $t_1$  ( $p = 0.3631$ ),  $t_2$  ( $p = 0.4664$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.1005$ ) nicht signifikant.

Abb. 14 Stimulation der VCL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie  
(n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

### 3.1.9 VCL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

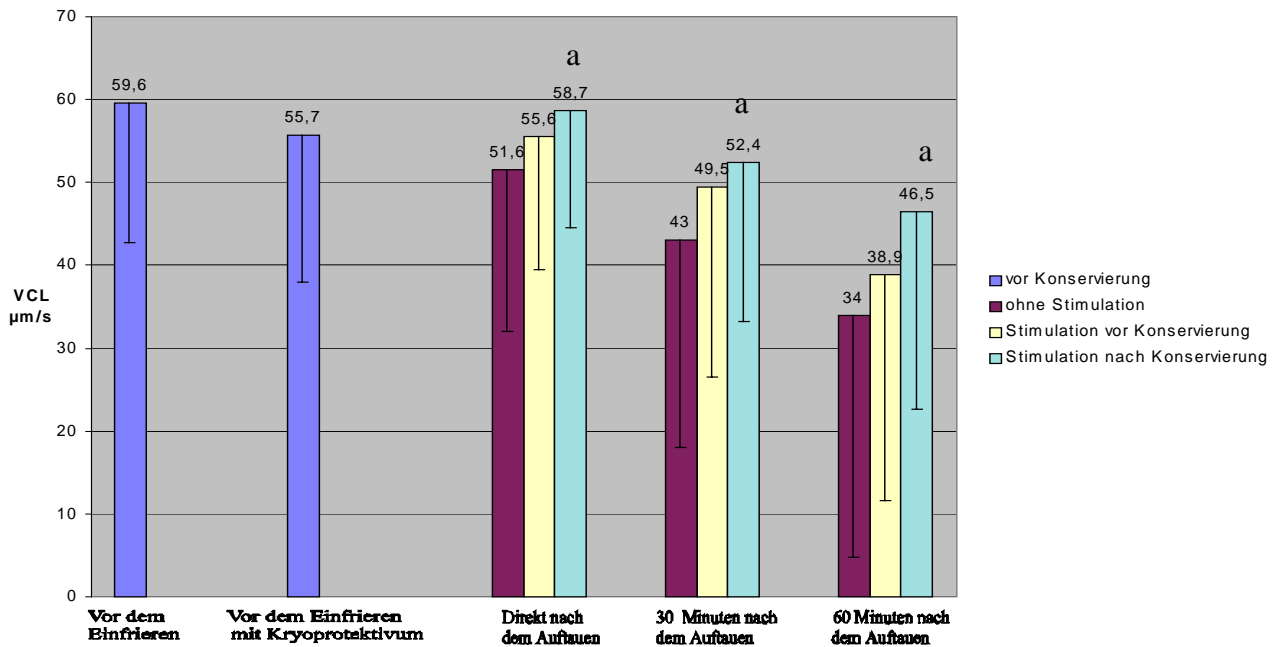
\*: verglichen mit der VCL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe nahm der Durchschnittswert der VCL von  $59.5 \mu\text{m/s}$  auf  $55.7 \mu\text{m/s}$  ab (Abb. 15). Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die ermittelte Geschwindigkeit bei den nicht stimulierten Proben  $51.6 \mu\text{m/s}$ , in der Messung 30 Minuten später  $43.0 \mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten  $34.0 \mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben der Gruppe B ergaben direkt nach dem Auftauen  $55.6 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1680^*$ ), auffolgend nach 30 Minuten  $49.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0551^*$ ) und nach einer Stunde  $38.9 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1809^*$ ). Durchschnittlich lagen die Werte höher als in Gruppe A. In keinem Fall jedoch erreichten diese ein unterschiedliches Signifikanzniveau.

In Gruppe C betragen die Geschwindigkeiten  $58.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0017^*$ ), nach 30 Minuten  $52.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0019^*$ ) und nach 1 Stunde  $46.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.002^*$ ). Der Unterschied der VCL der Gruppe C war in allen drei Fällen im Vergleich zu Gruppe A signifikant. Zum Zeitpunkt  $t_1$  ( $p = 0.3772$ ) ist der Unterschied der Gruppe B zu Gruppe C nicht, zu  $t_2$  ( $p = 0.3711$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.096$ ) ebenfalls nicht signifikant.



Abb. 15 Stimulation der VCL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie  
(n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.10 VSL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

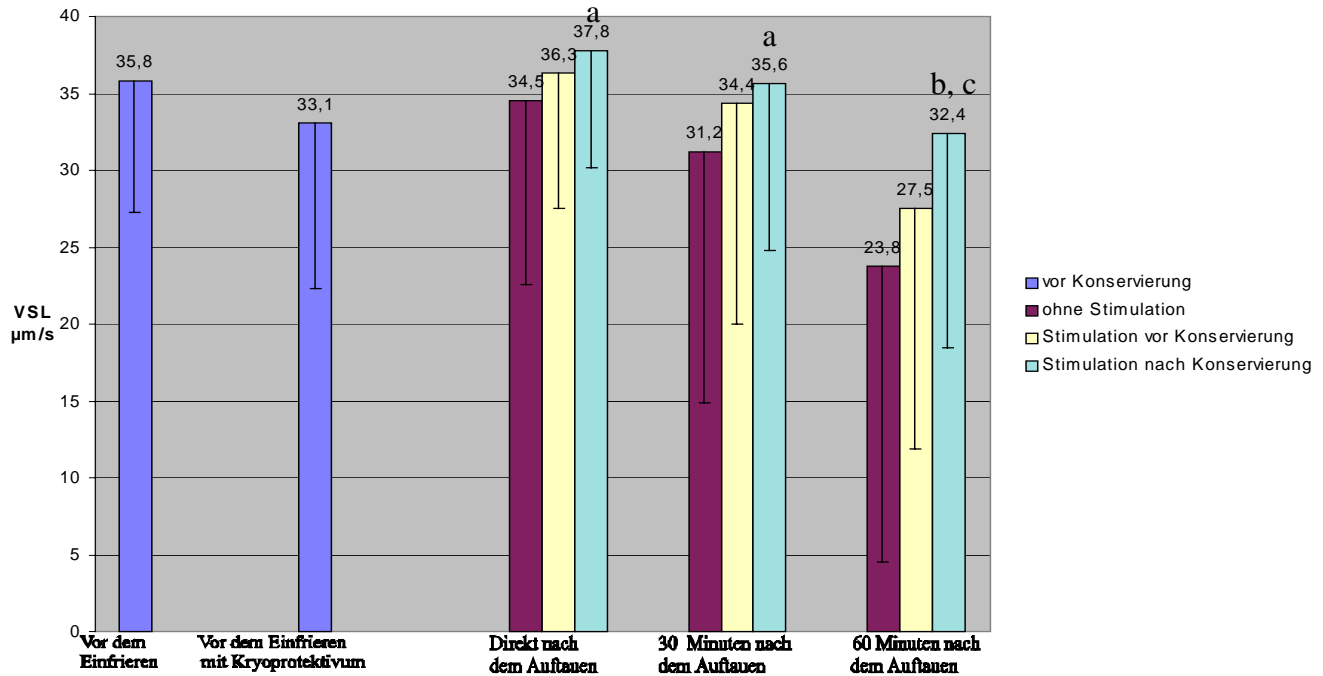
\*: verglichen mit der VSL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die VSL (straight line velocity) gibt die Geschwindigkeit über die kürzeste Distanz zwischen Anfangs- und Endpunkt der zurückgelegten Strecke an.

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe nahm der Durchschnittswert der VSL der motilen Spermatozoen von  $35.8 \mu\text{m/s}$  auf  $33.1 \mu\text{m/s}$  ab (Abb. 16). Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die Geschwindigkeit bei den nicht stimulierten Proben  $34.5 \mu\text{m/s}$ , in der Messung 30 Minuten später  $31.2 \mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten  $23.8 \mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben ergaben direkt nach dem Auftauen  $36.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.2904^*$ ), 30 Minuten später  $34.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0687^*$ ) und nach einer Stunde  $27.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0866^*$ ). Die Differenz zu Gruppe A war zu allen drei Zeitpunkten nicht signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung betrug der gemessene Wert zu  $t_1$   $37.8 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0345^*$ ) und war zu Gruppe A niedrig signifikant unterschiedlich. Nach 30 Minuten betrug er  $35.6 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0496^*$ ) sowie nach 1 Stunde  $32.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0006^*$ ). Für  $t_2$  war der Unterschied niedrig, für  $t_3$  hoch signifikant. Im Vergleich von Gruppe B mit Gruppe C war der Unterschied der Geschwindigkeit zu den Zeitpunkten  $t_1$  ( $p = 0.1471$ ) und  $t_2$  ( $p = 0.6506$ ) nicht signifikant. Zu  $t_3$  war er signifikant ( $p = 0.0055$ ).

Abb. 16 Stimulation der VSL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie  
(n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.1.11 VSL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$  : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$  : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

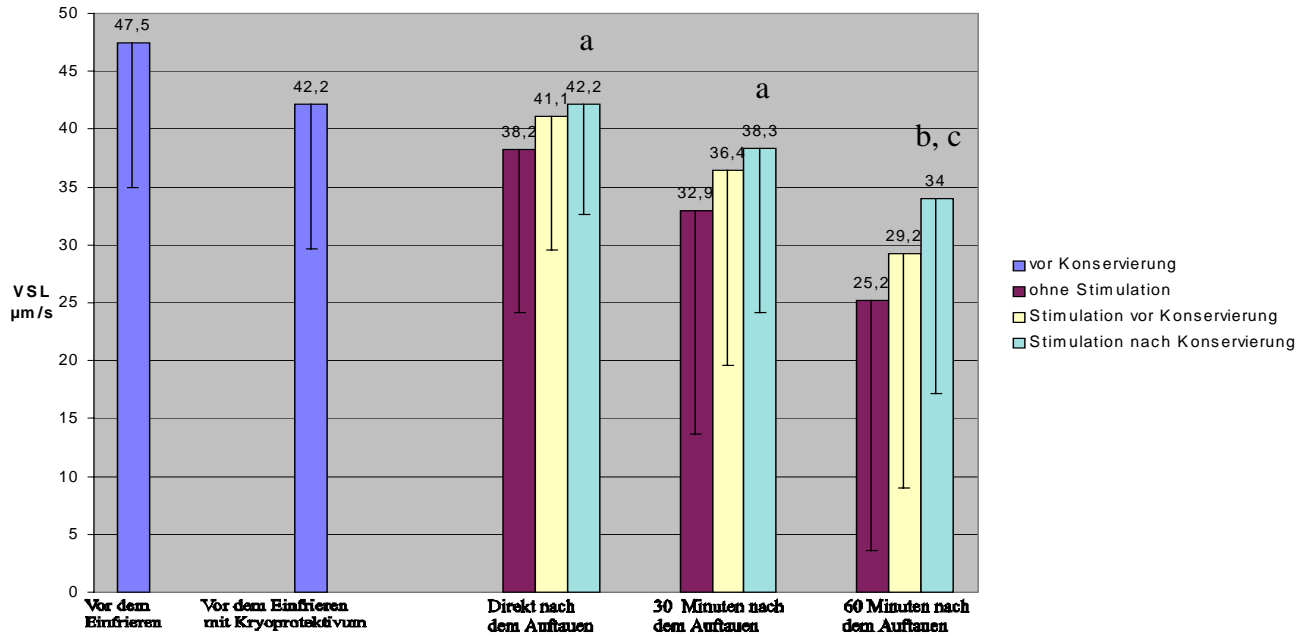
Zeitpunkt  $t_3$  : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VSL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Der Durchschnittswert der VSL der nativen Probe betrug  $47.4 \mu\text{m/s}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums  $42.2 \mu\text{m/s}$  (Abb. 17). Direkt nach dem Auftauvorgang wurden für die nicht stimulierte Gruppe A die Geschwindigkeiten  $38.2 \mu\text{m/s}$ , zu  $t_2$   $32.9 \mu\text{m/s}$  und zu  $t_3$   $25.2 \mu\text{m/s}$  gemessen. Für die vor Konservierung stimulierte Gruppe B ergaben sich für die direkt nach dem Auftauen erfasste Geschwindigkeit  $41.1 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.3222^*$ ), nach 30 Minuten  $36.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.2023^*$ ) und nach 60 Minuten  $29.2 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1538^*$ ). Die Durchschnittswerte waren zu allen drei Zeitpunkten höher, jedoch im Vergleich zu Gruppe A nicht signifikant unterschiedlich.

Bei Stimulation nach dem Auftauvorgang fiel die VSL der linear motilen Spermatozoen zu  $t_1$  von  $42.2 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0267^*$ ), über  $38.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0284^*$ ) zu  $t_2$ , auf  $34.0 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0019^*$ ) zu  $t_3$ . In Bezug zu Gruppe A waren die erfassten Werte zu allen Zeitpunkten durchschnittlich höher. Zu  $t_1$  und  $t_2$  waren sie niedrig, zu  $t_3$  signifikant unterschiedlich. Im Vergleich von Gruppe B und C waren die Unterschiede zu den drei Zeitpunkten für  $t_1$  ( $p = 0.3772$ ) und  $t_2$  ( $p = 0.6506$ ) nicht signifikant und zu  $t_3$  ( $p = 0.0055$ ) signifikant.

Abb. 17 Stimulation der VSL der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie mit Pentoxifyllin (n = 62 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

## 3.2 Einfluss von Pentoxifyllin auf einzelne Parameter bei Stimulation von Spermatozoen bei Oligozoospermie

### 3.2.1 Globalmotilität bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

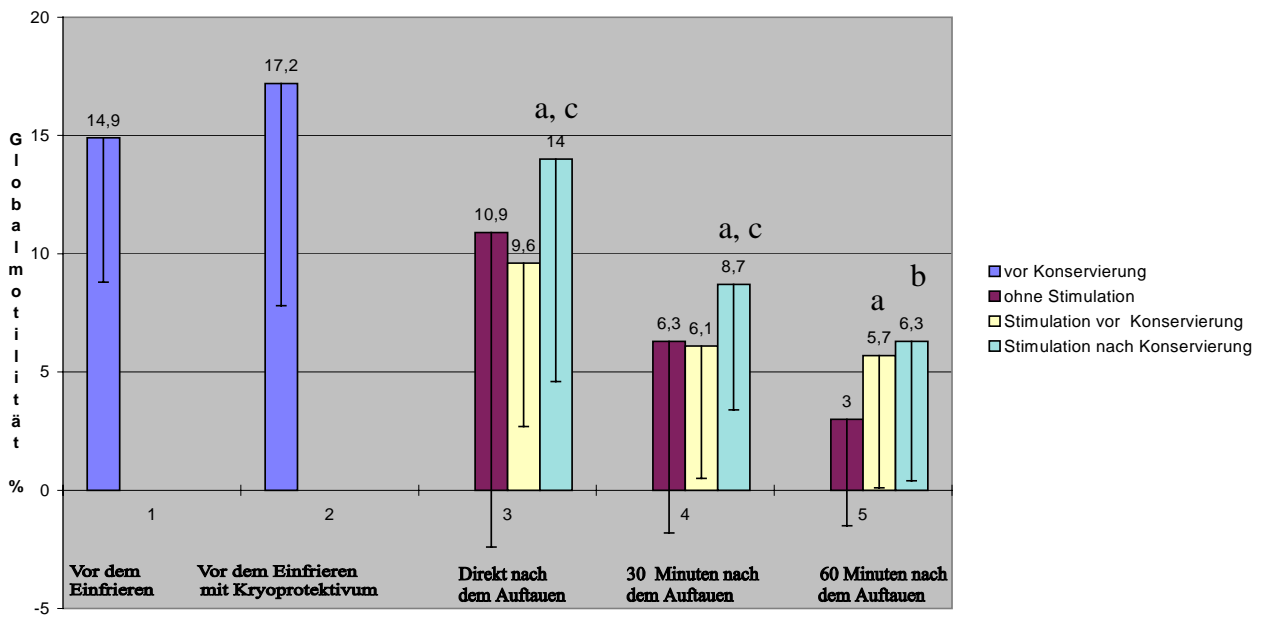
Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die durchschnittliche Globalmotilität der nativen Proben betrug 14.9%. Nach Zugabe des Kryoprotektivums stieg diese auf 17.2% (Abb. 18). In Gruppe A belief sie sich direkt nach dem Auftauvorgang auf 10.9%, 30 Minuten danach auf 6.3% und nach 60 Minuten auf 3.0%. Bei Gruppe B ergaben die Messungen zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen 9.6% ( $p = 0.1556^*$ ), 30 Minuten später 6.1% ( $p = 0.1394^*$ ) und nach einer Stunde 5.7% ( $p = 0.0193^*$ ). Im Vergleich zu Gruppe A fand sich nur nach 60 Minuten ein niedrig signifikanter Unterschied.

Zu den drei Zeitpunkten in Gruppe C waren die Messergebnisse zu  $t_1$  14.0% ( $p = 0.035^*$ ), zu  $t_2$  8.7% ( $p = 0.01^*$ ) und zu  $t_3$  6.3% ( $p = 0.003^*$ ). In allen Fällen lag die Globalmotilität höher als in Gruppe A. Zu  $t_1$  und  $t_2$  war die Differenz niedrig signifikant, zu  $t_3$  signifikant. Im Vergleich von Gruppe B mit C fand sich allen Zeitpunkten eine höhere Motilität in Gruppe C mit Stimulation nach dem Auftauen. Der Unterschied war für  $t_1$  ( $p = 0.0024$ ) und für  $t_2$  ( $p = 0.0051$ ) jeweils signifikant. Nach einer Stunde war er nicht signifikant ( $p = 0.2432$ ).

Abb. 18 Stimulation der Globalmotilität bei Oligozoospermie (n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.2 Motilität bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

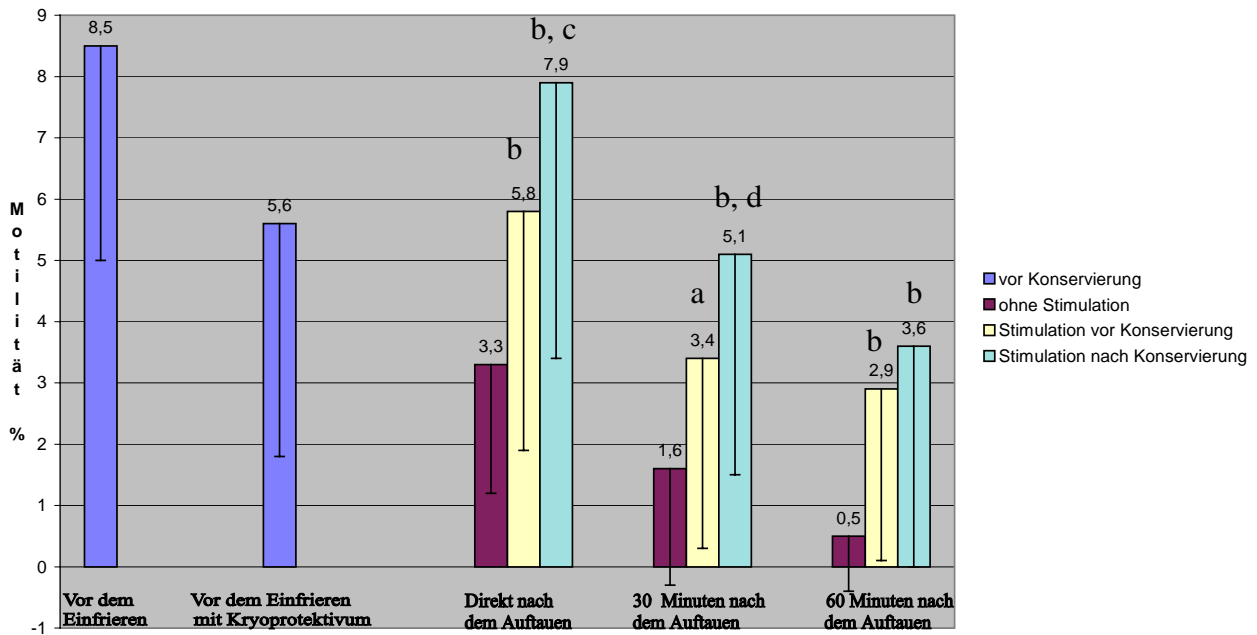
\*: verglichen mit der Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die durchschnittliche Motilität der nativen Proben ergab 8.5%, nach Zugabe des Kryoprotektivums 5.6% (Abb. 19). In Gruppe A betrug die durchschnittliche Motilität direkt nach dem Auftauvorgang 3.3% und sank nach 30 Minuten auf 1.9% sowie 0.5% nach 60 Minuten. In Gruppe B lagen die Messergebnisse zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen bei 5.8% ( $p = 0.0003^*$ ), 30 Minuten später bei 3.4% ( $p = 0.0023^*$ ) und nach einer Stunde bei 2.9% ( $p = 0.0009^*$ ). Im Vergleich mit Gruppe A lagen die durchschnittlichen Werte höher. Für  $t_1$  und  $t_3$  war der Unterschied hoch signifikant, für  $t_2$  war er signifikant.

Zum Zeitpunkt  $t_1$  in Gruppe C ergab die ermittelte Motilität 7.9% ( $p = 0.0001$ ), zu  $t_2$  5.1% ( $p = 0.0001$ ) und zu  $t_3$  3.6% ( $p = 0.0004$ ). Für alle drei Messpunkte lagen die Werte in Bezug auf Gruppe A hoch signifikant höher. Im Vergleich der Gruppen B und C war der Unterschied direkt nach Auftauen signifikant ( $p = 0.0078$ ), nach 30 Minuten hoch signifikant ( $p = 0.0005$ ) und nach einer Stunde nicht signifikant ( $p = 0.084$ ).



Abb. 19 Stimulation der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie (n =21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.01$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

d  $p < 0.001$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.3 Linear motile Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

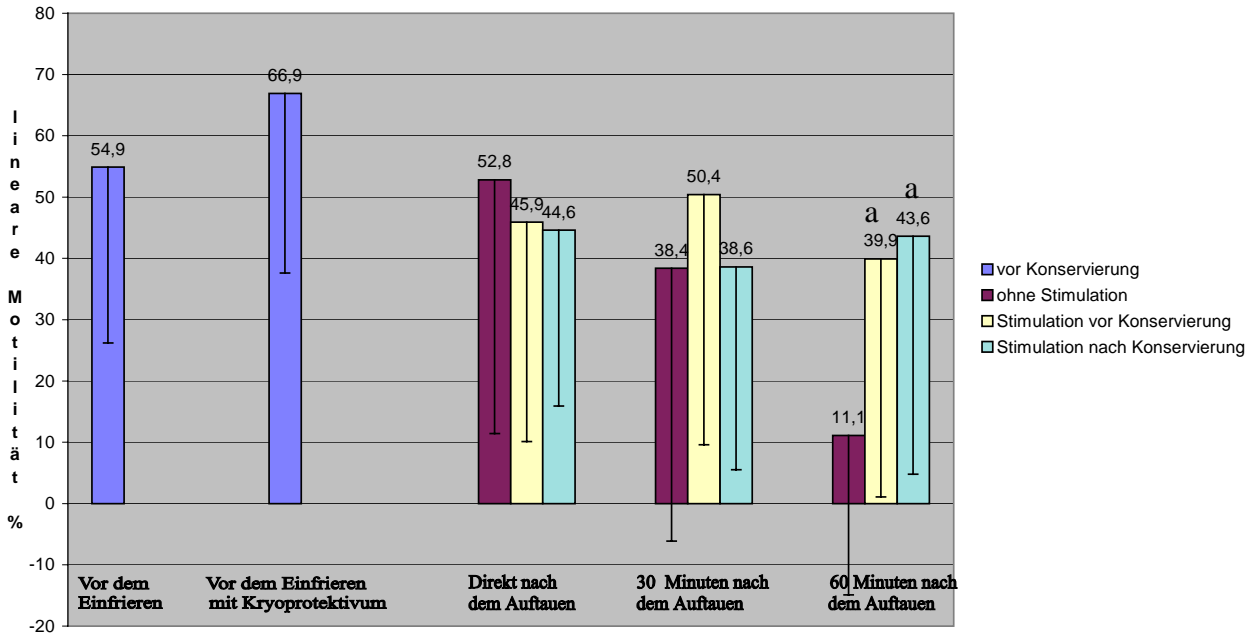
Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der Motilität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

In der nativen Probe betrug der Anteil der linear motilen Spermatozoen 54.9% (Abb. 20). Nach Zugabe des Kryoprotektivums stieg dieser auf 67.0%. Zum Zeitpunkt direkt nach dem Auftauen belief sich die lineare Motilität bei Gruppe A auf 52.8%, nach 30 Minuten auf 38.4% und nach einer Stunde auf 11.1%. Für Gruppe B ergaben sich direkt nach dem Auftauvorgang 84.7% ( $p = 0.9479^*$ ), nach 30 Minuten 50.4% ( $p = 0.262^*$ ) und nach einer Stunde 39.9% ( $p = 0.0063^*$ ). Bei Stimulation vor Konservierung waren die Messwerte höher als im Vergleich zur Gruppe A ohne Stimulation. Lediglich nach 60 Minuten war das Ergebnis signifikant unterschiedlich.

Eine ähnliche Konstellation ergab sich in Gruppe C. Die Werte lagen zu den jeweiligen Zeitpunkten direkt nach dem Auftauen bei 44.6% ( $p = 0.4866^*$ ), nach 30 Minuten bei 38.6% ( $p = 0.6831^*$ ) und nach 60 Minuten bei 43.6% ( $p = 0.0031^*$ ). Nur zu  $t_3$  war der Wert signifikant unterschiedlich. Der Unterschied der linearen Motilitäten im Vergleich von Gruppe B und C zu den Zeitpunkten  $t_1$  ( $p = 0.6542$ ),  $t_2$  ( $p = 0.0747$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.5924$ ) war jeweils nicht signifikant.

Abb. 20 Stimulation der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie (n =21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

### 3.2.4 Linearität bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

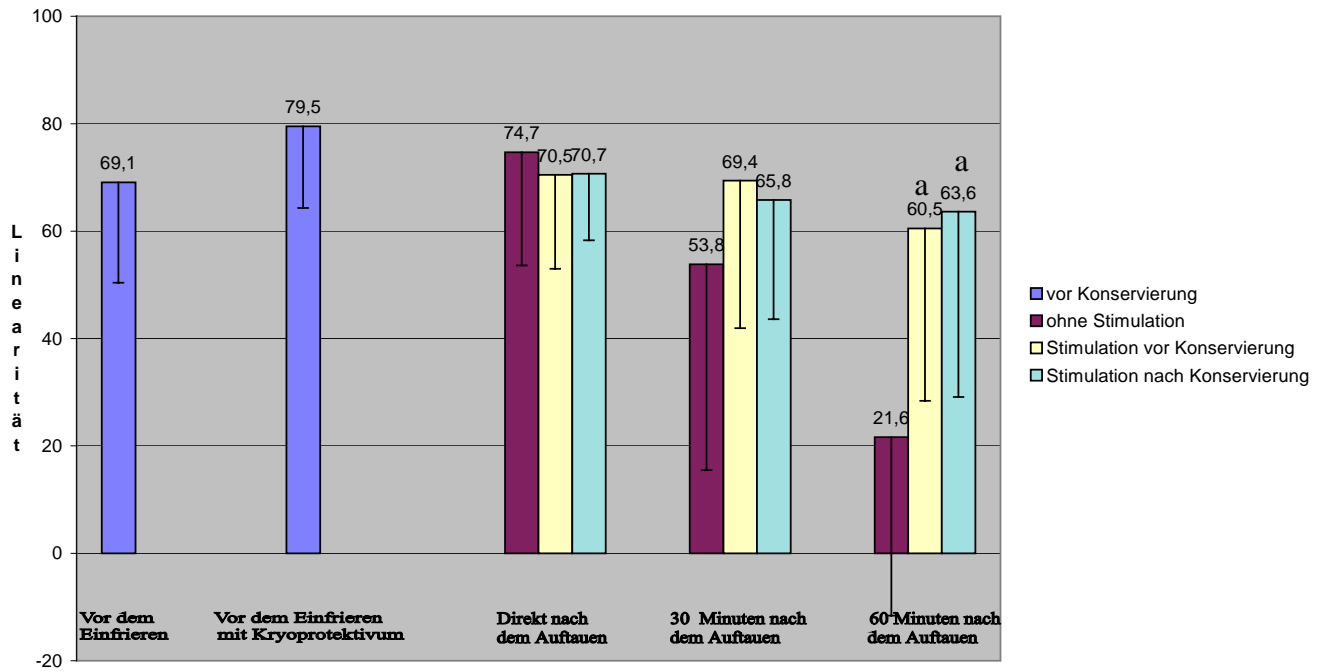
\*: verglichen mit der Linearität der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die durchschnittliche Linearität der nativen Spermatozoen betrug 69.1 (Abb. 21). Nach Zugabe des Kryoprotektivums stieg diese auf 79.5. In Gruppe A ergaben sich direkt nach dem Auftauvorgang 74.7, nach 30 Minuten 53.8 und nach 60 Minuten 21.6. Für Gruppe B fand sich in der Messungen direkt nach dem Auftauen 70.0 ( $p = 0.3752^*$ ), nach 30 Minuten 69.4 ( $p = 0.1165^*$ ) und nach einer Stunde 60.5 ( $p = 0.0016^*$ ). Nur zu  $t_3$  war die Linearität signifikant höher als in der nicht stimulierten Probe. Zu den anderen beiden Zeitpunkten fand sich kein signifikanter Unterschied.

In Gruppe C ergaben sich zu  $t_1$  70.7 ( $p = 0.4329^*$ ), zu  $t_2$  65.8 ( $p = 0.2871^*$ ) und zu  $t_3$  63.6 ( $p = 0.0012^*$ ). Bei Messung nach 60 Minuten war die Linearität signifikant höher als in Gruppe A. Für die beiden vorherigen Werte fanden sich keine signifikanten Differenzen.

Im Vergleich der Gruppen B und C war sowohl zu  $t_1$  ( $p = 0.7795$ ),  $t_2$  ( $p = 0.3958$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.6026$ ) kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Abb. 21 Stimulation der Linearität bei Oligozoospermie (n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

### 3.2.5 LHD (lateral head displacement) bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

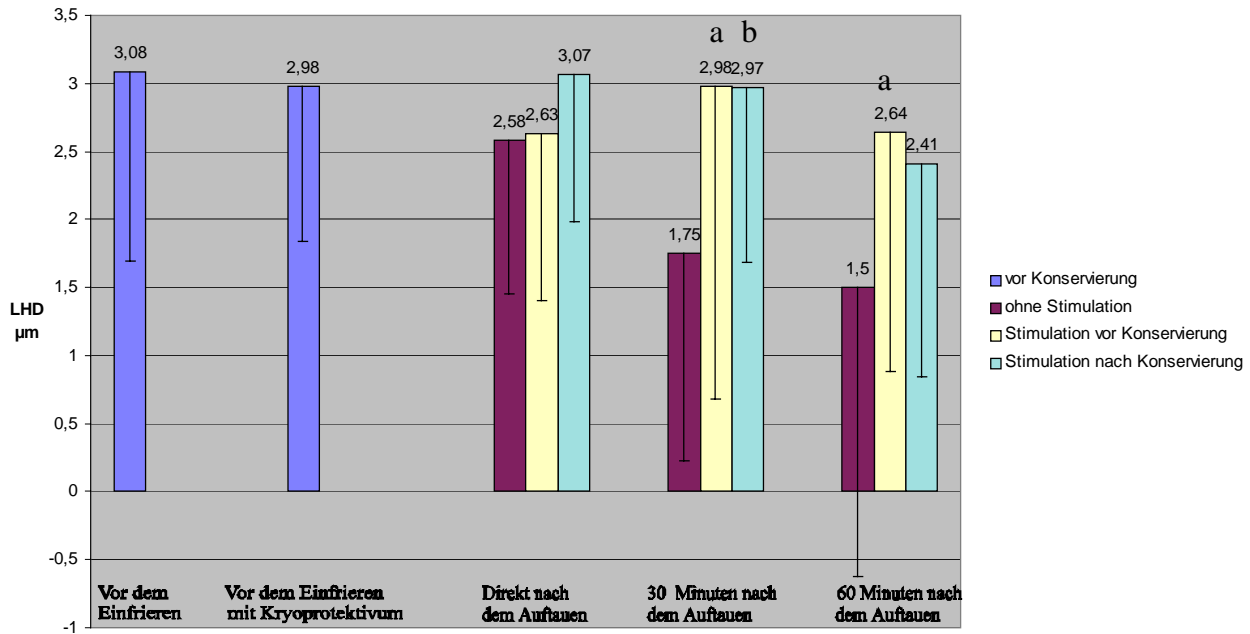
\*: verglichen mit dem LHD der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Das LHD der nativen Probe betrug 30.8  $\mu\text{m}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums 29.8  $\mu\text{m}$  (Abb. 22). Nach dem Auftauvorgang wurden in der nicht stimulierten Probe 25.8  $\mu\text{m}$ , nach 30 Minuten 17.5  $\mu\text{m}$  und nach einer Stunde 15.0  $\mu\text{m}$  gemessen. In der Gruppe mit Stimulation vor der Konservierung wurden direkt nach dem Auftauen 26.3  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.728^*$ ), nach 30 Minuten 29.8  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.0242^*$ ) und nach 60 Minuten 26.4  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.0168^*$ ) gemessen. Wurden die Werte mit den in Gruppe A ermittelten Werten verglichen, so waren die Unterschiede zu  $t_2$  und  $t_3$  niedrig signifikant.

Erfolgte die Stimulation nach dem Auftauvorgang, so betrug das LHD direkt nach Zugabe 30.7  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.0733^*$ ), nach 30 Minuten 29.7  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.0018^*$ ) und nach einer Stunde 24.1  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.0522^*$ ). Im Vergleich zu Gruppe A fand sich nur nach 30 Minuten eine signifikante Differenz. Direkt nach dem Auftauen und nach 60 Minuten war diese nicht signifikant.

Betrachtete man die Unterschiede zwischen den Gruppen mit Stimulation vor und nach Kryokonservierung, so ergaben sich für die Zeitpunkte  $t_1$  ( $p = 0.1084$ ),  $t_2$  ( $p = 0.4898$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.5566$ ) keine Signifikanzen.

Abb. 22 Stimulation des LHD bei Oligozoospermie (n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

### 3.2.6 VAP der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

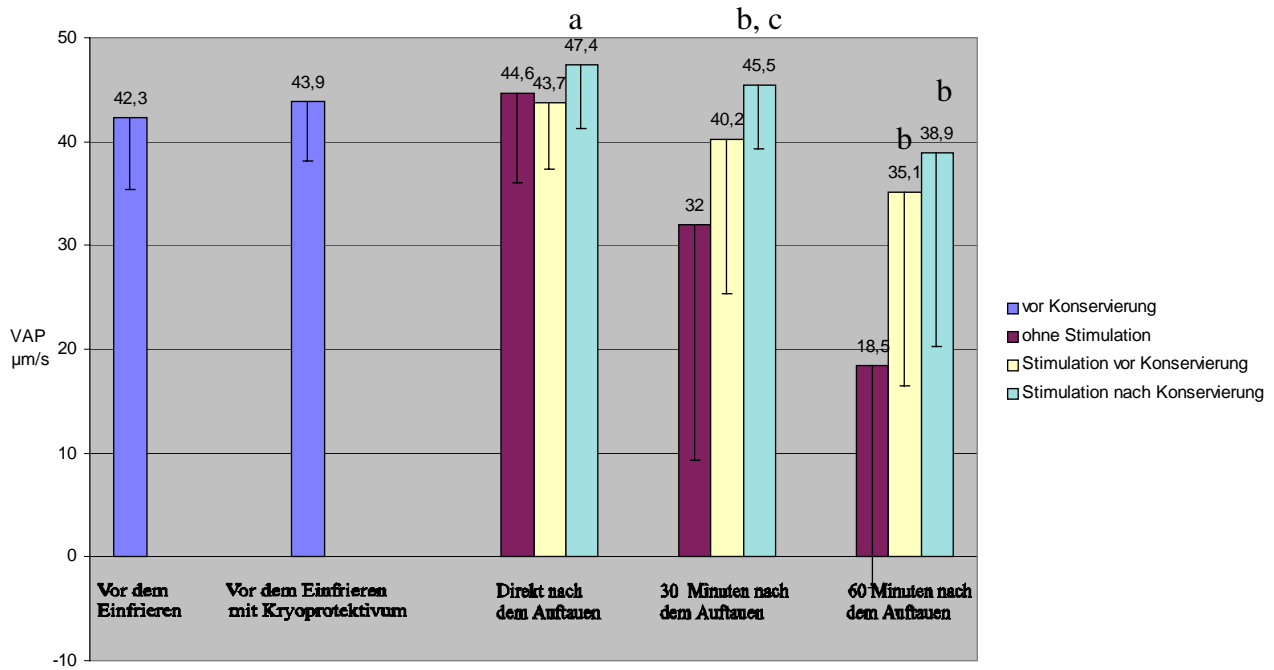
\*: verglichen mit der VAP der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe nahm der Durchschnittswert der VAP der motilen Spermatozoen von  $42.3 \mu\text{m/s}$  auf  $43.8 \mu\text{m/s}$  ab (Abb. 23). Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die Geschwindigkeit bei den nicht stimulierten Proben  $44.6 \mu\text{m/s}$ , in der Messung 30 Minuten später  $32.0 \mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten  $18.5 \mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben ergaben direkt nach dem Auftauen  $43.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.3128^*$ ), 30 Minuten später  $40.2 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1166^*$ ) und nach einer Stunde  $35.1 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0032^*$ ). Die Differenz zu Gruppe A war nur nach einer Stunde signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung betrug der Wert zu  $t_1$   $47.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0378^*$ ) und war zu Gruppe A niedrig signifikant. Nach 30 Minuten betrug er  $45.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.006^*$ ), sowie nach 1 Stunde  $38.9 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0036^*$ ). Für  $t_2$  und  $t_3$  war der Unterschied signifikant. Im Vergleich der Gruppe B mit Gruppe C war der Unterschied der Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t_1$  nicht signifikant ( $p = 0.3684$ ), zu  $t_2$  niedrig signifikant ( $p = 0.0222$ ) und zu  $t_3$  nicht signifikant ( $p = 0.1365$ ).



Abb. 23 Stimulation der VAP der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie (n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.7 VAP der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VAP der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

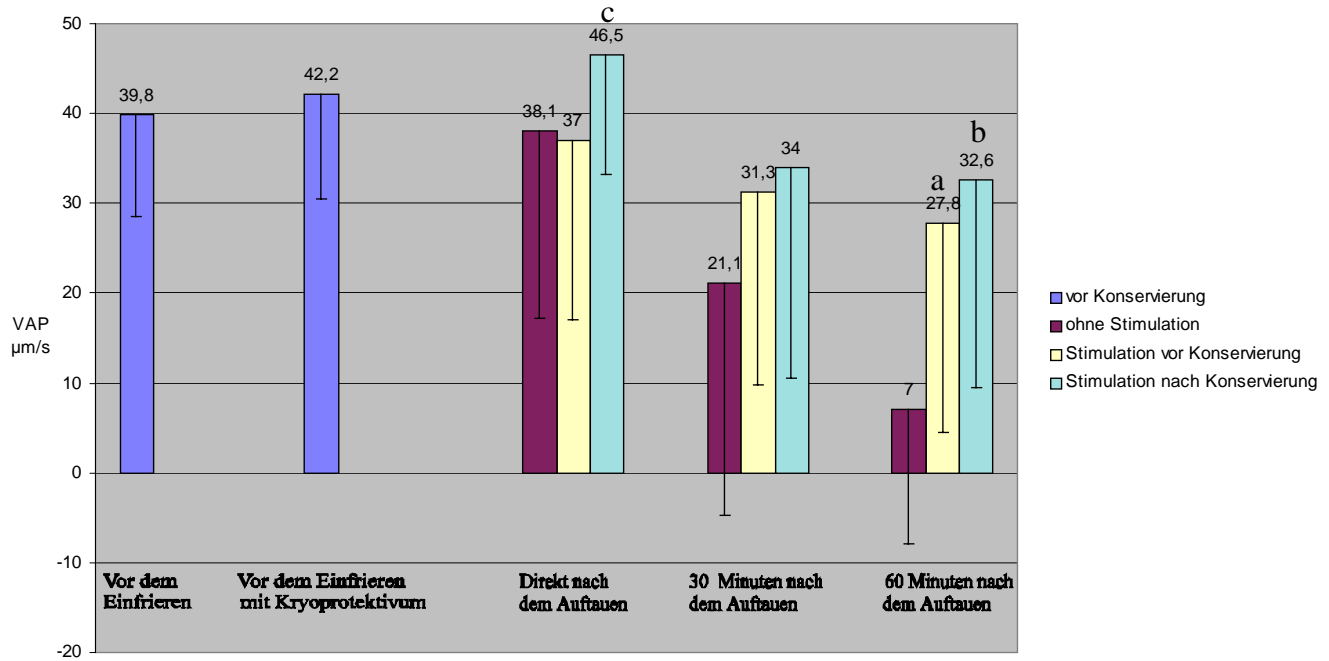
Die durchschnittliche VAP der nativen Probe betrug 39.8  $\mu\text{m/s}$  (Abb. 24). Nach Zugabe des Kryoprotektivums stieg sie auf 42.2  $\mu\text{m/s}$ . Direkt nach dem Auftauvorgang betrug die Geschwindigkeit in der nicht stimulierten Proben 38.1  $\mu\text{m/s}$ . Zu  $t_2$  sank die VAP auf 21.1  $\mu\text{m/s}$  und zu  $t_3$  auf 7.0  $\mu\text{m/s}$ . In Gruppe B wurden direkt zu  $t_1$  37.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.8879^*$ ), nach 30 Minuten 31.3  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.233^*$ ) und nach 60 Minuten 27.8  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0015^*$ ) gemessen.

Die erfasste Geschwindigkeit mit Stimulation vor Konservierung war zu allen drei Zeitpunkten höher als ohne Stimulation. Nur nach 60 Minuten war der Unterschied signifikant.

In Gruppe C fanden sich zu den drei jeweiligen Zeitpunkten  $t_1$  46.5  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1911^*$ ),  $t_2$  34.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1702^*$ ) und  $t_3$  32.6  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0007^*$ ). Auch hier lagen, wie in Gruppe B, die Geschwindigkeiten höher als in Gruppe A ohne Stimulation. Nach 60 Minuten war der Unterschied hoch signifikant. Die restlichen Messungen unterschieden sich nicht signifikant.

Im Vergleich der Gruppen B und C war direkt nach dem Auftauen die Differenz niedrig signifikant ( $p = 0.0479$ ). Nach 30 Minuten ( $p = 0.3627$ ) und nach 60 Minuten ( $p = 0.7960$ ) war sie nicht signifikant unterschiedlich.

Abb. 24 Stimulation der VAP der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie  
(n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.8 VCL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

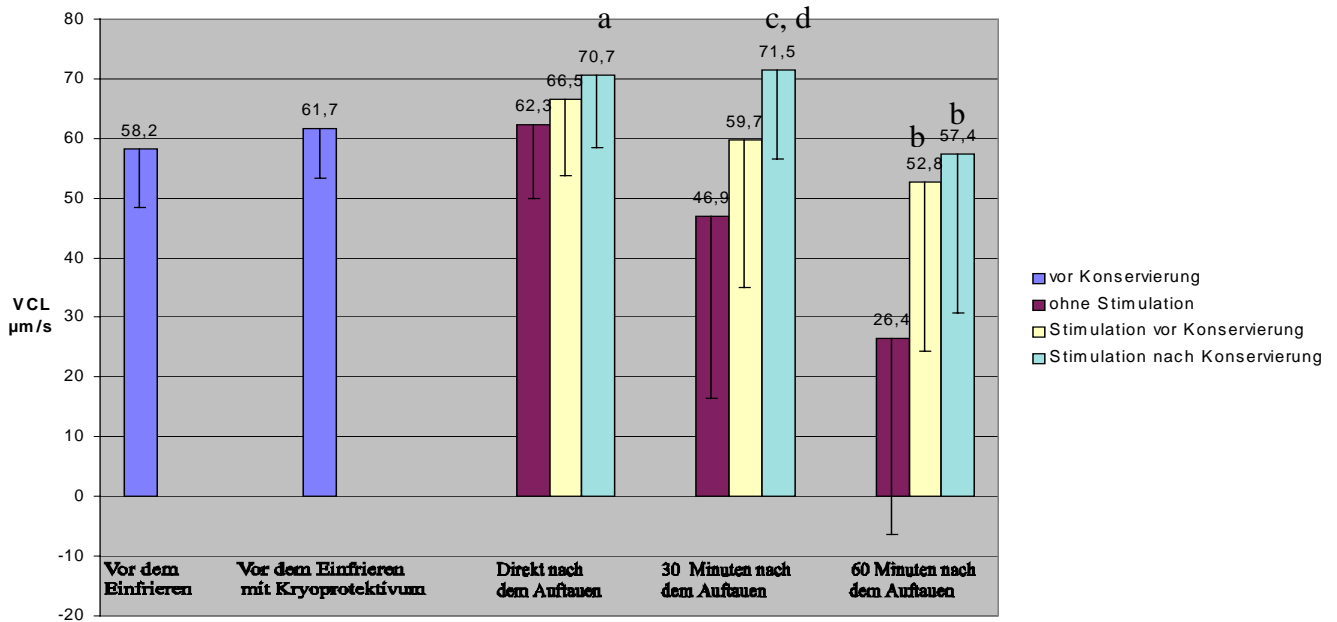
\*: verglichen mit der VCL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Die VCL (curvilinear velocity) gibt die Geschwindigkeit über den real zurückgelegten Weg an.

Der Durchschnittswert der VCL der nativen Probe betrug  $58.2 \mu\text{m/s}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums  $61.7 \mu\text{m/s}$  (Abb. 25). Direkt nach dem Auftauvorgang, zum Zeitpunkt  $t_1$ , wurden für die nicht stimulierte Gruppe A die Geschwindigkeit  $62.3 \mu\text{m/s}$ , zu  $t_2$   $46.9 \mu\text{m/s}$  und zu  $t_3$   $26.4 \mu\text{m/s}$  gemessen. Für die vor Konservierung stimulierte Gruppe B ergaben sich für die direkt nach dem Auftauen erfasste Geschwindigkeit  $66.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.3132^*$ ), nach 30 Minuten  $60.0 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0533^*$ ) und nach 60 Minuten  $52.8 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.006^*$ ). Die Durchschnittswerte waren zu allen drei Zeitpunkten höher als in Gruppe A. Nach einer Stunde war der Unterschied zu Gruppe A signifikant.

Bei Stimulation nach dem Auftauvorgang fiel die gemessene VCL der motilen Spermatozoen zu  $t_1$  von  $70.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0157^*$ ) über  $71.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0006^*$ ) zu  $t_2$  auf  $57.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0021^*$ ) zu  $t_3$ . Im Vergleich mit Gruppe A waren die Werte zu allen Zeitpunkten durchschnittlich höher. Zu  $t_1$  waren sie niedrig signifikant, zu  $t_2$  hoch signifikant und zu  $t_3$  signifikant unterschiedlich. Im Vergleich von Gruppe B und C waren die Unterschiede zu den drei jeweiligen Zeitpunkten für  $t_1$  ( $p = 0.1851$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.4094$ ) nicht signifikant und zu  $t_2$  ( $p = 0.0251$ ) niedrig signifikant.

Abb. 25 Stimulation der VCL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie mit Pentoxifyllin, (n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

d  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.9 VCL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

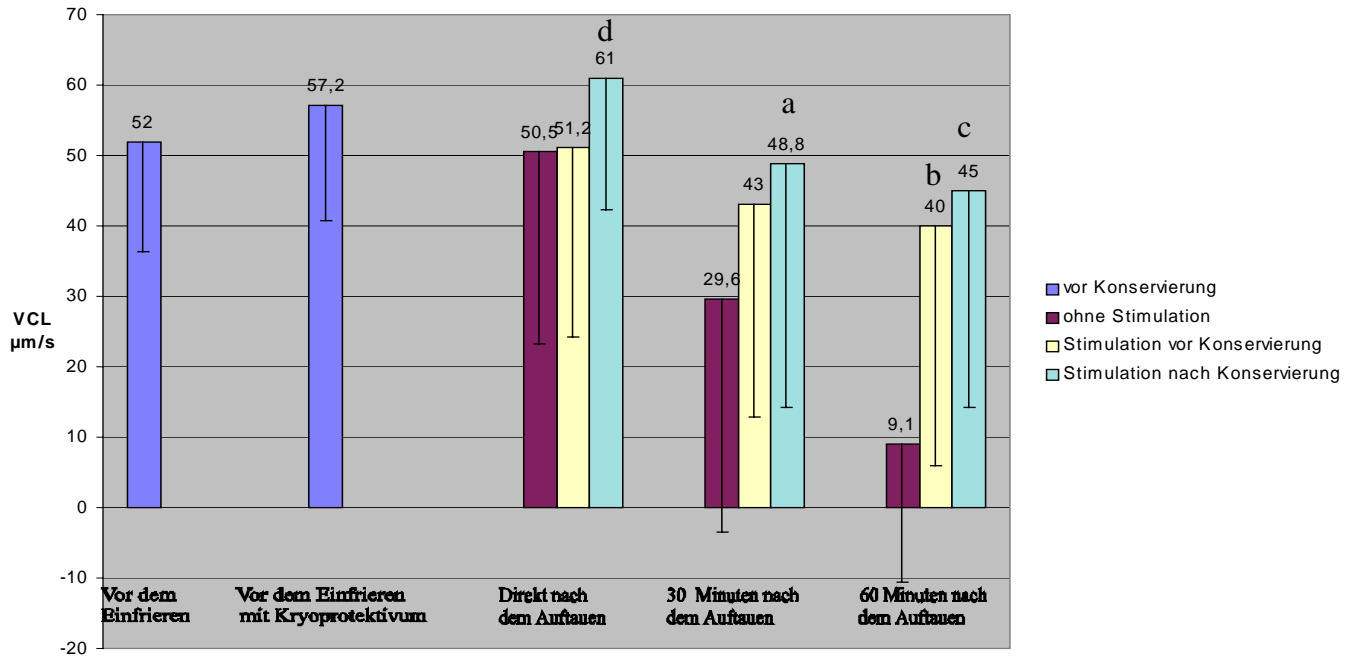
Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VCL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Nach Zugabe des Kryoprotektivums zur nativen Probe stieg der Durchschnittswert der VCL von 52.0  $\mu\text{m/s}$  auf 57.2  $\mu\text{m/s}$  an (Abb. 26). Direkt nach dem Auftauvorgang betragen die Geschwindigkeiten bei den nicht stimulierten Proben 50.5  $\mu\text{m/s}$ , in der Messung nach 30 Minuten 29.6  $\mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten 9.1  $\mu\text{m/s}$ . Die vor der Konservierung stimulierten Proben ergaben direkt nach dem Auftauen 51.2  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.4722^*$ ), 30 Minuten danach 43.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1625^*$ ) und nach einer Stunde 40.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0019^*$ ). Durchschnittlich lagen sie höher als in Gruppe A. Die Differenz war nur nach 60 Minuten signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung betragen die Werte 61.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1439^*$ ), nach 30 Minuten 48.8  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.034^*$ ) und nach 1 Stunde 45.0  $\mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0007^*$ ). Die höheren Messergebnisse in Gruppe C waren nach Auftauen nicht, nach einer halben Stunde niedrig und nach einer Stunde hoch signifikant zu Gruppe A. Zum Zeitpunkt  $t_1$  fand sich im Vergleich von Gruppe B mit C eine niedrige Signifikanz ( $p = 0.0479$ ). Zu  $t_2$  ( $p = 0.3627$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.7960$ ) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Abb. 26 Stimulation der VCL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie  
(n = 21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

d  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.10 VSL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$  : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$  : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_3$  : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

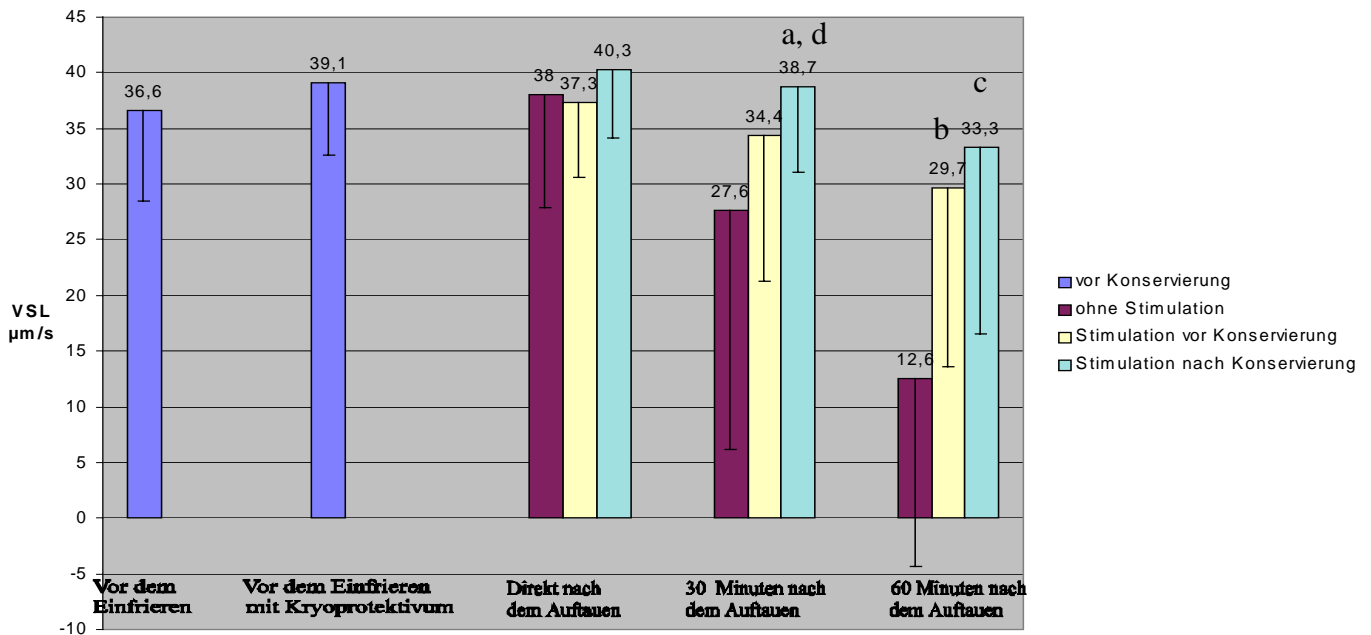
\*: verglichen mit der VSL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Der Durchschnittswert der VSL der nativen Probe betrug  $36.6 \mu\text{m/s}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums  $39.1 \mu\text{m/s}$  (Abb. 27). Direkt nach dem Auftauvorgang wurden für die nicht stimulierte Gruppe A  $40.0 \mu\text{m/s}$ , zu  $t_2$   $27.6 \mu\text{m/s}$  und zu  $t_3$   $12.6 \mu\text{m/s}$  gemessen. Für die vor Konservierung stimulierte Gruppe B ergaben sich für die direkt nach dem Auftauen erfasste Geschwindigkeit  $37.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.93572^*$ ), nach 30 Minuten  $34.4 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1587^*$ ) und nach 60 Minuten  $29.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0021^*$ ). Die Durchschnittswerte waren zu allen drei Zeitpunkten höher, jedoch nur zu  $t_3$  signifikant unterschiedlich im Bezug zu Gruppe A.

Bei Stimulation nach dem Auftauvorgang fiel die VSL der motilen Spermatozoen von  $40.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1852^*$ ) zu  $t_1$ , über  $38.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0173^*$ ) zu  $t_2$ , auf  $33.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0007^*$ ) zu  $t_3$ . In Bezug zu Gruppe A waren die erfassten Werte zu allen Zeitpunkten durchschnittlich höher. Zu  $t_1$  waren sie nicht, zu  $t_2$  waren sie niedrig, zu  $t_3$  hoch signifikant unterschiedlich. Im Vergleich von Gruppe B und C waren die Unterschiede zum Zeitpunkt  $t_1$  ( $p = 0.1989$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.3144$ ) nicht signifikant und zu  $t_2$  ( $p = 0.0283$ ) niedrig signifikant.



Abb. 27 Stimulation der VSL der motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie (n=21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.05$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

c  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

d  $p < 0.05$  zur Gruppe mit Stimulation vor Konservierung

### 3.2.11 VSL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie

Gruppe A: Probe ohne Stimulation

Gruppe B: die Stimulation der Probe erfolgte vor der Kryokonservierung

Gruppe C: die Stimulation der Probe erfolgte zum Zeitpunkt des Auftauens nach Kryokonservierung

Zeitpunkt  $t_1$ : direkt nach dem Auftauvorgang

Zeitpunkt  $t_2$ : 30 Minuten nach dem Auftauvorgang

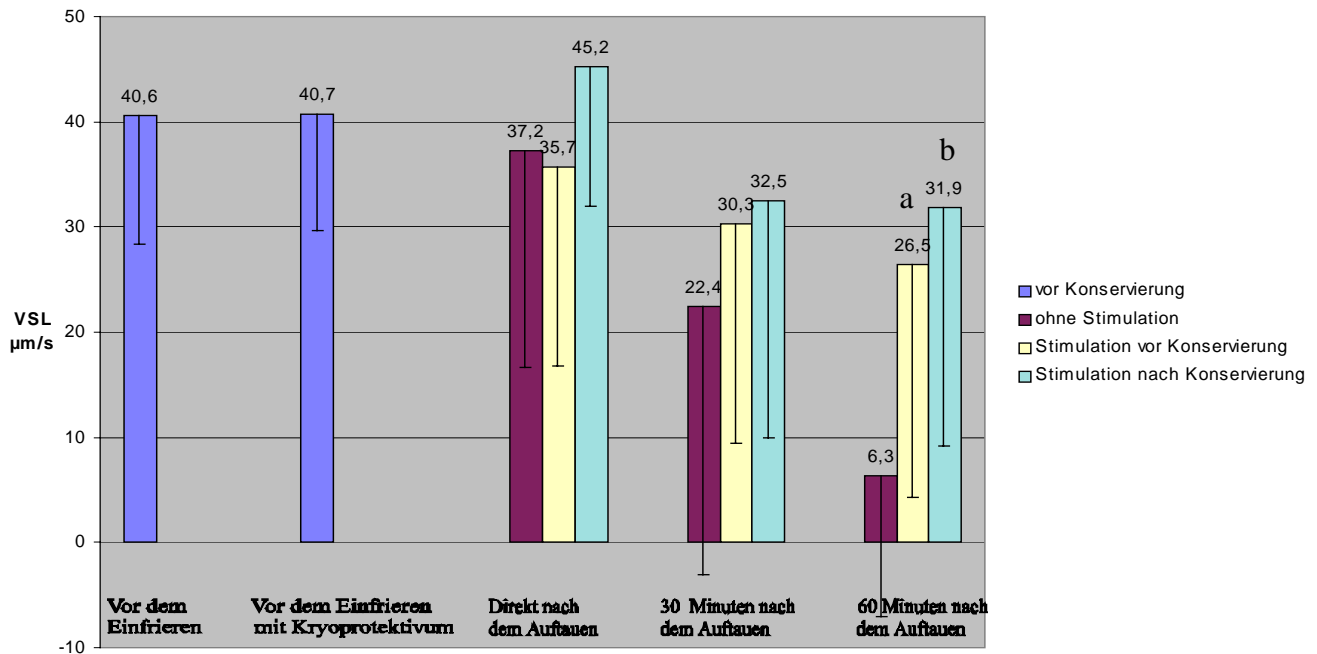
Zeitpunkt  $t_3$ : 60 Minuten nach dem Auftauvorgang

\*: verglichen mit der VSL der nicht stimulierten Gruppe zum jeweils gleichen Zeitpunkt

Der Durchschnittswert der VSL in der nativen Probe betrug  $40.6 \mu\text{m/s}$ , nach Zugabe des Kryoprotektivums  $40.7 \mu\text{m/s}$  (Abb. 28). Direkt nach dem Auftauvorgang ergaben sich  $37.3 \mu\text{m/s}$  bei den nicht stimulierten Proben, nach 30 Minuten  $22.4 \mu\text{m/s}$  und nach 60 Minuten  $6.3 \mu\text{m/s}$ . In der Messung der Gruppe B fanden sich nach dem Auftauen  $35.7 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.9038^*$ ), 30 Minuten später  $30.3 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.2774^*$ ) und nach einer Stunde  $26.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0015^*$ ). Der direkt nach dem Auftauen gemessene Wert in der Gruppe B lag niedriger, die Werte nach 30 und 60 Minuten lagen höher als bei den Proben ohne Stimulation. Lediglich nach 60 Minuten war die Differenz signifikant.

Bei Stimulation nach Konservierung fand sich zuerst eine durchschnittliche VSL von  $45.2 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1922^*$ ), welche nach 30 Minuten auf  $32.5 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.1912^*$ ) und nach 60 Minuten auf  $32.0 \mu\text{m/s}$  ( $p = 0.0007^*$ ) sank. Im Vergleich mit Gruppe A lagen die gemessenen Geschwindigkeiten höher. Nach einer Stunde war die Differenz hoch signifikant, die Unterschiede direkt nach dem Auftauen und nach 30 Minuten zeigten keine Signifikanz. Der Vergleich der Gruppen B mit C ergab zu den drei Zeitpunkten  $t_1$  ( $p = 0.0516$ ),  $t_2$  ( $p = 0.4513$ ) und  $t_3$  ( $p = 0.6233$ ) jeweils keinen signifikanten Unterschied.

Abb. 28 Stimulation der VSL der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie (n=21 Patienten)



Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

Statistische Methode: Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test

a  $p < 0.01$  zur Gruppe ohne Stimulation

b  $p < 0.001$  zur Gruppe ohne Stimulation

## **4 Diskussion**

### **4.1 Der Einfluss von Ptx auf die mit CASA erfassten Parameter bei Normozoospermie und Oligozoospermie nach Kryokonservierung**

#### **4.1.1 Einfluss von Ptx auf die Motilität - Einleitung**

Eine höhere Motilität der Spermatozoen steigert den Anteil der Spermatozoen, welche in vivo die Oozyte erreichen und mit ihr interagieren können (Morales et al., 1993). Bei Insemination und den Methoden der assistierten Reproduktion korrelieren Fertilisierungsrate, bzw. Schwangerschaftsraten und Motilität miteinander (Mahadevan & Trounson, 1984, Bongso et al., 1989, Tucker et al., 1991, Hinney et al., 1993).

Bei den mit CASA untersuchten fertilen und infertilen Männer waren signifikante Unterschiede in der Motilität sowie dem Anteil der linear motilen Spermatozoen zu finden (Hinting et al., 1988). Eine positive Korrelation konnte zwischen der Motilität und der Fertilisierungsrate nach IVF gezeigt werden (Bongso et al., 1989, Grunert et al., 1989, Hinting et al., 1990, Barlow et al., 1991, Davis et al., 1991). Diese war auch für Kryosperma nachzuweisen (Holt et al., 1989).

Der steigernde Effekt von Pentoxifyllin nach Kryokonservierung auf die verschiedenen Motilitätsparameter ist bekannt. Die Globalmotilität (Hellstrom & Sikka, 1989, Hammitt et al., 1989, Bell et al., 1993, Kay et al., 1993, Aribarg et al., 1994, Kolon et al., 1995, Sharma et al., 1996b, Sharma & Agarwal, 1997, Stanic, 2002) und der Anteil der nicht linear und linear motilen Spermatozoen (Köhn et al., 1993, Stanic, 2002) wird durch Ptx angehoben.

Bei schwachen Motilitätsparametern schien der Ptx-Effekt deutlicher ausgeprägt (Yovich et al., 1988, Morales et al., 1993, Tarlatzis et al., 1995). Weiterhin wurden Prozentanteile linear motiler Spermatozoen stärker stimuliert (Yovich et al., 1988, et al., 1990, Marrama et al., 1985, Lewis et al., 1994, Mc Kinney et al., 1994 ) als der Anteil der insgesamt motilen Zellen (Mc Kinney et al., 1994).

##### **4.1.1.1 Der Einfluss von Ptx auf die Globalmotilität bei Normo- und Oligozoospermie**

Im Rahmen der eigenen Experimente fand sich bei den Ejakulaten mit Normozoospermie für den gesamten zeitlichen Verlauf eine statistisch signifikante Steigerung der Globalmotilität durch

Pentoxifyllin. Der Effekt war sowohl bei Zugabe vor, als auch nach Kryokonservierung nachweisbar. Er schien jedoch bei der Zugabe nach dem Auftauvorgang ausgeprägter.

Bei IVF fand Grunert et al. (1989) bei den mit CASA erfassten Werten eine signifikante Verschlechterung der Fertilisierungsrate nach Absinken der Globalmotilität unter 30%. Für die Globalmotilität sollte dabei ein Wert von 23% als untere Grenze nicht unterschritten werden. Fisch et al. (1990) hielten eine Mindestmotilität von 20% für erforderlich. Bei der eigenen Untersuchung wurde die Globalmotilität der Ejakulate mit Normozoospermie durch Ptx hoch signifikant über diese Werte angehoben.

In einer Studie von Larsen et al. (2000) wurden die Motilitätsparameter von gesunden fertilen Paaren im Bezug zur Schwangerschaftsrate untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft mit Steigerung der Globalmotilität erhöht war. Durch die Kryokonservierung kommt es zur Schädigung der Spermatozoen mit einhergehender Reduktion des Fertilisierungspotentiales (Serafini et al., 1986, Crister et al., 1987, Centola et al., 1992, Verheyen et al., 1993, Brennan & Holden, 1995). Die Motilität und Globalmotilität sind als Ausdruck des Qualitätsverlustes vermindert (Cross & Hanks, 1991). Die signifikante Steigerung der Globalmotilität durch Ptx in der eigenen Arbeit könnte ein erhöhtes Fertilisierungspotential für Ejakulate mit Normozoospermie bedeuten.

In der Gruppe der Patienten mit Oligozoospermie wurde die Globalmotilität durch Ptx im Vergleich zur Gruppe ohne Stimulation über den gesamten Zeitraum angehoben. Die Zugabe des Stimulans nach dem Auftauen schien von Vorteil. Die Ergebnisse wiesen eine niedrig- bis hochsignifikante Steigerung im Vergleich zu den nicht stimulierten Gruppen auf. Der untere Grenzwert der Globalmotilität von 23%, wie von Grunert et al., (1989) für eine erhöhte Schwangerschaftsrate nach IVF und Insemination gezeigt, wurde durch Stimulation mit Ptx nicht erzielt. Es konnte lediglich der vor Kryokonservierung gemessene Wert der nativen Probe, welcher selbst schon deutlich unter 23% lag, mit Ptx erreicht werden.

In einer weiteren Studie wurden Minimalkriterien für native und aufgearbeitete Ejakulate für IVF und Insemination untersucht. Bei IVF wurde eine Globalmotilität von 30% - 40% für eine erfolgreiche Fertilisierung als ausreichend gezeigt. Bei Insemination sollte die Globalmotilität 30% nicht unterschreiten (Hinney et al., 1993).

In der eigenen Studie war durch Stimulation mit Ptx die Globalmotilität nach dem Auftauen sowohl bei Normozoospermie als auch bei Oligozoospermie höher als bei den nicht stimulierten Proben. Der Mindestanteil von 30% - 40% Globalmotilität wurde durch Ptx weder bei Normo-

zoospermie noch bei Oligozoospermie erreicht, so dass eine klinisch relevante Steigerung von Fertilisierungs- und Schwangerschaftsraten durch die Anwendung von Ptx unter Berücksichtigung dieser Motilitätsparameter nicht anzunehmen ist.

#### **4.1.1.2 Der Einfluss von Ptx auf die motilen Spermatozoen bei Normo- und Oligozoospermie**

Bei Normozoospermie fand sich eine Steigerung des Anteils der motilen Spermatozoen (entspricht der Globalmotilität ohne des Anteiles der lokal motilen Spermatozoen) durch Stimulation mit Ptx im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben. Die Unterschiede waren hoch signifikant. Die Ergebnisse lagen jedoch deutlich unter dem Grenzwert für motile Spermatozoen von 25%, welcher für erfolgreiche IVF und Inseminationen empfohlen wurde (Hinney et al.,1993).

Auch die motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie zeigten ein ähnliches Ansprechen auf Ptx wie bei Normozoospermie. Der Effekt des Ptx war sowohl bei Zugabe vor, als auch nach Kryokonservierung nachweisbar. Er schien jedoch bei Zugabe nach dem Auftauvorgang ausgeprägter. Eine Steigerung der motilen Spermatozoen über den empfohlenen Wert von 25% konnte nicht erreicht werden (Hinney et al.,1993).

Durch Stimulation mit Ptx konnte in den eigenen Versuchen weder bei Normo- noch bei Oligozoospermie eine für erfolgreiche Fertilisierungen ausreichende Steigerung der motilen Spermatozoen erzielt werden.

#### **4.1.1.3 Der Einfluss von Ptx auf die linear motilen Spermatozoen bei Normo- und Oligozoospermie**

Der Anteil der linear motilen Spermatozoen bei Normozoospermie stieg in sämtlichen Gruppen mit und ohne Zugabe von Ptx nach Konservierung über den Wert der nativen Probe an. Es wäre jedoch ein Abfall der progressiven Beweglichkeit zu erwarten gewesen. Bei den stimulierten Gruppen kann diese Beobachtung möglicherweise durch den Effekt des Ptx erklärt werden.

Ein stärkeres Ansprechen des Anteils der linear motilen Spermatozoen in Ejakulaten mit reduzierter Qualität auf die Stimulation mit Ptx nach Kryokonservierung ist bekannt (Yovich et al., 1988, Morales et al., 1993, Tarlatzis et al., 1995).

Ein erhöhter Anteil der linear motilen Spermatozoen über den nativen Wert hinaus war aber auch in der Gruppe ohne Stimulation zu beobachten, so dass dieser Effekt durch eine verstärktes Ansprechen der Spermatozoen auf Ptx nicht erklärt werden kann.

Der von Hinney et al. (1993) für eine erfolgreiche in-vitro Fertilisierung und Insemination gezeigte Mindestanteil von 8% linear motilen Spermatozoen wurde in den eigenen Untersuchungen bei Normo- und Oligozoospermie zu allen Zeitpunkten deutlich überschritten.

Bei Normozoospermie nahm der Anteil der linear motilen Spermatozoen ohne Stimulation über eine Stunde stetig ab. Nach einer Stunde war der Anteil der nach dem Auftauen stimulierten Gruppe im Vergleich zur nicht stimulierten Gruppe signifikant höher. Eine höhere Fertilisierungsfähigkeit durch die Zugabe von Ptx könnte unter Berücksichtigung dieses Motilitätsparameters somit möglich sein.

Bei Oligozoospermie fiel Anteil der linear motilen Spermatozoen nach Kryokonservierung ohne Stimulation stark ab. Im Vergleich zu der nicht stimulierten Gruppe schien Ptx das Absinken des Anteiles der linear motilen Spermatozoen zu verzögern. Auch bei Oligozoospermie könnte die Stimulation mit Ptx die Fertilisierungsfähigkeit durch Steigerung des Anteiles der linear motilen Spermatozoen anheben.

#### **4.1.2 Einfluss von Ptx auf die verschiedenen Geschwindigkeiten - Einleitung**

Die Geschwindigkeit der Spermatozoen konnte positiv mit der Penetrationsfähigkeit beim Hamster-Oozyten-Penetrations-Test (HOP) und der Schwangerschaftsrate nach IVF korreliert werden (Holt et al., 1985). Sie ist als Ausdruck der Spermatozoenfunktion interpretiert worden und hat deshalb prognostische Stellung für die Fertilisierung (Holt et al., 1985, Hinting et al., 1988, Grunert et al., 1989, Bongso et al., 1989, Vantman et al., 1989, Barlow et al., 1991).

In Publikationen, welche sich mit der Analyse mittels CASA erfasster Motilitätsparameter beschäftigen, wurde häufig die Geschwindigkeit der gesamten Probe beurteilt (Holt et al., 1985, Hinting et al., 1988, Bongso et al., 1989, Vantman et al., 1989, Davis et al., 1991, Centola, 1996, Sharma et al., 1996b, Larsen et al., 2000). In den eigenen Experimenten wurde auch die Geschwindigkeiten der linear motilen Spermatozoen berücksichtigt. Eine hohe Geschwindigkeit und eine hoher Anteil an progressiv motilen Zellen lässt sich mit den Fertilisierungs- und Schwangerschaftsraten nach IUI und IVF korrelieren (Bollendorf et al., 1996).

Durch die Zugabe von Ptx nach Kryokonservierung lässt sich eine Wirkung auf die verschiedenen Geschwindigkeiten feststellen. So wurden Steigerungen der VSL und VCL (Hammitt et al., 1989, Mbizvo et al., 1993, Köhn et al., 1993, Aribarg et al., 1994, Wang et al., 1994, Sharma & Agarwal,

1997) sowie der VAP (Sharma et al., 1996b) oder aber nur eine Steigerung der VCL und ein Abfall der VSL durch Ptx beobachtet (Kay et al., 1993). Auch bei Ejakulaten mit Oligozoospermie fand sich eine Steigerung der VCL durch die Zugabe von Ptx (Hellstrom & Sikka, 1989). Bei Ejakulaten mit Asthenozoospermie schien die Zunahme der VCL nach Ptx stärker ausgeprägt als bei Ejakulaten mit Normozoospermie (Tesarik et al., 1992a, Mc Kinney et al., 1994, Nassar et al., 1999).

#### **4.1.2.1 Der Einfluss von Ptx auf die VCL bei Normo- und Oligozoospermie**

Bei Spermatozoen, welche eine Gesamtgeschwindigkeit von über 50  $\mu\text{m/s}$  aufwiesen, war eine gesteigerte Fertilisierung nach IVF zu beobachten. Lagen die Geschwindigkeiten jedoch unter 30  $\mu\text{m/s}$ , so war eine verminderte oder keine Fertilisierung zu finden (Bongso et al., 1989). Die VCL wurde als wichtiger Wert bei der In-vitro-Fertilisation (Holt et al., 1985, Bongso et al., 1989, Grunert et al., 1989, Davis et al., 1991) und bei spontaner Konzeption evaluiert (Hinting et al., 1988, Vantman et al., 1989, Larsen et al., 2000). Bei Insemination mit kryokonservierten Spermatozoen konnten anhand der gemessenen VCL fertile und infertile Männer unterschieden werden. In der Gruppe der Infertilen wurde eine VCL von unter 50.4  $\mu\text{m/s}$ , in der Gruppe der Fertilen eine VCL von über 65.9  $\mu\text{m/s}$  ermittelt (Holt et al., 1989). In einer anderen Studie wurde eine VCL von 55.9  $\mu\text{m/s}$  für Spermatozoen infertiler und 72.2  $\mu\text{m/s}$  für Spermatozoen fertiler Männer gemessen (Barlow et al., 1991).

In den eigenen Experimenten lag die VCL der nicht stimulierten Spermatozoen bei Normozoospermie direkt nach dem Auftauen zwischen den von Holt et al. (1989) für fertile und infertile Männer angegebenen Werten. Nach 30 und 60 Minuten war die VCL bereits unter den für Infertile gemessenen Wert von 50.4  $\mu\text{m/s}$  abgefallen. Dem gegenüber lag die VCL der nach Kryokonservierung stimulierten Spermatozoen während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant über diesem Wert.

Auch bei Oligozoospermie wurde bei den stimulierten Proben eine höhere VCL als bei den Proben ohne Stimulation gemessen. Direkt nach dem Auftauen und nach 30 Minuten lagen die gemessenen Werte nur minimal unter dem für fertile Männer ermittelten Grenzwert von 72.2  $\mu\text{m/s}$  (Barlow et al., 1991). Die VCL lag während des gesamten Messzeitraumes über dem von Barlow et al. (1991) für infertile Männer gefundenen Wert von 55.9  $\mu\text{m/s}$ . In der nicht stimulierten Gruppe war schon nach 30 Minuten ein Abfall der VCL unter 55.9  $\mu\text{m/s}$  festzustellen. Legt man den von



Grunert et al. (1989) für die VCL angegebenen Grenzwert von 50  $\mu\text{m/s}$  zu Grunde, so konnte sowohl bei Normo- als auch Oligozoospermie durch Stimulation mit Ptx die Chancen für eine Fertilisierung nach IVF gesteigert werden. Ohne Ptx war schon nach 30 Minuten ein Abfall unter diesen Wert zu beobachten.

Die VCL der linear motilen Spermatozoen wurde durch Pentoxifyllin ebenfalls angehoben. Bei Normozoospermie war der Unterschied zur nicht stimulierten Gruppe nach dem Auftauen immer niedrig signifikant erhöht. Bei Oligozoospermie verhielt sich das Wirkprofil ähnlich. Der Effekt von Ptx schien jedoch ausgeprägter. Dieses verstärkte Ansprechen der linear motilen Spermatozoen bei Oligozoospermie wurde bereits beschrieben (Yovich et al., 1988, et al., 1990, Marrama et al., 1985, Lewis et al., 1994, Mc Kinney et al., 1994). Die Steigerung der VCL der linear motilen Spermatozoen könnte auf ein erhöhtes Fertilisierungspotential durch Ptx hindeuten. Entsprechende Untersuchungen, welche die VCL der linear motilen Spermatozoen bezüglich der Fertilisierung vergleichen, konnten nicht gefunden werden.

#### **4.1.2.2 Der Einfluss von Ptx auf die VAP bei Normo- und Oligozoospermie**

Aussagen zur VAP finden sich selten. Lediglich in einer Studie wurde die VAP mit den Schwangerschaftsraten bei gesunden Paaren in Bezug gesetzt. Dabei war in einer Univarianzanalyse die VAP ab einer Geschwindigkeit von über 43.8  $\mu\text{m/s}$  als Vorhersagewert für eine Schwangerschaft signifikant (Larsen et al., 2000).

In den eigenen Experimenten wurde die VAP der motilen Spermatozoen direkt nach Zugabe des Ptx niedrig signifikant, nach einer Stunde hoch signifikant im Vergleich zur nicht stimulierten Gruppe angehoben. Die gleichen Beobachtungen waren für den Anteil der linear motilen Spermatozoen zu machen. Ein positiver Einfluss von Ptx auf die Fertilität könnte anhand der von Larsen et al. (2000) gemachten Beobachtung möglich sein.

Bei Oligozoospermie wirkte sich die Zugabe von Ptx auf die VAP stärker als bei Normozoospermie aus. Über den gesamten erfassten Zeitraum waren für die motilen Spermatozoen niedrig bis hoch signifikante Steigerungen im Vergleich zur nicht stimulierten Gruppe zu beobachten. Auch für die linear motilen Spermien fand sich eine Steigerung. Wurde Ptx vor Konservierung zugegeben, so lagen die Werte niedriger als bei Zugabe nach dem Auftauen.

Die Schädigung der Spermatozoen durch die Kryokonservierung und der damit einhergehende Abfall der VAP schien bei Oligozoospermie stärker ausgeprägt als bei Normozoospermie. Durch

Ptx wurde die VAP in beiden Gruppen gesteigert. Der Abfall der VAP über eine Stunde war verzögert. Da von Larsen et al. (2000) bei gesunden Paaren ein Grenzwert der VAP für eine Schwangerschaft beschrieben wurde, könnte die durch Ptx erhöhte VAP auf ein gesteigertes Fertilisierungspotential der Spermatozoen hindeuten.

#### **4.1.2.3 Der Einfluss von Ptx auf die VSL bei Normo- und Oligozoospermie**

Eine Korrelation zwischen VSL und Schwangerschaftsraten bei gesunden Paaren konnte nicht gezeigt werden (Larsen, et al., 2000). Bei einer anderen Studie, welche fertile und infertile Kollektive nach Insemination und IVF verglich, wurde ein Wert über 25  $\mu\text{m/s}$  für die VSL in der Gruppe der fertilen Männer ermittelt (Davis et al., 1991). Hinney et al. (1993) konnte bei Insemination eine VSL von über 30  $\mu\text{m/s}$  und bei IVF eine VSL von über 25  $\mu\text{m/s}$  als prognostisch günstig für eine erfolgreiche Fertilisierung nachweisen.

Die VSL der motilen Spermatozoen bei Normozoospermie und Oligozoospermie war bei den eigenen Experimenten durch die Zugabe von Ptx nach dem Auftauen erhöht. In den stimulierten Gruppen lag sie immer über den von Davis et al. (1991) und Hinney et al. (1993) für eine wahrscheinliche Fertilisierung angegebenen Werten. In der nicht stimulierten Gruppe fiel die VSL nach einer Stunde unter diese Werte ab.

Für eine effektive Mukuspenetration wurde ein Mindestwert der VSL von 25  $\mu\text{m/s}$  für notwendig nachgewiesen (Mortimer & Swan, 1995). Die Daten dieser Studie deuten aber darauf hin, dass die Migrationsfähigkeit der Spermatozoen zur Eizelle insgesamt durch Ptx gesteigert werden könnte. Diese positive Wirkung des Ptx konnte auch im Bovine-cervical-mucus-penetrability-Test (BCMP) beobachtet werden. Nach Zugabe des Pentoxifyllin bei Ejakulaten mit Asthenozoospermie wurde das bessere Durchdringen des Zervikalschleimes nachgewiesen (Nassar et al., 1999). Die Mukuspenetration ist bei der intrauterinen Insemination jedoch nicht mehr von Bedeutung.

### **4.1.3 Einfluss von Ptx auf die Linearität und das LHD**

#### **4.1.3.1 Der Einfluss von Ptx auf die Linearität bei Normo- und Oligozoospermie**

Die Linearität stellt das Produkt aus VCL und VSL dar. Sie gibt die Gradlinigkeit einer Bewegung an. Der Effekt von Ptx auf die Linearität wurde unterschiedlich beschrieben.

Bei Ejakulaten mit normaler Qualität wurde eine Abnahme der Linearität nach Zugabe von Ptx gefunden (Lewis et al., 1993, Tournaye et al., 1994c, Sikka & Hellstrom, 1990, Paul, 1996b, Calogero et al., 1998, Nassar et al., 1999). Diese konnte auch für Ejakulate mit pathologischen Werten, sowie bei durch Kryokonservierung geschädigten Ejakulaten gezeigt werden (Hammitt et al., 1989, Mbizvo et al., 1993, Kay et al., 1993). Andererseits ist aber auch eine Zunahme (Sikka & Hellstrom, 1991) oder keine Änderung der Linearität durch Ptx beschrieben worden (Aribarg et al., 1994, Lewis et al., 1994, Sharma & Agarwal, 1997).

In der Gruppe mit Normozoospermie fand sich in den eigenen Experimenten keine eindeutige Tendenz mit Erhöhung oder Erniedrigung im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben. Die Linearität war jedoch zu allen drei Zeitpunkten in den stimulierten und nicht stimulierten Gruppen im Vergleich zu den nicht konservierten nativen Proben erhöht. Dieser Effekt schien somit unabhängig von der Zugabe des Pentoxifyllin zu sein. Vielmehr war er vermutlich auf den Konservierungsvorgang oder das Kryoprotektivum zurückzuführen.

In einem Vergleich der Linearität von Spermatozoen gesunder Spender und Patienten wurden unterschiedliche Werte gefunden. So betrug die Linearität im gesunden Kollektiv 53, während bei infertilen Männern ein Wert von 46 nachweisbar war (Knuth & Nieschlag, 1988). In einer weiteren Studie wurde für die Linearität ein Grenzwert von 30 beschrieben, um zwischen fertilen und infertilen Männern zu unterscheiden (Vantman et al., 1989).

Andere Autoren konnten für die Linearität als Vorhersagewert für eine Fertilisierung oder Schwangerschaft keine Aussagekraft nachweisen (Bongso et al., 1989, Larsen et al., 2000).

In den eigenen Versuchen konnte bei Normozoospermie kein Einfluss von Ptx auf die Linearität gefunden werden.

Bei Oligozoospermie fiel die Linearität ohne Stimulation innerhalb einer Stunde deutlich ab. Nach einer Stunde zeigte die Gruppe ohne Stimulation Werte unter 30 bzw. 46, wie sie bei pathologischen Ejakulaten zu finden waren (Knuth & Nieschlag, 1988, Vantman et al., 1989). Mit Ptx war der Abfall der Linearität deutlich verlangsamt. Durch die Stimulation mit Pentoxifyllin wurde die Linearität nach einer Stunde auf einem signifikant höheren Niveau, wie es bei gesunden Spendern zu beobachten war, gehalten.

#### **4.1.3.2 Der Einfluss von Ptx auf das LHD/ALH bei Normo- und Oligozoospermie**

Der energiereichere Kopfausschlag der Spermatozoen und seine erweiterte Amplitude soll der Zelle das Durchdringen dichter Strukturen, wie des stark viskösen Zervixmucus und der Zona pellucida ermöglichen. Es fand sich eine positive Korrelation von intensiviertem Kopfausschlag und verstärkter Flagellenbewegung (Aitken, 1988, Lewis et al., 1993). Bei einem Vergleich zwischen fertilen und infertilen Paaren war zwischen dem LHD der Spermatozoen und der Schwangerschaftsrate kein Zusammenhang nachzuweisen (Larsen et al., 2000).

Nach IUI und IVF konnte jedoch der gesteigerte Kopfausschlag mit einer erhöhten Fertilität in-vivo und in-vitro korreliert werden (Irvine & Aitken 1986, Bongso et al., 1989, Barlow et al., 1991, Sukcharoen, et al. 1995). Bei dem Vergleich von Ejakulaten gesunder und infertiler Männer wurden unterschiedlich starke Kopfausschläge der Spermatozoen ermittelt. Die Spermatozoen gesunder Männer wiesen eine LHD von 3,2  $\mu\text{m}$  auf. Bei den Spermatozoen infertiler Männer wurde ein LHD von 2,5  $\mu\text{m}$  gemessen (Knuth & Nieschlag, 1988). Um nach IUI die Zona pellucida der Oozyte penetrieren zu können, sollte der Kopfausschlag der Spermatozoen einen Grenzwert von 2,5  $\mu\text{m}$  nicht unterschreiten (Mortimer & Swan, 1995). Nach IVF konnte ab einem Kopfausschlag von über 2,89  $\mu\text{m}$  eine signifikant höhere Fertilisierung erzielt werden (Bongso et al., 1989). Weiterhin wurde das LHD als Wert mit prognostischer Bedeutung für die Fertilisierungskapazität bei Spermatozoen, welche durch Nebenhodenaspiration gewonnen worden waren, beschrieben (Davis, et al. 1991).

Die Amplitude des lateralen Kopfausschlages wird durch Ptx vergrößert (Lewis et al., 1993, 94, Kay et al., 1993, Pang et al., 1993a, Tesarik et al., 1992a, Tournaye et al., 1994c, Hammitt et al., 1989, Yovich, 1993, Paul et al., 1996b, Calogero et al., 1998).

In den eigenen Untersuchungen wurde nach Kryokonservierung und dem Auftauvorgang ein gesteigertes LHD bei Normozoospermie in allen Gruppen, mit und ohne Stimulation, beobachtet. Im Vergleich mit der nicht stimulierten Gruppe waren die Kopfausschläge der Spermatozoen durch Stimulation mit Ptx deutlich erhöht. Der von Knuth & Nieschlag (1988) ermittelte Wert von 3,2  $\mu\text{m}$  für fertile Männer konnte durch Ptx nicht erreicht werden. Direkt nach dem Auftauen und nach 30 Minuten lag das LHD jedoch noch über dem für infertile Männer bestimmten Wert von 2,5  $\mu\text{m}$ . Durch Ptx ließ sich das Merkmal eines stärkeren LHD länger aufrecht erhalten als ohne Stimulation.

Durch Stimulation mit Ptx war in den eigenen Experimenten bei Oligozoospermie zu allen Zeitpunkten die Amplitude der Kopfausschläge höher als ohne Stimulation. Durch die Zugabe von Ptx direkt nach dem Auftauen lag das LHD über 3,2  $\mu\text{m}$ , wie es bei fertilen Männern zu finden war (Knuth & Nieschlag, 1988). Nach 30 Minuten lag es noch über dem für IVF günstigen Wert von 2,89  $\mu\text{m}$  (Bongso et al., 1989).

Ohne Stimulation war der gemessene Wert des LHD direkt nach dem Auftauen nur knapp über dem für infertile Männer beschriebenen Wert von 2,5  $\mu\text{m}$  (Knuth & Nieschlag, 1988, Mortimer & Swan, 1995). Er fiel bereits nach 30 Minuten deutlich unter diesen Wert ab.

Ptx führte bei Normo- und Oligozoospermie nach Kryokonservierung zu einer Steigerung des LHD. Die gemessene Amplitude der Kopfausschläge schien für eine Fertilisierung bei IVF günstiger als ohne Stimulation. Da durch Stimulation eher Werte wie bei fertilen Männern zu finden waren, könnte Ptx das Fertilisierungspotential der Spermatozoen steigern und möglicherweise die Schwangerschaftsrate erhöhen.

#### **4.2 Mögliche Fehlerquellen der Studie**

Bei den untersuchten Ejakulaten handelte es sich um das Patientengut der andrologischen Ambulanz. Die Gruppen wurden nach Konzentration in Oligozoospermie und Normozoospermie für die Studie selektiert. Patienten mit zu geringem Volumen schieden aus. Eine Unterscheidung zwischen fertilen und infertilen Patienten konnte nicht getroffen werden.

Direkt vor Konservierung wurde das Ptx der entsprechenden Probe zugesetzt. Während der Äquilibration könnten von Ptx induzierte Prozesse bereits ablaufen und zum vorzeitigen Verbrauch der Reserven führen.

Die zur Konservierung verwendeten Tubes wiesen im Vergleich zu z.B. Straws ein schlechteres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auf. Das relativ leichtere Handling und der hohe Bedarf an benötigtem Ejakulatvolumen führte aber zum Einsatz von Tubes.

Der Kryoschaden könnte sich hierdurch jedoch stärker manifestiert haben. Die Ergebnisse der Studie hätten möglicherweise durch optimierte Voraussetzungen bessere Werte gezeigt. Sie hätten näher an oder noch deutlicher über den mit CASA ermittelten Grenzwerten für Ejakulate mit guter Fertilisierungskapazität liegen können.

Bei der Auswertung mit CASA sollten die zu untersuchenden Bildsequenzen zufällig ausgewählt werden. Eine unbewusste Selektionierung der Ausschnitte durch den Untersucher kann nicht ausgeschlossen werden. Bereiche einer hohen Spermatozoendichte und Motilität könnten dabei eher begünstigt worden sein.

Die Ergebnisse verschiedener CASA Systeme sind nur bedingt vergleichbar. So konnte nach Analyse mit dem Hamilton-Thorn System ein signifikanter Unterschied zwischen der linearen Motilität bei Männern mit und ohne erfolgreicher Fertilisation nach IVF gezeigt werden. Das auch in den eigenen Versuchen verwendete Strömberg Mika System ergab dagegen bei den gleichen Patienten keine signifikante Differenz. Ursache waren die unterschiedlichen, von den Herstellern empfohlene Einstellung der Sollwerte (Hinney et al., 1993).

### **4.3 Weitere Effekte von Ptx**

Die Wirkung von Ptx ist nicht nur allein auf die oben beschriebenen Motilitätsparameter beschränkt. Es wurden schädigende und protektive Einflüsse auf Zellen beschrieben. Die physiologischen Zellfunktionen von Spermatozoen und Oozyten können durch Ptx beeinflusst werden. Es finden sich Auswirkungen in Tests, welche die Fertilisierungsfähigkeit der Spermatozoen prüfen. Da sich somit bei den Methoden der assistierten Reproduktion negative Effekt des Ptx manifestieren können, sollte auch hierauf eingegangen werden.

#### **4.3.1 Toxischer Einfluss von Ptx**

In der Gruppe der Methylxanthine sind zytotoxische Effekte bekannt (Lander et al., 1988). Für Koffein wurde eine Schädigung der Spermatozoen gezeigt (Lanzafame et al., 1994). Es ergaben sich außerdem Hinweise auf mutagene Eigenschaften (Spindle & Wu, 1985). Aufgrund dieser Beobachtung wurde auch die Anwendung von Pentoxifyllin wegen möglicher toxischer Wirkungen diskutiert (Tournaye et al., 1993a, Tournaye et al., 1993b, Tournaye et al., 1993c, Tournaye et al., 1995). Grundsätzlich muss zwischen einem toxischen Effekt mit Auswirkung auf die Vitalität der Spermatozoen und einer möglichen Schädigung durch Alteration des Genoms unterschieden werden (s.u.).

#### **4.3.1.1 Zytotoxische Effekte von Ptx**

Zytotoxische Effekte auf Säugetierzellen sind für Dosierungen des Ptx über 5 mg/ml beschrieben worden (Slamenová et al., 1994). Auch für Spermatozoen ist eine Schädigung durch Ptx bekannt, die sich durch elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen der Ultrastruktur der Zellmembran manifestiert (Brennan & Holden, 1995). Ab einer Konzentration von ca. 5 mg/ml konnten erste toxische Effekte mit Einfluss auf die Motilitätsparameter beobachtet werden. Die Schädigung ging mit einer Abnahme der Geschwindigkeit, der Linearität und des Anteiles der motilen Spermatozoen einher. Der sensibelste Indikator für die Schädigung schien die Abnahme der VCL zu sein (Moohan et al., 1993, Centola et al., 1995). Mit weiterer Steigerung der Konzentration des Ptx bis zu 10 mg/dl war ein kompletter Abfall der Motilitätsparameter zu beobachten (Centola et al., 1995).

In der eigenen Studie wurde Ptx in einer Endkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Der toxische Bereich wurde nicht erreicht.

#### **4.3.1.2 Mutagener Effekt von Ptx**

Die Fähigkeit zur Hemmung der DNA-Synthese durch Ptx wurde beschrieben (Painter, 1977). Nach zweistündiger Inkubation von Hamsterzellen mit Ptx unter Verwendung eines metabolischen Aktivators (S9) war die Anzahl von Chromosomenaberrationen erhöht. Ein mutagener Effekt in einer Dosierung bis zu 9 mg/ml konnte jedoch nicht beobachtet werden (Ray et al., 1991, Slamenová et al., 1994). Weiterhin konnte eine morphologische Transformation embryonaler Hamsterzellen nach Inkubation mit Ptx in-vitro nicht gezeigt werden (Slamenová et al., 1994).

#### **4.3.1.3 Einfluss auf Oozyten und Embryo**

Insbesondere bei IVF ist der Kontakt von Ptx mit den Oozyten möglich, falls es nach Inkubation nicht durch Auswaschen entfernt wurde. Die Maturation von in-vitro fertilisierten Mäuseoozyten wurden durch Ptx in der frühen Zygote beeinträchtigt (Yovich, 1993, Tournaye et al., 1993b, Tournaye et al., 1993c, Dimitriadou et al., 1995). Nach Exposition mit Ptx kann die Fertilisierungsrate von Mäuseoozyten bei IVF reduziert sein (Yovich, 1993).

Wurde das Ptx durch Waschen aus dem Ejakulat entfernt, so war weder eine Reduktion der Fertilisierung, eine gesteigerte Abortrate, die Schädigung der Föten, noch eine vermehrte Teratogenität nach der Verwendung von Ptx bei IUI und IVF zu beobachten (Yovich et al., 1988,

et al., 1990, Yovich, 1993, Hammitt et al., 1989, Sikka & Hellstrom, 1991, Ord et al., 1992, Dimitriadou et al., 1995, Tarlatzis et al., 1995, Tournaye et al., 1994d, Tournaye et al., 1995, Negri et al., 1996)

#### **4.3.1.4 Bedeutung der Toxizität von Ptx bei Insemination und der assistierten Fertilisation**

Die Toxizität von Pentoxifyllin ist gering (Ward & Clissold, 1987). Durch den Waschvorgang zur Entfernung des Kryoprotektivums, z.B. Verdünnung mit Medium, Zentrifugation und Resuspension oder auch durch Verdünnung wird die verbleibende Restkonzentration in den mmol-Bereich verschoben. Eine theoretische, toxische Auswirkung wird zunehmend unwahrscheinlicher (Tasdemir et al., 1993, Pang et al., 1993b, Tournaye et al., 1995). Durch das Waschverfahren selbst kann eine Reduktion der Motilität bis zu 10% und mehr beobachtet werden (Wang et al., 1993, Verheyen et al., 1993, Aitken & Clarkson, 1987, Bongso et al., 1993).

Bei Verfahren wie IUI wird während der Migration durch den Uterus zum Tubenisthmus die Konzentration von Ptx hinreichend reduziert. Würden mit Ptx stimulierte Spermatozoen bei IVF ohne weitere Aufarbeitung mit der Oozyte inkubiert, so könnten an der Oozyte erhöhte Konzentration von Ptx erreicht werden. Das vorherige Waschen des Ejakulates wird daher empfohlen. (Wang et al., 1993, Verheyen et al., 1993, Aitken & Clarkson, 1987, Bongso et al., 1993).

#### **4.3.2 Protektive Effekte von Pentoxifyllin**

Im humanen Ejakulat werden Sauerstoffradikale (ROS) durch Leukozyten und Spermatozoen erzeugt. Zu den ROS werden Wasserstoffperoxide, Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Hydroperoxylradikale und Nitridoxide gezählt (Sharma & Agarwal, 1996, WHO, 1999). Bei Ejakulaten mit pathologischen Charakteristika wurde eine übermäßige Erhöhung dieser hochreaktiven Sauerstoffradikale gefunden (Aitken & Clarkson, 1987, Aitken, 1988, Aitken et al., 1989). Auch nach Induktion der akrosomalen Reaktion durch Zugabe von Kalzium-Ionophor (A23187) konnte eine exzessive Steigerung der ROS in Ejakulaten mit normaler Qualität und bei Oligozoospermie beobachtet werden (Aitken & Clarkson, 1987, Aitken et al., 1989, Aitken & West, 1991, Gavella et al., 1991).

Der Zusammenhang zwischen einer exzessiven Erhöhung der ROS und der eingeschränkten Funktion der Spermatozoen wurde aufgrund der Ergebnisse im Hamster-Oozyten-Penetrations-Test (HOP) angenommen (Gavella et al., 1991).



Durch die ROS werden ungesättigte Fettsäuren der Zellmembran peroxidiert und Proteine denaturiert (Gavella et al., 1991, Gavella & Lipovac, 1992, Mc Kinney et al., 1996). Es resultiert eine Störung der Zellfunktion (Aitken et al., 1988). Unter anderem ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, bzw. die Fähigkeit zur akrosomalen Reaktion gestört (Gavella et al., 1991, Gavella & Lipovac, 1994, Sharma & Agarwal, 1996).

Alterationen der DNA mit Strangbrüchen wurden durch hohe Konzentrationen von ROS gefunden (Emiliani et al., 2001)

Die Neutralisation der Oxidantien durch das enzymatische Zellschutzsystems der Spermatozoen wurde durch Kryokonservierung reduziert (Alvarez & Storey, 1992, Lasso et al., 1994).

Ptx verringerte als Antioxidant in Konzentrationen von 3,7 mmol/ml bis 10 mmol/ml signifikant die Bildung von Peroxiden (Gavella et al., 1991, Gavalla & Lipovac, 1992, Mc Kinney et al., 1996). Eine Reduktion der peroxidierten Membranlipide durch Pentoxifyllin konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Bell et al., 1993, Wang et al., 1994).

Für Ejakulate mit normaler Qualität wurde schon ab einer Ptx-Konzentration von 1 mmol/ml ein protektiver Einfluss nach Kryokonservierung nachgewiesen. Die elektronenmikroskopisch gezeigten Alterationen der Köpfe waren in Anwesenheit von Ptx deutlich verringert (Brennan & Holden, 1995). Es wurde ein verminderter Akrosomenverlust nach Kryokonservierung gefunden. Die Anzahl der intakten Zellen, welche noch in der Lage waren, akrosomal zu reagieren, wurde durch Pentoxifyllin erhöht (Esteves et al., 1998).

Beim HOS-Test wird die Integrität der Plasmamembran von Spermatozoen beurteilt. Es fand sich eine hohe Korrelation zwischen dem Anteil der im hypoosmotischen Medium physiologisch schwellenden Plasmamembranen und der Fähigkeit zur Kapazitation, bzw. Oozytenpenetration (Jeyendran et al., 1984). Nach Kryokonservierung war mit einer Konzentration von 3 mmol/ml Ptx keine Steigerung des Anteiles der Spermatozoen mit Schwellverhalten im HOS-Test zu finden (Check et al., 1995, Stanic et al., 2002).

Wurde Ptx als mögliches Protektivum vor Kryokonservierung zugegeben, konnte im Vergleich zu Proben, bei denen keine Zugabe erfolgt war, eine höhere Vitalität mit angehobener Motilität und gesteigerten Geschwindigkeiten beobachtet werden (Wang et al., 1993, Bell et al., 1993, Brennan & Holden, 1995). Ptx konnte aber auch eine negative Wirkung aufweisen. Mit steigender Inkubationszeit vor der Kryokonservierung war ein zunehmender Abfall der Motilität und Anstieg

der akrosomal reagierten Spermatozoen nach dem Auftauen bei Versuchen an Widderspermatozoen zu finden (Maxwell et al., 1995).

In der eigenen Studie wurde im Vergleich der vor Konservierung stimulierten Proben mit den nicht stimulierten Proben nach dem Auftauen eine signifikante Steigerung bei einigen Motilitätsparametern gefunden. Dieses war sowohl bei Normozoospermie als auch Oligozoospermie zu beobachten.

#### **4.3.3 „Burn out-Phänomen“ durch Ptx**

Die durch Ptx gesteigerte Aktivität der Spermatozoen ist durch cAMP vermittelt (Enginsu et al., 1994). Durch die erhöhte intrazelluläre Glykolyse kommt es in der Zelle zu einem höheren Energieumsatz mit Verbrauch der Energiereserven (Hicks et al., 1972, Rees et al., 1990). Dieses als „burn out“ beschriebene Phänomen kann zum vorzeitigen Aktivitätsabfall der Spermatozoen führen (Yovich et al., 1990, Tesarik et al., 1992a, Tournaye et al., 1993a). Bei geschädigten Spermatozoen kann dieser Effekt früher auftreten (Shen et al., 1991). Nach Kryokonservierung wurde aber auch eine länger anhaltende Aktivität durch Stimulation mit Ptx als ohne Stimulation beschrieben (Aribarg et al., 1994)

In dieser Studie war ohne Stimulation nach dem Auftauen bereits nach einer Stunde ein deutlicher Abfall der Motilitätsparameter zu beobachten. Im Gegensatz zur nicht stimulierten Gruppe waren die Werte der mit Ptx stimulierten Gruppen auch nach einer Stunde deutlich höher. Über den Zeitraum von einer Stunde war kein „burn out“ zu beobachten. Möglicherweise hätte ein längerer Beobachtungszeitraum einen Abfall der Werte der stimulierten Spermatozoen unter die der nicht stimulierten Spermatozoen gezeigt.

Die Stimulation nach dem Auftauen erschien im Vergleich zur Stimulation vor Konservierung vorteilhafter. Die Parameter waren stärker angehoben, die Wirkung fiel langsamer ab. Während der Äquilibration der Proben bis zur eigentlichen Einlagerung ist es dagegen offensichtlich schon zum Verbrauch von Energiereserven gekommen.

#### **4.3.4 Hyperaktivierung durch Ptx**

Die Hyperaktivierung drückt die Vorbereitung der Zelle zur Befruchtung aus. Sie wird während der Kapazitation durchlaufen. Kennzeichen der hyperaktiven Motilität sind ein kräftigerer, gehäufte Flagellenschlag, eine erhöhte Amplitude des lateralen Kopfausschlages der

Spermatozoen und eine verminderte progressive Bewegung (Mbizvo et al., 1990, Pang et al., 1993b). Die Hypermotilität soll der Zelle behilflich sein, den zervikalen Mukus zu durchdringen, sich vom krypten- und faltenreichen Epithel der Tuben zu lösen und die visköse Eileiterflüssigkeit zu durchschwimmen. Die Penetration der relativ harten Zona pellucida wird begünstigt (Yanagimachi et al., 1994).

Je höher die Zahl der zur Befruchtung vorbereiteten Zellen, desto wahrscheinlicher ist die Erfolgsquote einer tatsächlichen Befruchtung. Die Hyperaktivierung der Zellen eines Ejakulates korrelierte mit der Fertilisierungsfähigkeit (Kay et al., 1993, Johnston et al., 1994). In den jeweiligen Tests (HOP, HZA, ZPA, s. 4.3.6) konnte eine gesteigerte Bindung oder Penetration beobachtet werden (Wang et al., 1991, Yogev et al., 1995a).

Pentoxifyllin konnte eine Hyperaktivierung der Spermatozoen bedingen. Dabei war die Hyperaktivierung durch den gesteigerten cAMP-Spiegel vermittelt (Calogero et al., 1998).

Dieses Phänomen wurde sowohl für Normo-, Oligo- und Asthenozoospermie (Pang et al., 1993a, Kay et al., 1993, Yovich, 1993, Wang et al., 1994, Tournaye et al., 1994c, Centola et al., 1995, Paul et al., 1996b, Esteves et al., 1998, Nassar et al., 1999) als auch Kryosperma beobachtet (Mbizvo et al., 1993, Kay et al., 1993, Johnston et al., 1994). Bei Asthenozoospermie war die Aktivierungsrate niedriger als bei Normozoospermie (Tournaye et al., 1994b). Dennoch wurde auch in Proben mit reduzierter Motilität ein besseres Durchdringen des zervikalen Mukus im „Bovine cervical mucus penetrability test“ (BCMP) nach Stimulation mit Ptx gezeigt (Nassar et al., 1999).

#### **4.3.5 Der Einfluss von Ptx auf die akrosomale Reaktion (AR)**

Die Fähigkeit zur akrosomalen Reaktion ist eine wichtige Voraussetzung für die Fusion mit der Eizelle (Tesarik, 1989, Liu & Baker, 1992). Die Induktion der akrosomalen Reaktion kann unter anderem durch cAMP erfolgen (Zaneveld et al., 1991, De Jonge et al., 1991a, b, Yanagimachi, 1981, Yovich et al., 1990). Da Ptx das intrazelluläre cAMP erhöht, wurde der Effekt dieser Substanz auf die akrosomale Reaktion ebenfalls untersucht. Bei Normozoospermie konnte jedoch keine oder nur gering signifikante Erhöhung der AR durch Ptx gezeigt werden (Tesarik et al., 1992b, Morales et al., 1993, Tasdemir et al., 1993, Kay et al., 1994, Ford et al., 1994, Maxwell et al., 1995).

Die Induktion der AR ist außerdem durch Aktivierung der Adenylatzyklase  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (De Jonge et al., 1991, Kay et al., 1994, Ford et al., 1994). Nach Kapazitation der Spermatozoen kann die AR durch natürliche Stimuli wie Folikularflüssigkeit (FF), Zona pellucida Protein (ZP3) oder künstliche Stimuli wie Kalzium-Ionophor (A23187) induziert werden. Es werden aber auch Spermatozoen mit ausbleibender AR auf diese Stimuli beobachtet. Nach Tesarik & Mendoza, (1993) liegt dann eine akrosomale Insuffizienz vor. Pentoxifyllin kann den Anteil der akrosomal reagierten Zellen bei akrosomaler Insuffizienz nach Induktion mit FF oder A23187 erhöhen (Tesarik et al., 1992b, Tesarik & Mendoza, 1993). Der Anteil der Spermatozoen, bei welchem eine akrosomale Reaktion erfolgreich induziert werden kann, korreliert positiv mit einer erfolgreichen Fertilisation nach IVF (Fenichel et al., 1991, Cummins et al., 1991, Tasdemir et al., 1993, Yovich et al., 1994). Bei Spermatozoen mit akrosomaler Insuffizienz sind durch Ptx gesteigerte Fertilisierungsraten nach IVF gezeigt worden (Tesarik et al., 1992b, Tesarik & Mendoza, 1993, Tasdemir et al., 1993, Yovich et al., 1994, Ford et al., 1994).

Proben mit z.B. Asthenozoospermie zeigten allerdings eine beschleunigte Reaktion der AR auf Ptx. Eine vorzeitig ablaufende AR könnte bei IUI und IVF zur Verschlechterung der Fertilisierungsrate führen (Tesarik & Mendoza, 1993).

#### **4.3.6 Einfluss von Ptx auf physiologische Funktionen der Spermatozoen**

Die physiologische Funktion der Spermien ist die Fertilisierung der Oozyte. Dieser Vorgang kann in sogenannten Bio-Assays beurteilt werden. Zu diesen Tests gehören der Hamster-Ovum-Penetrations-Test und der Hemi-Zona-Binding-Assay.

##### **4.3.6.1 Die Wirkung von Ptx auf Spermatozoen im Hamster-Ovum-Penetrations-Test (HOP; Sperm-Penetration-Assay (SPA))**

Beim HOP-Test werden denudierte, von der Zona pellucida befreite Hamstereizellen mit Spermatozoen andrologischer Patienten inkubiert (Yanagimachi et al., 1979). Die Auswertung erfolgt mikroskopisch. Dabei werden Eizellen mit dekondensierten Spermatozoenköpfen/männlichen Pronuclei mit jeweilig zugehörigem Flagellum als penetriert bewertet (Schill & Bollmann, 1986, Lambert et al., 1992). Die Anzahl der Penetrationen gibt Auskunft über das Befruchtungspotential von Spermatozoen eines Patienten (Cohen et al., 1982).

Durch Ptx wurde die Häufigkeit der Penetrationen nach Aufarbeitung mit Swim up gesteigert. Dieses konnte sowohl für Normozoospermie, Oligozoospermie als auch Asthenozoospermie gezeigt werden (Lambert et al., 1992, Morales et al., 1993). Wurde Ptx in Kombination mit Folikularflüssigkeit (FF) inkubiert, so waren deutlich mehr Bindungen zu registrieren. Gerade Ejakulate mit Asthenozoospermie schienen stärker auf die Stimulation anzusprechen (Lambert et al., 1992).

Verwendete man Ptx bei Kryosperma in Kombination mit einem AR-Induktor (A23187), zeigte sich eine deutliche Steigerung der Penetrationen im HOP-Test (Ford et al., 1994). Dies konnte auch für zonafreie menschliche Eizellen gezeigt werden (Tesarik & Mendoza, 1993).

#### **4.3.6.2 Die Wirkung von Ptx auf Spermatozoen im Sperm-Binding-Assay (SBA) und beim Hemi-Zona-Binding-Assay (HZB/HZA)**

Beim SBA werden mehrere humane Oozyten nach Entfernen der Kumuluszellen und Corona radiata gleichzeitig einem Testejakulat und einer fertilen Kontrollgruppe präsentiert (Liu et al., 1988). Die Konzentration der Ejakulate sind einander durch Aufbereitung angeglichen und mit verschiedenen Fluorochromen markiert.

Beim HZB wird die Zona pellucida einer Oozyte unter dem Mikroskop in zwei gleich große Hemisphären geteilt (Burkman et al., 1988). Beide Hälften können vergleichend mit Spermatozoen eines Patienten oder fertilen Spenders (Kontrolle) inkubiert werden (Paul et al., 1996a).

Die Auswertung des SBA und des HZB erfolgt durch Identifikation der an die Zona pellucida gebundenen Zellen. Ein gutes Testergebnis hängt vom Anteil motiler, kapazitierter Spermatozoen mit intakter Kopfstruktur ab. Der HZB wird von einigen Autoren als optimale Methode zur Beurteilung der Bindungskapazität von Spermatozoen angesehen (Liu & Baker, 1992, Yogev et al., 1995a, b).

Bei Proben, welche einen erniedrigten Bindungsindex aufwiesen, konnte durch Zugabe von Ptx das Ergebnis im HZB und SBA optimiert werden (Chiang et al., 1992, Yogev et al., 1995a, b, Moohan et al., 1996). Beim HZB zeigte sich bei einer Konzentration von 3 mmol/ml Ptx eine Steigerung der an die Zona pellucida gebundenen Spermatozoen von bis zu 20% (Paul et al., 1996a). Dieser steigernde Effekt konnte sowohl für Normozoospermie, Oligozoospermie und Asthenozoospermie nachgewiesen werden. Proben mit normalem Bindungsindex sprachen

weniger stark auf Ptx an (Chiang et al., 1992, Yogev et al., 1995a, b). Bei Teratozoospermie zeigte sich keine verbesserte Bindung nach Inkubation der Spermatozoen mit Ptx im HZB (Kaskar et al., 1994).

Bei manchen Ejakulaten fand sich im HZB und im SBA kein Effekt oder sogar ein negativer Einfluss aufgrund einer zu früh ablaufenden akrosomalen Reaktion nach Stimulation mit Ptx (Yogev et al., 1995a, Moohan et al., 1996).

### **4.3.7 Die Wirkung von Ptx bei intrauteriner Insemination und Methoden der assistierten Fertilisation**

#### **4.3.7.1 Die Wirkung von Ptx bei IUI**

Für eine erfolgreiche Fertilisierung ist bei IUI eine hohe und ausreichend lang bestehende Motilität der Spermatozoen von Bedeutung (Denil et al., 1992). Bei infertilen Männern kann ein schnellerer Abfall der Motilitätsparameter beobachtet werden (Denil et al., 1992).

Pentoxifyllin beeinflusst die für die Migration im weiblichen Genitaltrakt wichtigen Motilitätscharakteristika. Bei Oligozoospermie führte Ptx zu einer gesteigerten Schwangerschaftsrate, während sich ein Vorteil bei Normozoospermie nicht fand (Negri et al., 1996). Andererseits zeigten Tarlatzis et al. (1995), dass Ptx sowohl bei Ejakulaten mit unauffälligen als auch pathologischen Spermogrammen eine Steigerung der Schwangerschaftsrate bewirken konnte. Die Stimulation mit Pentoxifyllin war dabei anderen Aufarbeitungsmethoden wie Swim up oder Percoll signifikant überlegen (Sharma & Agarwal, 1997).

Kryogeschädigtes Sperma weist eine schlechte „recovery rate“ mit reduzierter Fertilität auf (Crister et al., 1987, Keel et al., 1987, Centola et al., 1992, Verheyen et al., 1993, Brennan & Holden, 1995). Die Fertilisierungsfähigkeit fällt zudem nach dem Auftauen schnell ab (Overstreet & Drobins, 1993). Weiterhin ist bei Proben mit Astheno-, Oligo- und Teratozoospermie der schädigende Effekt der Kryokonservierung stärker ausgeprägt (Beck & Silverstein, 1975, Mc Laughlin et al., 1992a, Glassman & Bennett, 1980).

Es wurde eine gesteigerte Fertilisierungsrate für Kryosperma nach IUI durch die Behandlung mit Ptx gezeigt (Johnston et al., 1994). In dieser Studie wurde sowohl bei Normozoospermie als auch bei Oligozoospermie eine Optimierung der Motilität, Geschwindigkeit und Bewegungsintensivität

erzielt. Im Vergleich zu den nicht behandelten Proben war der Abfall dieser Motilitätsparameter verzögert.

Unter dem Einfluss von Ptx kann aber die akrosomale Reaktion frühzeitig ablaufen (Tesarik et al., 1992b). Es besteht somit die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der intrauterinen Insemination die AR bereits abgeschlossen ist und es hierdurch zu einer Minderung der Fertilisierungsfähigkeit kommt (Yanagimachi, 1981).

#### **4.3.7.2 Die Wirkung von Ptx bei IVF-ET**

Der Zusammenhang zwischen den Motilitätsparametern, wie z.B. einer hohen Motilität oder der VCL, und einem positiven Ergebnis nach IVF, ist bekannt (Mahadevan et al., 1984, Tesarik & Testart, 1989, Bongso et al., 1989, Barlow et al., 1991, Rhemrev et al., 2001). Es wurden erhöhte Fertilisierungsraten für Ejakulate mit normaler und pathologischer Qualität nach Stimulation mit Ptx nachgewiesen (Yovich et al., 1988, et al., Hammitt et al., 1989, Oehninger et al., 1988, Yovich et al., 1990, Fountain et al., 1995, Edirisinghe et al., 1995). Andere Studien konnten keine gesteigerten Fertilisierungsraten mit Ptx zeigen (Tournaye et al., 1993a, Tournaye et al., 1994a, Tournaye et al., 1994b, Tournaye et al., 1995, Dimitriadou et al., 1995).

Bei Ejakulaten, welche aufgrund einer zu schlechten Qualität für IVF nicht in Frage gekommen wären, wurden nach Stimulation mit Ptx Schwangerschaften erzielt (Lacham-Kaplan & Trouson, 1993, Ord et al., 1992). Die Stimulation mit Ptx war im Vergleich mit anderen Aufbereitungsmethoden wie Swim up oder Percoll bei Normo-, Oligo-, und Asthenozoospermie signifikant überlegen (Yovich et al., 1988, Yovich et al., 1990, Tarlatzis et al., 1995, Ord et al., 1992).

In der eigenen Studie wurde durch Stimulation mit Ptx eine signifikante Steigerungen der Motilitätsparameter sowohl bei Normo- als auch Oligozoospermie erreicht. Diese Verbesserung der Qualität könnte auf eine gesteigerte Fertilisierungsrate durch Ptx nach IVF hindeuten.

#### **4.3.7.3 Die Wirkung von Ptx bei der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI)**

ICSI ist seit ihrer Einführung als Technik der assistierten Reproduktion bei hochgradiger Einschränkung der Spermaqualität etabliert (Check et al., 2000, Nagy, 2000, Monzo et al., 2001, Westlander et al., 2001). Es wird theoretisch eine einzige lebende Spermatozoe pro Oozyte zur Fertilisierung benötigt (Barros et al., 1997). Zur Identifikation vitaler Spermatozoen wird die Motilität von Spermatozoen herangezogen (Casper et al., 1996, Barros et al., 1997, El-Nour et al.,

2001). Bei komplettem Verlust der Spermatozoenmotilität gelingt eine Fertilisierung bei über 50% nicht (Robert et al., 1996, Barros et al., 1997, Vandervorst et al., 1997).

Bei Ptx-Stimulation von Ejakulaten mit normaler Qualität werden bei ICSI keine gesteigerten Fertilisierungs- und Schwangerschaftsraten erzielt (Liu et al., 1994). Die Anwendung von Ptx bietet aber die Möglichkeit, vitale Spermatozoen zu erkennen. Durch den schnellen Wirkungseintritt von Ptx können bei völliger Immotilität lebende Spermatozoen unter Umständen nach Induktion der Beweglichkeit identifiziert werden (Mendoza et al., 2000, Terriou et al., 2000, Janzen et al., 2001, Windt et al., 2002, Hovav et al., 2002). Es wurden eine Fertilisierungsrate von 64,7% und eine Schwangerschaftsrate von 40% gefunden. Sie waren höher als nach Testung der Vitalität durch den HOS-Test (Esteves et al., 1996, Mendoza et al., 2000).

Bei den eigenen Untersuchungen war die Globalmotilität bei Oligozoospermie nach Kryokonservierung durch Ptx signifikant erhöht. Durch Zugabe von Ptx wurde durch Induktion einer Bewegung der Anteil der für ICSI potentiell zur Verfügung stehenden Zellen angehoben.



## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Als Folge des Gefrier- und Auftauprozesses bei der Kryokonservierung resultiert eine Schädigung menschlicher Spermatozoen. Es können morphologische, funktionelle und biochemische Veränderungen beobachtet werden. Der schädigende Effekt ist bei Proben mit reduzierter Spermaqualität stärker ausgeprägt. Zur Verbesserung der Qualität kann Pentoxifyllin (Ptx), ein Methylxanthinderivat, mit Einfluss auf verschiedene Motilitätsparameter eingesetzt werden. Durch Hemmung der intrazellulären Phosphodiesterase wird der Abbau des zyklischen Adenosin 3,5-monophosphats (cAMP) vermindert. cAMP wirkt als second-messenger und führt zu einer Steigerung der Motilität, einem erhöhten Energieumsatz sowie einer Induktion der akrosomalen Reaktion.

In dieser Arbeit wurde bei 62 Patienten mit Normo- und 21 Patienten mit Oligozoospermie der Effekt von 3,6 mmol/ml Pentoxifyllin auf die Motilitätsparameter kryokonservierter Spermatozoen untersucht. Ptx wurde entweder vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen zugegeben. Die Auswertung erfolgte durch computer-assistierte Samenanalyse (CASA) direkt, 30 und 60 Minuten nach dem Auftauvorgang.

Bei Patienten mit Normo- und Oligozoospermie führte die Stimulation mit Ptx zu einer Steigerung der Globalmotilität, des Anteils der linear motilen Spermatozoen, der Geschwindigkeiten „straight line velocity“ (VSL), „curvilinear velocity“ (VCL) und „average path velocity“ (VAP) sowie des lateral head displacements (LHD). Für die Linearität war ein steigender Effekt nur bei Oligozoospermie nachzuweisen. Die Stimulation mit Ptx schien insgesamt bei Zugabe nach dem Auftauen und bei den Ejakulaten mit Oligozoospermie ausgeprägter.

Durch die Stimulation mit Ptx konnte nach Kryokonservierung eine Optimierung der meisten Motilitätsparameter erreicht werden. Dabei wurden die für eine erfolgreiche Fertilisierung oder Schwangerschaft in der Literatur beschriebenen Grenzwerte im Vergleich zu den nicht stimulierten Proben durch Stimulation eher erreicht oder überschritten. Dieses konnte bei Normozoospermie für die Globalmotilität, die VSL und VCL und bei Oligozoospermie für die VSL und das LHD gezeigt werden. Anhand der nach Stimulation mit Ptx gesteigerten Motilitätsparameter scheinen höhere Fertilisierungs- und Schwangerschaftsraten nach IUI und IVF durch Ptx wahrscheinlich. Die schnell einsetzende Wirkung von Ptx könnte weiterhin zur Identifikation vitaler Spermatozoen nach Kryokonservierung für ICSI genutzt werden.

## 5.2 Zusammenfassung (englisch)

Cryopreservation of human spermatozoa causes morphological, functional und biochemical damage. Alteration is more detrimental in patients with poor semen quaility. Pentoxifylline (Ptx), a methylxanthinderivative, increases sperm motility characteristics by inhibiting phosphodiesterase which leads to an increased intracellular cyclic adenosin 3'5' monophosphat level (cAMP). cAMP enhances sperm motility and consumption of energy reserves. Acrosome reaction is also induced by cAMP.

In this study sperm motility charcteristics of spermatozoa from 62 normozoospermic und 21 oligozoospermic patients were analyzed immediately, 30 and 60 minutes postthaw by a computer-assisted sperm analyzer (CASA). Samples were stimulated by 3,6 mmol/ml Ptx prefreeze or postthaw.

Pentoxifylline treated samples with normo- and oligozoospermia showed a significant increase in sperm motility, progressive motile spermatozoa, straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) and lateral head displacement (LHD). There was no positive effect on linearity in cases with normozoospermia, but a positive effect was observed in oligozoospermic samples. Stimulation with Ptx was shown to be more effective postthaw and in patients with oligozoospermia.

A literature search demonstrated cut-offs of sperm movement characteristics assessed by CASA which were correlated with fertilization rates after artificial insemination (AI) and IVF. In our study, motility, VSL and VCL in normozoospermic samples and VSL and LHD in oligozoospermic ejaculates were found to exceed these thresholds by stimulation with Ptx. This improved sperm motility may lead to higher fertilization and pregnancy rates after AI und IVF.

The immediate effect of Ptx on sperm motility could be used as a simple and reliable method to obtain living spermatozoas following the freeze- thaw process for intracytoplasmic sperm injections (ICSI).

## 6 Literatur

Aitken RJ, Clarkson JS, Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa, *Journal of Reproduction & Fertility* (1987), 81: 459-469

Aitken RJ, Assessment of sperm function for IVF, *Human Reproduction* (1988), 3: 89-95

Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW, Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia, *Journal of Andrology* (1989), 10: 214-220

Aitken RJ, West KM, Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on percoll gradient, *International Journal of Andrology* (1991), 13: 433-451

Alfredsson JH, Gudmundsson SP, Snaedal G, Artificial insemination by donor with frozen semen. *Obstetric and Gynecological Survey* (1983), 38: 305-313

Alvarez JG, Storey BT, Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation, *Journal of Andrology* (1992), 13: 232-241

Aribarg A, Sukcharoen N, Jetsawangsi U, Ngeamvijawat J, Effects of pentoxifyllin on sperm motility characteristics and motility longevity of postthaw cryopreserved semen using computer-assisted semen analysis, *Journal of the Medical Association of Thailand* (1994), 77: 71-75

Barlow P, Delvigne A, Dromme J van, Hoeck J van, Vendenbosch K., Leroy F, Predictive value of classical and automated sperm analysis for in-vitro fertilization, *Human Reproduction* (1991), 6: 1119-1124

Barros A, Sousa M, Angelopoulos T, Tesarik J, Efficient modification of intracytoplasmic sperm injection technique of cases with total lack of sperm movement, *Human Reproduction* (1997), 12 : 1227-1229

Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J, Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm, *Archives of Andrology* (1990), 25: 29-40

Beck WW Jr, Silverstein I, Variable motility recovery of spermatozoa following freeze preservation, *Fertility & Sterility* (1975), 26: 863-867

Bell M, Wang R, Wayne JB Hellstrom, Sikka SC, Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane and lipid peroxidation and recovery of motile human sperm, *Journal of Andrology* (1993), 14: 472-478

Bollendorf A, Check JH, Lurie D, Evaluation of the effect of the absence of sperm with rapid and linear progressive motility on subsequent pregnancy rates following intrauterine insemination or in vitro fertilization, *Journal of Andrology* (1996), 17: 550-557

Bongso TA, Ng SC, Mok H, Lim MN, Teo HL, Wong PC, Ratnam SS, Effect of sperm motility on human in vitro fertilization, *Archives of Andrology* (1989), 22: 185-190

Bongso A, Jarina AK, Ho J, Ng SC, Ratnam SS, Comparative evaluation of three sperm washing methods to improve sperm concentration and motility in frozen-thawed oligozoospermic and normozoospermic samples, *Archives of Andrology* (1993), 31: 223-230

Bosman E, du Toit D, Wessels PH, Bornman MS, du Plessis DJ, Sperm adenosine triphosphate concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis, *Archives of Andrology* (1994), 33: 7-10

Brennan AP, Holden CA, Pentoxifylline-supplemented cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation, *Human Reproduction* (1995), 10: 2308-2312

Brotherton J, Cryopreservation of human semen, *Archives of Andrology* (1990), 25: 181-195

Bunge RG, Caffeine-stimulation of ejaculated human spermatozoa, *Urology* (1973), 1: 371

Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Krugen TF, Rosenwaks Z, Hogen GD, The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential, *Fertility & Sterility* (1988), 49: 688-701

Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S, Dágata R, Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline, *Human Reproduction* (1998), 13: 911-915

Casper RF, Merriano JS, Javi KA, The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia, *Fertility & Sterility* (1996), 65: 972-976

Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH, Cryopreservation of human semen, *Journal of Andrology* (1992), 13: 283-288

Centola GM, Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility, *Archives of Andrology* (1996), 36: 1-7

Centola GM, Cartie RJ, Cox C, Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifylline with demonstration of toxicity, *Journal of Andrology* (1995), 16: 136-142

Check ML, Check JH, Long R, Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane, *Archives of Andrology* (1991), 27: 155-160

Check DJ, Kiefer D, Katsoff D, Check JH, Effect of pentoxifylline added to freezing media on subsequent post-thaw hypoosmotic swelling test and other semen parameters, *Archives of Andrology* (1995), 35: 161-163

Check ML, Check JH, Katsoff D, Summers-Chase D, ICSI as an effective therapy for male factor with antisperm antibodies, *Archives of Andrology* (2000), 45: 125-130

Chiang PH, Tsai EM, Shen MR, Chang JC, Lin YC, Huang CH, Chiang CP, Effects of pentoxifylline in the hamster zona-free oocyte spermatozoa penetration assay and on spermatozoa transmembrane migration motility, *European Urology* (1992), 21: 151-154

Cohen J, Mooyaart M, Vreeburg JTM, Zeilmaker GH, Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters, *International Journal of Andrology* (1982), 5: 210-224

Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD, Cryopreservation of human spermatozoa. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction, *Fertility & Sterility* (1987), 47: 656-663

Cross NL, Hanks SE, Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes, *Human Reproduction* (1991), 6: 1279-1283

Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge (ARIC). Relationship to fertility and other semen parameters, *Journal of Andrology* (1991), 12: 98-103

Davis RO, Overstreet JW, Asch RH, Ord T, Silber SJ, Movement characteristics of human epididymal sperm used for fertilization of human oocytes in vitro, *Fertility & Sterility* (1991), 56: 1128-1135

Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW, Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival, *Fertility & Sterility* (1995), 63: 1051-1057

De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, Zaneveld LJD, Effect of phorbol esters, synthetic diacyl glycerols and a protein kinase C inhibitor on the sperm acrosome reaction, *Journal of Andrology* (1991a), 12: 62-70

De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, Zaneveld LJD, Modulation of human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate/cyclic AMP second-messenger pathway, *Journal of Experimental Zoology* (1991b), 258: 113-125

Dimitriadou F, Rizos D, Mantzavinos T, Arvaniti K, Voutsina K, Prapa A, Kanakas N, The effect of pentoxifylline on sperm motility, oocyte fertilization, embryo quality, and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program, *Fertility & Sterility* (1995), 63(4): 880-886

Eddy EM, O'Brien DA, The spermatozoon, In: *The physiology of reproduction*, sec. ed., Raven Press, Ltd., New York (1994): 29-76

Edirisinghe WR, Junk S, Yovich JM, Bootsma B, Yovich JL, Sperm stimulants can improve fertilization rates in male-factor cases undergoing IVF to the same extent as micromanipulation by partial zona dissection (PZD) or subzonal sperm insemination (SUZI): a randomized controlled study, *Journal of Assisted Reproduction & Genetics* (1995), 12: 312-318

El-Nour AM, Al Mayman HA, Jaroudi KA, Coskun S, Effects of the hypo-osmotic swelling test on the outcome of intracytoplasmic sperm injection for patients with only nonmotil spermatozoa available for injection: a prospective randomized trial, *Fertility & Sterility* (2001), 75: 480-484

Emiliani S, Bergh M van den, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y, Evidence of reduced single-stranded testicular sperm DNA from obstructive azoospermic men after 3 days of in-vitro culture, *Human Reproduction* (2001), 16: 1200-1203

Enginsu ME, Menheere PCA, Evers JLH, Geraedts JPM, Effect of pentoxifylline on intracellular sperm cAMP concentration, *Molecular Andrology* (1994), 6: 163-169

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ jr, Agarwal A, Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate, *Human Reproduction* (1998), 13: 3384-3389

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ jr, Agarwal A, Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm, *Fertility & Sterility* (1996), 66: 798-804

Fawcett DW, *The Mammalian Spermatozoon*, *Developmental Biology* (1975), 44: 394-436

Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL, Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization, *Fertility & Sterility* (1991), 55: 994-999

Fisch B, Kaplan-Kraicer R, Amit S, Zukerman Z, Ovadia J, Tadir Y, The relationship between sperm parameters and fertilizing capacity in vitro: a predictive role for swim-up migration, *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* (1990), 7: 38-44

Fisch JD, Behr B, Conit M, Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors, *Human Reproduction* (1999), 13: 1248-1254

Ford WC, Rees JM, McLaughlin EA, Ling L, Hull MG, Pentoxifylline acts synergistically with A23187 to increase the penetration of zona-free hamster oocytes by cryopreserved human spermatozoa, *International Journal of Andrology* (1994), 17: 199-204

Fountain S, Rizk B, Avery S, Palmer C, Blayney M, Macnamee M, Mills C, Brinsden P, An evaluation of the effect of penoxifylline on sperm function and treatment outcome of male-factor infertility: a preliminary study, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, (1995), 12: 704-709

Friberg J, Nilsson O, Motility and morphology of human sperms, In: *Current problems in fertility*, Edited by A Ingelman-Sundberg, NO Lunell, New York, Plenum Press (1971): 17-22

Gavella M, Lipovac V, Marotti T, Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm, *International Journal of Andrology* (1991), 14: 320-327

Gavella M, Lipovac V, Pentoxifylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa, *Andrologia* (1992), 24: 37-39

Glassman AB, Bennett CE, Semen analysis: criteria for cryopreservation of human spermatozoa, *Fertility & Sterility* (1980), 34: 66-67

Graham EF, Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: *The integrity of frozen spermatozoa*, National Academy of Sciences, Washington (1978): auf Seite 4

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP, Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive, *Journal of Andrology* (1990), 11: 73-88



Hammit DG, Bedia E, Rogers PR, Syrop CH, Donovan JF, Williamson RA, Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen, *Fertility & Sterility* (1989), 52: 495-502

Hellstrom WJG, Sikka SC, Pentoxifylline stimulates the movement characteristics of cryopreserved sperm. *Surgical Forum* (1989), 40: 648-650

Hicks JJ, Pedron N, Rosado A, Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid, *Fertility & Sterility* (1972), 23: 886-893

Hinney B, Wike G, Michelmann HW, Prognostic value of an automated sperm analysis in IVF or insemination therapy, *Andrologia* (1993), 25: 195-202

Hinting A, Comhaire F, Schoonjans BS, Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men, *Fertility & Sterility* (1988), 50: 635-639

Hinting A, Comhaire F, Vermeulen L, Dhont M, Vermeulen A, Vandekerckhove D, Value of sperm characteristics and the result of in-vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction, *International Journal of Andrology* (1990), 13: 59-66

Holt WV, North RD, Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study, *Journal of Experimental Zoology* (1984), 230: 473-483

Holt WV, Moore HDM, Hillier SG, Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays, *Fertility & Sterility* (1985), 44: 112-119

Holt WV, Shenfield F, Leonard T, Hartman TD, North RD, Moore HDM, The value of sperm swimming speed measurements in assessing the fertility of human frozen spermatozoa, *Human Reproduction* (1989), 4: 292-297

Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Sato A, Yazawa H, Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon, *Fertility & Sterility* (1995), 63: 1241-1245

Hovav Y, Yaffe H, Zenter B, Dan-Goor M, Almagor M, The use of ICSI with fresh and cryopreserved electroejaculate from psychogenic anejaculatory men, *Human Reproduction* (2002), 17: 390-392

Irvine DS, Aitken RJ, Predictive value of in-vitro sperm function tests in the context of an AID service, *Human Reproduction* (1986), 1: 539-545

Ishikawa H, Tomomasa H, Yshii S, Koiso K, Tajima Y, Okamura N, Sugita Y, Correlation between the sperm motility and the adenylate cyclase activity in infertile men, *Andrologia* (1989), 21: 437-440

Janzen N, Goldstein M, Schlegel PN, Palermo GD, Rosenwaks Z, Hariprashad J, Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia, *Fertility & Sterility* (2000), 74: 696-701

Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJD, Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, *Journal of Reproduction & Fertility* (1984), 70: 219-228

Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJD, Effect of cryopreservation in the presence of glycerol on motility and fertilizing capacity of human spermatozoa determined by in vitro human hamster test system, *Andrologia* (1982), 3: 241-248

Johnston RC, Mbizvo MT, Summerbell D, Kovacs GT, Baker HW, Relationship between stimulated hyperactivated motility of human spermatozoa and pregnancy rate in donor insemination: a preliminary report, *Human Reproduction* (1994), 9: 1684-1687

Kaskar K, Franken DR, Van der Horst G, Kruger TF, The effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics and zona pellucida binding potential of teratozoospermic men, *Human Reproduction* (1994), 9: 477-481

Kay VJ, Coutts JRT, Robertson L, Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa, *Human Reproduction* (1993), 8: 727-731

Kay VJ, Coutts JRT, Robertson L, Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction, *Human Reproduction* (1994), 9: 2318-2323

Keck C, Nieschlag E, Die Bedeutung der Kryokonservierung von Spermien als therapiebegleitende Maßnahme bei onkologischen Erkrankungen, *Fertilität* (1992), 5: 1-19

Keel BA, Webster BA, Roberts DK, Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa, *Journal of Reproduction & Fertility* (1987), 81: 213-220

Knuth UA, Nieschlag E, Bewegungsmessung von Spermien durch automatische Bildanalyse, *Fertilität* (1988), 4: 5-12

Köhn FM, Henkel R, Schill WB, Pentoxifyllin stimuliert die Motilität von Spermatozoen nach Kryokonservierung, *Fertilität* (1993), 9: 79-84

Kolodziej FB, Donnerhack A, Katzorke TH, Propping D, Die Lagerungszeit als Einflussgröße auf die Wiederbelebungsrate der Spermatozoen nach Kryokonservierung, *Fertilitätsforschung bei Tumorpatienten: kryobiologische Aspekte. Fortschritte der Fertilitätsforschung* (1987), 14: 61 – 65

Kolon TF, Philips KA, Buch JP, Pentoxifylline enhancement of post-thaw motility in cryopreserved semen of spinal cord-injured men, *International Journal of Fertility* (1995), 40: 156-160

Lacham-Kaplan O, Trouson A, The effects of the sperm motility activators 2-deoxyadenosine and pentoxifylline used for sperm micro-injection on mouse and human embryo development, *Human Reproduction* (1993), 8: 945-952

Lambert HL, Steinleitner A, Eiserman J, Serpa N, Cantor B, Enhanced gamete interaction in the sperm penetration assay after coincubation with pentoxifylline and human follicular fluid, *Fertility & Sterility* (1992), 58: 1205-1208

Lander N, Soloway AH, Minton JP, Rawal BD, Gairola CC, Potential metabolic mutagens of caffeine and various methylxantines, *Journal of Pharmacology and Science* (1988), 77: 955-958

Lanzafame F, Chapman MG, Guglielmino A, Gearon CM, Forman RG, Pharmacological stimulation of sperm motility, *Human Reproduction* (1994), 9: 192-199

Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwereman A and "The Danish First Pregnancy Planner Study Team", Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population, *Human Reproduction* (2000), 15: 1562-1567

Lasso, JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT, Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation, *Journal of Andrology* (1994), 15: 255-265

Lewis SE, McKinney KA, Thompson W, Influence of pentoxifylline on human sperm motility in asthenozoospermic individuals using computer-assisted analysis, *Archives of Andrology* (1994), 32: 175-183

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W, Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis, *Fertility & Sterility* (1993), 59: 418-423

Liu DY, Lopata A, Johnston WI, Baker HWG, A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro, *Fertility & Sterility* (1988), 50: 782-788

Liu DY, Baker HWG, Tests of human sperm function and fertilization in vitro, *Fertility & Sterility* (1992), 58: 465-483

Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, van Steirteghem AC, Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa, *Human Reproduction* (1994), 9: 1127-1130

Mack SR, Zaneveld LJD, Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa, *Gamete Research* (1987), 18: 375-383

Mahadevan MM, Trounson AO, The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization, *Fertility & Sterility* (1984), 42: 400-405

Marrama P, Baraghini GF, Carani C, Celani MF, Giovenco P, Grandi F, Monanini V, Further studies on the effects of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligo-asthenozoospermia, *Andrologia* (1985), 17: 612-616

Matson PL, Yovich JM, Edirisinghe WR, Junk SM, Yovich JL, An argument for the past and continued use of pentoxifylline in assisted reproductive technology, *Human Reproduction* (1995), 10: 67-71

Maxwell WMC, Robinson SJ, Roca J, Molinia FC, Sanchez-Partida LG, Evans G, Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein, *Journal of Reproduction & Fertility* (1995), 7: 1081-1087

Mbizvo MT, Johnston RC, Baker GHW, The effect of the motility stimulants, caffeine, pentoxifylline, and 2-deoxyadenosine on hyperactivation of cryopreserved human sperm, *Fertility & Sterility* (1993), 59: 1112-1117

Mc Kinney KA, Lewis SE, Thompson W, Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility, after drug removal, in normozoospermic and asthenozoospermic individuals, *Andrologia* (1994), 26: 235-240

Mc Kinney KA, Lewis SE, Thompson W, The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa, *Andrologia* (1996), 28: 15-20

Mc Laughlin EA, Ford WCL, Hull MGR, Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa, *Journals of Reproduction & Fertility* (1992a), 95: 527-534

Mc Laughlin EA, Ford WCL, Hull MGR, The contribution of the toxicity of a glycerol-egg-yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation, *Journals of Reproduction & Fertility* (1992b), 95: 749-754

Mendoza de MVH, González-Utor AL, Cruz N, Gutiérrez P, Cascales F, Sillero JM, In situ use of pentoxifyllin to assess sperm vitality in intracytoplasmic sperm injection for treatment of patients with total lack of sperm movement, *Fertility & Sterility* (2000), 74: 176-177

Monzo A, Kondylis F, Lynch D, Mayer J, Jones E, Nehchiri F, Marsl M, Schuffner A, Muasher S, Gibbons W, Oehninger S, Outcome of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients: stressing the liason between the urologist and reproductive medicine specialist, *Urology* (2001), 58: 69-75

Moohan JM, Winston RML, Lindssy KS, Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline, *Human Reproduction* (1993), 8: 1696-1700

Moohan JM, Effect of pentoxifylline on the sperm zona pellucida binding ability of normozoospermic individuals, *ACDS (Advances in Contraception-Delivery-Systems)* (1996), 12: 179-186

Morales P, Llanos M, Yovich JL, Cummins JM, Vigil P, Pentoxifylline increases sperm penetration into zona free hamster oocytes without increasing the acrosome reaction, *Andrologia* (1993), 25: 359-362

Mortimer ST, Swan MA, Kinematics of capacitating human spermatozoa analysed at 60 Hz, *Human Reproduction* (1995), 10: 873-879

Nagy ZP, Sperm centriole dysfunction and sperm immotility, *Molecular and Cellular Endocrinology* (2000), 166: 59-62

Nassar A, Morshedi M, Mahony M, Srisombut C, Lin MH, Oehninger S, Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia, *Andrologia* (1999), 31: 9-15

Negri P, Grechi E, Tomasi A, Fabbri E, Capuzzo A, Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination, *Human Reproduction* (1996), 11: 1236-1229

Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E, Computerized semen analysis with sperm tail detection, *Human Reproduction* (1990a), 5: 19-23

Neuwinger J, Knuth UA, Nieschlag E, Evaluation of the Hamilton-Thorn 2030 motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic, *International Journal of Andrology* (1990b), 13: 100-109

Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T, Effects of superoxide dismutase on mouse in vitro fertilization and embryo culture system, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (1992), 9: 274-280

Oehninger S, Acosta A, Morshedi M, Veeck L, Swanson RJ, Simmons K, Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertility & Sterility* (1988), 50: 283-287

Ord T, Marelllo E, Patrizio P, Balmaceda JP, Silber SJ, Asch RH, The role of the laboratory in the handling of epididymal sperm for assisted reproductive technologies, *Fertility & Sterility* (1992), 57: 1103-1106

Overstreet JW, Drobnis EZ, Sperm transport in the female genital tract. In: Barratt, CLR and Cooke, ID (eds), *Donor Insemination* (1993), Cambridge University Press, Cambridge, UK: 33-49

Painter RB, Rapid test to detect agents that damage human DNA, *Nature* (1977), 265: 650-651

Pang SC, William DB, Huang T, Wang C, Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivated motility in vitro: A preliminary report, *Fertility & Sterility* (1993a), 59: 465-467

Pang SC, Chan PJ, Lu A, Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen, *Fertility & Sterility* (1993b), 60: 336-343

Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS, Action of pentoxifylline directly on semen, *Human Reproduction* (1995), 10: 354-359

Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS, The paradoxical effects of pentoxifylline on the binding of spermatozoa to the human zona pellucida, *Human Reproduction* (1996), 11: 814-819

Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS., Factors affecting pentoxifylline stimulation of sperm kinematics in suspensions, *Human Reproduction* (1996b), 11: 1929-1935

Pedersen H, Further observations on the fine structure of the human spermatozoon, *Zellforschung Mikroskopie Anatomie* (1972), 123: 305-315

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, *Fertility & Sterility* (1985), 44: 493-498

Ray B, Nice L, Williams J, Grant S, McDermott A, Hull M, Preliminary testing of pentoxifylline prior to use in an IVF programme using sister chromatid exchange analysis, *Journal of Reproduction & Fertility* (1991), 7: auf Seite 48

Rees JM, Ford, WCL, Hull MGR, Effect of caffeine and pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa, *Journal of Reproduction & Fertility* (1990), 90: 147-156

Rhemrev JPT, Lens JW, McDonnell J, Schoemaker J, Vermeiden JPW, The postwash total progressively motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during in vitro fertilization treatment, *Fertility & Sterility* (2001), 76: 884-891

Richter MA, Haning RV Jr, Shapiro SS, Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen, the patient as her own control. *Fertility & Sterility* (1984), 41: 277-280

Richter W, Dettmer D, Glander H, Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa, *Molecular Human Reproduction* (1999), 5: 732-736

Robert CF, Cowan L, James MS, Lucato ML, Keith JA, The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia, *Fertility & Sterility* (1996), 65: 972-976



Schill WB, Der Einfluss der kryobiologischen Behandlung von Humansperma auf die Aktivität der akrosomalen Protease Akrosin, *Andrologie* (1973), 5: 333-337

Schill WB, Acrosin activity of cryo-preserved human spermatozoa, *Fertility & Sterility* (1975), 26: 711-720

Schill WB, Bollmann W, Spermakonservierung, Insemination, In-vitro-Fertilisation, Urban & Schwarzenberg (1986): 3-6, 23-81

Serafini PC, Hauser D, Moyer D, Marrs RP, Cryopreservation of human spermatozoa: correlations of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova, *Fertility & Sterility* (1986), 46: 691-695

Sharma RK, Agarwal A, Role of reactive oxygen species in male infertility, *Urology* (1996), 48: 835-850

Sharma RK, Tolention MV Jr, Thomas AJ Jr, Agarwal A, Optimal dose and duration of exposure to artificial stimulants in cryopreserved human spermatozoa, *Journal of Urology* (1996a), 155: 568-573

Sharma RK, Tolention MV Jr, Agarwal A, Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation, *Urology* (1996b), 47: 77-81

Sharma RK, Kohn S, Padron OF, Agarwal A, Effect of artificial stimulants on cryopreserved spermatozoa from cancer patients, *Journal of Urology* (1997), 157: 521-524

Sharma RK, Agarwal A, Influence of artificial stimulation on unprocessed and percoll-washed cryopreserved sperm, *Archives of Andrology* (1997), 38: 173-179

Shen MR, Chiang PH, Yang RC, Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy, *British Journal of Clinical Pharmacology* (1991), 31: 711-714

Sherman JK, History of artificial insemination and the development of human semen banking, Aus: The integrity of frozen spermatozoa, National Academy of sciences, Washington (1978): 201-207

Sikka SC, Hellstrom WJG, Functional evaluation and motility parameters of pentoxifylline-stimulated cryopreserved human sperm. Assisted Reproductive Technology/Andrology (1990), 1: 309-319

Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG, Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility, Journal of Andrology (1995), 16: 464-468

Sikka SC, Hellstrom WJ, The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation, Journal of Andrology (1991), 12: 165-170

Slamenova D, Dusinska M, Gabelova A, Horvathova E, Oravec C, Chalupa I, Szabova E, Assessment of toxicity, clastogenicity, mutagenicity and transforming activity of pentoxifylline in mammalian cells cultured in vitro, Mutation Research (1994), 322: 275-285

Spindle A, Wu K, Developmental and cytogenetic effects of caffeine on mouse blastocysts, alone or in combination with benzo(a)pyrene, Teratology (1985), 32: 213-218

Stanic P, Sonicki Z, Suchanek E, Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa, International Journal of Andrology (2002), 25: 186-190

Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ, Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination, Fertility & Sterility (1995), 63: 1293-1300

Tarlatzis BC, Kolibianakis EM, Bontis J, Tousiou M, Lagos S, Mantalenakis S, Effect of pentoxifylline on human sperm motility and fertilizing capacity, Archives of Andrology (1995), 34: 33-42

Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T, Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro, Human Reproduction (1993), 8: 2102-2107

Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R, Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2000), 17: 194-199

Tesarik J, Testart J, Human sperm-egg interaction and their disorders: implications in the management of infertility, *Human Reproduction* (1989), 4: 729-741

Tesarik J, Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon, *Human Reproduction* (1989), 4: 957-961

Tesarik J, Thebault A, Testart J, Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens, *Human Reproduction* (1992a), 7:1257-1263

Tesarik J, Menodza C, Carreras A, Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm, *Fertility & Sterility* (1992b), 58: 1185-1190

Tesarik J, Menodza C, Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency, *Fertility & Sterility* (1993), 60: 141-148

Tournaye H, Janssens R, Camus M, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem A, Pentoxifylline is not useful in enhancing sperm function in cases with previous in vitro fertilization failure, *Fertility & Sterility* (1993a), 59: 210-215

Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A, Effects of pentoxifylline on in-vitro development of preimplantation mouse embryos, *Human Reproduction* (1993b), 8: 1475-1480

Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A, Effects of pentoxifylline on implantation and post-implantation development of mouse embryos in vitro, *Human Reproduction* (1993c), 8: 1948-1954

Tournaye H, Janssens R, Verheyen G, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A, An indiscriminate use of pentoxifylline does not improve in-vitro fertilization in poor fertilizers, *Human Reproduction* (1994a), 9: 1289-1292

Tournaye H, Wieme P, Janssens R, Verheyen G, Devroey P, Van-Steirteghem A, Incubation of spermatozoa from asthenozoospermic semen samples with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine: variability in hyperactivation and acrosome reaction rates, *Human Reproduction* (1994b), 9: 2038-2043

Tournaye H, Janssens R, Devroey P, Van Steirteghem A, The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospermic semen, *International Journal of Andrology* (1994c), 17: 1-8

Tournaye H, Janssens R, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, In vitro fertilization in couples with previous fertilization failure using sperm incubated with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine, *Fertility & Sterility* (1994d), 62: 574-579

Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, Janssens R, Van Steirteghem A, Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology, *Human Reproduction* (1995), 10: 72-77

Tucker MJ, Chan YM, Wong CJM, Routine intrauterine insemination and the effect of spermatozoal washing as assessed by computer assisted semen analyzer, *International Journal of Fertility* (1991), 36: 113-120

Turner EA de, Aparicio NJ, Turner D, Schwarzstein L, Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosin 3'5'-monophosphate, and a  $\beta$ -blocking agent on human sperm motility, *Fertility & Sterility* (1978), 29: 328-331

Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P, Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection, *Human Reproduction* (1997), 12 : 2429-2433

Vantman D, Denison L, Banks SM, Sherins RJ, Koukoulis G, Assessment of sperm motility characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer assisted semen analyser, *Fertility & Sterility* (1989), 51: 156-161

Verheyen G, Pletinckx I and Van Steirteghem A, Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm, *Human Reproduction* (1993), 8: 1678-1684

Wang C, Leung A, Tsoi WL, Leung J, Ng V, Lee KF, Evaluation of human sperm hyperactivated motility and its relationship with the zona-free hamster oocyte sperm penetration assay, *Journal of Andrology* (1991), 12: 253-257

Wang R, Sikka SC, Veeraragavan K, Bell M, Hellstrom JGW, Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants, *Fertility & Sterility* (1993), 60: 711-715

Wang R, Bell M, Hellstrom JG Wayne, Sikka SC, Post-thaw sperm motility, cAMP concentration and membrane lipid peroxidation after stimulation with pentoxifylline and platelet -activating factor, *International Journal of Andrology* (1994), 17: 169-173

Ward A, Clissold SP, Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* (1987), 37: 50-97

Westlander G, Rosenlund B, Soderlung B, Wood M, Bergh C, Sperm retrieval, fertilization, and pregnancy outcome in repeated testicular sperm aspiration, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2001), 18: 171-177

WHO, Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, (1993) The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge

WHO, Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleimhautinteraktion. 4. Auflage, Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 1999

Windt ML, Coetzee K, Kruger FG, Menkveld R, Van MJ, Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa from men with azoospermia, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2002), 19: 53-59

Yanagimachi R, Lopata A, Odom CB, Bronson RA, Mahi CA, Nicolson GL, Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for the assessing the fertilizing capacity of spermatozoa, *Fertility & Sterility* (1979), 51: 562-574

Yanagimachi R, Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Biggers JD (eds.) *Fertilization and embryonic development in vitro*, Plenum Press, New York (1981): 81-182

Yanagimachi R, Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Markert CL, Greenwald GS, Pfaff DW, editors. *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York (1994): 189-317

Yogev L, Gamzu R, Botchan A, Homonnai ZT, Amit A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H, Pentoxifylline improves sperm binding to the zona pellucida in the hemizona assay, *Fertility & Sterility* (1995a), 64: 146-149

Yogev L, Homonnai ZT, Gamzu R, Amit A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H, The use of hemizona assay in the evaluation of the optimal sperm preparation technique, *Human Reproduction* (1995b), 10: 851-854

Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL, Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility, *Fertility & Sterility* (1988), 50: 179-181

Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL, Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility, *Fertility & Sterility* (1990), 53: 715-722

Yovich JL, Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction, *Human Reproduction* (1993), 8: 1786-1791

Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL, Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study, *Fertility & Sterility* (1994), 61: 902-910

Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR, Human sperm capacitation and the acrosome reaction, *Human Reproduction* (1991), 6: 1265-1274

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill möchte ich herzlich die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung der Proben und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. F.-M. Köhn für seine gute Betreuung trotz seines Ortswechsels, sowie seine Geduld.

Großen Dank schulde ich Frau cand. med. vet. Nadja Mertens für die Einarbeitung und Unterstützung. Gleiches gilt für Frau Dr. rer. nat. Petra Baltes und Herrn Dipl. biol. Uwe Schalles für wertvolle Ratschläge und Hilfestellung.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des andrologischen Forschungslabors des Zentrums für Dermatologie und Andrologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Pabst vom Institut für medizinische Informatik und Statistik (Leiter: Prof. Dr. Dudeck) danke ich für die statistische Beratung.

## 8 Lebenslauf

Name: Franz Stefan Biber  
Geburtsdatum: 01.03.1969 zu Ulm  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: verheiratet, römisch-katholisch  
Eltern: Dipl. ing. Franz Georg Biber  
Helga Biber, geb. Nepp  
Schulbildung: 1975 - 1979 Grundschule Budesheim  
1979 - 1988 Georg-Büchner-Gymnasium Bad Vilbel  
Allgemeine Hochschulreife  
Wehrdienst: 1988 - 1989 1. Inst. Bat. 7, Glückauf-Kaserne Unna  
Studium: 1989 - 1996 Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen  
1991 Ärztliche Vorprüfung  
1992 1. Staatsexamen  
1994 2. Staatsexamen  
1996 3. Staatsexamen, Gesamtnote der Examina: 2,16  
Dissertation: 01/1993 Beginn der Doktorarbeit am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität zu Gießen, Betreuer: PD Dr. Köhn  
Approbation: 03.12.1997  
Arzt im Praktikum: 01.06.1996 - 30.11.1997 bei Chefarzt Dr. A. Lehmköster, Plastische Chirurgie und Handchirurgie, St. Marien Hospital Vreden  
Assistenzarzt: 01.12.1997 - 30.09.2001 bei Chefarzt Dr. A. Lehmköster, Plastische Chirurgie und Handchirurgie, St. Marien Hospital Vreden  
seit dem 01.10.2001 Assistenzarzt bei Chefarzt Prof. Dr. R. R. Olbrisch, Plastische Chirurgie, Florence-Nightingale Krankenhaus Düsseldorf/Kaiserswerth