

Beeinflussung der Motilität humaner Spermatozoen mittels verschiedener Chelatbildner in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nicolai Wroblewski
aus Gießen

Gießen 2000

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
-Hautklinik-
Abteilung allgemeine Dermatologie und Andrologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Priv. Doz. Dr. R. Henkel

Gutachter: Prof. Dr. W. Weidner

Tag der Disputation: 19. November 2001

**Für meine Eltern,
Petra und Klaus,
für
Finn und Claudia**

Folgende Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Abstracts:

1. N Wroblewski, W Miska, W Weidner, W-B Schill, R Henkel (2001) Influence on human sperm motility by addition of different chelators. 26. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 22.-23.02.2001, Gießen, Germany, Abstractbook p.46
2. R Henkel, N Wroblewski, W Miska and W-B Schill (2001) Dose-dependent effect of different chelators on motility of human spermatozoa. 45th Akademiese Jaardag, University of Stellenbosch, South Africa, 22.-23-08.2001, Abstractbook
3. N Wroblewski, R Henkel, W Miska and W-B Schill (2001) Dosisabhängige Wirkung unterschiedlicher Chelatbildner auf die Motilität humaner Spermatozoen. 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 06.-08.09.2001, Berlin, Germany, Andrologia (accepted)

Poster:

1. N Wroblewski, R Henkel, W Miska and W-B Schill (2001) Dosisabhängige Wirkung unterschiedlicher Chelatbildner auf die Motilität humaner Spermatozoen. 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 06.-08.09.2001, Berlin, Germany, Andrologia (accepted)

Lectures:

1. N Wroblewski, W Miska, W Weidner, W-B Schill, R Henkel (2001) Influence on human sperm motility by addition of different chelators. 26. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, 22.-23.02.2001, Gießen, Germany
2. R Henkel, N Wroblewski, W Miska and W-B Schill (2001) Dose-dependent effect of different chelators on motility of human spermatozoa. 45th Akademiese Jaardag, University of Stellenbosch, South Africa, 22.-23-08.2001

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1.	Die Spermatogenese	3
1.2.	Die Reifung im Nebenhoden	4
1.3.	Das Ejakulat	5
1.4.	Aufbau der Spermatozoen	6
1.5.	Die Motilität der Spermatozoen	8
1.6.	Die Rolle von Zink im männlichen Geschlechtstrakt	9
1.7.	Zinkzugabe zu Spermatozoen	10
1.8.	Zielsetzung dieser Arbeit	10
2.	Material und Methoden	12
2.1	Ausgangsmaterial und Probengewinnung	12
2.2.	Verwendete Gefäße und Gebrauchsgegenstände	12
2.3.	Kulturmedium und Lösung	12
2.3.1.	Human-Tubular-Fluid (HTF)-Medium nach Quinn et al. (1985)	13
2.3.2.	KCl-Lösung	14
2.4.	Aufarbeitung der Spermatozoen	14
2.4.1.	Swim-up	14
2.5.	Messung der Motilitätsparameter mit der Computergestützten Motilitätsanalyse (CASA)	15
2.5.1	Der Meßvorgang an dem SM-CMA	18
2.6.	Zugabe von ZnSO ₄ zum Medium	18
2.6.1.	Präparation der Spermatozoen	18
2.6.2.	Ansätze und Analyse der Motilitätsparameter	18
2.7.	Messung des Einflusses von verschiedenen Chelatoren auf die Motilität von Spermatozoen	21
2.7.1.	Die Chelatbildner	21
2.7.1.1.	DL-Penicillamin	21
2.7.1.2.	2,3 Dimercaptopropan-1-sulfonat-Na (DMPS)	22
2.7.1.3.	2,3,- Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)	23
2.7.1.4.	Das Oligopeptid von Metallothionein "Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala"	23
2.7.2.	Vorbereitung der Ansätze	23
2.7.3.	Versuch zur Eliminierung von Zink aus humanen Spermatozoen	24
2.7.3.1.	Inkubation von Spermatozoen mit den Chelatbildnern über einen Beobachtungszeitraum von 6 Stunden	24
2.7.3.2.	Inkubation mit Chelatbildnern und anschließende Bestimmung der Zinkkonzentration	26
2.7.3.3.	Vorbereitung der Proben für die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	26
2.8.	Bestimmung von Zink in Spermatozoen mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	28
2.8.1.	Vorbereitung der Proben	29
2.8.2.	Kalibrierung der AAS	29
2.8.3.	Messung der Proben	30
2.9.	Statistische Auswertung	30

3.	Ergebnisse	31
3.1.	Zugabe von Zinksulfat zu Spermatozoen in vitro	31
3.2.	Wirkung der Chelatkomplexbildenden Substanzen auf die Motilitätsparameter von humanen Spermatozoen in vitro bei einer Inkubationszeit von bis zu 6 Stunden	34
3.2.1.	Das Oligopeptid von Metallothionein "Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala"	34
3.2.2.	Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)	39
3.2.3.	Dimercaptopropan-1-sulfonat-Na (DMPS)	43
3.2.4.	DL-Penicillamin	48
3.3.	Vergleich des Einflusses von DMPS, DMSA und DL-Penicillamin auf die Motilität von humanen Spermatozoen nach 2 Stunden Inkubationszeit	52
3.4.	Zinkkonzentration der Spermatozoen	55
4.	Diskussion	57
4.1.	Methodische Voraussetzungen	57
4.2.	Computer assisted Semen Analysis (CASA)	57
4.3.	Die Bedeutung der Motilität	59
4.4.	Die Bedeutung der Morphologie der Spermatozoen für die Motilität	60
4.5.	Generierung der Motilität der Spermatozoen	62
4.6.	Der Nebenhoden und seine Bedeutung für die Motilität der Spermatozoen	63
4.7.	Bedeutung von Metallionen für die Motilität von Spermatozoen	64
4.8.	Bedeutung des Elementes Zink für die Motilität von Spermatozoen	66
4.8.1.	Zink im Ejakulat	66
4.8.2.	Zink im Seminalplasma	67
4.8.3.	Zink im Spermatozoon	69
4.8.3.1.	Zink im Spermatozoonkopf	70
4.8.3.2.	Zink im Flagellum des Spermatozoon	70
4.9.	Funktion der Mantelfasern	75
4.10.	Die Wirkung von Zinkentzug und -zugabe auf die Motilität von Spermatozoen	75
4.10.1.	alimentärer Zinkmangel	75
4.10.2.	orale Zinkgabe	76
4.10.3.	Zinkzugabe in vitro	77
4.10.4.	Metallchelatoren	78
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literatur	87
7.	Danksagung	101
8.	Lebenslauf	102

1. Einleitung

Der Holländer van Leeuwenhoek hat 1677 das im Ejakulat Gefundene als *Animalcula*, Tierchen, bezeichnet. Daß die Spermatozoen damals als etwas lebendes (Tierchen) angesehen wurden, dürfte der Eigenschaft der Beweglichkeit zuzuschreiben sein, die die offensichtlichste Eigenschaft von Spermatozoen ist. Auch heute ist die Motilität ein Parameter, dem große Beachtung geschenkt wird. Dies wird durch die Tatsache bezeugt, daß es auch zum jetzigen Zeitpunkt viele Arbeitsgruppen gibt, die sich mit der Motilität von Spermatozoen befassen (Lindemann, 1996; Stoltenberg et al., 1997b; Sorensen et al., 1999b; Henkel et al., 1999). Die Motilität der Spermatozoen ist für die Befruchtung von entscheidender Bedeutung. Ohne sie kann der Transport des männlichen Erbguts zur Eizelle der Frau sowie die Penetration der Eizelle nicht stattfinden.

Die Erzeugung der Motilität ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Strukturen im Spermatozoenflagellum (Lindemann, 1996). Defekte oder Veränderungen dieser Strukturen können das Bewegungsmuster der Spermatozoen beeinflussen oder zum gänzlichen Verlust der Motilität führen (Ryder, 1990; Haidl & Becker, 1991). Um die Erzeugung der Spermatozoenmotilität besser zu verstehen, dadurch einen tieferen Einblick in physiologische und pathophysiologische Prozesse zu gewinnen und diese nach Möglichkeit für neue therapeutische Ansätze nutzen zu können, befaßt sich diese Arbeit mit Beeinflussungsmöglichkeiten der Motilität von humanen Spermatozoen.

1.1. Die Spermatogenese

Ein Hoden des Menschen besteht aus ca. 500 Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) mit den sie umgebenden peripheren tubulären Zellen und einem interstitiellen Kompartiment, das aus den Leydigzellen, Makrophagen, Bindegewebszellen, Blutgefäßen, Nerven und Lymphräumen besteht. Die Spermatogenese findet in den *Tubuli seminiferi* statt. Das Keimepithel der *Tubuli seminiferi* besteht zum einen aus den Stammzellen, die den Reservepool für die Bildung von Spermatozoen bilden, den daraus hervorgehenden Keimzellen in den verschiedenen Entwicklungsstufen und zum Anderen aus den Sertoli-Zellen, die neben ihrer Aufgabe als Stützgerüst auch noch nutritive und koordinative Funktionen bei der Spermatogenese besitzen.

Durch Follikel-Stimulierendes-Hormon (FSH) aus der Hypophyse angeregt, vollziehen die Spermatogonien mitotische Teilungen. Die einen der aus der Teilung hervorgegangenen Zellen differenzieren sich nicht und steht so weiterhin als Reservepool zur Verfügung. Die anderen Zellen vollziehen als primäre Spermatozyten die erste meiotische Reifeteilung und werden dadurch zu sekundären Spermatozyten. Diese vollziehen die zweite meiotische Teilung und werden zu haploiden Spermatiden. Die Spermatiden teilen sich nicht weiter, sondern differenzieren sich durch komplizierte Strukturveränderungen (Spermiogenese) zu reifen Spermatozoen, die schließlich den Verband des Keimepithels verlassen (Spermiation). Die Dauer von Beginn der Spermatogenese bis zum Ende Spermiation beträgt etwa 74 Tage, pro Tag werden so 10^7 - 10^8 Spermatozoen gebildet (Fritsch, 1998).

1.2. Die Reifung im Nebenhoden

Der 74 Tage dauernden Spermatogenese schließt sich ein 12-14 tägiger Reifungsprozeß im Nebenhoden an. Makroskopisch unterteilt man den Nebenhoden in Nebenhodenkopf (Caput Epididymis), Nebenhodenkörper (Corpus Epididymis), und Nebenhodenschwanz (Cauda Epididymis). Mikroskopisch enthält der Nebenhodenkopf 8-12 Ductuli efferentes, die auf der einen Seite über das Rete Testis mit den Tubuli seminiferi des Hoden in Verbindung stehen. Auf der anderen Seite gehen die Ductuli efferentes in den 3-6m langen Ductus epididymis über, der den Hauptteil des Nebenhodenkörpers ausmacht und im Nebenhodenschwanz in den Ductus deferens übergeht. Das Lumen dieses Gangsystems ist mit Epithelzellen ausgekleidet, die auf der einen Seite in der Lage sind eine Reihe spezifischer Substanzen wie z.B. L-Carnitin, Glycerophosphocholin, α -Glucosidase und Myoinosit zu sezernieren, auf der anderen Seite aber auch resorbierende Funktionen für z.B. tote Spermatozoen oder testikuläre Flüssigkeit besitzen. Während der Nebenhodenpassage erfahren die Spermatozoen eine biochemische und biophysiological Veränderung, die man als "Reifung" bezeichnet (Fritsch, Trenkwalder & Schill, 1985). Sowohl das Nebenhodenepithel, als auch die Nebenhodenflüssigkeit spielen hierbei eine Rolle (Glover et al., 1974; Cooper & Orgebin-Crist, 1975). Testikuläre Spermatozoen sind nicht motil und können noch keine Eizelle befruchten. Die Spermatozoen erfahren im Nebenhoden eine Veränderung des Energiemetabolismus, der Lektinrezeptoren, des Phospholipid- und Proteingehaltes, Membranstrukturen verfestigen sich und neue Rezeptoren bilden sich aus (Fritsch, 1998). In

die Membran der Spermatozoen werden Glycoproteine, Carnitin und Steroide eingelagert, die zu einer Zunahme der negativen Oberflächenladung führen (Lavon et al., 1971; Hammerstedt et al., 1979; Nicolson & Yanagimachi, 1979; Jones et al., 1980). Im Bereich des Nebenhodenschwanzes werden Spermatozoen für die Ejakulation bereitgehalten, die dort, falls es zu keiner Ejakulation kommt, auch wieder resorbiert oder in den Urin abgegeben werden können (Fritsch, 1998). Erst diese Modifikationen im Nebenhoden ermöglichen die Motilität, insbesondere die Progressivmotilität (Chevrier & Dacheux, 1988) und damit die Erlangung der Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Haidl et al., 1993; Haidl et al., 1994).

1.3. Das Ejakulat

Das Ejakulat besteht aus Spermatozoen und den Sekreten der akzessorischen Drüsen, welche sich erst bei der Ejakulation miteinander vermengen. Das Sekret der Bläschendrüsen, das ca. 60% des Ejakulates ausmacht, ist alkalisch und enthält Substanzen wie z.B. Fruktose, Prostaglandine, Trypsininhibitoren und Lactoferrin. Das Sekret der Prostata enthält z.B. saure Phosphatase, Spermin, Spermidin, Proteasen, hat einen pH - Wert von ca. 6,4 und macht ungefähr 30% des Ejakulates aus. Unter Androgeneinfluß kommt es zu einer Erhöhung von Zink, Magnesium, Ziträt und antibakteriell wirksamen Substanzen im Prostatasekret (Fritsch 1998). Die Cowper-Drüsen dienen der Antikoagulation, die Littré-Drüsen reinigen die Urethra, gemeinsam sorgen sie vor der Ejakulation für die Lubrikation der Urethra.

Das Ejakulat ohne Spermatozoen bezeichnet man als Seminalplasma. Es dient als Transportmedium der Spermatozoen und hat wichtige nutritive Funktionen (Nieschlag, 1996). Außerdem schützt es diese vor exogenen Einflüssen, wie zum Beispiel vor Oxidation. Hierbei spielt Zink, durch Hemmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, eine wichtige Rolle (Gavella et al., 1998). Neben diesen und weiteren Funktionen ist die Wirkung des Seminalplasmas jedoch noch nicht bis ins Letzte geklärt.

1.4. Aufbau der Spermatozoen

Das Spermatozoon ist die am stärksten polarisierte Zelle im Körper und gliedert sich in einen Kopf und einen Schwanz. Der Kopf hat eine längsovale Form, ist ca. 3-5 μm breit und erfüllt neben der Funktion als Träger des Erbguts wichtige Aufgaben u.a. bei der Bindung an die Eizelle sowie bei der Penetration der Eizelle (Hoshi et al., 1994). Für diese Funktionen besitzt er eine Akrosomenkappe, die etwa zwei Drittel des Kopfes überzieht und neben anderen das Enzym Akrosin enthält (Yuan et al., 1995), welches zumindest beim Menschen für die Penetration der Zona pellucida verantwortlich gemacht wird (Tesarik et al., 1987; Hedrick et al., 1988; Henkel et al., 1995).

Der Spermatozoenschwanz, das Flagellum, hat eine Länge von ca. 60 μm und ist damit ungefähr 10 mal länger als der Kopf (Cummins & Woodall, 1985). Das Flagellum gliedert sich in das dem Kopf folgende Halsstück (1 μm), das sich anschließende Mittelstück (3-5 μm), das Hauptstück (44-55 μm), und das Endstück (6-10 μm). Im Bereich des Mittelstücks befinden sich die für die aerobe Energiegewinnung notwendigen Mitochondrien in einer helicalen Anordnung. Im Bereich des Hauptstückes besteht die Umhüllung nicht nur aus der Membran, sondern zusätzlich aus der sogenannten fibrösen Hülle. Diese schließt sich im Hauptstück an die mitochondriale Hülle an und besteht aus zwei längsverlaufenden Säulen, die durch Querrippen verbunden sind (Eddy, 1988). Im sich anschließenden Endstück ist diese Struktur nicht mehr vorhanden. Das Flagellum steht über die Basalplatte mit dem Kopf in Verbindung und setzt sich aus einem zentralem Axonem und neun äußeren elastischen Längsfasern zusammen. Das Axonem besteht aus zwei zentralen Tubuli und neun peripheren Doppeltubuli. Aufgrund dieser Anordnung spricht man von einer "9+2 Struktur". Die peripheren Doppeltubuli sind mit den zentralen Tubuli durch Radialspeichen und untereinander mittels Nexin verbunden. Jedes Doppeltubuli Paar besitzt außerdem zwei Dyneinarme, ein äußeres und ein inneres, die mit ihrer ATPase den Ort der Bewegungsgenerierung darstellen. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Spermatozoon. Die das Axonem umgebenden Fasern, die Mantelfasern, sind Strukturen, die die peripheren Doppeltubuli in ihrem Verlauf nach kaudal bis auf ca. zwei Drittel der Flagellumlänge begleiten (Serres et al., 1983; Cummins et Woodall, 1985). Deshalb wird hier bei Säugerspermatozoen von einer "9+9+2-Anordnung" gesprochen. Den Mantelfasern wird eine passiv elastische Funktion bei der Generierung der Spermatozoenmotilität zugeschrieben (Haidl et al., 1991a; Henkel et al., 1992; Stalf et al., 1993; Lindemann, 1996; Henkel et al., 2001).

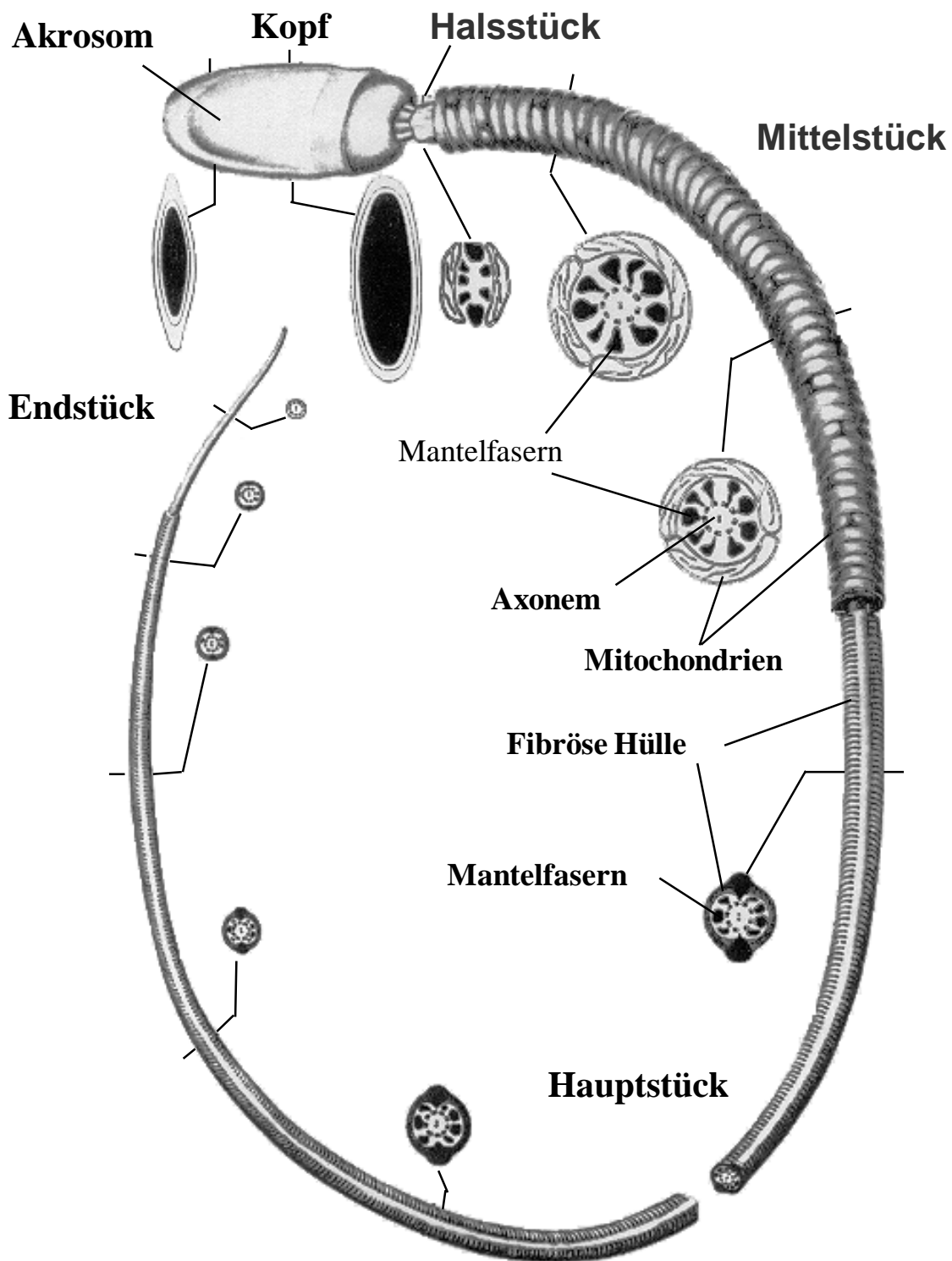


Abbildung 1: Schematische Aufbau eines Spermatozoon (aus Fawcett, 1975).

Eine weitere wichtige Aufgabe der Mantelfasern ist die Protektion der Spermatozoen vor Scherkräften, die bei der Ejakulation entstehen. Ohne diesen Schutz würden sich diese Scherkräfte letal auf die Spermatozoen auswirken (Baltz et al., 1990).

1.5. Die Motilität der Spermatozoen

Als Voraussetzung für die Generierung einer regulären Motilität ist ein morphologisch intaktes Spermatozoon, insbesondere ein intaktes Flagellum, welches für die aktive Bewegungsgenerierung verantwortlich ist, unverzichtbar. Die aktive Erzeugung des Flagellenschlages erfolgt durch die Aktivierung der äußeren und inneren Dyneinarme im Axonem. Durch die Aktivierung der ATPase der Dyneinarme auf einer Längsseite des Axonems kommt es zu einer Gleitbewegung der Mikrotubuli-Dubletten, die sich in einer Biegung des Flagellums umsetzt. Werden die Dyneinarme der anderen Seite des Axonems aktiviert, so kommt es zu einer Biegung in die entgegengesetzte Richtung. Diese Gleitbewegungen der Mikrotubuli führt zu den oszillierenden Bewegungen des Flagellums, wobei die vollständige Klärung dieses Mechanismus noch aussteht (Nieschlag, 1996). Für die Gleitbewegung der Mikrotubuli-Dupletten wird Energie benötigt. Diese wird durch Spaltung von Adenosin-tri-phosphat (ATP) zu Adenosin-di-phosphat (ADP) + Phosphat (P) durch die ATPase der Dyneinarme gewonnen. Ein ausreichendes Reservoir an ATP ist notwendig, um die Beweglichkeit der Spermatozoen zu sichern. Das benötigte ATP erzeugt das Spermatozoon hauptsächlich aerob mittels der Atmungskette seiner Mitochondrien, die im Mittelstück des Flagellums lokalisiert sind. Zwar ist auch durch eine rein anaerobe Energiegewinnung eine Generierung von Motilität möglich, doch wird für die Ausbildung der Progressivmotilität der Spermatozoen das ATP der Mitochondrien benötigt (Zamboni et al., 1992; Folgero et al., 1993).

An die Motilität von Spermatozoen wird unterschiedliche Ansprüche gestellt. Dies äußert sich in einer Änderung des Bewegungsmusters. Es wechselt von einem progressivmotilen, welches für die Passage durch den weiblichen Genitaltrakt bis zur Eizelle notwendig ist, zu einem hyperaktiven Bewegungsmuster, was für die Penetration der Zona pellucida erforderlich ist (Burkman, 1991). Das progressivmotile Bewegungsmuster zeichnet sich durch eine niedrige Amplitude des Flagellenschlages und eine hohe Schlagfrequenz aus (Bedford et al., 1973). Das hyperaktive Bewegungsmuster weist eine hohe Amplitude des Flagellumschlages auf und geht mit einer kräftigen hin und her Bewegung des Spermatozoonkopfes einher (Burkman, 1990).

Von entscheidender Bedeutung für das Bewegungsmuster des Flagellenschlages scheinen die Mantelfasern zu sein, die eher passiv-elastische als aktive Funktionen bei der Generierung der Motilität haben (Haidl et al., 1991a; Henkel et al., 1992; Stalf et al., 1993; Haidl et al., 1993; Lindemann, 1996; Henkel et al., 2001). Es wurde nachgewiesen, daß die Mantelfasern von Spermatozoen einen hohen Gehalt der Aminosäure Cystein, und damit einen hohen Gehalt an Sulfhydrylgruppen aufweisen. Diese Sulfhydrylgruppen der Mantelfasern bilden mit Zink einen Zink-Mercaptid-Komplex, der diese vor der Oxidation zu Disulfidbrücken schützt (Calvin & Bleau, 1974; Calvin et al., 1975; Baccetti et al., 1976a,b; Calvin, 1979). Hierdurch wird die Anzahl der Disulfidbrücken in den Mantelfasern der Flagellen gering gehalten. Auf diese Weise kann maßgeblich Einfluß auf die Steifigkeit der Mantelfasern genommen werden (Calvin et al., 1973; Calvin et al., 1975). Die Ausbildung von Disulfidbrücken führt zu einer Erhöhung der Steifigkeit der Mantelfasern. In einem Computermodell, dem "geometric-clutch"-Modell zeigte Lindemann (1996), daß die Mantelfasern bei Säugetierspermatozoen als Element der Kraftübertragung zwischen dem Axonem und dem Verbindungsstück und schließlich dem Kopf des Spermatozoons fungieren. Hierbei sollen sie durch ihre Laxizität bzw. Steifigkeit maßgeblichen Einfluß auf die Generierung des Bewegungsmusters und die Kraftentwicklung haben.

1.6. Die Rolle von Zink im männlichen Geschlechtstrakt

Zink scheint im männlichen Geschlechtstrakt eine besondere Rolle zu spielen. Das Ejakulat ist die Körperflüssigkeit mit der höchsten Zinkkonzentration. Man kann zwischen dem Zink im Seminalplasma und dem Zink im Spermatozoon unterscheiden. Hauptsächlich stammt das Zink im Seminalplasma aus dem Sekret der Prostata (Schirren et al., 1964; Eliasson & Lindholmer 1971; Janick et al., 1971; Danscher et al., 1978; Mann & Lutwak-Mann 1981; Kavanagh 1985). Ihm werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Es soll eine antibakterielle Wirkung besitzen (Fair et al., 1976) und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Spermatozoen und Lymphozyten unterdrücken (Gavella et al., 1998). Bezüglich des Einflusses von Zink im Seminalplasma auf die Motilität der Spermatozoen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Einige Untersuchungen fanden keinen Zusammenhang (Lindholmer & Eliasson 1972; Papadimas et al., 1983; Behne et al., 1988; Abou-Shakra 1989 ; Noack-Füller et al., 1993;

Lewis-Jones et al., 1996; Henkel et al., 1999), andere zeigten eine positive Korrelation (Janick et al. 1971; Stankovic et al. 1976; Carreras & Mendoza, 1990) und wieder andere fanden eine negative Korrelation (Danscher et al., 1978; Homonnai et al., 1978; Carreras & Mendoza, 1990; Ando et al., 1990; Carpino et al., 1998; Sorensen et al., 1999a).

Das Zink der Spermatozoen findet sich zu 93% - 97% im Flagellum (Calvin et al. 1975; Calvin 1979; Henkel et al., 1999). Hier könnte es eine wichtige Rolle als essentieller Faktor bei einigen Enzymen spielen (Hrudka, 1979; Witkin, 1980; Karacagil et al., 1985; Kanwar et al., 1988). Zum anderen könnte die bereits beschriebene Assoziation zu den Mantelfasern eine wichtige Rolle für die Generierung des Bewegungsmusters spielen (Fawcett, 1975; Stalf et al., 1993; Haidl et al., 1993; Henkel et al., 1999; Henkel et al., 2001). Diese Untersuchungen weisen auf eine ausgesprochen wichtige und differenzierte Rolle von Zink für die Spermatozoen und insbesondere für deren Motilität hin.

1.7. Zinkzugabe zu Spermatozoen

Um den Zusammenhang zwischen Zink und dem Parameter Motilität genauer zu untersuchen, gibt es zahlreiche Arbeiten, die sich mit der alimentären Zinkgabe (Gupta et al., 1988; Hafiez et al., 1990; Eltohamy & Younis, 1991; Bedwal et al., 1994; Martin et al., 1994) oder der Substitution von Zink zu gewaschenen Spermatozoen (Saito et al., 1967; Lindholmer et al., 1974b; Stegmayr et al., 1982; Kanwar et al., 1988; Riffo et al., 1992) beschäftigt haben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren uneinheitlich und haben teilweise sogar gegensätzliche Resultate hervorgebracht. Die Beobachtung, daß die Zinksubstitution zu einer Reduktion der Motilität führt, hatte Untersuchungen zur Folge, die sich mit dem Entzug von Zink aus Spermatozoen beschäftigt haben. Hierbei kamen auch Metallchelatoren zum Einsatz. Man unterscheidet hier zwischen Metallchelatoren, die ihre Wirkung intra- oder extra- zellulär entfalten. Die intrazellulären Zinkchelatoren scheinen eher einen hemmenden Einfluß (Danscher & Rebbe 1974; Stoltenberg, 1997b), die extrazellulären Zinkchelatoren eher einen fördernden Einfluß auf die Motilität zu haben (Huacuja et al. 1973; Sorensen 1999b).

1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Da die Motilität der Spermatozoen einen essentiellen Faktor für die Fertilisation darstellt, sind Kenntnisse über deren Entstehung und Beeinflussungsmöglichkeiten von größtem Interesse. Neue Erkenntnisse diesbezüglich könnten ihren Nutzen sowohl bei Paaren mit Kinderwunsch, als auch in der Empfängnisverhütung finden. Zink scheint für die Motilität der Spermatozoen eine wichtige Rolle zu spielen. Es ist in den Flagellen von Spermatozoen in hoher Konzentration vorhanden (Calvin et al., 1975; Calvin 1979; Henkel et al., 1999) und schützt die Sulfhydrylgruppen der Mantelfasern durch Bildung von Mercaptidkomplexen vor der Oxidation zu Disulfidbrücken (Calvin et al., 1973; Calvin et al., 1975). Eine Erhöhung der Disulfidbrücken in den Mantelfasern erhöht deren Steifigkeit und nimmt somit Einfluß auf das Bewegungsmuster der Spermatozoen. Diese Einflußnahme von Zink wird durch die Beobachtung gestützt, das es während der Reifung der Spermatozoen im Nebenhoden zu einer Abnahme des Zinkgehaltes und zu einer Zunahme der Disulfidbrücken kommt (Bedford & Calvin 1974; Calvin 1981; Srivastava et al., 1983; Kaminska et al., 1987). Das Bewegungsmuster der Spermatozoen wird hierbei progressivmotil (Bedford 1973; Bork et al., 1988; Chevrier & Dacheux 1988; Cornwall & Chang 1990; Haidl et al., 1994). Um die Funktion dieses Metalls, welches im männlichen Geschlechtstrakt in hohen Konzentrationen vorkommt, und dessen Wirkung auf die Motilität der Spermatozoen besser zu verstehen, beschäftigt sich diese Arbeit sowohl mit der Zinksubstitution, als auch mit dem Entzug von Zink aus Spermatozoen durch Metallchelatoren.

2. Material und Methoden

2.1. Ausgangsmaterial und Probengewinnung

Als Untersuchungsmaterial dienten humane Spermatozoen, die von Ejakulaten der Routinediagnostik des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen sowie von freiwilligen Spendern stammten. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden insgesamt 83 Ejakulate verwendet. Die Gewinnung der Ejakulate erfolgte nach einer Karenzzeit von mindestens drei und maximal fünf Tagen durch Masturbation in einen Polypropylen-Becher, der sofort verschlossen wurde. Die so erhaltenen Ejakulate wurden bis zu ihrer Verflüssigung bei 37°C in einem Inkubator gelagert.

2.2. Verwendete Gefäße und Gebrauchsgegenstände

Da Zink als Spurenelement ubiquitär vorhanden ist und sich selbst in Glas in höheren Konzentrationen befindet (Swaminathan et al., 1993), mußten Gefäße und Gebrauchsgegenstände (z.B. Spatel) genutzt werden, die eine möglichst geringe Zink-Konzentration, bzw. -Kontamination aufwiesen. Für die spätere Analyse des Zinkgehaltes der Proben mußte die Kontamination so gering wie möglich gehalten werden. Deswegen wurden für die Ansätze der Substanzen (wie Medien und Lösungen) und die Aufbewahrung der Proben ausschließlich Materialien aus Plastik verwendet.

2.3. Kulturmedium und Lösung

Bei der Art des bei den verschiedenen Versuchen verwendeten Mediums mußten je nach Zielsetzung Kompromisse eingegangen werden. So war es notwendig, bei Versuchen, die die Motilität der Spermatozoen über einen längeren Zeitraum verfolgten, ein Medium zu wählen, welches Vitalität und Motilität über den Beobachtungszeitraum möglichst hoch hielten. Um dieses zu erreichen, mußte das Medium eine Vielzahl an Substanzen enthalten, die für die

Erhaltung der Vitalität essentiell waren. Das bedeutete aber auch, daß die Zinkkontamination des Mediums relativ hoch war. Bei anderen Versuchen in deren Vordergrund die Bestimmung von Spurenelementen (z.B. Zink) stand, wurden Medien benutzt die möglichst wenige, möglichst reine Substanzen enthielten. Dies hatte zur Folge, daß in diesen Medien Vitalität und Motilität schneller zurückgingen.

2.3.1 Human-Tubular-Fluid (HTF)-Medium nach Quinn et al. (1985)

Dieses Medium, das auf der Ionenzusammensetzung der menschlichen Tubenflüssigkeit basiert, wurde für sämtliche Schritte der Spermatozoenaufbereitung verwendet. Auch für die unter 2.6. und 2.7. beschriebenen Versuche, bei denen die Spermatozoen über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, fand dieses Medium Verwendung.

Es setzte sich folgendermaßen zusammen:

NaCl: 101,60 mM (pro analysi, Merck, Darmstadt, Deutschland); KCl: 4,69 mM (Merck, pro analysi); CaCl₂ x 2 H₂O: 2,04 mM (Merck, pro analysi); MgSO₄ x 7 H₂O: 0,20 mM (Merck, pro analysi); KH₂PO₄: 0,37 mM (Merck, pro analysi); Phenolrot: 0.005 g/l (Merck); NaHCO₃: 25,00 mM (Merck, pro analysi); Glucose (wasserfrei): 2,78 mM (Merck); Na-Pyruvat: 0,33 mM (Serva, Heidelberg, FRG, reinst); Na-Lactat (60% Syrup): 21,40 mM (Sigma, Taufkirchen, FRG); Penicillin: 0,060 g/l (Sigma); Streptomycinsulfat: 0,050 g/l (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland); HEPES: 20,00 mM (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethylsulfonsäure, Sigma)

Nach dem Ansetzen des Mediums, wurde dessen Osmolarität auf 280 mosmol/kg eingestellt und steril in 250 ml Kulturflaschen filtriert. Vor Arbeitsbeginn wurden 10 mg/ml humanes Serumalbumin (HSA) (Behring, Marburg, Deutschland) hinzugefügt. Human-Tubular-Fluid-Medium mit 10 mg/ml humanem Serumalbumin wird im Weiteren als HTF-HSA Medium bezeichnet.

2.3.2. KCl-Lösung

Diese Lösung wurde verwendet, um die Proben für die Messung mittels Atomabsorptionsspektrometrie vorzubereiten. Sie setzte sich folgendermaßen zusammen:

Aqua dest. (p.A.; Merck) wurde mit KCl (suprapur; Merck) auf eine Osmolarität von 280 mosmol/l eingestellt.

2.4. Aufarbeitung der Spermatozoen

2.4.1. Swim-up

Diese Spermatozoenseparationstechnik wurde erstmals von Mahadevan & Baker (1984) beschrieben. Sie besteht in einem Waschschrift mit anschließendem Aufschwimmen motiler Spermatozoen von dem Pellet in das darüber befindliche Kulturmedium. Um die Ausbeute an motilen Spermatozoen zu erhöhen, wurde der Swim-up fraktioniert durchgeführt. Hierfür wurde die Probe auf vier Zentrifugenröhrchen (Eppendorf-Cup, 2ml) verteilt, was eine Vergrößerung der Oberfläche von der die Spermatozoen aufschwimmen konnten zur Folge hatte.

Nachdem sich das Ejakulat verflüssigt hatte, wurde es im Verhältnis 1:5 mit HTF-HSA Medium verdünnt. Dieses Gemisch wurde auf einem Vortex vermengt und für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 6 ml HTF-HSA Medium resuspendiert, auf 4x2 ml Eppendorf-Cup`s verteilt und erneut 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Pellets mit einem definierten Volumen HTF-HSA Medium, das für die verschiedenen Versuche unterschiedlich war, überschichtet. Dieses Volumen richtete sich nach dem Volumen, welches in dem jeweiligen Versuch benötigt wurde. Es wurde so gering wie möglich gehalten, um eine möglichst hohe Konzentration an Spermatozoen zu erhalten.

Im Folgenden wird die bei den verschiedenen Versuchen zugegebene Menge an HTF-HSA aufgelistet:

- Versuch: "Zugabe von $ZnSO_4$ zu humanen Spermatozoen" (2.6.), hier wurden pro Eppendorf-Cup 400 μ l HTF-HSA Medium verwendet.
- Versuch: "Inkubation der Chelatoren über 2 Stunden" (2.7.2), hier wurden pro Eppendorf-Cup 500 μ l HTF-HSA Medium verwendet.
- Versuch: "Inkubation der Chelatoren Über 6 Stunden" (2.7.3.), hier wurden pro Eppendorf-Cup 400 μ l HTF-HSA Medium verwendet.

Diese Ansätze wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit den motilen Spermatozoen vorsichtig abpipettiert, ohne Teile des Pellets (immotile Spermatozoen) zu aspirieren.

2.5. Messung der Motilitätsparameter mit der Computergestützten Motilitätsanalyse (CASA)

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für die Messung von Motilitätsparametern der Spermatozoen die CASA genutzt. Verwendet wurde ein Strömberg Mika-Cell Motion Analyser (SM-CMA) (Strömberg-Mika Cell Motion Analysis; Mika Medical Equipment, Bad Feilnbach, FRG). Über ein Mikroskop zeichnete eine Videokamera die Bewegungen der Spermatozoen auf und wertete die gewonnenen Daten mit Hilfe eines Computers (SM-CMA-Programm, Version 1989) aus. Dies hatte zum einen den Vorteil der Objektivität, zum anderen konnten auf diese Weise Parameter, wie z.B. Geschwindigkeit, ermittelt werden, die anderweitig nicht erfaßbar gewesen wären. Aus den mit der Kamera aufgezeichneten Bildsequenzen konnten folgende Parameter ermittelt werden:

1. immotile Spermatozoen

2. Globalmotilität:

diese wurde Untergliedert in:

- lokal motile Spermatozoen
- Kreisläufer
- nicht linear motile Spermatozoen
- linear motile Spermatozoen (entspricht der Progressivmotilität Grad A+B nach WHO-Klassifizierung (WHO, 1992).

3. Geschwindigkeitsparameter:

VSL (straight-line-velocity): "Progressivgeschwindigkeit" ($\mu\text{m/s}$)

VCL (curve-line-velocity): "Spurgeschwindigkeit" ($\mu\text{m/s}$)

VAP (average-path-velocity): "Pfadgeschwindigkeit" ($\mu\text{m/s}$)

Die Geschwindigkeitsangaben wurden für die motilen Spermatozoen, Kreisläufer, nicht linear motile Spermatozoen und linear motile Spermatozoen gemessen. Zur genaueren Erläuterung dieser Geschwindigkeitsparameter werden sie in Abbildung 2 dargestellt. Mit diesem Programm konnte außerdem die Zelldichte der Spermatozoen in Mio/ml ermittelt werden.

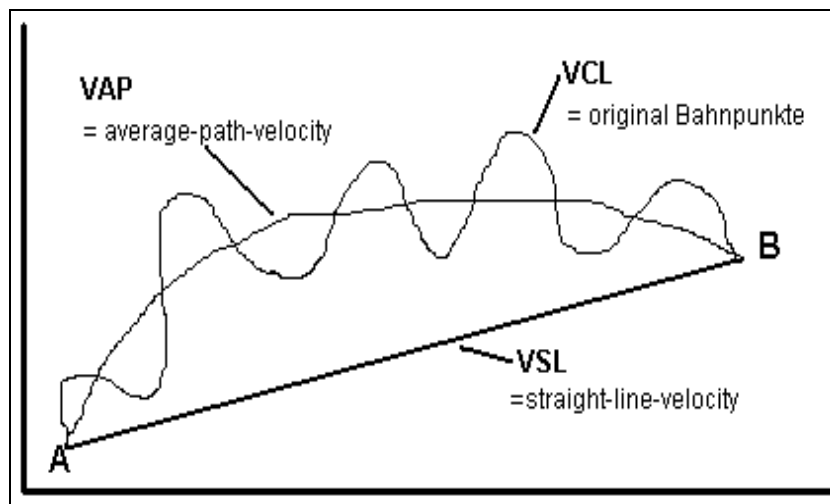


Abbildung 2:

Darstellung der mit der CASA ermittelten Geschwindigkeitsparameter:

VSL = Geschwindigkeit ermittelt auf einer vom ersten (A) zum letzten (B) Bahnpunkt gedachten geraden Linie

VCL = Geschwindigkeit ermittelt auf der Vektorenbahn, die aus den Original-Bahnpunkten besteht

VAP = Geschwindigkeit ermittelt auf der gemittelten Bahn aller gemessenen Objekte

Die Grundeinstellungen des Gerätes waren wie in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt die Parametereinstellungen der CASA.

FRMAX: 32	Anzahl der Bilder der Sequenz
FRMIN: 15	Anzahl der Bilder, die ein Spermium mindestens erkannt sein muß um gezählt zu werden
Time: 20	Zeit zwischen zwei Videohalbbildern
AREAMIN: 40	Untere Flächengrenze in Pixel, über die ein Partikel fallen muß um in die Auswertung einzugehen.
AREAMAX: 300	Obere Flächengrenze in Pixel, unter die ein Partikel fallen muß um in die Auswertung einzugehen.
Objects: light	Durch das gewählte Phasenkontrastmikroskopieverfahren erscheinen die Objekte heller als der Hintergrund
Class: 3	Klasseneint. der Geschwindigkeit im numerischen Ergebnis in $\mu\text{m/s}$
IMO: 5	Geschwindigkeitsgrenze für immotile Objekte in $\mu\text{m/s}$
LOC: 20	Geschwindigkeitsgrenze für lokal bewegliche Objekte in $\mu\text{m/s}$
DEPHT: 10	Tiefe der Meßkammer
COLUMNS: 4	Anzahl der zu bearbeitenden horizontalen Zeilen
PDIST: 30	Kreisradius in Pixel, in dem Teilchen zugeordnet werden
VANISH: 2	Anzahl der Bilder, bei denen ein Spermatozoon weiter berücksichtigt wird, falls es bei einer Drehung bedingt durch die flache Form "untergetaucht" ist
SELDIR: on	Zur Zuordnung der Teilbahnen wird durch den entsprechenden Algorithmus die Richtung einer Bahn als Bahnparameter untersucht
CORRECT: on	Eine Videokamera liefert Bilder im interlaced-Betrieb, weshalb aufeinander folgende Halbbilder in horizontaler Richtung jeweils um eine Zeile verschoben sind. Dies wird bei der Schwerpunktsermittlung korrigiert
TUKEYWIN: 4	Größe des linearen Tukeyfensters, mit dem die Bahnen geglättet werden
TAIL: light	Mustererkennung linienhafter Strukturen an den Kopfenden sind heller als der Hintergrund
CALIBRATION: 400	Eichfaktor für das verwendete Kamera-Mikroskopobjektiv

2.5.1. Der Meßvorgang an dem SM-CMA

Die vorbereiteten Proben wurden zuerst resuspendiert. Anschließend wurden jeder Probe 5 µl entnommen, auf eine auf 37°C temperierte Makler-Counting-Chamber (Israel Electrooptical Industrie, Rehovot, Israel) aufgebracht und die Motilität mittels CASA gemessen. Pro Probe wurden mindestens drei Messungen in drei unterschiedlichen Blickfeldern vorgenommen. Die zu analysierenden Blickfelder wurden vorher definiert. Dies sollte die Beeinflussung der Meßergebnisse durch Zuwendung zu Orten größerer Spermatozoendichte oder größerer Motilität möglichst gering halten. Zusätzlich mußte die Anzahl der registrierten Spermatozoen je Probe mindestens 100 betragen. Waren dafür mehr als drei Messungen nötig, so wurde darauf geachtet, daß die Randbezirke der Meßkammer im gleichen Maß wie die inneren Bezirke zur Messung herangezogen wurden.

2.6. Zugabe von ZnSO₄ zum Medium

Um den Einfluß von Zink auf die Motilität von Spermatozoen zu untersuchen, wurden Spermatozoen mit ZnSO₄ inkubiert und mit Hilfe der CASA im Hinblick auf ihre Beweglichkeit analysiert.

2.6.1. Präparation der Spermatozoen

Die Spermatozoen wurden wie in 2.1. beschrieben gewonnen, anschließend gewaschen (2.4.1.) und dann einem fraktionierten Swim-up zugeführt (2.4.2.). Insgesamt wurden bei dieser Untersuchung zehn Ejakulate ausgewertet.

2.6.2. Ansätze und Analyse der Motilitätsparameter

Die aufbereiteten Spermatozoen in HTF-HSA wurden zu je 190 µl auf 21 ein Milliliter Eppendorf-Cups verteilt, wobei die Probe vor jedem Pipettierschritt auf einem Vortex resuspendiert wurde, um in den einzelnen Ansätzen eine möglichst homogene Dichte an Spermatozoen zu erreichen. Diesen Ansätzen wurde Zinksulfat (Zinksulfat-Heptahydrat, pro analysi; Merck), gelöst in HTF-HSA, oder als Kontrolle ausschließlich HTF-HSA zugesetzt.

Zu den Zeitpunkten (t_0), (t_{1h}), (t_{2h}), (t_{4h}) und (t_{6h}) wurde jeweils eine Probe mit 1 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 , 10 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 , 100 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4 und 1 mmol/l ZnSO_4 , sowie einen Kontrollansatz gemessen. Außerdem wurde zu Beginn der Messungen einmal ein Kontrollansatz gemessen. Insgesamt entstanden auf diese Weise für jeden Versuch 21 Ansätze, diese gliederten sich folgendermaßen auf:

- 5 Ansätze als Kontrollgruppe
- 4 Ansätze mit 1 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4
- 4 Ansätze mit 10 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4
- 4 Ansätze mit 100 $\mu\text{mol/l}$ ZnSO_4
- 4 Ansätze mit 1 mmol/l ZnSO_4

Diese Ansätze wurden zu den oben genannten Zeiten mit Hilfe der CASA analysiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde ein Ansatz der Kontrollgruppe untersucht, zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten wurde ein Kontrollansatz und ein Ansatz von jeder Konzentration Zinksulfat untersucht. Bis zum Zeitpunkt der Messung wurden die Ansätze in einem Wärmeschrank bei 37 °C (Kelvitron®t; Heraeus Instruments) inkubiert. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

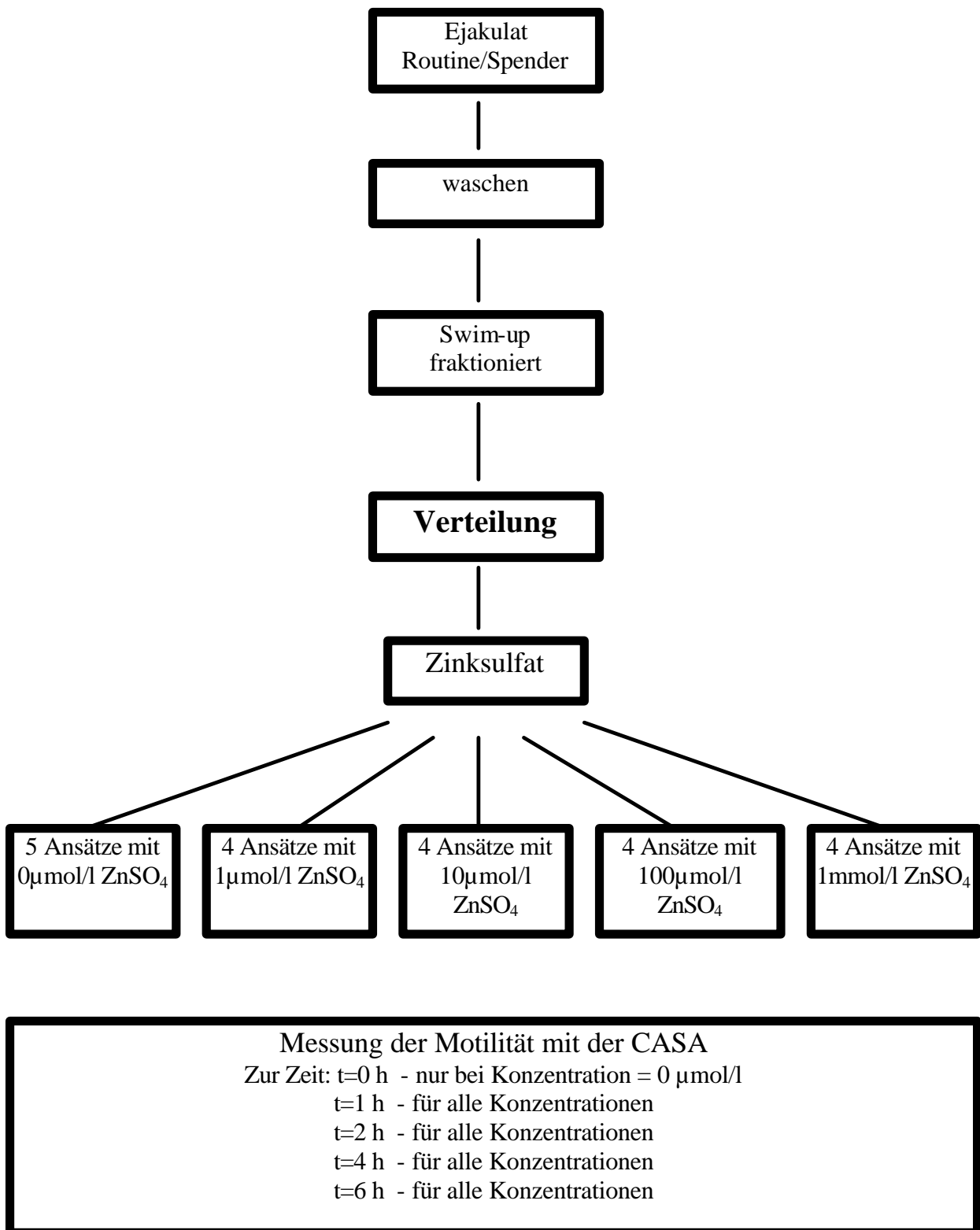


Abbildung 3: Versuchsablauf zur Wirkung von Zink auf die Motilität von Spermatozoen.

2.7. Messung des Einflusses von verschiedenen Chelatoren auf die Motilität von Spermatozoen

In dieser Untersuchung sollte der Einfluß der Chelatoren DMPS (2,3 Dimercaptopropan-1-sulfonat-Na, Sigma), DMSA (meso-2,3-Dimercaptobernsteinsäure, Sigma), DL-Penicillamin (puriss., Fulka AG, Buchs., Schweiz) und eines Oligopeptides von Metallothionein (Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala, Sigma) auf die Beweglichkeit von Spermatozoen beobachtet werden. Dazu wurden die Ejakulate zunächst aufbereitet. In der anschließenden Untersuchung wurden die Spermatozoen mit den Substanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und zu verschiedenen Zeiten mit der CASA bezüglich ihrer Motilitätsparameter analysiert.

2.7.1. Die Chelatbildner

Chelatbildner sind organische und anorganische Verbindungen, die als sogenannte Liganden mittels ihrer 2 oder mehreren verschiedenen funktionellen Gruppen mit Metallkationen (z.B. Ca^{2+}) ringförmige Komplexe, sogenannte Chelate, bilden. Chelatbildner kommen als natürliche Bioliganden im Intermediärstoffwechsel der Mineralstoffe, im Rahmen der Funktion der Blut- und Blattfarbstoffe, bei enzymatischen Reaktionsabläufen u.a.m. vor. Synthetische Chelatbildner (Ethylendiamintetraessigsäure, höhere Aminopolyessigsäuren, etc.) dienen zur Entfernung radioaktiver oder toxischer Metallionen aus dem Körper.

2.7.1.1. DL-Penicillamin

Diese Substanz findet in der medizinischen Therapie vor allem Anwendung in der Behandlung von Vergiftungen mit Pb, Hg, Au, Zn, Co und Cu (Estler, 1994). Abbildung 4 zeigt die Strukturformel von DL-Penicillamin und dessen Chelatbildung mit einem Metall.

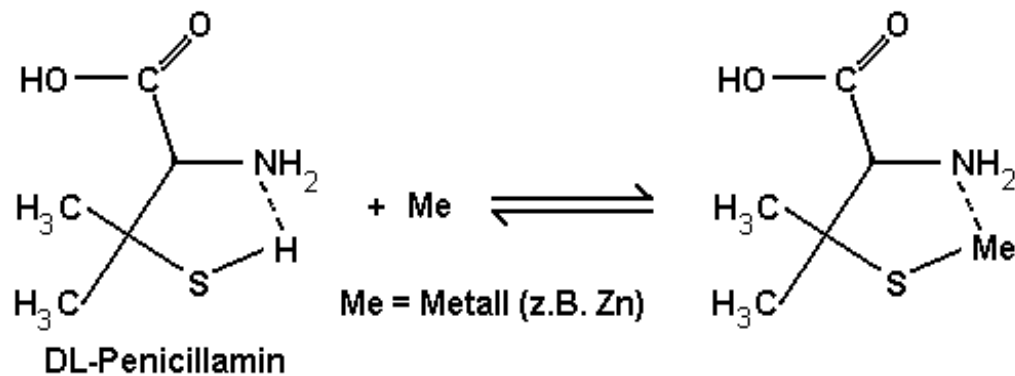


Abbildung 4: Darstellung der Strukturformel des Chelators DL-Penicillamin

2.7.1.2. 2,3 Dimercaptopropan-1-sulfonat-Na (DMPS)

Auch diese Substanz findet Anwendung in der medizinischen Therapie, vor allem in der Behandlung von Vergiftungen mit Quecksilber in anorganischen oder organischen Verbindungen oder als Hg-Dampf. Aber auch bei Vergiftungen mit Pb, As, Sb, Cr, Ag, Bi und anderen zweiwertigen Kationen findet DMPS Verwendung (Estler, 1994). Abbildung 5 zeigt die Strukturformel von DMPS, sowie dessen Möglichkeiten der Chelatbildung.

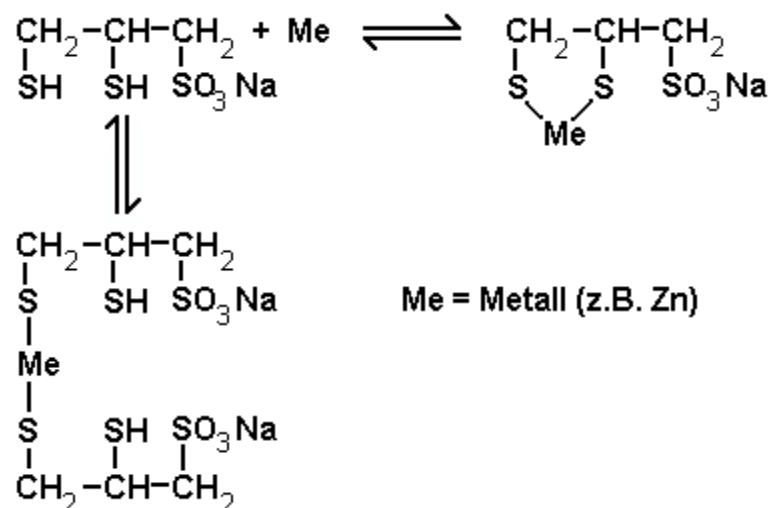
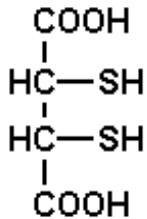


Abbildung 5: Darstellung der Strukturformel des Chelators DMPS

2.7.1.3. 2,3,- Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)

DMSA wurde therapeutisch vor allem als Antidot bei Quecksilbervergiftungen untersucht (Kuschinsky & Lüllmann, 1989). Die für diese Untersuchung verwendete Substanz war meso-2,3-Dimercaptobernsteinsäure. Abbildung 6 zeigt die Strukturformel von DMSA.



2,3 Dimercaptobernsteinsäure

Abbildung 6: Strukturformel des Chelators DMSA

2.7.1.4. Das Oligopeptid von Metallothionein "Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala"

Dieses niedermolekulare Peptid wurde ausgewählt, weil es eine Sulfhydrylgruppen enthaltende Teilsequenz des im Körper vorkommenden Metallothionein ist. Metallothionein ist für die Bindung von Metallen und Spurenelementen notwendig.

2.7.2. Vorbereitung der Ansätze

Die Chelatoren wurden in folgenden Konzentrationen angesetzt: 7 µmol/l; 70 µmol/l; 700 µmol/l ; 7 mmol/l. Die so erhaltenen Stammlösungen wurden fraktioniert und zu je 500 µl in 0,5 ml Eppendorf-Cups bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.7.3. Versuch zur Eliminierung von Zink aus humanen Spermatozoen

2.7.3.1. Inkubation von Spermatozoen mit den Chelatbildnern über einen Beobachtungszeitraum von 6 Stunden

Bei dieser Untersuchung gingen die Daten von zwanzig Ejakulaten in die Ergebnisse ein. Die aufbereiteten Spermatozoen in HTF-HSA wurden zu je 60 μl auf 16 0,5 - Milliliter Eppendorf-Cups verteilt, wobei die Probe vor jedem Pipettierschritt auf einem Vortex durchgemengt wurde, um in den einzelnen Ansätzen eine möglichst homogene Dichte an Spermatozoen zu erreichen. Diesen Ansätzen wurden je 10 μl der Chelatoren DMPS, DMSA, DL-Penicillamin und des Oligopeptids (Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala), gelöst in HTF-HSA, oder ausschließlich HTF-HSA, als Kontrolle, zugesetzt.

Für jeden Chelatbildner wurde ein Ansatz mit einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$, sowie ein Kontrollansatz hergestellt. Zu Beginn der Messungen (t_0) wurde ein Kontrollansatz, anschließend wurde zu den Inkubationszeitpunkten (t_{1h}), (t_{2h}), (t_{4h}) und (t_{6h}) ein Ansatz in jeder Konzentration von jedem Chelatbildner sowie ein Kontrollansatz gemessen. Auf diese Weise entstanden für jeden Chelatbildner folgende Ansätze:

- 1 Ansatz als Kontrollgruppe
- 1 Ansatz mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Chelator
- 1 Ansatz mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Chelator
- 1 Ansatz mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Chelator

Die so angefertigten Ansätze wurden zu den oben genannten Zeitpunkten mit Hilfe der CASA analysiert. Bis zum Zeitpunkt der Messung wurden die Ansätze bei 37 °C inkubiert. Abbildung 7 zeigt den schematischen Versuchsablauf.

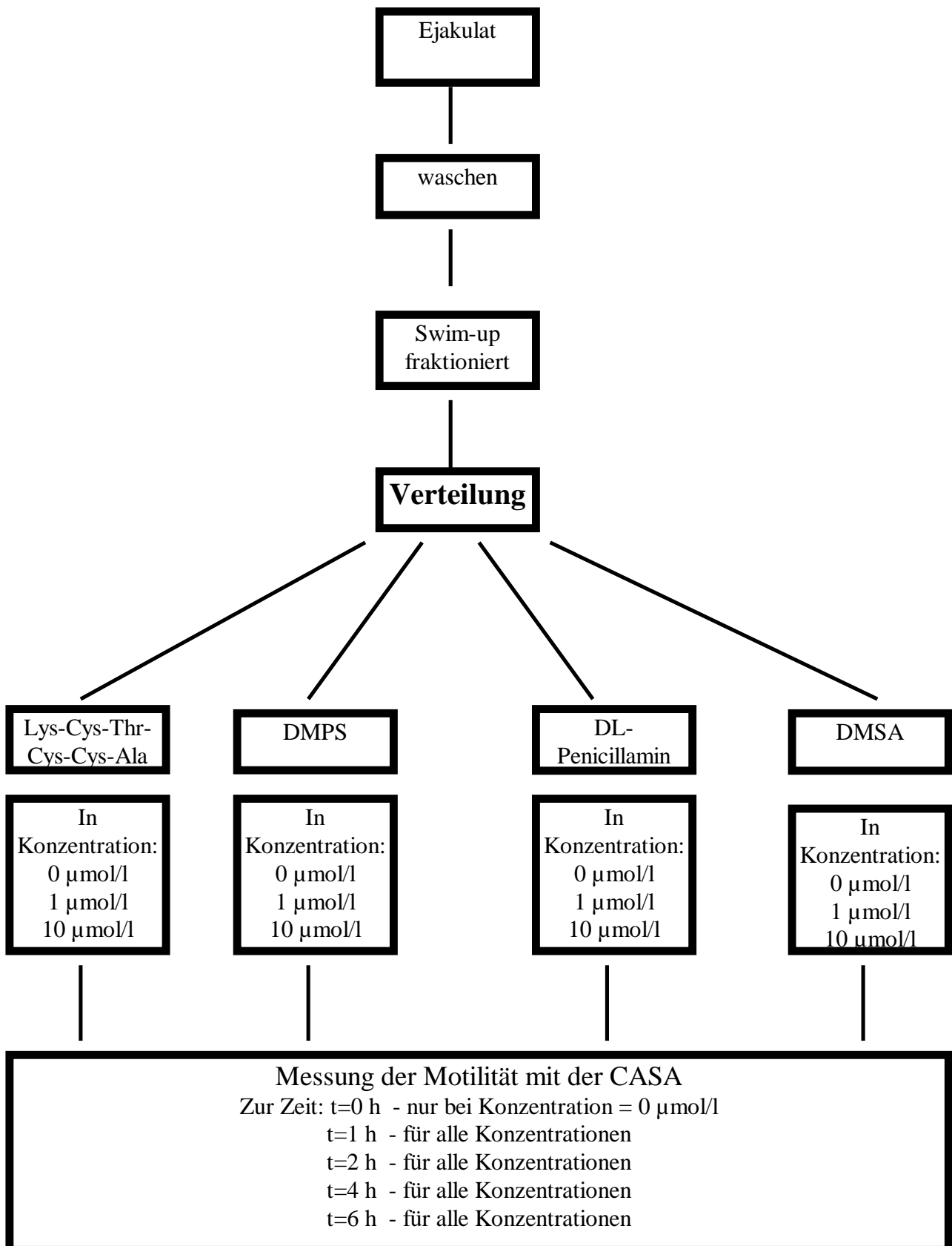


Abbildung 7: Versuchsablauf zur Wirkung von Chelatoren auf die Motilität von Spermatozoen.

2.7.3.2. Inkubation mit Chelatbildnern und anschließende Bestimmung der Zinkkonzentration

Ziel dieser Untersuchung war es, die Änderung der Motilitätsparameter durch die Chelatoren DMSA, DMPS und DL-Penicillamin, die bereits in den Versuchen über 6 Stunden gefunden wurden, nachzuvollziehen und anschließend die Spermatozoen bezüglich ihres Zinkgehaltes zu untersuchen. Um nach der Messung der Motilitätsparameter ausreichend Spermatozoen für die Zinkmessung zur Verfügung zu haben, wurden von einem Ejakulat lediglich vier Ansätze hergestellt. Diese wurden, bis auf die Kontrollgruppe, nur zum Untersuchungszeitpunkt zwei Stunden bezüglich ihrer Motilitätsparameter untersucht.

Die Spermatozoen wurden wie in 2.1. beschrieben gewonnen, gewaschen, und mittels fraktionierten Swim-up's (2.4.) aufbereitet. Die Ergebnisse von 21 untersuchten Ejakulaten gingen bei dieser Untersuchung in die Auswertung ein. Die aufbereiteten Spermatozoen in HTF-HSA wurden zu je 480 µl auf 4 zwei - Milliliter Eppendorf-Cups verteilt, wobei die Probe vor jedem Pipettierschritt auf einem Vortex resuspendiert wurde. Diesen Ansätzen wurden je 80 µl der Chelatoren DMPS, DMSA und DL-Penicillamin, gelöst in HTF-HSA in einer Konzentration von 700 µmol/l, oder ausschließlich HTF-HSA als Kontrolle zugesetzt. Auf diese Weise entstand ein Ansatz mit 100 µmol/l DMSA, ein Ansatz mit 100 µmol/l DMPS, ein Ansatz mit 100 µmol/l DL-Penicillamin und ein Kontrollansatz. Die so angefertigten Ansätze wurden mit Hilfe der CASA analysiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde nur die Kontrollgruppe untersucht, zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden wurde jeder Ansatz einmal gemessen. Bis zum Zeitpunkt der Messung wurden die Ansätze in einem Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Abbildung 8 zeigt schematisch den Versuchsablauf zur Messung der Motilität der Spermatozoen sowie die Präparation der Spermatozoen für die Atomabsorptionsspektrometrie.

2.7.3.3. Vorbereitung der Proben für die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Nachdem die Messungen mit der CASA abgeschlossen waren, wurde der Rest eines jeden Ansatzes für 10 Minuten bei 440xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 160 µl KCl-Lösung resuspendiert. Die Spermatozoendichte wurde durch das Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Probe bis zur

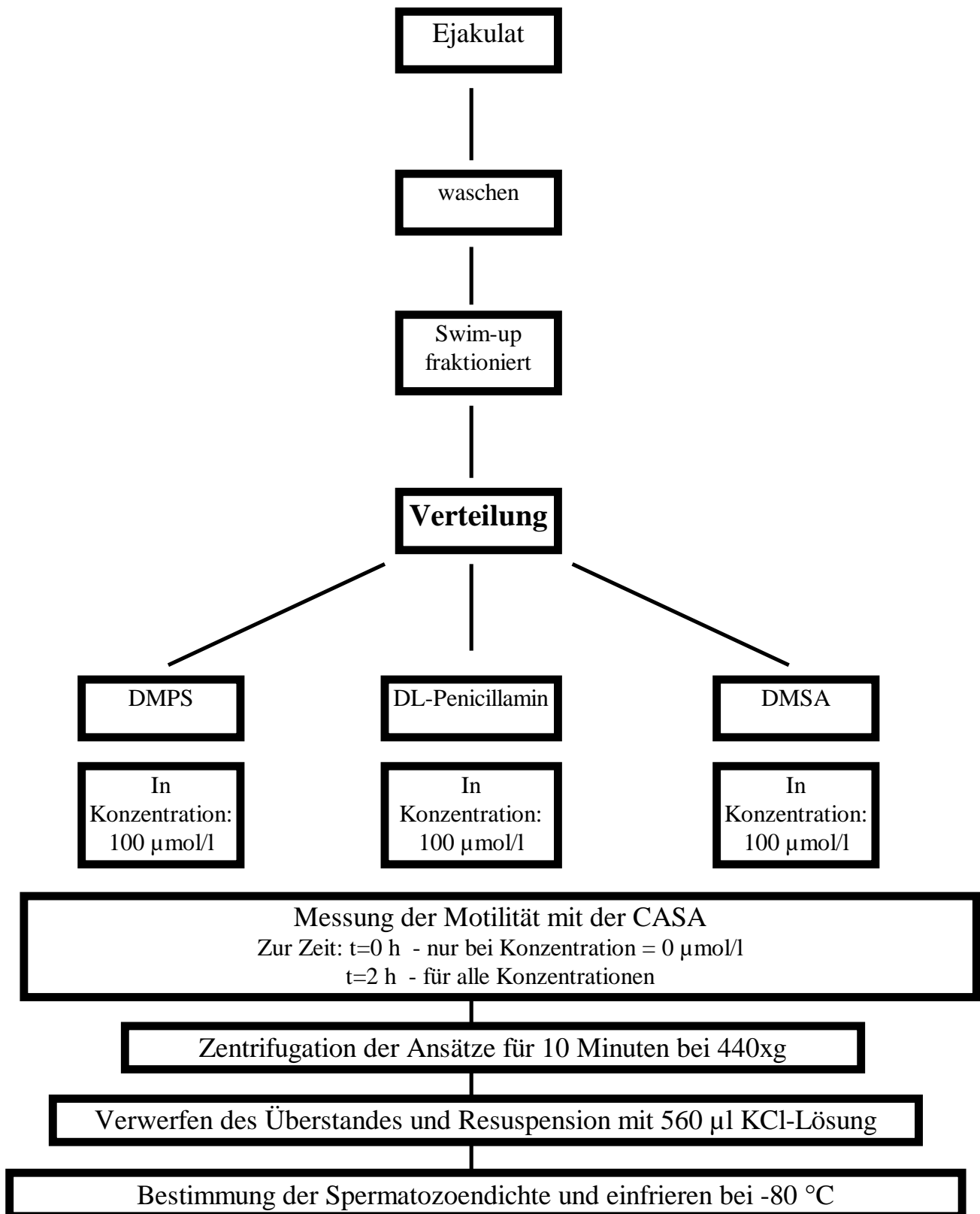


Abbildung 8: Schematischer Versuchsablauf der Wirkung von Chelatoren auf die Motilität von Spermatozoen und der Vorbereitung für die AAS.

Messung mit der AAS bei -80 °C eingefroren.

2.8. Bestimmung von Zink in Spermatozoen mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Die Bestimmung des Zinkgehaltes der Spermatozoen mit der Atomabsorptionsspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. F. Hüther und Dr. R. Weber vom Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt.

Atomabsorptionsspektrometrie ist die Messung einer Absorption von optischer Strahlung durch Atome im Gaszustand (Welz, 1983). Diese Meßmethode beruht auf der Eigenschaft, daß eine Atomart nur Strahlung einer ganz bestimmten Wellenlänge aufnehmen und auch wieder abgeben kann. Dies formulierte Planck in dem Gesetz der quantenhaften Absorption und Emission der Strahlung, nachdem ein Atom nur Strahlung eindeutig gegebener Wellenlänge absorbiert, d.h. nur bestimmte Energiebeträge aufnehmen und auch wieder abgeben kann (Welz, 1983).

Die Eigenschaft eines Atoms, nur eine bestimmte Energie einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen zu können, wird genutzt, in dem mit einer Strahlungsquelle ein Licht dieser speziellen Wellenlänge erzeugt wird. Wird eine Probe durch Energiezufuhr atomisiert und werden diese Atome in den Strahlengang der Strahlenquelle gebracht, so schwächt sich die Intensität der Strahlung um einen bestimmten Betrag. Dieser Betrag entspricht der Menge, der in den Strahlengang gebrachten Atome. Die Änderung der Intensität wird als Extinktion erfaßt. Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden kann schließlich die Stoffmenge einer Atomart in einer Probe die sich im Strahlengang befunden haben muß bestimmt werden.

Versuchsaufbau:

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Perkin-Elmer 300 Atomabsorptionsspektrometer (Perkin-Elmer 300, Überlingen, Deutschland) mit einer Graphitrohrküvette (Perkin-Elmer HGA-70) verwendet. In die Graphitrohre wurde die jeweilige Probe eingebracht und nicht wie bei einer konventionellen Flammenabsorptionsspektrometrie (Flammen-AAS) durch eine Flamme, sondern durch Anlegen einer hohen Stromstärke (500A) bei geringer Spannung (10V)

verglüht. Hierdurch wurde die Probe in den gasförmigen Zustand gebracht. Die bekannten Störmöglichkeiten der Flammen-AAS, die Oxidbildung, kann bei der Graphitrohr-AAS durch eine Intergasatmosphäre mit Argon als Schutzgas verhindert werden. Ein weiterer Vorteil der Graphitrohrküvette gegenüber der konventionellen Methode besteht darüber hinaus in einem wesentlich längeren Verbleiben der Atome im Strahlengang, wodurch sich auch extrem geringe Substanzmengen pro Probe quantitativ bestimmen lassen. Die Graphitrohrtechnik ist mit einer Nachweisgrenze von 0,001 µg/l für Zink wesentlich sensitiver als die Flammen-Technik mit einer Nachweisgrenze von 1µg/l. Die AAS ist ein Verfahren hoher Empfindlichkeit und Spezifität bei gleichzeitig geringer Störanfälligkeit (Welz, 1983).

2.8.1. Vorbereitung der Proben

Die aus den Versuchen (2.7.4.) erhaltenen Proben wurden aufgetaut. Danach wurden zur Matrixkorrektur 20 µl der Probe mit 20 µl 2% Salpetersäure (HNO₃ 65%, suprapur, Merck) vermengt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies bewirkte eine Oxidation der verbliebenen Zellmatrix und verhinderte so die Verfälschung der Messung durch deren Einfluß. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe mit 1% HNO₃ so weit verdünnt (in der Regel 1:5), daß die Zinkkonzentration der Probe im Bereich der Kalibrationsgeraden lag.

2.8.2. Kalibrierung der AAS

Die Atomabsorptionsspektrometrie ist kein Absolut-, sondern ein Relativverfahren, das nur im Vergleich mit Bezugslösungen oder Bezugssubstanzen ein quantitatives Ergebnis bringt (Welz, 1983). Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Kalibrierverfahren, war das Standard-Kalibrierverfahren.

Zur Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden Ansätze mit einer Zinkstandardlösung (1000 mg/l, Art. Nr. 19806, Merck) in den Konzentrationen 0 µg/l, 10 µg/l, 16 µg/l, 25 µg/l, 50 µg/l, 75 µg/l und 100 µg/l hergestellt. Der Zinkstandard wurde mit 1%iger HNO₃ auf die jeweiligen Konzentrationen für die Kalibrationslösung verdünnt. Hierbei wurde für jede Konzentration ein extra Ansatz hergestellt.

Vor jeder Messung mußte die Zinklampe der AAS "eingelüht" werden, d.h. die Strahlung bei einer Wellenlänge von 213,8 nm mußte konstant sein. Für jede Konzentration der Kalibrationslösung wurden drei Messungen durchgeführt. Anhand der hierdurch ermittelten Eichgeraden wurde die Zinkkonzentration der Proben ermittelt.

2.8.3. Messung der Proben

Nachdem die Matrixkorrektur abgeschlossen war und die Proben in den Meßbereich der Eichgeraden verdünnt waren, begann die Messung. Vor jeder Messung wurde die vorbereitete Probe auf einem Vortex (Genie 2, Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz) durchmengt. Die Injektionsmenge in die AAS betrug 20 µl. Zuerst wurde die Probe für 30 Sekunden bei 100°C getrocknet, zur Zersetzung des organischen Anteils wurde sie anschließend für 30 Sekunden auf 702°C erhitzt und schließlich für 7 Sekunden bei 2600°C atomisiert. Jede Probe wurde dreimal gemessen. Für die spätere statistische Analyse der Daten wurde der Mittelwert aus den drei Messungen gebildet.

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe des Statistik Programmes SPSS (SPSS GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden die zu vergleichenden Stichproben mit dem Wilcoxon-Test verglichen. Später gefundene signifikante Unterschiede zeigten sich bereits hier. Nach Rücksprache mit Statistikern des Institutes für Medizinische Informatik der JLU-Gießen wurden dann die Stichproben auf Normalverteilung untersucht. Dies geschah durch die Testung der Differenz der zu vergleichenden Stichproben mit dem Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) - Test. Der Kolmogorov-Smirnov-Test basiert auf der größten absoluten Differenz zwischen beobachteter und erwarteter kumulativer Verteilung. Fand sich eine Normalverteilung, so wurden die Stichproben mit dem "T-Test bei gepaarten Stichproben" verglichen. War keine Normalverteilung gegeben, kam der Vorzeichentest, der keine Normalverteilung voraussetzt zur Anwendung.

3. Ergebnisse

3.1. Zugabe von Zinksulfat zu Spermatozoen in vitro

In die Ergebnisse dieser Untersuchung flossen Daten von zehn ausgewerteten Ejakulaten. Abbildung 9 zeigt den Anteil motiler Spermatozoen in Prozent für jeden der Ansätze zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in den verschiedenen Konzentrationen. Obwohl hier zum Teil deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Ansätzen mit Zinksulfat zu erkennen sind, hat die statistische Auswertung der Daten lediglich für die zwei der unten angeführten Ansätze einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ergeben. Alle übrigen Ansätze differierten nicht voneinander. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der gefundenen zweiseitigen Signifikanzen im Vergleich der Kontrollgruppe mit dem jeweiligen Ansatz. Zum einen fand sich zum Inkubationszeitpunkt zwei Stunden im Ansatz mit der Konzentration 1 mmol/l eine Erhöhung der Motilität (2-seitige Signifikanz $p=0,0055$). Zum anderen führte die Konzentration 1 mmol/l nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden zu einer Erniedrigung des Anteils motiler Spermatozoen (2-seitige Signifikanz $p=0,0059$). Eine tendentielle Beeinflussung der Spermatozoenmotilität läßt sich aus den gefundenen Daten nicht ablesen.

Abbildung 10 zeigt den Anteil linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen unter dem Einfluß von $ZnSO_4$. Es wird deutlich, daß sich der Anteil linear motiler Spermatozoen bei allen Ansätzen in engen Grenzen bewegt. Tabelle 3 zeigt die zweiseitige Wahrscheinlichkeit, mit der sich die jeweils verglichenen Stichproben unterscheiden. Es fanden sich auch hier lediglich zwei Ansätze mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Dieser zeigt sich zur Inkubationszeit 4h zwischen der Kontrollgruppe und dem Ansatz mit der Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$ Zinksulfat (2-seitige Signifikanz $p=0,0085$) und zur Inkubationszeit 6h zwischen der Kontrollgruppe und dem Ansatz mit der Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$ Zinksulfat (2-seitige Signifikanz $p=0,002$). Diese beiden Ansätze haben einen höheren Anteil „Linear motile Spermatozoen“. Alle übrigen Ansätze weisen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Eine eindeutige tendenzielle Beeinflussung durch eine bestimmte $ZnSO_4$ -Konzentration oder durch einen bestimmten Inkubationszeitpunkt ist nicht festzustellen.

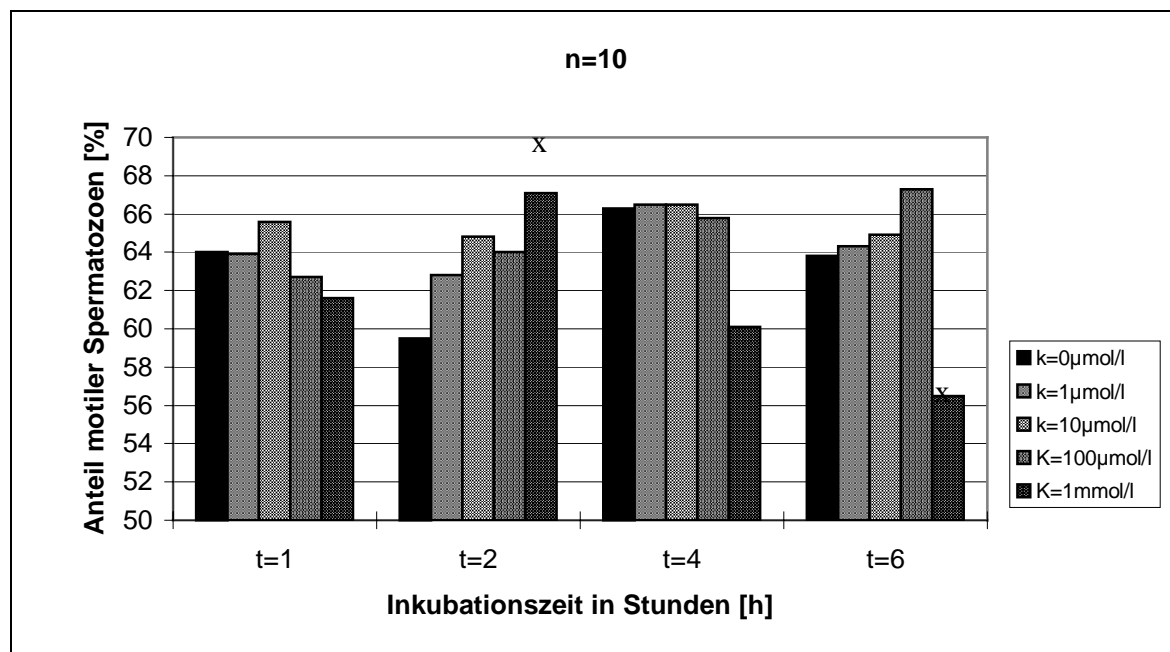


Abbildung 9: Anteil motiler Spermatozoen unter dem Einfluß von Zinksulfat in verschiedenen Konzentrationen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Die Abbildung zeigt weder bezüglich der Inkubationszeit, noch bezüglich der $ZnSO_4$ -Konzentration einen einheitlichen Einfluß auf den Anteil der „Motilen Spermatozoen“. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit Zinksulfat inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Nur bei zwei Vergleichen zeigte sich eine signifikante Änderung im Anteil der motilen Spermatozoen. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

VERGLICHENE STICHPROBEN:	P - ZWEISEITIG:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l $ZnSO_4$	0,9709
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l $ZnSO_4$	0,5744
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l $ZnSO_4$	0,7639
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1mmol/l $ZnSO_4$	0,5269
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l $ZnSO_4$	0,1094
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l $ZnSO_4$	0,1743
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l $ZnSO_4$	0,1694
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1mmol/l $ZnSO_4$	0,0055 X
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l $ZnSO_4$	0,9499
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l $ZnSO_4$	0,9401
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l $ZnSO_4$	0,8949
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1mmol/l $ZnSO_4$	0,0866
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l $ZnSO_4$	0,7864
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l $ZnSO_4$	0,4716
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l $ZnSO_4$	0,2071
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1mmol/l $ZnSO_4$	0,0059 X

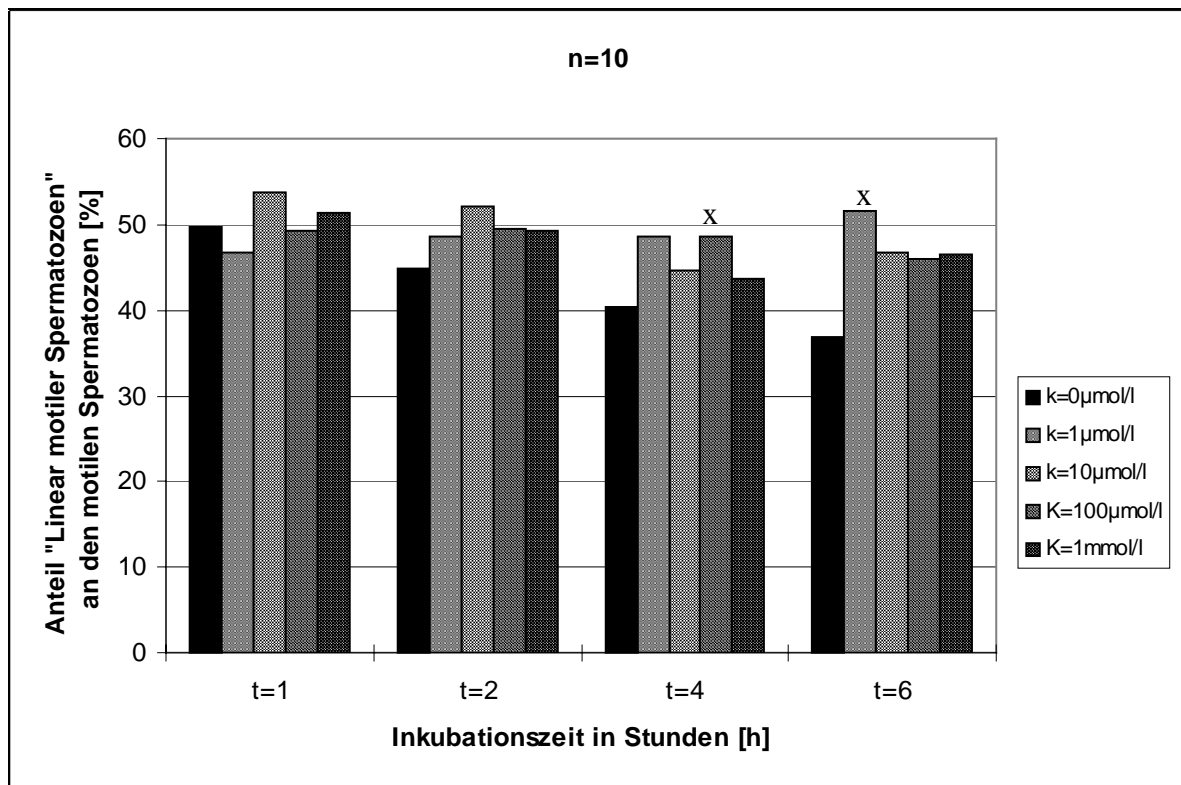


Abbildung 10: Veränderung des prozentualen Anteils der „Linear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von Zinksulfat. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit Zinksulfat inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Lediglich bei zwei Stichproben zeigte sich eine signifikante Änderung des Anteils linear motiler Spermatozoen. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l ZnSO ₄	0,3490
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l ZnSO ₄	0,3249
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l ZnSO ₄	0,9199
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1mmol/l ZnSO ₄	0,7816
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l ZnSO ₄	0,3056
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l ZnSO ₄	0,0590
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l ZnSO ₄	0,1501
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1mmol/l ZnSO ₄	0,2450
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l ZnSO ₄	0,1031
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l ZnSO ₄	0,2892
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l ZnSO ₄	0,0085 X
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1mmol/l ZnSO ₄	0,5739
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l ZnSO ₄	0,0016 X
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l ZnSO ₄	0,0794
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l ZnSO ₄	0,0527
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1mmol/l ZnSO ₄	0,1116

3.2. Wirkung der Chelatkomplexbildenden Substanzen auf die Motilitätsparameter von humanen Spermatozoen in vitro bei einer Inkubationszeit von bis zu 6 Stunden

Im Folgenden werden die vier getesteten Chelatbildner im einzelnen vorgestellt. Die zur Darstellung kommenden Motilitätsparameter wurden ausgewählt, weil sich zumindest bei drei der vier getesteten Substanzen ein deutlicher Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt hat.

3.2.1. Das Oligopeptid von Metallothionein „Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala“

In diese Untersuchung gingen Daten von zehn ausgewerteten Ejakulaten ein. Der geringe Unterschied der Ansätze mit dem Oligopeptid zur Kontrollgruppe ist der Grund, weshalb die Versuchsreihe bereits nach zehn durchgeführten Versuchen abgebrochen wurde.

Bei den nichtlinear motilen Spermatozoen fand sich lediglich im Vergleich der Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala mit der Kontrollgruppe zum Inkubationszeitpunkt 4 Stunden und im Vergleich der Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala mit der Kontrollgruppe zum Inkubationszeitpunkt 6 Stunden ein schwach signifikanter Unterschied mit $p=0,048$, bzw. $p=0,026$. Eine Übersicht der Unterschiede zwischen den Ansätzen mit dem Peptid und den Kontrollansätzen mit der dazugehörigen zweiseitigen Wahrscheinlichkeit gibt Tabelle 4. Abbildung 11 zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils der nichtlinear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß der Inkubationszeit und der Zugabe des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala. Bei den beiden Ansätzen mit signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe zeigte sich nach 4h und nach 6h eine Abnahme der nichtlinear motilen Spermatozoen. Auch wenn sich die Unterschiede in der statistischen Datenanalyse nicht als signifikant erwiesen haben, ist aus Abbildung 11 zu ersehen, daß sich der Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen in allen Ansätzen durch die Zugabe des Oligopeptids erniedrigt.

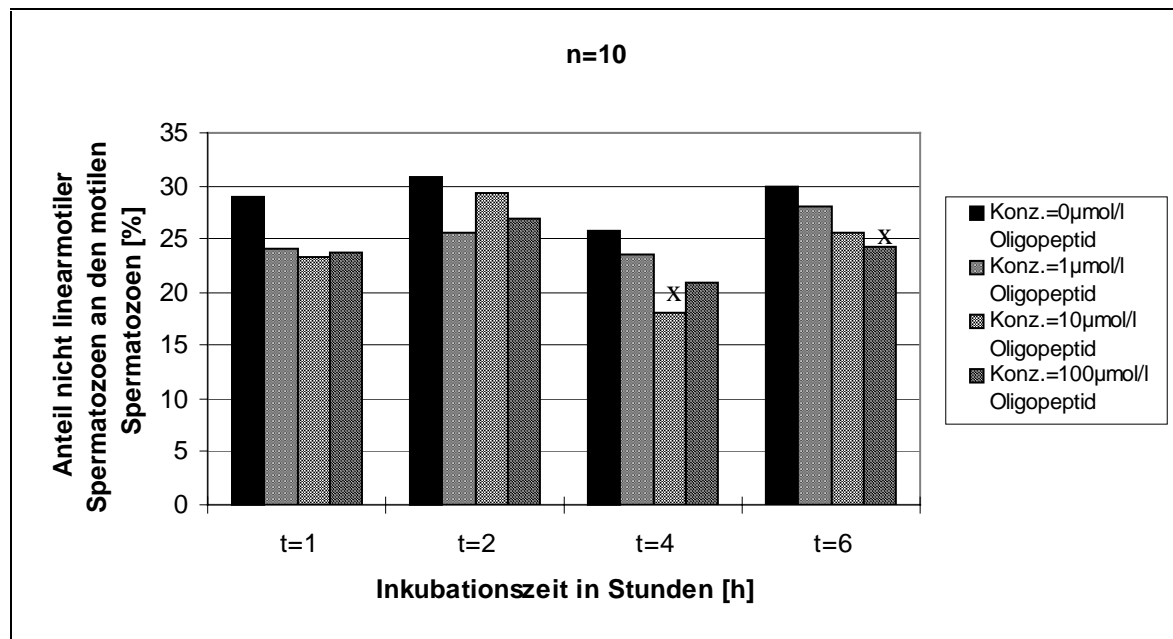


Abbildung 11: Veränderung des prozentualen Anteils der „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß der Zeit und der Zugabe des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala. Signifikante Unterschiede zeigten sich lediglich nach 4h zwischen der Kontrollgruppe und der Konzentration 10 µmol/l des Oligopeptides und nach 6h zwischen der Kontrollgruppe und der Konzentration 100 µmol/l des Oligopeptides. Hier zeigt sich eine Abnahme der „Nichtlinear motilen Spermatozoen“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit dem Oligopeptid inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Lediglich zwei der in Abbildung 12 aufgezeigten Unterschiede erwiesen sich als signifikant. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l Peptid	0,2002
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l Peptid	0,1473
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l Peptid	0,1449
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l Peptid	0,2490
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l Peptid	0,7410
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l Peptid	0,4381
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l Peptid	0,5118
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l Peptid	0,0481 X
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l Peptid	0,1010
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l Peptid	0,3644
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l Peptid	0,0920
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l Peptid	0,0256 X

Bei dem Anteil linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe. Der Unterschied ist signifikant ($p=0,022$). Der Ansatz mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala zum Inkubationszeitpunkt 6 Stunden verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe weist einen Unterschied mit einer Signifikanz von $p=0,005$ auf. Der Ansatz mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala zum Inkubationszeitpunkt 6 Stunden unterscheidet sich von der Kontrollgruppe signifikant ($p=0,001$). Alle übrigen Vergleiche erwiesen sich als nicht signifikant. Eine Übersicht über diese Ergebnisse gibt Tabelle 5. Abbildung 12 zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe finden sich lediglich bei drei Ansätzen nach 2 Stunden und 6 Stunden und führen zu einer Zunahme der linear motilen Spermatozoen. Auffällig ist auch hier, daß obwohl nur drei der gefundenen Unterschiede signifikant waren, die Kontrollgruppe zu jedem Inkubationszeitpunkt einen geringeren Anteil linear motiler Spermatozoen besaß, als die Ansätze denen das Oligopeptid zugesetzt wurde. Dies weist darauf hin, daß das Oligopeptid Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala die Motilität der Spermatozoen tendenziell hin zu einem linearmotilen Bewegungsmuster verändert.

Die Geradeausgeschwindigkeit, die straight line velocity (VSL), der motilen Spermatozoen weist im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschieden auf. Tabelle 6 zeigt die zweiseitige Wahrscheinlichkeit, mit der ein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Ansätzen mit dem Chelatbildner besteht. Abbildung 13 zeigt die Veränderung der straight line velocity (VSL) der motilen Spermatozoen in $\mu\text{m/s}$ durch den Einfluß des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala. Bei diesem Motilitätsparameter findet sich bei keinem der Ansätze ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Graphik verdeutlicht die Homogenität der gefundenen Meßergebnisse. Da die gefundenen Geschwindigkeitswerte besonders zum Meßzeitpunkt vier und sechs Stunden gleichmäßig um den Kontrollwert herum gruppiert sind, ist bei diesem Geschwindigkeitsparameter von keiner speziellen Beeinflussung durch das Oligopeptid auszugehen.

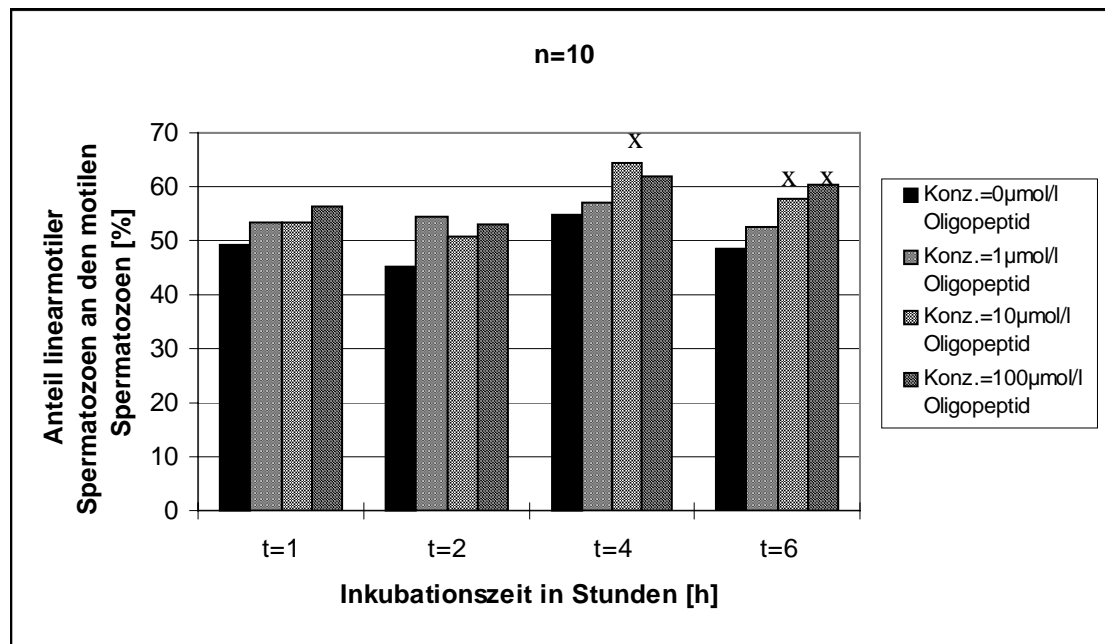


Abbildung 12: Veränderung des prozentualen Anteils „Linear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch die Zugabe des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe finden sich lediglich bei drei Ansätzen. Bei diesen kommt es zu einer Zunahme der „Linear motilen Spermatozoen“ im Vergleich zur Kontrollgruppe. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit dem Oligopeptid inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Obwohl sich die in Abbildung 13 dargestellte Veränderung durch die Zugabe des Oligopeptides bei allen Konzentrationen fand, waren nur drei dieser Unterschiede signifikant. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l Peptid	0,4349
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l Peptid	0,3806
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l Peptid	0,1285
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l Peptid	0,0759
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l Peptid	0,3017
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l Peptid	0,1320
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l Peptid	0,6265
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l Peptid	0,0326 X
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l Peptid	0,0603
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l Peptid	0,0752
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l Peptid	0,0051 X
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l Peptid	0,0011 X

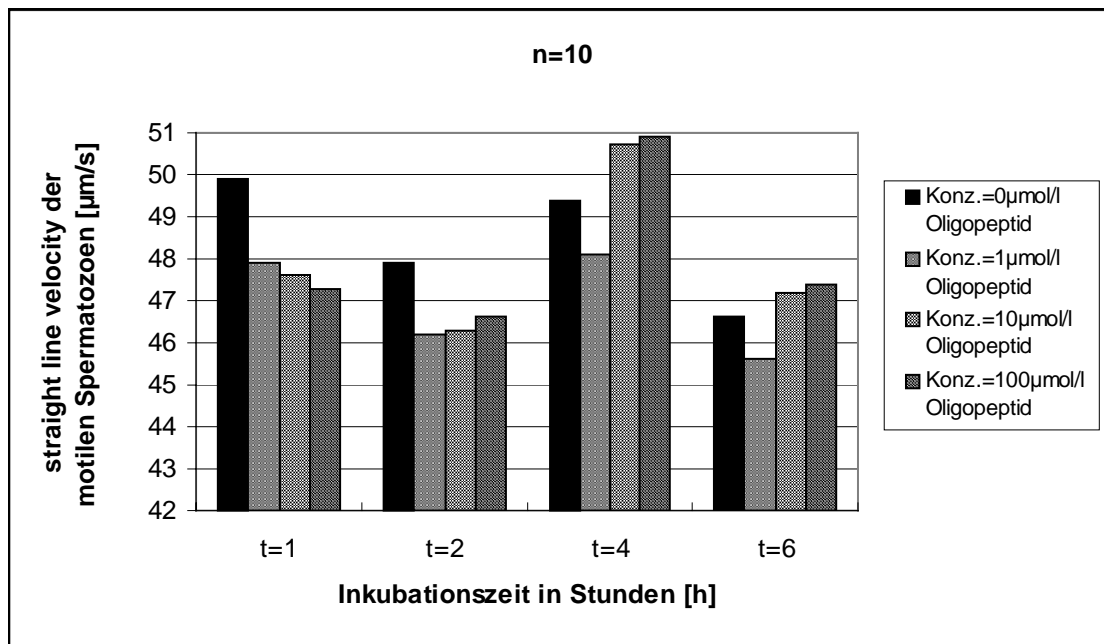


Abbildung 13: Veränderung der „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen in $\mu\text{m/s}$ durch den Einfluß des Oligopeptids Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Bei dem Motilitätsparameter „VSL“ findet sich bei keinem der Ansätze ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Tabelle 6: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit dem Oligopeptid inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Zu keiner Zeit findet sich ein signifikanter Unterschied.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l Peptid	0,5300
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l Peptid	0,4687
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l Peptid	0,3629
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l Peptid	0,5452
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l Peptid	0,6033
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l Peptid	0,6386
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l Peptid	0,5947
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l Peptid	0,6227
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l Peptid	0,5871
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l Peptid	0,5819
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l Peptid	0,6998
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l Peptid	0,5809

3.2.2. Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)

Bei dieser Untersuchung fanden die Ejakulate von 20 Probanden Verwendung.

Bei dem Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen kam es durch Zugabe von DMSA in jeder der getesteten Konzentrationen und zu jedem Inkubationszeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Wie in Abbildung 14 dargestellt, führt die Addition von DMSA zu den präparierten Spermatozoen zu einer deutlichen Reduktion des prozentualen Anteils der nichtlinear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen. Hierbei zeigte sich, daß selbst die kleinste Konzentration ($1\mu\text{mol/l}$) von DMSA diesen Motilitätsparameter deutlich beeinflussen kann. Die zweiseitige Signifikanz erstreckt sich von $p=0,048$, für den Zeitpunkt 4 Stunden mit der Konzentration $1\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$, für die Konzentrationen $10\mu\text{mol/l}$ und $100\mu\text{mol/l}$ zum Inkubationszeitpunkt 1 Stunde. Die Einzeldaten über die im gefundene zweiseitige Wahrscheinlichkeit, mit der sich die beiden jeweiligen Stichproben unterscheiden zeigt Tabelle 7.

Durch die Zugabe von DMSA konnte der Anteil linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen in jeder der getesteten Konzentrationen und zu jedem Inkubationszeitpunkt signifikant beeinflusst werden. Wie in Abbildung 15 dargestellt, führt die Addition von DMSA zu den präparierten Spermatozoen zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils der linear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen. Die Kontrollansätze enthalten einen deutlich geringeren Anteil linearmotiler Spermatozoen im Vergleich zu den Ansätzen mit DMSA. Die zweiseitige Signifikanz, erstreckt sich von $p=0,0096$, für den Zeitpunkt 2 Stunden mit der Konzentration $100\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$, für die Konzentrationen $10\mu\text{mol/l}$ zum Inkubationszeitpunkt 6 Stunden. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die gefundenen Unterschiede.

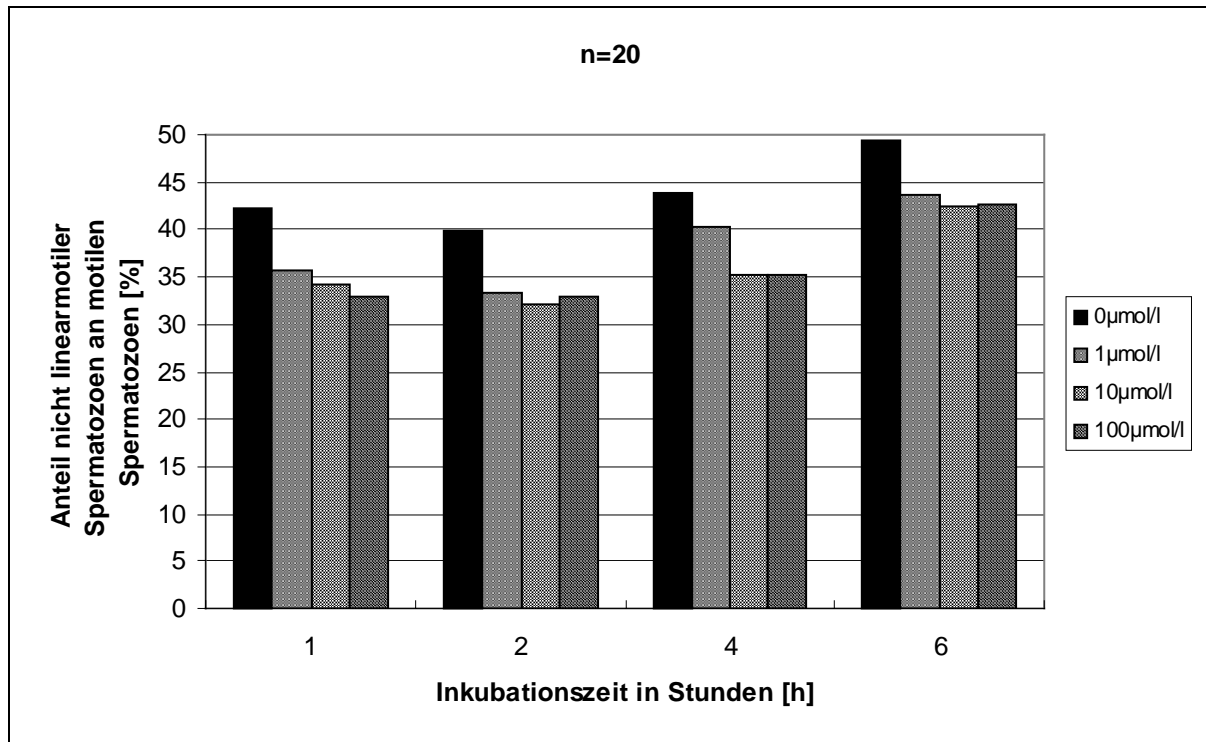


Abbildung 14: Veränderung des prozentualen Anteils „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMSA zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Die verschiedenen Ansätze mit DMSA unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant von dem jeweiligen Kontrollansatz. Die Abbildung zeigt, daß DMSA den Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ vermindert.

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMSA inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DMSA signifikant erniedrigt. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DMSA	0,0002 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DMSA	0,0001 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DMSA	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DMSA	0,0124 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DMSA	0,0082 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DMSA	0,0183 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DMSA	0,0484 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DMSA	0,0006 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DMSA	0,0019 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DMSA	0,0278 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DMSA	0,0086 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DMSA	0,0144 x

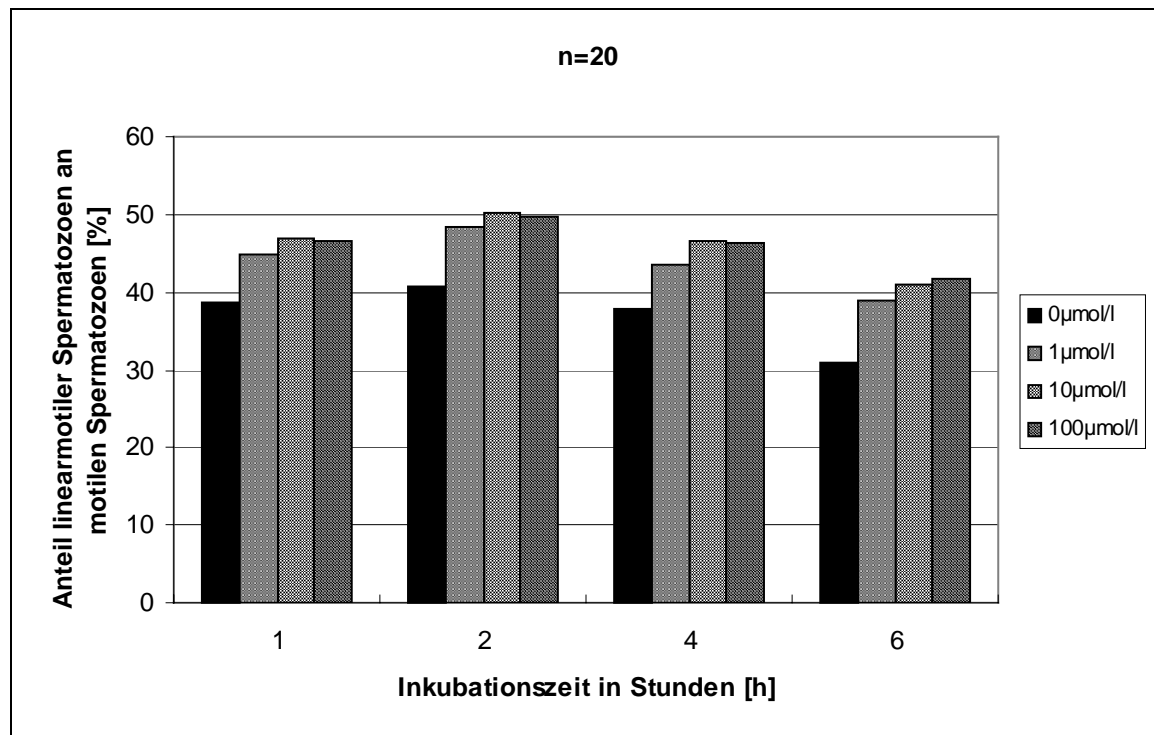


Abbildung 15: Veränderung des prozentualen Anteils „Linear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMSA. Die verschiedenen Ansätze mit DMSA unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant von dem Kontrollansatz. Der Anteil „Linear motiler Spermatozoen“ ist gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Tabelle 8: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMSA inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Linear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DMSA signifikant erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DMSA	0,0001 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DMSA	0,0003 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DMSA	0,0002 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DMSA	0,0075 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DMSA	0,0055 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DMSA	0,0096 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DMSA	0,0034 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DMSA	0,0004 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DMSA	0,0011 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DMSA	0,0028 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DMSA	0,0001 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DMSA	0,0002 x

Die Geradeausgeschwindigkeit ändert sich ebenfalls durch die Zugabe von DMSA. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung der Geradeausgeschwindigkeit bei allen Ansätzen denen DMSA zugesetzt wurde. Diese Erhöhung unterscheidet sich in allen Ansätzen signifikant von der Kontrollgruppe. Abbildung 16 zeigt diese Erhöhung der „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen. Die zweiseitige Signifikanz erstreckt sich von $p=0,034$ für den Zeitpunkt 4 Stunden mit der Konzentration $1 \mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentrationen $1\mu\text{mol/}$ zum Inkubationszeitpunkt 1 Stunde. Tabelle 9 zeigt die Wahrscheinlichkeit jedes einzelnen Unterschiedes zwischen den Ansätzen denen DMSA zugesetzt wurde und den Kontrollansätzen.

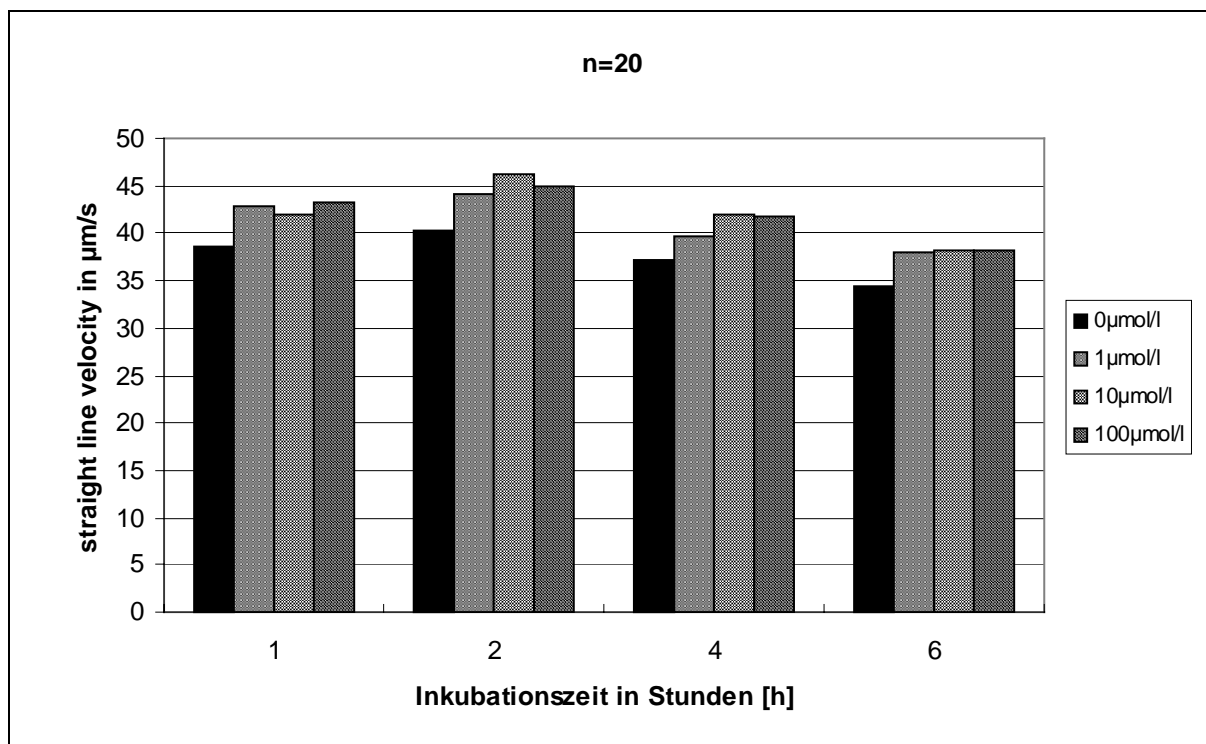


Abbildung 16: Veränderung der Geschwindigkeit „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMSA. Die verschiedenen Ansätze mit DMSA unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant vom Kontrollansatz. Die Spermatozoen denen DMSA zugesetzt wurde erreichen eine höhere Geradeausgeschwindigkeit (VSL).

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMSA inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Die Geradeausgeschwindigkeit ist bei den Stichproben denen DMSA zugesetzt wurde deutlich erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=1 μ mol/l DMSA	0,0001 x
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=10 μ mol/l DMSA	0,0028 x
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=100 μ mol/l DMSA	0,0007 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=1 μ mol/l DMSA	0,0011 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=10 μ mol/l DMSA	0,0001 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=100 μ mol/l DMSA	0,0006 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=1 μ mol/l DMSA	0,0340 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=10 μ mol/l DMSA	0,0005 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=100 μ mol/l DMSA	0,0009 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=1 μ mol/l DMSA	0,0041 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=10 μ mol/l DMSA	0,0035 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=100 μ mol/l DMSA	0,0023 x

3.2.3. Dimercaptopropan-1-sulfonat-Na (DMPS)

Auch hier gingen die Daten der 20 Ejakulate ein.

Der Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen wurde durch die Zugabe von DMPS in jeder der getesteten Konzentrationen und zu jedem Inkubationszeitpunkt gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Abbildung 17 zeigt den prozentualen Anteil der nichtlinear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen unter dem Einfluß des Chelatbildners DMPS zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Es ist deutlich erkennbar, daß die Kontrollgruppe einen höheren Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen enthält und das bereits die geringste Konzentration DMPS (1 μ mol/l) genügt, um diese Änderung herbeizuführen. Die zweiseitige Signifikanz zwischen den Ansätzen mit DMPS und den Kontrollansätzen erstreckt sich von $p=0,0329$, für den Zeitpunkt 4 Stunden mit der Konzentration 1 μ mol/l bis hin zu $p<0,0001$, für die Konzentration 100 μ mol/ zum Inkubationszeitpunkt 1 Stunde. Tabelle 10 zeigt die Wahrscheinlichkeit aller gefundenen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Ansätzen mit DMPS.

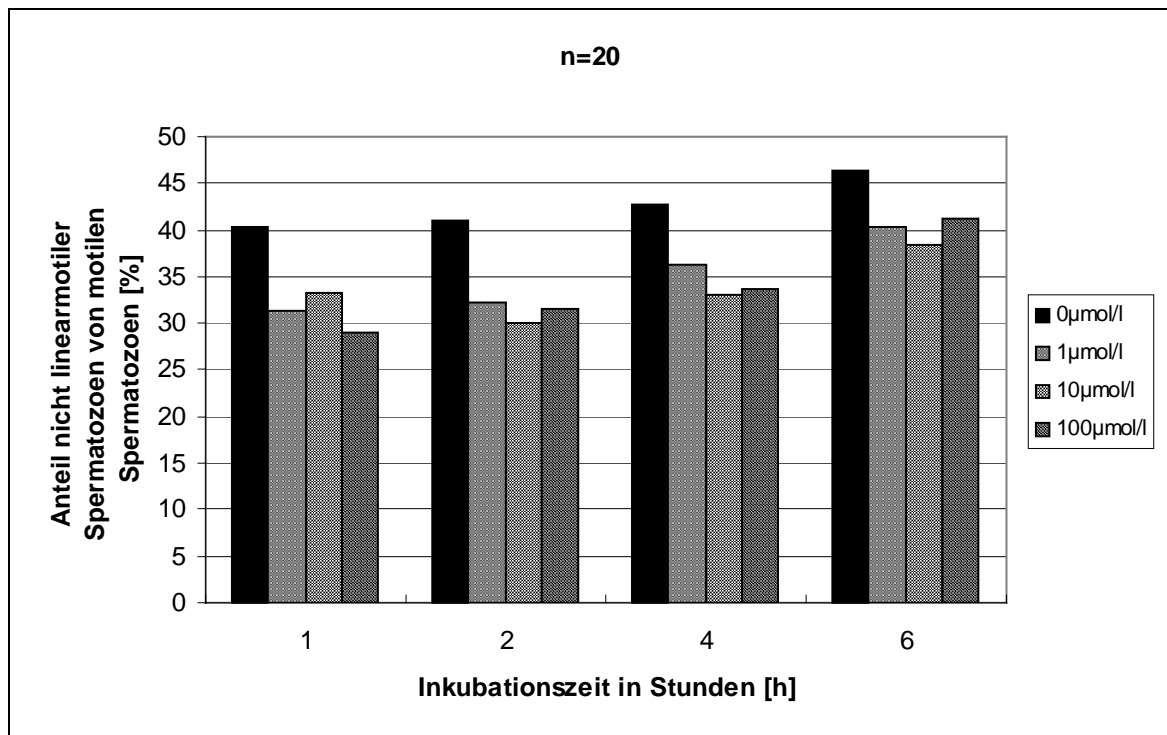


Abbildung 17: Veränderung des prozentualen Anteils der „Nichtlinear motilen Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMPS. Die verschiedenen Ansätze mit DMPS führen zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt zu einer signifikanten Erniedrigung des Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ gegenüber den Kontrollansätzen.

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMPS inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DMPS signifikant erniedrigt. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DMPS	0,0005 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DMPS	0,0019 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DMPS	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DMPS	0,0016 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DMPS	0,0023 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DMPS	0,0192 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DMPS	0,0329 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DMPS	0,0003 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DMPS	0,0016 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DMPS	0,0021 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DMPS	0,0070 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DMPS	0,0138 x

Der Anteil linearmotiler Spermatozoen wurde durch Zugabe von DMPS deutlich erhöht. Diese Erhöhung des Anteils linearmotiler Spermatozoen zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum. Außerdem zeigte sich, daß jede der getesteten Konzentrationen von $1\mu\text{mol/l}$ bis $100\mu\text{mol/l}$ DMPS in der Lage war, einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zu bewirken. Auch bei diesem Motilitätsparameter zeigte sich, daß bereits die niedrigste Konzentration an DMPS ($1\mu\text{mol/l}$) genügte, um einen signifikanten Unterschied zu bewirken. Abbildung 18 zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß der Zugabe von DMPS in den verschiedenen Konzentrationen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Es wird verdeutlicht, daß die Zugabe von DMPS zu den präparierten Spermatozoen zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils der linear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen führt. Die zweiseitige Signifikanz erstreckt sich von $p=0,0414$ für den Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration $1\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentration $100\mu\text{mol/}$ zum Inkubationszeitpunkt 1 Stunde. Die Wahrscheinlichkeit der gefundenen Unterschiede sind in Tabelle 11 dargestellt.

Die Geradeausgeschwindigkeit, die straight line velocity (VSL) der Spermatozoen wurde durch die Zugabe von DMPS signifikant erhöht. Hierbei zeigten sich ähnliche Resultate wie sie bereits bei DMSA gefunden wurden. Es kommt zu einer signifikanten Erhöhung der Geradeausgeschwindigkeit, die sich während des gesamten Inkubationszeitraumes und bei jeder der getesteten Konzentrationen von DMPS findet. Abbildung 19 zeigt die Veränderung der Geschwindigkeit „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMPS zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Auch hier konnte bereits bei der geringsten Konzentration von DMPS ($1\mu\text{mol/l}$) ein deutlicher Effekt erzielt werden. Die zweiseitige Signifikanz der gefundenen Unterschiede belief sich auf $p=0,0201$ für den Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration $1\mu\text{mol/l}$, als geringster, bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentration $100\mu\text{mol/}$ zum Inkubationszeitpunkt 1 Stunde, als größter. Die gefundenen signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

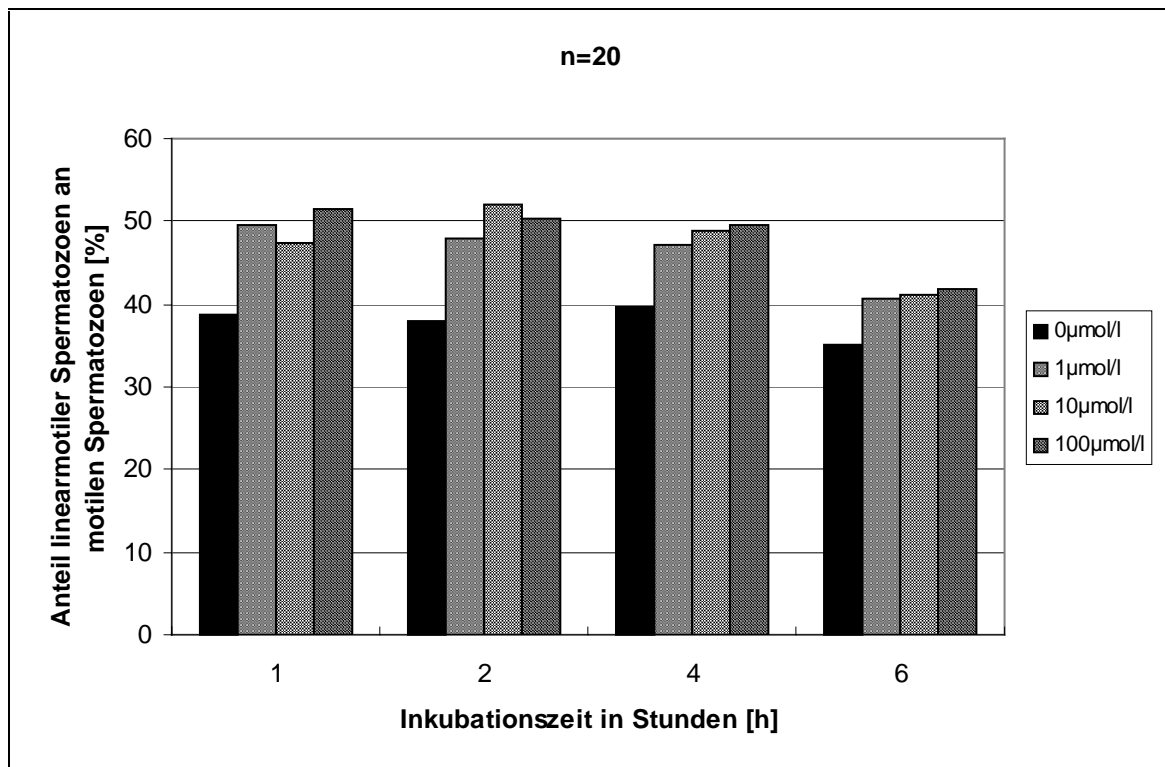


Abbildung 18: Veränderung des prozentualen Anteils „Linear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMPS. Die verschiedenen Ansätze mit DMPS unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant vom Kontrollansatz. Es kommt zu einer Erhöhung des Anteils „Linear motilen Spermatozoen“ unter der Einflußnahme von DMPS.

Tabelle 11: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMPS inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Linear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DMPS signifikant erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h; k=0µmol/l vs. k=1µmol/l DMPS	0,0006 x
t=1h; K=0µmol/l vs. k=10µmol/l DMPS	0,0009 x
t=1h; K=0µmol/l vs. k=100µmol/l DMPS	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DMPS	0,0004 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DMPS	0,0002 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DMPS	0,0016 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DMPS	0,0144 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DMPS	0,0027 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DMPS	0,0010 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DMPS	0,0414 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DMPS	0,0140 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DMPS	0,0022 x

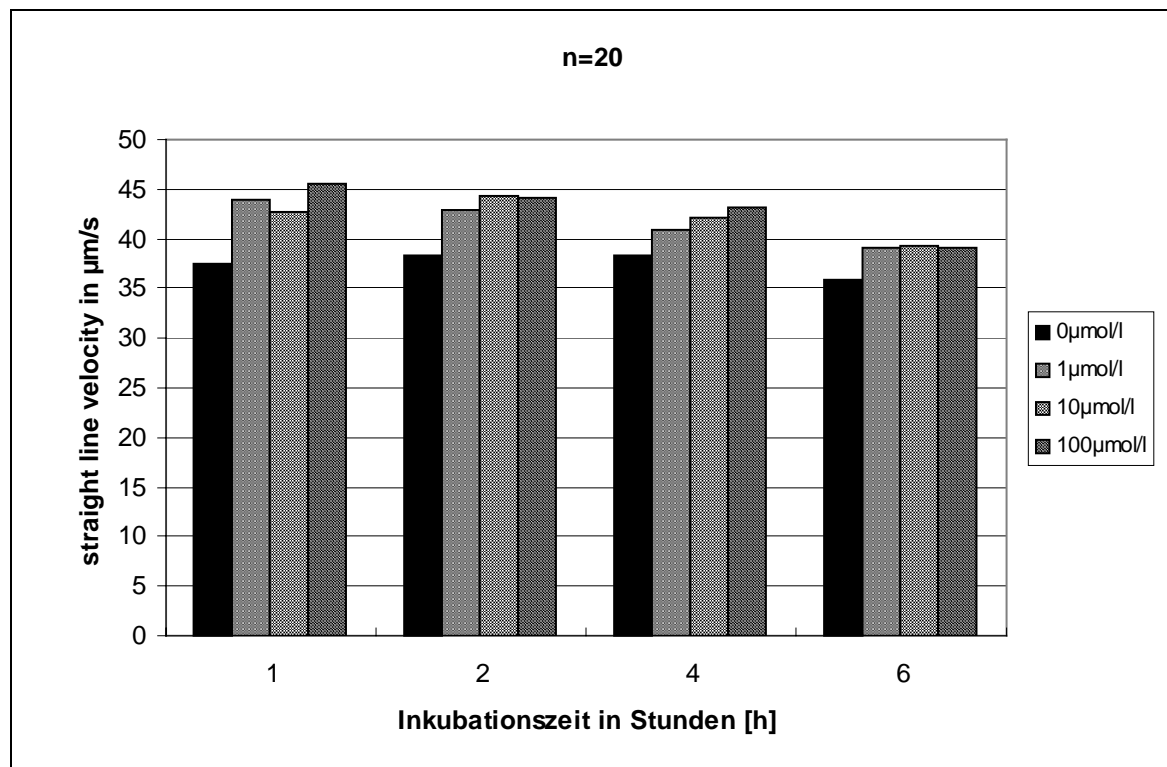


Abbildung 19: Veränderung der Geschwindigkeit „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DMPS. Die verschiedenen Ansätze mit DMPS führen zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt zu einer signifikanten Erhöhung der Geradeausgeschwindigkeit (VSL).

Tabelle 12: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DMPS inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Die Geradeausgeschwindigkeit ist bei den Stichproben denen DMPS zugesetzt wurde deutlich erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DMPS	0,0002 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DMPS	0,0002 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DMPS	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DMPS	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DMPS	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DMPS	0,0001 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DMPS	0,0201 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DMPS	0,0002 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DMPS	0,0015 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DMPS	0,0040 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DMPS	0,0029 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DMPS	0,0013 x

3.2.4. DL-Penicillamin

Die Daten von 20 ausgewerteten Ejakulaten wurden hier statistisch ausgewertet.

DL-Penicillamin konnte den Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigen. Bereits die geringste Konzentration ($1\mu\text{mol/l}$) des Chelatbildners führte zu einer deutlichen Erniedrigung des Anteils nichtlinear motiler Spermatozoen. Aber auch alle anderen getesteten Konzentrationen von DL-Penicillamin führten zu jedem Inkubationszeitpunkt zu einer signifikanten Erniedrigung dieses Motilitätsparameters. Abbildung 20 zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils nichtlinear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DL-Penicillamin zu den verschiedenen Meßzeitpunkten. Diese Abbildung verdeutlicht, daß die Kontrollgruppe zu jedem gemessenen Zeitpunkt einen größeren Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen enthält. Die zweiseitigen Signifikanzen für die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Ansätzen, die mit DL-Penicillamin inkubiert wurden, erstrecken sich von $p=0,0228$, für den Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration $1\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentration $10\mu\text{mol/}$ zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden. Tabelle 13 stellt die Wahrscheinlichkeit aller gefundenen Unterschiede zwischen den Kontrollansätzen und den Ansätzen mit DL-Penicillamin dar.

Die Zugabe von DL-Penicillamin zu den präparierten Spermatozoen führt zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils der linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen (Abbildung 21). Diese Veränderung zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum und war bereits bei der geringsten Konzentration ($1\mu\text{mol/l}$) nachweisbar. Die zweiseitige Signifikanz für die gefundenen Unterschiede erstreckt sich von $p=0,0027$ für den Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration $1\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentration $10\mu\text{mol/}$ zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden. Tabelle 14 zeigt eine Auflistung aller gefundenen Unterschiede zwischen den Ansätzen mit DL-Penicillamin und den Kontrollansätzen.

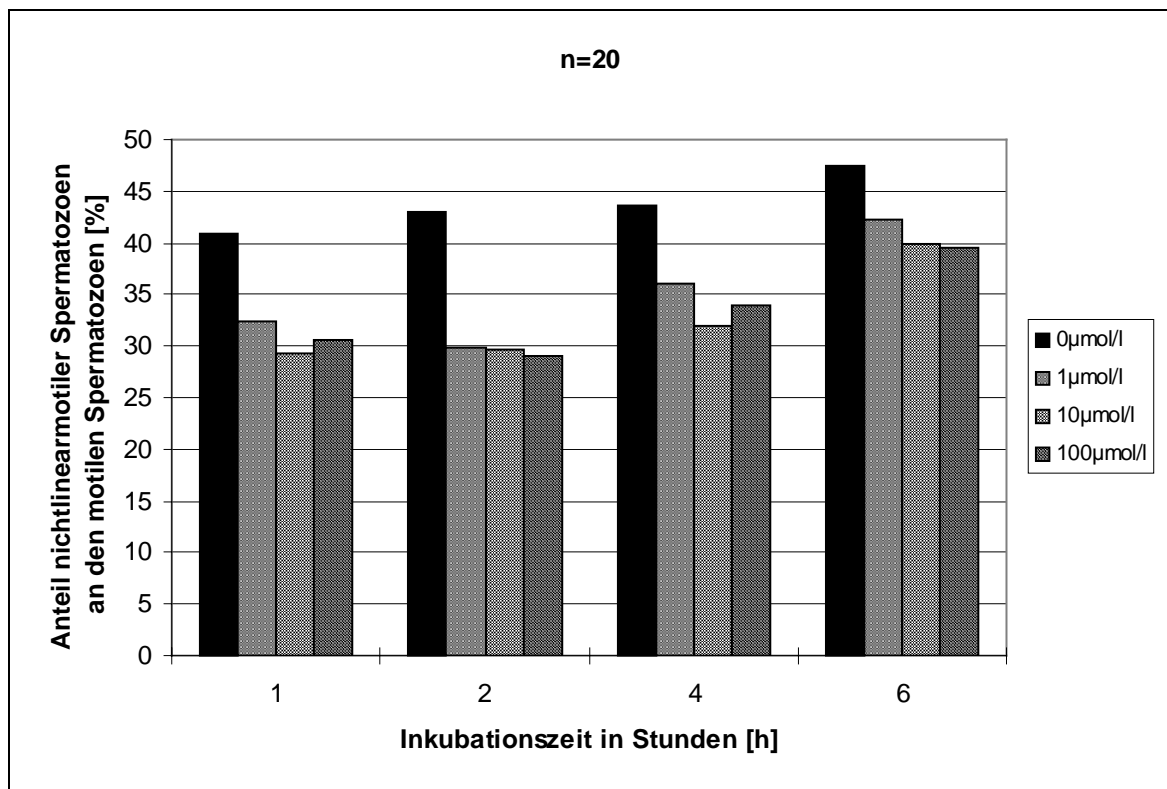


Abbildung 20: Veränderung des prozentualen Anteils „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DL-Penicillamin. Die verschiedenen Ansätze mit DL-Penicillamin haben zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt einen signifikant geringeren Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“.

Tabelle 13: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DL-Penicillamin inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DL-Penicillamin signifikant erniedrigt. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0004 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0010 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0015 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0228 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0052 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0045 x

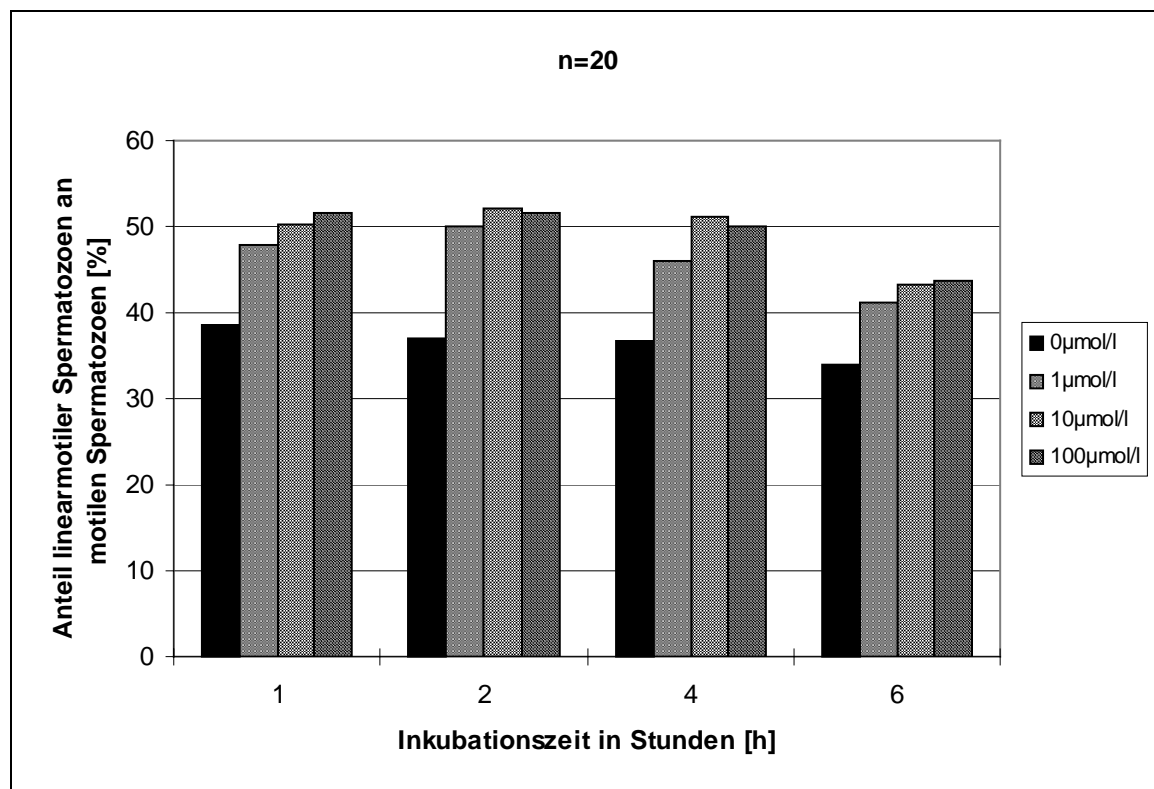


Abbildung 21: Veränderung des prozentualen Anteils der „Linear motilen Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DL-Penicillamin. Die verschiedenen Ansätze mit DL-Penicillamin unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant von den Kontrollansätzen und führen zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils „Linear motile Spermatozoen“.

Tabelle 14: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DL-Penicillamin inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Der Anteil „Linear motiler Spermatozoen“ ist bei den Ansätzen mit DL-Penicillamin signifikant erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0004 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0003 x
t=1h;k=0µmol/l - t=1h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0002 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0µmol/l - t=2h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0003 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=4h;k=0µmol/l - t=4h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0002 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=1µmol/l DL-Penicillamin	0,0027 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=10µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=6h;k=0µmol/l - t=6h;k=100µmol/l DL-Penicillamin	0,0001 x

Auch die Geradeausgeschwindigkeit wurde durch die Zugabe von DL-Penicillamin signifikant erhöht (Abbildung 22). Dies zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum. Wie bei den anderen beiden Chelatbildnern (DMSA, DMPS) kam es bereits bei der geringsten Konzentration von DL-Penicillamin ($1\mu\text{mol/l}$) zu einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die zweiseitige Signifikanz dieser Unterschiede erstreckt sich von $p=0,0026$ für den Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration $100\mu\text{mol/l}$ bis hin zu $p<0,0001$ für die Konzentration $10\mu\text{mol/l}$ zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden. Tabelle 15 zeigt eine Zusammenfassung aller diesbezüglich gefundenen signifikanten Unterschiede.

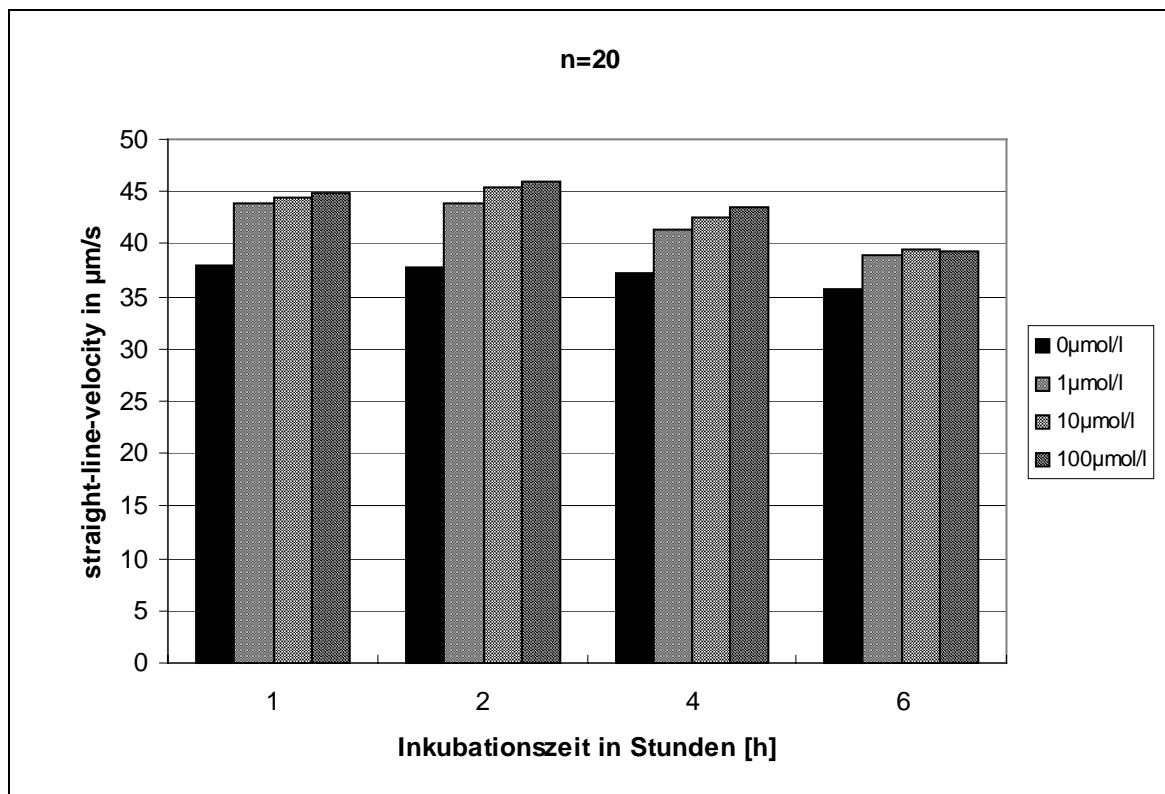


Abbildung 22: Veränderung der Geschwindigkeit „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen durch den Einfluß von DL-Penicillamin. Die verschiedenen Ansätze mit DL-Penicillamine unterscheiden sich zu jedem gemessenen Inkubationszeitpunkt signifikant von den Kontrollansätzen und weisen Spermatozoen mit einer erhöhten Progressivgeschwindigkeit auf.

Tabelle 15: Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit (p) mit der sich die mit DL-Penicillamin inkubierten Stichproben von der Kontrollgruppe unterscheiden. Die Geradeausgeschwindigkeit ist bei den Stichproben denen DL-Penicillamin zugesetzt wurde deutlich erhöht. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Verglichene Stichproben:	p - zweiseitig:
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=1 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=10 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=1h;k=0 μ mol/l - t=1h;k=100 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0002 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=1 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=10 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=2h;k=0 μ mol/l - t=2h;k=100 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=1 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0012 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=10 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0003 x
t=4h;k=0 μ mol/l - t=4h;k=100 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0001 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=1 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0007 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=10 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0008 x
t=6h;k=0 μ mol/l - t=6h;k=100 μ mol/l DL-Penicillamin	0,0026 x

3.3. Vergleich des Einflusses von DMPS, DMSA und DL-Penicillamin auf die Motilität von humanen Spermatozoen nach 2 Stunden Inkubationszeit

Bei dieser Untersuchung wurden die Substanzen DMPS, DMSA und DL-Penicillamin für 2 Stunden mit aufbereiteten Spermatozoen inkubiert. Ein Ansatz enthielt 100 μ mol/l der jeweiligen Substanz als Endkonzentration. Nach der Inkubationszeit wurden die Motilitätsparameter mit Hilfe der CASA erfaßt. Der Rest des Ansatzes wurde für die Zinkbestimmung mit der Atomabsorptionsspektrometrie aufbewahrt. Bei dieser Untersuchung wurden insgesamt 21 Ejakulate verwendet. Bei der statistischen Analyse der gefundenen Daten fanden sich ebenfalls bei den Motilitätsparametern „Nichtlinear motile Spermatozoen“, „Linear motile Spermatozoen“ und „motile Spermatozoen VSL“ die schon in den Versuchen über sechs Stunden gefundenen signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Der Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen wurde durch die Zugabe der Chelatoren in den angegebenen Konzentrationen signifikant reduziert. Bei einem Vergleich der Chelatoren untereinander zeigt sich, daß sowohl zwischen DMSA und DMPS (zweiseitige Signifikanz $p=0,643$), als auch zwischen DMSA und DL-Penicillamin (zweiseitige Signifikanz $p=0,663$) und zwischen DMPS und DL-Penicillamin (zweiseitige Signifikanz $p=0,19$) kein

signifikanter Unterschied bezüglich der Wirkung auf den Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen festzustellen besteht (Abbildung 23). Es ist ersichtlich, daß DL-Penicillamin den Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen am stärksten zu reduzieren vermag, obwohl sich dieser Chelatbildner in seiner Wirkung nicht signifikant von den anderen Chelatbildnern abgrenzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wies der Chelator DMSA mit $p=0,0044$ (zweiseitige Signifikanz), DMPS mit $p=0,0082$ (zweiseitige Signifikanz) und DL-Penicillamin mit $p=0,003$ (zweiseitige Signifikanz) einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

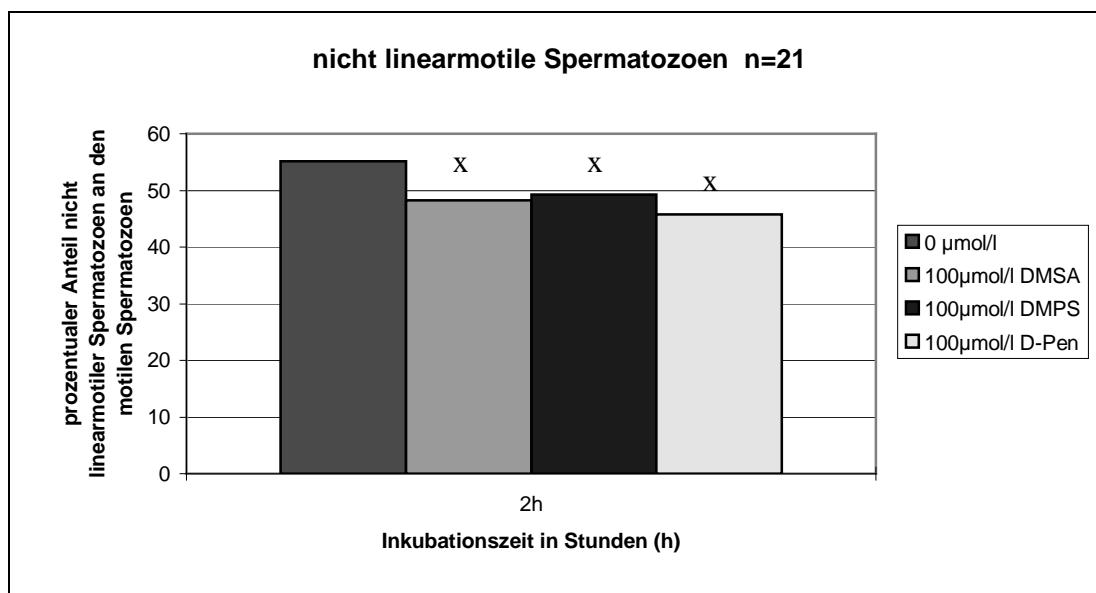


Abbildung 23: Veränderung des prozentualen Anteils der „Nichtlinear motilen Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch die Wirkung der Chelatoren DMSA, DMPS und D-Penicillamine. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wies der Chelator DMSA mit $p=0,0044$, DMPS mit $p=0,0082$ und D-Penicillamine mit $p=0,003$ einen signifikant geringeren Anteil „Nichtlinear motiler Spermatozoen“ als die Kontrollgruppe auf. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Der Anteil linear motiler Spermatozoen steigert sich durch Zugabe der Chelatoren. Auch hierbei scheint DL-Penicillamin den stärksten Effekt auf die Spermatozoen zu haben, denn der Anteil linear motiler Spermatozoen ist bei diesem Ansatz am größten. Bei einem Vergleich der Chelatoren untereinander zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Weder zwischen DMSA und DMPS (zweiseitige Signifikanz $p = 0,905$), noch zwischen DMSA und DL-Penicillamin (zweiseitige Signifikanz $p = 0,34$) und auch nicht zwischen DMPS und DL-Penicillamin (zweiseitige Signifikanz $p = 0,23$) kein signifikanter Unterschied bezüglich

der Wirkung auf den Motilitätsparameter linear motile Spermatozoen. Abbildung 24 zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils der linear motilen Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch die Wirkung der Chelatoren DMSA, DMPS und DL-Penicillamin. DMSA weist mit $p=0,0013$ (zweiseitige Signifikanz), DMPS mit $p=0,0006$ (zweiseitige Signifikanz) und DL-Penicillamin mit $p=0,001$ (zweiseitige Signifikanz) einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

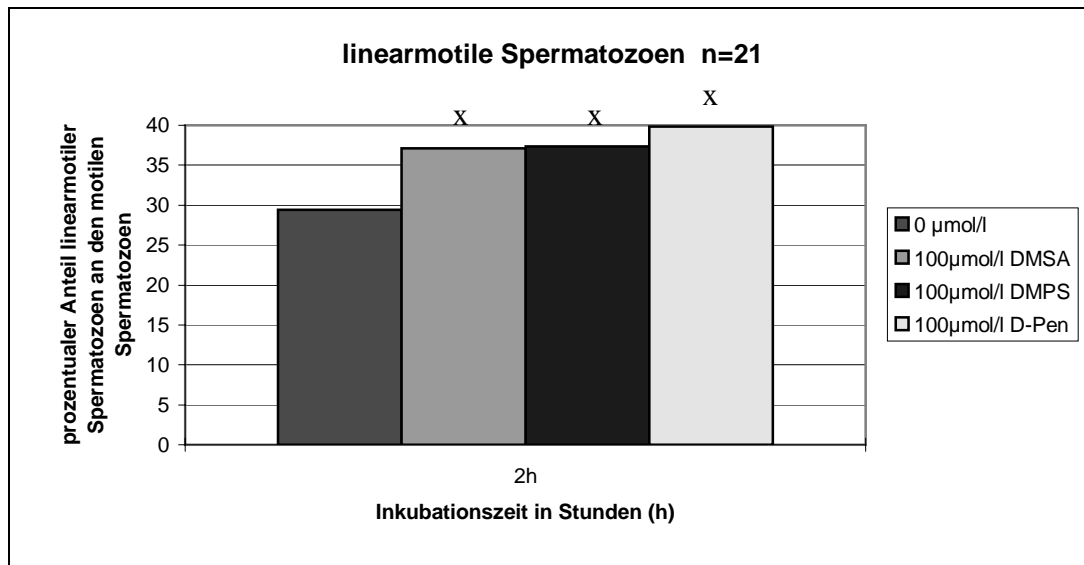


Abbildung 24: Veränderung des prozentualen Anteils der „Linear motilen Spermatozoen“ an den motilen Spermatozoen durch die Wirkung von DMSA, DMPS und DL-Penicillamine. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden unterschied sich DMSA mit $p=0,0013$, DMPS mit $p=0,0006$ und D-Penicillamine mit $p=0,001$ signifikant, mit einem höheren Anteil linearmotiler Spermatozoen, von der Kontrollgruppe. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

Unter dem Einfluß der eingesetzten Chelatbildner kam es zu einer signifikanten Zunahme der Geradeausgeschwindigkeit (VSL) (Abbildung 26). Die schnellsten Spermatozoen enthielt der Ansatz mit DL-Penicillamin. Bei einem Vergleich der Chelatoren untereinander zeigt sich, daß zwischen den Chelatoren DMSA und DL-Penicillamin noch einmal ein signifikanter Unterschied (zweiseitige Signifikanz $p=0,011$) bezüglich der Wirkung auf den Motilitätsparameter „VSL“ der motilen Spermatozoen festzustellen ist. Das heißt, daß DL-Penicillamin einen deutlich stärkeren Einfluß auf diesen Motilitätsparameter nimmt als DMSA. Der Vergleich der beiden übrigen Paare, zwischen DMSA und DMPS (zweiseitige Signifikanz $p=0,276$) und zwischen DMPS und DL-Penicillamin (zweiseitige Signifikanz

$p=0,08$), ergab keinen Unterschied. Abbildung 25 zeigt die Veränderung der straight line velocity (VSL) der motilen Spermatozoen durch die Wirkung der Chelatoren DMSA, DMPS und DL-Penicillamin jeweils in einer Konzentration von $100\mu\text{mol/l}$. DMSA weist mit $p=0,0206$ (zweiseitige Signifikanz), DMPS mit $p=0,0032$ (zweiseitige Signifikanz) und DL-Penicillamin mit $p=0,0006$ (zweiseitige Signifikanz) einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

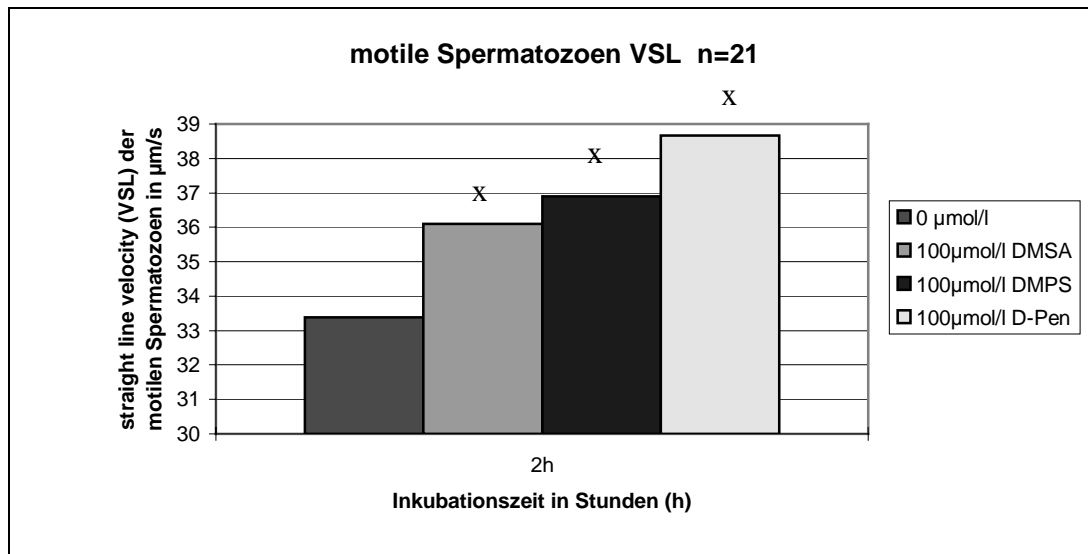


Abbildung 25: Veränderung der „straight line velocity (VSL)“ der motilen Spermatozoen durch die Wirkung der Chelatoren DMSA, DMPS und DL-Penicillamine. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wies DMSA mit $p=0,0206$, DMPS mit $p=0,0032$ und DL-Penicillamine mit $p=0,0006$ eine signifikant höhere „straight line velocity (VSL)“ als die Kontrollgruppe auf. X: Unterschied, signifikant zur Kontrollgruppe.

3.4. Zinkkonzentration der Spermatozoen

In diese Untersuchung gingen Daten von 19 Ejakulaten ein. Gemessen wurde die Zinkkonzentration der Ansätze mit $100\mu\text{mol/l}$ DMSA, $100\mu\text{mol/l}$ DMPS, $100\mu\text{mol/l}$ DL-Penicillamin und der Kontrollansatz nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Die statistische Analyse der Stichproben ergab keine Normalverteilung. Deshalb fand zum Vergleich der Daten der Vorzeichentest Anwendung. Tabelle 16 zeigt die gefundenen Mediane und Mittelwerte der Zinkkonzentration der Spermatozoen in $\text{ng}/10^6$ Spermatozoen, auch weitere deskriptive Daten sind dargestellt.

Tabelle 16: Zinkgehalt von Spermatozoen in $\text{ng}/10^6$ Spermatozoen vor und nach Inkubation für zwei Stunden mit verschiedenen Chelatbildnern.

Ansatz:	Median:	Mittelwert:	Min.-Wert:	Max.-Wert:	25%-Perzentile:	75%-Perzentile:
Kontrollansatz:	23,7	30,7	4,8	92,5	12,7	34,9
100 $\mu\text{mol/l}$ DMSA:	27,7	31,6	6,2	93,7	16,9	36,2
100 $\mu\text{mol/l}$ DMPS:	21,9	28,9	3,7	96	14,6	30,5
100 $\mu\text{mol/l}$ D-Pen:	24,1	27,8	9,3	70,1	14,8	32,4

Der Vergleich des Kontrollansatzes mit den Ansätzen, denen die Chelatoren zugesetzt wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied. Die zweiseitige Signifikanz betrug für den Kontrollansatz und DMSA $p=0,064$, für den Kontrollansatz und DMPS $p=1$ und für den Kontrollansatz und DL-Penicillamin $p=0,65$.

Abbildung 26 zeigt die Zinkkonzentration in $\text{ng}/10^6$ Spermatozoen für die verschiedenen Ansätze nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Man erkennt deutlich, daß sich die Zinkkonzentration der Spermatozoen in allen Ansätzen in sehr engen Grenzen bewegt.

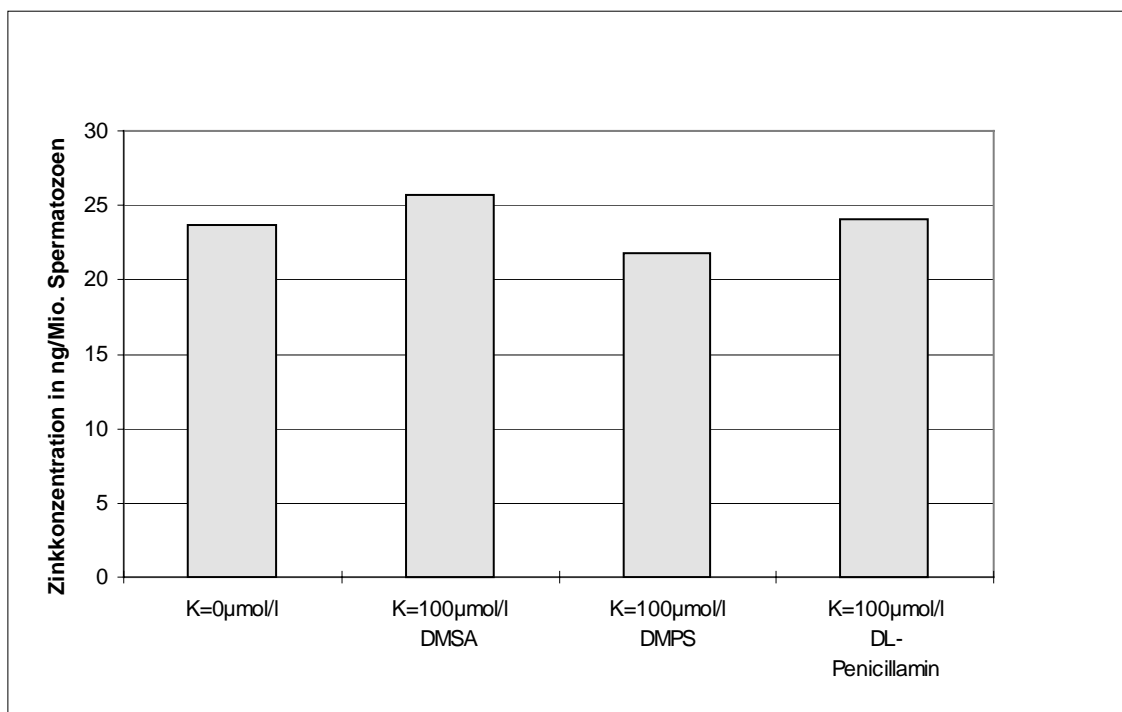


Abbildung 26: Zinkkonzentration in $\text{ng}/10^6$ Spermatozoen für die verschiedenen Ansätze nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Die statistische Untersuchung, daß es zwischen den Ansätzen mit den Chelatoren und dem Kontrollansatz keinen signifikanten Unterschied gibt.

4. Diskussion

4.1. Methodische Voraussetzungen

Für die Bestimmung von Zink in Samenproben gibt es die unterschiedlichsten Methoden. In dieser Arbeit kam die Atomabsorptionsspektrometrie mit einer Graphitrohrtechnik zur Anwendung. Daß die AAS ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung von Zink bei Spermatozoen ist, bezeugen zahlreiche Untersuchungen (Eliasson & Lindholmer, 1971; Calvin et al., 1975; Kvist, 1980a; Kavanagh, 1985; Saaranen et al., 1987; Carreras & Mendoza, 1990; Noack-Füller et al., 1993). Die bekannte Störmöglichkeit der Flammen-AAS, die Oxidbildung, kann hier durch eine Intergasatmosphäre mit Argon als Schutzgas in der Graphitrohre verhindert werden. Der Vorteil der Graphitrohrküvette gegenüber der konventionellen Methode ist außerdem ein wesentlich längeres Verbleiben der Atome im Strahlengang, wodurch sich auch extrem kleine Substanzmengen quantitativ bestimmen lassen. Die Graphitrohrtechnik ist mit einer Nachweisgrenze von 0,001 µg/l für Zink wesentlich sensitiver als die Flammen-Technik mit einer Nachweisgrenze von 1µg/l. Die AAS ist somit ein Verfahren hoher Empfindlichkeit und Spezifität bei gleichzeitig geringer Störanfälligkeit (Welz, 1983). Neben den im Teil Material und Methoden bereits erwähnten Vorsichtsmaßnahmen bezüglich einer Kontamination mit Zink während der Probenvorbereitung wurden für die Arbeit an der AAS spezielle Pipettenspitzen verwendet und es wurde darauf geachtet, daß die Zinklampe ausreichend Zeit zum Vorglühen und somit eine stabile Strahlenemission hatte.

4.2. Computer assisted Semen Analysis (CASA)

Die Einführung der CASA in die Analyse von Ejakulaten hat die Möglichkeit hervorgebracht, Parameter der Motilität von Spermatozoen zu messen, die mit bloßem Auge unter dem Mikroskop nicht zu erfassen gewesen wären (Vantman et al., 1988). Insbesondere die Messung der Geschwindigkeit der Spermatozoen und die hieraus berechneten Parameter, wie zum Beispiel die Geradeausgeschwindigkeit, könnten nicht erfaßt und ausgewertet werden. Die gebräuchlichsten Systeme sind der Hamilton-Thorn-Motion-Analyser

(HTM-System; Hamilton-Thorn Research, Danvers, USA), das CTS-System (Motion Analysis Corp., Santa Rosa, USA), das Cell-Soft-System (Cell Soft, Cryo Resources Ltd., New York, NY) und der Stromberg-Mika-Cell Motion Analyser (SM-CMA; Strömberg-Mika, Bad Feilnbach, Deutschland). Die Analyse der Motilitätsparameter wurde in dieser Arbeit mit einem SM-CMA durchgeführt. Für die Verwendung von CASA in der Routinediagnostik ist eine Vergleichbarkeit der verschiedenen CASA-Systeme untereinander und auch die Vergleichbarkeit der CASA Messung zur Auszählung mit dem Mikroskop notwendig (Krause et al., 1993). Untersuchungen hierzu ergaben kein einheitliches Bild. Jasko et al. (1990) fanden große Unterschiede von ein und derselben Samenprobe bei der Analyse per Hand und mittels CASA. Andere Autoren hingegen fanden keine bis geringfügige Unterschiede diesbezüglich (Davis & Katz, 1992; Krause et al., 1993). Da in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Veränderung der Motilitätsparameter gerichtet wurde, spielte der Vergleich zu anderen CASA Systemen eher eine hintergründige Rolle. Im Vordergrund standen möglichst optimale, reproduzierbare Testbedingungen. Hierfür war die Wahl von zweckbezogenen Einstellungen der Systemparameter der CASA (Knuth et al., 1987) und die Optimierung der physikalischen Bedingungen, wie z.B. die Temperatur der Zählkammer notwendig (Albe et al., 1988). Die in dieser Arbeit verwendete Makler-Zählkammer (Makler, 1980) zeichnete sich durch ihre gute Handhabung aus. Ein weiterer wichtiger Parameter, der bei den verschiedenen CASA Systemen unterschiedlich zu sein scheint, ist die Spermatozoenkonzentration mit der eine optimale Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse erreicht werden kann. Bei der Verwendung des Cell-Soft Systems sollen Proben mit einer Konzentration kleiner als 40 Mio. Sperm./ml verwendet werden, um möglichst exakte Geschwindigkeitsparameter zu erhalten (Vantman et al., 1988). Seibert et al. (1988) hingegen empfehlen für den IBM-kompatiblen Bildanalysecomputer eine Spermatozoendichte von kleiner als 70 Mio. Spermatozoen/ml. Für den in dieser Arbeit verwendeten SM-CMA wurde dagegen eine Spermatozoendichte von 50 - 150 Mio. Spermatozoen/ml empfohlen, um möglichst exakte Messungen durchführen zu können (Toni et al., 1995). Die Messung mit einer relativ hohen Spermatozoendichte kam dieser Arbeit sehr entgegen, da so bei einer Mindestregistrierung von 100 Spermatozoen pro Probe und Zeitpunkt oft nur wenige Messungen notwendig waren. Dies ermöglichte die Testung vieler verschiedener Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten an nur einem Ejakulat. Außerdem wurde durch die kurze Verweildauer der Probe unter dem Mikroskop die Gefahr

der lichtinduzierten Temperaturerhöhung, die mit einer Erhöhung der Motilität einhergeht, minimiert (Toni et al., 1995).

Auch wenn sich mit der Einführung der CASA eine Menge neuer Möglichkeiten zur Beurteilung der Spermatozoenmotilität ergeben haben, sind zur Beschreibung spezieller Prozesse wie zum Beispiel der Hyperaktivität noch weitere Entwicklungen notwendig (Grunert et al., 1990; Burkmann et al., 1991; Kuo et al., 1998).

4.3. Die Bedeutung der Motilität

Für die Befruchtung der Eizelle, sowohl auf natürlichem Wege, als auch bei einigen künstlichen Befruchtungsmethoden, ist die Motilität der Spermatozoen unverzichtbar. Die Motilität gewährleistet zum einen den Transport des männlichen Erbguts durch den weiblichen Genitaltrakt, wobei das Spermatozoon im Uterus passiv transportiert wird, zum anderen bewerkstelligt sie das Durchdringen der Eihülle (Cooper, 1986).

Bei der Ejakulation werden die Spermatozoen in der Vagina deponiert und wandern nach der Liquifizierung aus dem Koagulum in die Zervix des Uterus. Von dort bewegen sie sich über den Korpus uteri in den Eileiter, in dessen Ampulle die Befruchtung stattfindet. Um den Weg bis dorthin zu bewältigen, ist eine progressive, nach vorne gerichtete Motilität unverzichtbar. Diese zeichnet sich durch eine geringe Amplitude und eine hohe Schlagfrequenz aus. Hat das Spermatozoon erst einmal die Eizelle erreicht, rückt der raumgewinnende Charakter der Spermatozoenbewegung in den Hintergrund. Jetzt muß das Spermatozoon die Eihülle durchdringen. Hierfür ändert sich das Bewegungsmuster in eine Form, die als "Hyperaktivität" bezeichnet wird. Die Hyperaktivität findet man ausschließlich im Ovidukt. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß der Ausschlag des Flagellums kräftiger und die Amplitude des Flagellumschlages größer wird und der Spermatozoenkopf kräftige Hin- und Herbewegungen vollzieht. Durch die Änderung ihres Bewegungsmusters verlieren die Spermatozoen ihre Progressivmotilität, erhöhen aber ihre Durchdringungskraft, die zur Überwindung der äußeren und inneren Eihülle notwendig ist. Dieser Sachverhalt zeigt, daß für eine Befruchtung das schlichte Vorhandensein von Motilität nicht ausreicht. Die Qualität der Bewegung sowie die Änderung des Bewegungsmusters sind weitere wichtige Aspekte der Spermatozoenmotilität. Maßgeblichen Einfluß auf das Bewegungsmuster könnte hierbei Zink nehmen, denn als Weichmacher der Mantelfasern, die als Strukturelement des Flagellums von elementarer

Bedeutung sind, nimmt es Einfluß auf die Form des Flagellums und somit auch auf das Bewegungsmuster. Aus diesem Grund befaßt sich diese Arbeit mit den Beeinflussungsmöglichkeiten der Motilität durch die Zugabe von Zink und durch die Zugabe von Chelatbildnern, die den Spermatozoen Zink entziehen sollen. Hierbei sollte versucht werden, mehr über die Mechanismen in Erfahrung zu bringen, die für eine Änderung der Motilität verantwortlich sein können.

Ein anderer wichtiger Vorgang, der sich bei dem Zusammentreffen von Spermatozoon und Eizelle ereignet und das Eindringen des Spermatozoons in diese ermöglicht, ist die Akrosomreaktion. Dabei kommt es durch die Fusion der Plasmamembran der Eizelle mit der äußeren akrosomalen Membran des Spermatozoon zur Freisetzung der akrosomalen Enzyme (wie z.B. Akrosin, Hyaluronidase), die dem Spermatozoon das Vordringen in die Eizelle ermöglichen (Fritsch, 1998).

In Anbetracht dieser Aufgaben ist bei der Untersuchung der männlichen Fertilität die Motilität ein sehr wichtiger Parameter. Die Tatsache, daß die Generierung des Bewegungsmusters letztendlich nicht vollständig geklärt ist, macht es notwendig, mehr über die Funktion und damit auch über die Beeinflussungsmöglichkeiten der Motilität von Spermatozoen in Erfahrung zu bringen.

4.4. Die Bedeutung der Morphologie der Spermatozoen für die Motilität

Eine regelrechte Morphologie ist für das Spermatozoon eine unbedingte Voraussetzung, um den Weg bis zur Eizelle bewältigen zu können. Aus diesem Grund lag das Bestreben vieler Untersuchungen darin, ein morphologisches Korrelat für eine Fehlfunktion der Spermatozoen, wie zum Beispiel den Verlust der Motilität, zu finden (Mc Clure, 1983; Ryder, 1990; Haidl & Becker, 1991).

Diese Arbeit befaßt sich mit der Motilität von Spermatozoen. Strukturen, die hierfür verantwortlich sind, befinden sich im Flagellum. Aber auch Strukturdefekte an anderen Lokalisationen können dafür verantwortlich sein, daß der Weg zur Eizelle nicht bewältigt werden kann. So fanden Katz et al. (1990), daß sich einige Spermatozoen bei gleichen Motilitätsparametern langsamer durch den Zervixschleim bewegten als andere. Dies wurde auf einen erhöhten Widerstand des Spermatozoonkopfes zurückgeführt.

Bei der Untersuchung von Spermatozoen und dem Versuch, funktionelle Defekte einem morphologischem Korrelat zuzuordnen, hat sich das Elektronenmikroskop als besonders geeignet erwiesen (Mc Clure, 1983). In einer Untersuchung von Ryder (1990) wurden Spermatozoonflagellen von insgesamt 400 Patienten mit Hilfe eines Elektronenmikroskopes betrachtet. Die untersuchten Spermatozoen wiesen entweder keine oder nur eine geringe Beweglichkeit auf. Als Ergebnis der Untersuchung wurden bei 3% der Spermatozoen Defekte an den Dyneinarmen, bei 1% das Fehlen des zentralen Mikrotubuli-Paares, bei 23% die Kombination mehrerer Abnormitäten nebeneinander, bei 23% eine Necropermie mit degenerierten Flagellen und in 51% morphologisch völlig intakte Spermatozoen gefunden. In einer anderen Arbeit (Haidl & Becker, 1991) wurden Spermatozoen, die lichtmikroskopische Defekte, wie z.B. Kaliberschwankungen des Schaftes, unscharfe Begrenzung des Schaftes, Ausdünnung des Flagellum oder Verlust des Endstückes aufwiesen, mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Hierbei fand sich oftmals die Kombination von mindestens zwei Defekten. Häufig wurde das Fehlen von Mikrotubulipaaren des Axonem mit dem Fehlen der korrespondierenden Mantelfaser gemeinsam beobachtet. Noch häufiger fand sich eine Kombination eines Defektes an den Mantelfasern und eines Membrandefektes. Ebenso wurden isolierte Defekte der Mantelfasern beobachtet; praktisch nie wurde ein Defekt der fibrösen Hülle gefunden (Haidl & Becker, 1991). Andere Untersuchungen zeigten, daß Mantelfasern in einem Flagellum in abnormer Anzahl oder in desorganisierter Form vorliegen können (Mc Clure et al., 1983; Dadoune, 1988). Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß ein beträchtlicher Anteil der Flagellumstörungen, die zu einer Einschränkung der Motilität führen, auf einen morphologischen Defekt der Mantelfasern zurückzuführen sein könnte. Als Ursache für diese Flagellumstörungen wurden entzündliche, toxische, sowie zu einem großen Teil genetische Ursachen angeführt (Haidl & Becker, 1991).

Für die Tatsache, daß genetische Ursachen bei Flagellumstörungen von Spermatozoen eine Rolle spielen, sprechen Krankheitsbilder, bei denen es neben der Störung am Spermatozoon auch zu Defekten an anderen Organen kommt. Bei dem Kartagener Syndrom (Afzelius et al., 1979) fehlen die Dyneinarme der Mikrotubuli, sowohl in den Flagellen der Spermatozoen, als auch in den Zilien des Atemwegepithels. Gleichzeitig liegt ein Situs inversus vor und es kommt zu Bronchiektasien. Von Neugebauer (1990) wurde für die Kombination von dem Fehlen des zentralen Mikrotubuli-Paares oder dem kompletten Axonem, der Verdickung der fibrösen Hülle, einem kurzem Mittelstück mit defekten Mitochondrien der Spermatozoen und einem

Fehlen des zentralen Mikrotubuli-Paares der Nasenzilien in 15% der Fälle ein eigenständiges Syndrom gefordert.

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Ryder (1990) konnte bei 400 untersuchten Ejakulaten mit einer gestörten Spermatozoenmotilität lediglich in 49 % ein morphologisches Korrelat gefunden werden. Bei den anderen 51 % fand sich eine intakte Morphe. Bei diesen 51 % besteht die Möglichkeit, daß die Störung der Motilität nicht durch einen strukturellen, sondern durch einen funktionellen Defekt/Aspekt verursacht wurde. Aus diesem Grund sind Untersuchungen zu funktionellen Aspekten der Spermatozoenmotilität, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sehr wichtig.

4.5 Generierung der Motilität der Spermatozoen

Die aktive Erzeugung der Bewegung findet im Flagellum statt. Die neun äußeren Doppel-Mikrotubuli des Axonems mit ihren inneren und äußeren Dyneinarmen stellen den eigentlichen Motor des Spermatozoons dar. Die Dyneinarme besitzen ATPase - Aktivität, die ATP zu ADP und Phosphat spaltet und dadurch Energie freisetzt. Diese Energie wird dazu genutzt, die Dyneinarme an das benachbarte Doppelmikrotubulipaar gleiten zu lassen und so eine Biegung des Axonems zur einen Seite zu bewirken (Lindemann & Kanous, 1997). Werden die Dyneinarme der anderen Seite aktiviert, so kommt es zu einer Biegung des Axonems, und somit auch des Flagellums in die andere Richtung. Auf diese Weise kommt der oszillierende Schlag des Spermatozoonflagellums zustande. Einen detaillierten Überblick über die Entstehung der Motilität geben Lindemann & Kanous (1997). Das benötigte ATP wird anaerob aus der Glykolyse und aerob aus der Atmungskette der sich im Mittelstück des Flagellums befindlichen Mitochondrien gewonnen. Um ein progressives, nach vorne gerichtetes Bewegungsmuster erreichen zu können, ist das ATP aus der Atmungskette unverzichtbar. Es wurde gezeigt (Folgero et al., 1993), daß hierfür das ATP ausschließlich aus der Glykolyse nicht ausreichen würde.

Eine besonders wichtige Rolle für das Bewegungsmuster der Spermatozoen scheinen die Mantelfasern zu spielen, die das Axonem auf ca. 60% seiner Länge begleiten. Ihnen wird hierbei eher eine passiv-elastische, als eine aktive Funktion bei der Bewegungsentwicklung zugeschrieben (Fawcett, 1975; Stalf et al., 1993; Haidl et al., 1993; Henkel et al., 2001). Auf ihre Funktion wird detailliert in Kapitel 4.8.3.2.1. eingegangen.

4.6. Der Nebenhoden und seine Bedeutung für die Motilität der Spermatozoen

Im Nebenhoden vollziehen die Spermatozoen einen Prozeß, der als Reifung (Fritsch, Trenkwaller & Schill, 1985) bezeichnet wird. Hierbei erlangen die Spermatozoen die Fähigkeit zur Progressivmotilität (Chevrir & Dachieux, 1988) und zur Befruchtung der Eizelle (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Haidl et al., 1994).

Eine wichtige Funktion erfüllt hierbei das Nebenhodenepithel. Es ist sowohl zur Resorption, als auch zur Sekretion befähigt. Die Basalzellen des Epididymis fungieren unter anderem als Makrophagen, die degenerierte Spermatozoen phagozytieren können. In einer histochemischen Untersuchung wurde nachgewiesen, daß an die Basalzellen des Epididymis die gleichen Antikörper gebunden haben wie an fixe Gewebsmakrophagen (Yeung et al., 1994).

Die Zunahme der Motilität geht mit einer Änderung des Bewegungsmusters einher. Dieses ändert sich von einem nicht progressivmotilen Flagellumschlag mit niedriger Frequenz und hoher Amplitude im Rete testis und Caput epididymis (Mohri & Yanagimachi, 1980; Cooper, 1986; Mathieu et al., 1992) zu einem Flagellumschlag mit geringer Amplitude und hoher Frequenz im Bereich von Corpus und Cauda epididymis (Bedford et al., 1973; Bork et al., 1988; Chevrir & Dachieux, 1988; Haidl et al., 1994). Yeung et al. (1993) zeigten, daß die Beweglichkeit von humanen Spermatozoen vom Rete testis über Caput epididymis, hin zum Corpus epididymis zunimmt. Diese Zunahme zeigte sich für die Motilitätsparameter VSL, VCL, VAP und auch für den Anteil der motilen Spermatozoen an der Gesamtmenge der Spermatozoen. Im letzten Stück des Nebenhodens, der Cauda epididymis, nehmen diese Bewegungsparameter dann wieder leicht ab. Untersuchungen zu diesem Thema wurden auch an anderen Säugetierspezies durchgeführt, so zum Beispiel beim Schafsbock (Pariset et al., 1985; Amann et al., 1987), beim Bullen (Acott et al., 1983), beim Eber (Bork et al., 1988), beim Schimpansen (Gould et al., 1988) und bei der Ratte (Yeung et al., 1992).

Während der Nebenhodenpassage kommt es zu einer Zunahme der Rigidität des Flagellums. Eine Erklärung für die Änderung des Bewegungsmusters und auch für die Zunahme der Steifigkeit des Spermatozoonflagellum wird von Bedford und Calvin (1974) in der Ausbildung von Disulfidbrücken im Bereich der Mantelfasern und der fibrösen Hülle vermutet. Bei der Ratte kommt es parallel zur Abnahme der freien Sulfhydrylgruppen auch zu einer Reduktion des Zinkgehaltes der Spermatozoen (Calvin et al., 1975). Während der Nebenhodenpassage wird so der Zinkgehalt der Spermatozoen um ungefähr 60% reduziert (Srivastava et al., 1983; Kaminska et al., 1987). Diese Zinkreduktion findet sowohl im Flagellum als auch im Kopf des

Spermatozoons statt (Calvin, 1981). Diese Beobachtungen haben zu Überlegungen geführt, daß die Zinkreduktion im Flagellum des Spermatozoons, die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Entwicklung von Progressivmotilität in einem engen Zusammenhang stehen. Zink scheint hierbei eine Schlüsselrolle einzunehmen. Diesen Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter nachgegangen.

Mit zunehmendem Lebensalter steigt der Zinkgehalt der ejakulierten Spermatozoen an, was seine Ursache in einer nachlassenden Nebenhodenfunktion haben könnte. Schirren und Bettendorf (1987) fanden beim Rattenmodell, daß die Anzahl der Leydigzellen während des Lebens beständig abnimmt. Dies führt zu einer Reduktion der Androgenkonzentration und zu einer Abnahme der Zinkelimination, die bei der Ratte androgenabhängig ist. Als Indikatoren für die Funktionsfähigkeit des Nebenhodens sind Carnitin und α -Glucosidase bekannt (Schrader, 1986). Besonders α -Glucosidase, welche im Corpus und Cauda des Epididymis, sowie im proximalen Ductus deferens gebildet wird, weist eine Korrelation sowohl mit der Spermatozoenkonzentration, als auch mit der Motilität der Spermatozoen auf (Yeung et al., 1990).

Diese Beobachtungen und Untersuchungsergebnisse verdeutlichen, daß der Prozeß der Reifung während der Nebenhodenpassage für eine regelrechte Entwicklung von Motilität und Bewegungsmuster der Spermatozoen eine unbedingte Voraussetzung ist.

4.7. Bedeutung von Metallionen für die Motilität von Spermatozoen

Verschiedene Metallionen, die sowohl im Ejakulat, als auch im Spermatozoon selber nachgewiesen werden konnten, haben einen Einfluß auf die Motilität von Spermatozoen. Dabei haben die einzelnen Ionen sehr unterschiedliche Wirkungen und auch Orte an denen sie angreifen.

Kupfer zum Beispiel bindet zu 17% irreversibel an die Spermatozoen und macht diese immotil (Holland & White, 1988). Als Wirkmechanismus könnte hierbei die Hemmung von Schlüsselenzymen eine Rolle spielen. Diese Eigenschaft von Kupfer macht man sich in der Empfängnisverhütung zu Nutze. Bei der Spirale zum Beispiel werden zur Immobilisierung der Spermatozoen freie Kupferionen abgegeben (Holland & White, 1988).

Einige Elemente (Zn, Ca, Mg, Pb, Cr, Sr) wurden im Ejakulat sowohl fertiler als auch infertiler Männern in gleicher Konzentration nachgewiesen. Andere Elemente (Fe, Mo, Al, Cu, Cd, Mn, Sn) hingegen wurden vermehrt bei infertilen Männern gefunden (Umeyama et al., 1986).

Eine Erhöhung von Magnesium im Ejakulat scheint keinen Einfluß auf die Motilität der Spermatozoen zu haben (Sorensen et al., 1999a). Zusammen mit Kalzium wurde Mg^{2+} in der Membran von sekretorischen Granula und Vesikeln aus der Prostata nachgewiesen (Stegmayer et al., 1982). Diese Granula sollen einen modulierenden Einfluß auf die Konzentration von essentiellen Kationen und damit auch auf die Motilität haben (Stegmayer et al., 1982). An der Membran der Granula soll eine ATPase lokalisiert sein, die Ca^{2+} und Mg^{2+} abhängig ist und durch Zink kompetitiv gehemmt werden kann (Ronquist et al., 1978a,b). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Konzentration von Zn^{2+} im Seminalplasma mit der von Mg^{2+} positiv korreliert (Papadimas et al., 1983; Umeyama et al., 1986; Sorensen, 1999a).

Die Rolle von Ca^{2+} wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Früher wurde davon ausgegangen, daß Ca^{2+} sowohl für die Kapazitation, als auch für die Motilität (Morton et al., 1974; Lindemann et al., 1987) und auch für die Akrosomreaktion (Yanagimachi & Usui, 1974; Yanagimachi, 1981) humaner Spermatozoen essentiell ist (DasGupta et al., 1993). Neuere Untersuchungsergebnisse haben jedoch gezeigt, daß die Akrosomreaktion (Rotem et al., 1992 ; Foresta et al., 1992; Krausz et al., 1994) und die Kapazitation (Furuya et al., 1993) unter bestimmten Umständen auch in kalziumfreien Medium stattfinden können. Bezüglich der Motilität gibt es unterschiedliche Daten. Die einen Autoren weisen darauf hin, daß es zwischen der Beweglichkeit und der Kalziumkonzentration im Seminalplasma eine negative Korrelation gibt (Arver & Sjoberg, 1982; Duncan et al., 1993; McLaughlin et al., 1994; Sorensen et al., 1999a). Andere zeigten, daß die Motilität nicht durch kalziumfreies Medium beeinflusst wird (Thomas & Meizel, 1988; Prien et al., 1990; Magnus et al., 1990) und daß Ca^{2+} - Ionen zumindest zum Teil an der Aufrechterhaltung der Motilität beteiligt sind (Luconi et al., 1996). Außerdem sollen diese auch zu einer Erhöhung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Spermatozoen führen können (Detweiler & Thomas, 1998). Eine neuere Untersuchung (Sorensen et al., 1999a) zeigte eine signifikante Erhöhung der Bewegungsparameter VSL und LIN bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen im Seminalplasma. Bei der statistischen Analyse dieser Daten zeigte sich jedoch auch, daß in einer multiplen Regressionsanalyse mit der Zink- und Kalziumkonzentration bezüglich der Motilität, Kalzium seinen signifikanten Einfluß auf die Motilität der Spermatozoen verlor. Dieses

Ergebnis spricht für eine herausragende Bedeutung von Zink für die Modulation der Bewegungsparameter von humanen Spermatozoen.

4.8. Bedeutung des Elementes Zink für die Motilität von Spermatozoen

Das Spurenelement Zink scheint im männlichen Geschlechtstrakt und im Spermatozoon eine besondere Rolle zu spielen. Nicht nur, daß das Ejakulat eine Zinkkonzentration enthält, die in dieser Höhe sonst in keiner anderen Körperflüssigkeit zu finden ist, sondern auch die Tatsache, daß es eine große Anzahl von Untersuchungen gibt (Noack-Füller et al., 1993; Henkel et al., 1999; Sorensen et al., 1999a), die sich mit dem Zinkgehalt von Spermatozoen in Bezug zu Funktionsparametern befassen, deutet auf die wichtige Rolle von Zink für die männliche Fertilität hin.

4.8.1. Zink im Ejakulat

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen der Zinkgehalt des gesamten Ejakulates analysiert wurde (Marmar et al., 1975; Umejama et al., 1986; Behne et al., 1988; Noack-Füller et al., 1993; Henkel et al., 1999; Sorensen et al., 1999a). In diesen Arbeiten wurden Durchschnittswerte von 129,2 mg Zink/l Ejakulat bis 150 mg Zink/l Ejakulat gefunden. Korrelationen zwischen dem Zinkgehalt im Ejakulat und Funktionsparametern von Spermatozoen ergaben jedoch recht uneinheitliche Ergebnisse. Die Globalmotilität soll negativ mit dem Zinkgehalt des Ejakulates korrelieren (Danscher et al., 1978). Neuere Untersuchungen ergaben, daß Zink einen supprimierenden Einfluß auf die Progressivmotilität, nicht aber auf den prozentualen Anteil motiler Spermatozoen haben soll (Sorensen et al., 1999a). Andere Studien fanden keinen Zusammenhang zwischen der Zinkkonzentration im Ejakulat und der Motilität (Lewis-Jones et al., 1996; Stoltenberg et al., 1997a). In diesen Arbeiten wurde eine Nachweismethode benutzt, die ausschließlich ungebundenes Zink nachweist. Der Zinkgehalt der Ejakulate von infertilen Männern soll sich nicht von denen der fertilen Männer unterscheiden, jedoch sollen infertile Männer mit Normozoospermie einen höheren Zinkgehalt im Ejakulat aufweisen als fertile Männer (Umeyama et al., 1986). Marmar et al. (1975) zeigten, daß Ejakulate mit dem höchsten Fertilisierungspotential die höchste mittlere Zinkkonzentration

haben. Diese zum Teil widersprüchlichen Beobachtungen könnten dadurch begründet sein, daß Zink im Ejakulat in zwei verschiedenen Fraktionen vorliegt. Zum einen ist es im Seminalplasma enthalten, zum anderen findet es sich auch im Spermatozoon selber. Somit ist es vorstellbar, daß der Zinkgehalt einer Fraktion verändert ist, ohne das sich dies in einer Erniedrigung des Zink im Ejakulat zeigt, da es durch die andere Fraktion zu einer Kompensation kommt. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf den Zinkgehalt und dessen Funktion in den einzelnen Kompartimenten des Ejakulats eingegangen.

4.8.2. Zink im Seminalplasma

Das Zink im Seminalplasma wird von den akzessorischen Drüsen sezerniert. Untersuchungen verschiedener Autoren haben ergeben, daß das Zink des Seminalplasmas hauptsächlich aus der Prostata stammt (Schirren et al., 1964; Eliasson & Lindholmer, 1971; Janick et al., 1971; Danscher et al., 1978; Mann & Lutwak-Mann, 1981; Kavanagh, 1982). Die Prostata ist das Gewebe des menschlichen Körpers mit dem größten Zinkgehalt (Mawson & Fischer, 1953; Whitmore, 1963; Gyorkey et al., 1967). Viele Untersuchungen mit den unterschiedlichsten Methoden haben sich mit der quantitativen Analyse von Zink im Seminalplasma beschäftigt (Eliasson & Lindholmer, 1971; Skandhan, 1981; Kavanagh, 1985; Saaranen et al., 1987; Abu-Shakra et al., 1989; Riffo et al., 1992; Noack-Füller et al., 1993; Sieboldt et al., 1993; Sorensen et al., 1999a; Henkel et al., 1999). Einige dieser Arbeiten zeigten, daß der Zinkgehalt im Seminalplasma als Funktionsparameter für die Prostata genutzt werden kann. Im Seminalplasma ist das Zink zum Teil an prostatiscche Glykoproteine gebunden (Herrmann, 1975). Diese unterteilen sich in Glykoproteine mit hoher Molekularmasse (HMW-Zn), mittlerer Molekularmasse (IMW-Zn) und niedriger Molekularmasse (LMW-Zn) (Arver et al., 1982). Infektionen der Prostata sollen mit einer Erniedrigung der Zinkkonzentration im Seminalplasma einhergehen (Marmar et al., 1975; Eliasson, 1977). Es gibt diesbezüglich allerdings auch widersprüchliche Aussagen (Papadimas et al., 1983). Als Ursache für einen erniedrigten Zinkgehalt im Seminalplasma bei Infektionen der Prostata könnte eine erniedrigte Sekretionsfähigkeit dieser durch die entzündlichen Reaktionen in Frage kommen (Kavanagh, 1985). Außerdem wird Zink als antibakterieller Faktor diskutiert (Fair et al., 1976), da eine Erniedrigung des Zinkes im Seminalplasma nur bei bakteriellen, nicht aber bei abakteriellen Entzündungen der Prostata beobachtet wurde. Diese antibakterielle Wirkung von Zink könnte

eine Erklärung für den hohen Zinkgehalt des Seminalplasmas sein. Eine weitere Wirkung, die dem Zink im Seminalplasma zugeschrieben wird, ist ein hemmender Einfluß auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Spermatozoen und Lymphozyten (Gavella et al., 1998).

Bezüglich des Zusammenhanges zwischen Zink im Seminalplasma und den Funktionsparametern von Spermatozoen gibt es unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche Daten. In einigen Arbeiten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Zinkgehalt im Seminalplasma und der Motilität, der Progressivmotilität oder der Dichte der Spermatozoen, sowie der Fertilität gefunden werden (Papadimas et al., 1983; Behne et al., 1988; Abou-Shakra 1989; Noack-Füller et al., 1993; Lewis-Jones et al., 1996; Henkel et al., 1999). Dagegen zeigten Andere (Janick et al., 1971; Stankovic et al., 1976; Caldamone et al., 1979; Carreras et al., 1990; Sorensen et al., 1999a) eine positive Korrelation für die Spermatozoendichte und für die Fertilisierungsfähigkeit sowie für die Motilität. Eine negative Korrelation wurde für die Progressivmotilität (VAP, VSL, STR, LIN) (Sorensen et al., 1999a), die Globalmotilität und die Dichte der Spermatozoen gefunden (Danscher et al., 1978; Homonnai et al., 1978; Ando et al., 1990; Carreras et al., 1990; Carpino et al., 1998; Sorensen et al. 1999a). Diese sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse könnten daher rühren, daß die Ursache für die Erniedrigung oder Erhöhung des Zinkgehaltes im Seminalplasma ganz verschieden sein kann. Zum Beispiel führt ein alimentärer Zinkmangel zu einer Erniedrigung des Zinkgehaltes im Testis und auch im Seminalplasma. Bei einem testikulären Zinkmangel kann es durch Degeneration und Atrophie des Keimepithels, zur Schädigung der interstitiellen Zellen mit einem Rückgang der testikulären Testosteronproduktion und einem Rückgang der Spermio-genese kommen (Gupta et al., 1988; Hafiez et al., 1990; Eltohamy & Younis, 1991; Bedwal et al., 1994; Martin et al., 1994). Eine Erniedrigung des Zinkgehaltes im Seminalplasma durch eine Funktionsstörung der Prostata, wie zum Beispiel bei einer bakteriellen Prostatitis, hat auf die Differenzierung der Spermatozoen hingegen keinen Einfluß. Letztendlich findet sich aber bei beiden eine erniedrigte Zinkkonzentration im Seminalplasma.

4.8.3. Zink im Spermatozoon

Neben dem Seminalplasma enthalten auch die Spermatozoen selber Zink. In dieser Arbeit wurde der Zinkgehalt von gewaschenen humanen Spermatozoen mit der

Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Die Zinkkonzentration der Kontrollgruppe betrug im Median $23,7\text{ng}/10^6$ Spermatozoen und hatte einen Mittelwert von $30,7\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen. Diese Werte liegen im Bereich der von anderen Autoren gewonnenen Ergebnisse. Die mittlere Zinkkonzentration in gewaschenen menschlichen Spermatozoen reicht in der Literatur von $25\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Huacuja et al., 1973, mittels AAS) über $31\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Rosado et al., 1977, mittels Röntgenmikroanalyse), über $40,0\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Henkel et al., 1999, AAS) bis zu $55,3\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Lindholmer & Eliasson, 1972, mittels AAS). Die Ergebnisse von Sieboldt et al. (1993) hatten eine Spannweite von $21,6 - 503\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (mittels ICP-Emissionsspektralanalyse). Die Zinkkonzentration der Spermatozoen, denen ein Chelatbildner (DMSA, DMPS oder DL-Penicillamin) zugesetzt wurde, differierte nicht signifikant von der Zinkkonzentration der Kontrollgruppe. Die Spermatozoen denen für zwei Stunden DMSA zugesetzt wurde, hatten im Median eine Zinkkonzentration von $25,7\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Mittelwert = $31,6\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen). Der Median der Zinkkonzentration der Spermatozoen, die mit DMPS inkubiert wurden lag bei $21,9\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Mittelwert = $28,9\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen) und der der Zinkkonzentration derer, die mit DL-Penicillamin inkubiert wurden bei $24,1\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen (Mittelwert = $27,8\text{ ng}/10^6$ Spermatozoen). Vergleichswerte in der Literatur zu der Zinkkonzentration in Spermatozoen die mit den hier verwendeten Chelatoren behandelt wurden, gibt es nicht.

Will man eine Aussage dazu treffen, ob die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen der Motilitätsparameter durch eine Veränderung des Zink im Spermatozoon verursacht wurde, kann man unter Berücksichtigung der gefundenen Daten grundsätzlich zwei Thesen aufstellen.

(I). Die Zugabe der Chelatoren führt zu keiner Bindung von Zink an diese und die Änderung der Motilitätsparameter beruhen auf einem anderen Mechanismus. Die in der Messung der Zinkkonzentration gefundenen Daten wären hiermit gut vereinbar.

(II). Die Zugabe der Chelatoren führt zu einer Bindung von Zink durch diese, und die Änderung der Motilitätsparameter ist auf diesen Vorgang zurückzuführen. Die gemessenen Zinkkonzentrationen der Ansätze würden dieses nicht belegen, sie schließen diesen Mechanismus aber auch nicht grundsätzlich aus. Zum einen könnte der bewirkte Unterschied der Motilität durch eine Reduktion der Zinkkonzentration verursacht sein, die so gering ist, daß die Sensitivität der verwendeten Methode nicht groß genug ist um diesen zu detektieren. Hierfür würde sprechen, daß die gefundenen Veränderungen der Motilitätsparameter bereits bei der geringsten Konzentration bei allen Chelatoren gefunden wurde.

Zum anderen ist in dieser Arbeit der Verbleib der zugegebenen Chelatoren nicht geklärt. So könnte, selbst wenn die Chelatoren Zink gebunden und damit den Spermatozoen für die dort ausgeübten Funktionen entzogen haben, die Chelatoren mit dem Zink immer noch mit dem Spermatozoon assoziiert sein. Das würde bedeuten, daß der Waschvorgang nach der Inkubationszeit die Chelatoren mit dem Zink nicht von den Spermatozoen zu trennen vermochte. In diesem Falle wäre das Zink, obwohl es an die Chelatoren gebunden ist, bei der Messung mit der AAS immer noch in der Fraktion der Spermatozoen anzutreffen.

4.8.3.1. Zink im Spermatozoonkopf

Lediglich 5-10 % des Zinkes befinden sich im Kopf des Spermatozoon (Calvin et al., 1975; Henkel et al., 1999). Das Zink steht hier zu 75% mit Disulfidbrücken in Assoziation (Calvin et al., 1975). Während der Phase der Kondensation des Chromatins kommt es im Kopf des Spermatozoons zu einer Abnahme des Zinkgehaltes (Calvin & Bedford 1971; Baccetti et al., 1976b). Während der Ejakulation soll dann wieder Zink aufgenommen werden (Kvist et al., 1985b; Björndahl et al., 1986; Björndahl & Kvist, 1990). Es wird vermutet, daß durch die Aufnahme von Zink die Vulnerabilität des Spermatozoonkopfes herabgesetzt wird (Björndahl et al., 1986). Dies soll durch eine Zink-Thiol Interaktion im Chromatin erreicht werden (Kvist, 1980a). Einen großen Einfluß auf diese Geschehnisse soll das Prostatasekret haben (Kvist et al., 1990).

4.8.3.2. Zink im Flagellum des Spermatozoon

Der weitaus größte Teil des Zinkes im Spermatozoon befindet sich mit 93% beim Menschen (Henkel et al., 1999) und mit 97% bei der Ratte (Calvin et al., 1975; Calvin, 1979) im Flagellum. Im Flagellum, dem Fortbewegungsorganell des Spermatozoons gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten der Wirkungsweise von Zink, zum einen eine aktive, zum anderen eine passive Weise. Eine aktive Rolle bei der Entstehung der Motilität könnte Zink als essentieller Cofaktor bei einigen schwermetallabhängigen Enzymen spielen. Enzyme, die im Spermatozoon zu dieser Kategorie gehören, sind unter anderen die α -Glycerophosphat-Dehydrogenase, die Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Polymerase und die Laktatdehydrogenase (LDH)

(Hrudka, 1979; Witkin, 1980), sowie die Cytochromoxydase und Glutamat-Dehydrogenase der Mitochondrien.

Die Untersuchungsergebnisse bezüglich der Wirkung von Zink auf diese Enzyme ergaben zum Teil sehr uneinheitliche Ergebnisse. Auf der einen Seite soll Zink bei oligoasthenozoospermen Patienten die Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase aktivieren und damit zu einer Erhöhung der Motilität führen (Karacagil et al., 1985). Auf der anderen Seite soll Zink auf einige Enzyme der Energiegewinnung (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Glycogenphosphorylase, Fructose-1,6-Diphosphatase, Amylase, LDH) hemmend wirken (Kanwar et al., 1988). Eine Erhöhung des intrazellulären Zinks soll die Zellatmung drosseln (Chvapil, 1973), und auch im Nebenhoden soll Zink hemmend auf den Metabolismus der Spermatozoen wirken (Lindholmer, 1974a) und so die Spermatozoen bis zur Ejakulation in einem Ruhestadium halten.

Als "antioxidatives Paradoxon" wird die Tatsache beschrieben, daß Zink die Superoxiddismutase, die als Schutzfaktor gegen reaktive Sauerstoffspezies dient, hemmt und auf der anderen Seite selbst als Antioxidans wirkt (Samman, 1993). Letztendlich hat auch ein alimentärer Zinkmangel einen Einfluß auf die Motilitätsparameter und die Fertilität. Untersuchungen an verschiedenen Spezies haben gezeigt, daß es durch einen alimentären Zinkmangel zur Degeneration und Atrophie des Keimepithels, zu Schäden an den interstitiellen Zellen, zur Drosselung der Spermatogenese, zur Abnahme der Spermatozoenkonzentration und zur Abnahme des testikulären Testosterons, welches für die Entwicklung des Hodens von großer Bedeutung ist, kommen kann (Root et al. 1979; Abbasi et al., 1980; Prasad, 1985; Gupta et al., 1988; Hafiez et al., 1990; Eltohamy & Younis, 1991; Bedwal et al., 1994; Martin et al., 1994).

Eine eher passive Rolle könnte Zink als Strukturelement an den Sulfhydrylgruppen der Mantelfasern des Flagellums spielen. Es zeigte sich, daß Zink im Flagellum zum Großteil an Sulfhydrylgruppen cysteinreicher Makromoleküle der Mantelfasern gebunden ist (Calvin et al., 1975; Calvin, 1979). Bei Ratten sollen 75% (Calvin et al., 1973; Calvin, 1979; Calvin, 1981) und bei Bullen 65% (Baccetti et al., 1976b; Pallini et al., 1979) des Zinkgehaltes des Flagellum in den Mantelfasern lokalisiert sein. Im letzten Stück des Flagellums, in dem auch keine Mantelfasern mehr vorhanden sind, soll Zink gänzlich fehlen (Baccetti et al., 1976b). Diese Daten sprechen sehr dafür, daß es zwischen dem Zink im Flagellum und den Mantelfasern einen Zusammenhang gibt. Nach Calvin et al. (1973; 1979)

steht Zink im Flagellum der Spermatozoen in enger Beziehung zu den Sulfhydrylgruppen der Mantelfasern und schützt diese durch Bildung von Mercaptidkomplexen vor Oxidation.

4.9. Funktion der Mantelfasern

Daß die Mantelfasern im Flagellum eine essentielle Struktur darstellen, wird dadurch unterstrichen, daß sie in Spermatozoen vieler verschiedener Spezies vorzufinden sind (Baccetti et al., 1976b; Afzelius, 1988; Burfeind & Hoyer-Fender, 1991; Perez-Ramirez & Castells, 1991). Sie stellen bis zu 30% des Proteingehaltes von humanen Spermatozoen dar. Bezüglich ihrer Funktion gibt es mehrere Theorien. Zum einen wurde eine aktive Rolle bei der Generierung der Motilität durch ATPase-Aktivität oder durch Phosphorproteine angenommen (Nelson, 1958; Brito et al., 1986). Dieses wurde jedoch in jüngeren Arbeiten widerlegt (Haidl et al., 1991a; Henkel et al., 1992; Stalf et al., 1993; Henkel et al., 1994). Zur Zeit wird eher von passiv-elastischen Funktionen der Mantelfasern ausgegangen (Fawcett, 1975; Stalf et al., 1993; Haidl et al., 1993; Henkel et al., 1999; Henkel et al., 2001). Zum anderen sollen die Mantelfasern eine protektive Funktion gegenüber Scherkräften, die während der Ejakulation auftreten, besitzen (Baltz et al., 1990). Ohne diese Protektion würde es unter der Ejakulation zu letalen Schädigungen der Spermatozoen, insbesondere der Flagellen, kommen. Eine außerordentlich wichtige Funktion ist die Einflußnahme der Mantelfasern bei der Generierung des Bewegungsmusters von Säugetierspermatozoen (Phillips, 1972). Die Krümmung des Flagellumschlages ist demnach abhängig von dem artspezifischen Durchmesser und der Starre der Mantelfasern. Lindemann stellte 1994 (Lindemann, 1994a,b) ein Computer-Modell, das "geometric-clutch"-Modell vor. Dieses wurde entwickelt, um die Bewegungsgenerierung bei einfachen Zilien und Flagellen zu simulieren und damit neue Erkenntnisse über diesen Prozeß zu gewinnen. 1996 folgte eine Arbeit (Lindemann, 1996), in der zu diesem Modell zusätzlich Strukturen, wie sie bei Säugetierspermatozoen vorzufinden sind, eingebracht wurden. Hierbei handelt es sich um die Mantelfasern, die fibröse Hülle und das Verbindungsstück (ein Anker der Mantelfasern zu der Basis des Flagellums). Das Axonem ist bei Säugetierspermatozoen nicht direkt mit der Basis des Flagellums verbunden, sondern steht über die Mantelfasern, und diese wieder über das Verbindungsstück, mit der Basis des Flagellum in Verbindung. Abbildung 27 spiegelt diese Verhältnisse wider.

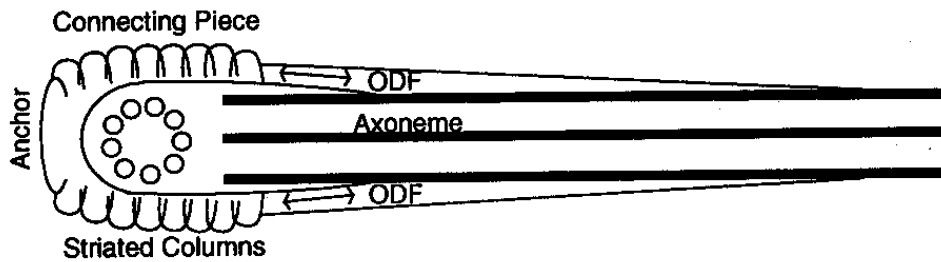


Abbildung 27: Schematische Darstellung eines Spermatozoenflagellums (aus Lindemann, 1996).

Das bedeutet, daß die Mantelfasern als kraftübertragendes Element durch ihre Elastizität einen maßgeblichen Einfluß auf das Bewegungsmuster der Spermatozoen haben. Die Untersuchungen von Lindemann (1996) zeigten, daß die Mantelfasern und die fibröse Hülle zu einer Erhöhung der Steifigkeit des Flagellums führen. Diese Erhöhung der Steifigkeit reduziert die maximale Krümmung des Flagellums und führt zu einer Verteilung der Krümmung über einen längeren Teil des Axonems. Auf diese Weise sind mehr Dynein-Brücken gemeinsam an der Durchführung einer Krümmung beteiligt. Hierdurch wird ermöglicht, daß das einfache Grundprinzip des Axonem auch bei größeren Säugetierspermatozoen funktionieren kann. Eine besonders wichtige Rolle für die Steifigkeit des Spermatozoon scheinen die Sulfhydrylgruppen der Aminosäure Cystein, die besonders häufig in den Proteinen der Mantelfasern vorkommt, zu spielen (Calvin & Bleau, 1974; Calvin et al., 1975; Baccetti et al., 1976a,b; Calvin, 1979). Diese bilden entweder mit Zink stabile Mercaptidkomplexe ($3SH-Zn$) oder liegen als Disulfidbrücken vor (Calvin et al., 1973; Calvin et al., 1975). Als Disulfidbrücke sollen sie die Starre und Rigidität der Mantelfasern und somit auch des Flagellums erhöhen. Dies würde dann eher zu einem Flagellumschlag geringer Amplitude führen, wie er bei der Progressivmotilität anzutreffen ist. Durch die Mercaptidkomplex-Bildung mit Zink soll hingegen die Starre und Rigidität der Mantelfasern herabsetzt werden. Die Erhöhung der Laxizität würde zu einer Erhöhung der Amplitude des Flagellumschlages, wie sie bei dem nicht progressivmotilen, verdrängenden Bewegungsmuster anzutreffen ist, führen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß im Rete testis und im Caput epididymis ein Flagellumschlag von großer Amplitude und ein nicht progressiv motiles Bewegungsmuster anzutreffen ist (Mohri & Yanagimach, 1980; Cooper, 1986; Mathieu, 1992). Während der

Nebenhodenpassage, in Caput- und Cauda epididymis, verkleinert sich die Amplitude des Flagellumschlages und das Bewegungsmuster erhält einen eher progressiv motilen Charakter (Bedford, 1973; Bork et al., 1988; Chevrier & Dacheux, 1988; Cornwall & Chang, 1990; Haidl et al., 1994). Gleichzeitig kommt es während der Nebenhodenpassage zu einer Zunahme der Disulfidbrücken (Bedford & Calvin, 1974) und zu einer Abnahme der freien Sulfhydrylgruppen (Calvin et al., 1975 (Ratte)). Parallel zu diesen Geschehnissen kommt es während der Nebenhodenpassage zu einer Abnahme des Zinkgehaltes, sowohl im Caput als auch im Flagellum des Spermatozoons, um ungefähr 60% (Calvin, 1981; Srivastava et al., 1983; Kaminska et al., 1987). Abbildung 28 veranschaulicht diesen Mechanismus.

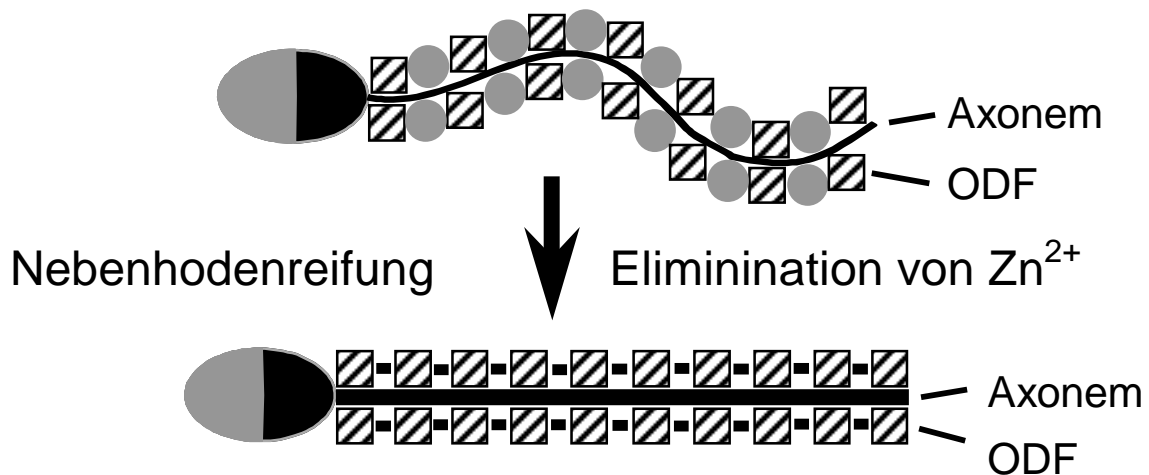


Abbildung 28: Darstellung der Elimination von Zink aus den Mantelfasern und die damit verbundene Erhöhung derer Steifigkeit durch Ausbildung von Disulfidbrücken (aus Henkel et al., 2001).

▨ Cystein; ● Zn²⁺; ▨-▨ Cystein Moleküle verbunden durch Disulfidbrücken

Diese Koinzidenz von Änderung des Bewegungsmusters, Zunahme der Disulfidbrücken in den Mantelfasern und Abnahme des Zinkgehaltes der Spermatozoen während der Nebenhodenpassage deutet auf einen engen Zusammenhang zwischen der Abnahme des Zinkgehaltes und der Zunahme der Progressivmotilität hin.

Diese Beobachtungen haben Parallelen zu den von uns durchgeführten Untersuchungen. Unter der Einflußnahme der Chelatbildner kam es zu einer Änderung der Motilität der Spermatozoen. Während es zu einer Reduktion des Anteils nichtlinear motiler Spermatozoen kam, stieg der Anteil linear motiler Spermatozoen an. Eine ähnliche Änderung wurde, wie oben beschrieben, bei der Reifung im Nebenhoden unter einer Zinkreduktion beobachtet. Somit könnte die Änderung des Bewegungsmusters für eine Eliminierung des Zink durch die Chelatoren unter den gewählten in-vitro Bedingungen sprechen.

4.10. Die Wirkung von Zinkentzug und -zugabe auf die Motilität von Spermatozoen

Die gefundenen Zusammenhänge zwischen zweifach positiv geladenen Metallionen, im Besonderen Zink, und dem Parameter Motilität haben zu weiteren Untersuchungen geführt. Es haben sich eine ganze Reihe von Wissenschaftlern mit der Substitution von Metallionen zu Spermatozoen in vivo und in vitro beschäftigt. Man kann bei der Zinksubstitution zwischen zwei verschiedenen Arten unterscheiden. Bei der alimentären Zinksubstitution wird darauf abgezielt den Zellen im Testis ausreichend Zink für die Produktion von Spermatozoen zur Verfügung zu stellen. Bei Versuchen, die sich mit der Zinksubstitution in vitro befassen, wird die Wirkung des Metalls auf das bereits ausdifferenzierte Spermatozoon untersucht.

4.10.1. Alimentärer Zinkmangel

Tierexperimente haben gezeigt, daß ein alimentärer Zinkmangel zur Degeneration und Atrophie des Keimepithels, zur Schädigung der interstitiellen Zellen mit einem Rückgang der testikulären Testosteronproduktion und zu einem Rückgang der Spermiogenese führt (Gupta et al., 1988; Hafiez et al., 1990; Eltohamy & Younis, 1991; Bedwal et al., 1994; Martin et al., 1994). Beim Mensch hat eine zinkarme Diät zu einer reversiblen Reduktion der Spermatozoen im Ejakulat geführt (Abbasi et al., 1980). Als Ursache für diese Veränderungen werden mehrere Mechanismen in Betracht gezogen. Ein durch Zinkmangel bedingter Testosteronmangel führt zu einer Schädigung des endoplasmatischen Retikulums der Leydig'schen Zellen (Hesketh, 1982). Da Zink ein Bestandteil des Steroidrezeptors ist (Zinkfingerprotein), der die Genexpressivität steuert, könnte auf diesem Weg unter anderem

auf die Testosteronsynthese Einfluß genommen werden (Green et al., 1988). Im Rattenmodell konnte bei Zinkmangel eine Hemmung des Enzymes Dipeptidyl-Carboxypeptidase nachgewiesen werden, welches für die Reifung der Spermatozoen notwendig ist (Reevs, 1990). Schließlich führt ein alimentärer Zinkmangel bei Ratten auch noch zu einer Reduktion der antioxidativen Prozesse und somit zu vermehrten Schäden an testikulären Proteinen, Lipiden und an der DNA (Oteiza et al., 1995). Dies verdeutlicht, daß die Einflußnahme von alimentärem Zinkmangel auf die Vitalität und Motilität von Spermatozoen durch viele verschiedene Mechanismen möglich ist, die ihren gemeinsamen Ursprung in einem testikulären Zinkmangel finden.

4.10.2. Orale Zinkgabe

Die eben erwähnten Erkenntnisse führten zu Untersuchungen, die sich mit der alimentären Zinksubstitution beschäftigten. Eine orale Zinksubstitution mit $ZnSO_4$ führte bei oligozoospermen Patienten zu einer Erhöhung der Spermatozoenkonzentration und der Progressivmotilität, der Gesamtmotilität und des Zinkes im Ejakulat, sowie im Seminalplasma (Tikival et al., 1987; Takihara et al., 1983; Kynaston et al., 1988). Nach einer Prostatitis führte die Zinksubstitution zu einer Erhöhung des Zinkes im Ejakulat (Marmar et al., 1975). Allerdings gibt es auch gegenteilige Berichte. So fanden Takihara et al. (1983) zwar eine Erhöhung von Zink im Seminalplasma, konnten jedoch keinen Einfluß auf die Konzentration oder Motilität der Spermatozoen nachweisen. Sandana et al. (1985) konnten keine Änderung der Zinkkonzentration im Seminalplasma nach oraler Substitution finden. Die tägliche Zinkdosis wurde bei den genannten Arbeiten mit bis zu 240 mg Zink/d deutlich über den täglich benötigten 10 mg Zink/d gewählt. Diese Ergebnisse lassen, wenigstens bei einigen Formen der männlichen Infertilität, besonders bei Verdacht auf testikulären Zinkmangel, den Versuch einer Therapie mit oral appliziertem Zink als gerechtfertigt erscheinen, unterstreichen aber auch die Notwendigkeit von weiteren Untersuchungen.

4.10.3. Zinkzugabe in vitro

Um den Einfluß von Zink auf die Spermatozoen genauer zu untersuchen, beschäftigten sich einige Arbeiten mit der Zugabe von Zink zu gewaschenen Spermatozoen in vitro. Die hierbei gefundenen Resultate waren uneinheitlich. Saito et al. (1969) fanden eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Motilität von Spermatozoen. Bei den Konzentrationen von 0,2 und 0,02 mmol/l Zink kam es zu einer Zunahme der Motilität, im Gegensatz dazu nahm diese bei einer Konzentration von 2 mmol/l Zink ab (Saito et al., 1969). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Stegmayr & Ronquist (1982) nach der Inkubation von humanen Ejakulaten mit Zink gemacht. Eine Konzentration von bis zu 2 µmol/l Zink führte zu einer Erhöhung, eine Konzentration von bis zu 5 µmol/l Zink zu einer Erniedrigung der Motilität. Kanwar et al. (1988) fanden eine Zeit- und Dosis-abhängige Hemmung der Motilität durch Zinkchlorid. Ebenso fanden Rizzo et al. (1992) nach Zugabe von 100 µmol/l Zink zu gewaschenen Spermatozoen nach Swim-up eine signifikante Reduktion der progressiven Motilität, die durch Waschen in zinkfreiem Medium reversibel war. Lindholmer et al. (1974b) konnten nach der Zugabe von Zinksulfat zu Spermatozoen eine Hemmung der Motilität sowie ein Aufrollen der Flagellen beobachten. Oka et al. (1988) fanden nach der Zugabe von Zinkzitat zu Ejakulaten von Patienten mit Asthenozoospermie eine Stimulierung der Spermatozoenmotilität. In einer jüngeren Untersuchung von Sorensen et al. (1999b) konnte nach der Substitution von 0,6 mM/l $ZnCl_2$ zu Spermatozoen nach Swim-up keine Veränderung der Motilitätsparameter festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Substitution von Zinksulfat zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Motilität der Spermatozoen und bestätigte damit die Ergebnisse von Sorensen et al. (1999b). Bei dem Anteil motiler Spermatozoen finden sich lediglich in zwei der 16 Ansätze Differenzen zur Kontrollgruppe. Der erste Unterschied findet sich zum Zeitpunkt 2 Stunden mit der Konzentration 1 mmol/l (zweiseitige Signifikanz = 0,0055, T-Test). Hier ist der Anteil motiler Spermatozoen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Der zweite Unterschied findet sich zum Zeitpunkt 6 Stunden mit der Konzentration 1mmol/l (zweiseitige Signifikanz $p=0,0059$), hier ist der Anteil motiler Spermatozoen gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Die Tatsache, daß lediglich zwei der 16 getesteten Ansätze einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufweisen und diese beiden die gleiche Menge an Zinksulfat enthielten, aber eine gegensätzliche Wirkung zeigen, deutet darauf hin, daß diese Änderung nicht durch den Einfluß von Zinksulfat verursacht wurde. Bei dem Anteil linear motiler Spermatozoen an den

motilen Spermatozoen finden sich ebenfalls nur bei zwei der 16 Ansätze signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Im Ansatz mit der Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$ kam es zum Inkubationszeitpunkt 4 Stunden zu einer Erhöhung des Anteils linearmotiler Spermatozoen (zweiseitige Signifikanz $p=0,0085$). Eine Erhöhung des Anteils linearmotiler Spermatozoen gegenüber der Kontrollgruppe zeigte ebenfalls der Ansatz mit der Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$ zum Inkubationszeitpunkt 6 Stunden (zweiseitige Signifikanz $p=0,002$).

Um eine abschließende Beurteilung der hier gefundenen Daten abgeben zu können, muß man einräumen, daß auch diese Arbeit die Wirkung einer Zinksubstitution *in vitro* nicht vollends klären kann. Die Tatsache, daß bei beiden betrachteten Motilitätsparametern lediglich je zwei der 16 Ansätze Unterschiede zur Kontrollgruppe aufwiesen und hierbei bei einem Parameter die gleiche Konzentration an Zinksulfat eine entgegengesetzte Wirkung verursachte, erlaubt die Vermutung, daß auch diese Unterschiede nicht durch den Einfluß von Zink verursacht wurden. Die in dieser Arbeit gefundenen Daten deuten darauf hin, daß die Zinksubstitution *in vitro* in den getesteten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Motilität von Spermatozoen hat. Diese Beobachtung ist gut mit denen von Sorensen (1999b) zu vereinbaren. Legt man die Untersuchungsergebnisse von Calvin et al. (1973; 1975) zugrunde, die zeigen daß Zink in den Mantelfasern der Spermatozoen die Sulfhydrylgruppen vor Oxidation schützt, so würde man erwarten, daß durch Erhöhung des Angebotes an Zink ein weiterer Schutz vor Oxidation geboten wird. Dies wäre mit den hier gefundenen Untersuchungsergebnissen vereinbar, da sich nach der Zugabe von Zink keine wesentliche Änderung der Motilität ergeben hat. Nicht zu erwarten ist, daß sich durch die alleinige Zugabe von Zink die Disulfidbrücken lösen, es hierdurch zu einer Strukturveränderung kommt und sich das Bewegungsmuster ändert.

4.10.4. Metallchelatoren

Es existieren Arbeiten, in denen versucht wurde, mit Hilfe von Metallchelatoren dem Ejakulat oder auch den Spermatozoen Metallionen zu entziehen. Kalzium kann sowohl durch einen intra- als auch durch einen extrazellulär wirkenden Chelator gebunden werden, und steht damit für weitere Reaktionen nicht mehr oder nur begrenzt zur Verfügung. Neben der Wirkung auf die Phosphorylierung von Proteinen und die Aktivität von Enzymen wurde auch der Effekt von Kalziumentzug auf die Motilität von Spermatozoen untersucht. Der intrazelluläre Ca-Chelator "1,2-bis-(*o*-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester

(BAPTA/AM)“ soll die Motilität von Spermatozoen in einem geringem Maße und die extrazellulären Ca - Chelatoren EGTA und EDTA in einem stärkeren Maße reduzieren (Luconi et al., 1996; Bourinbaiar et al., 1996; Centola G.M., 1998). Eine andere Arbeit mit Haushuhn Spermatozoen zeigte, daß der stimulierende Effekt von Calyculin A1 auf die Motilität, den Sauerstoffverbrauch und den ATP-Gehalt der Spermatozoen durch die Zugabe des intrazellulären Ca-Chelators BAPTA/AM gehemmt werden kann. Diese Hemmung war durch die Zugabe von Kalziumchlorid (CaCl_2) reversibel (Ashizawa et al., 1995). Insgesamt scheint Kalzium einen eher stimulierenden Einfluß auf die Motilität von Spermatozoen zu haben. Der Entzug von Kalzium durch Chelatoren führt zu einer Reduktion der Motilität (Ashizawa et al., 1995; Luconi et al., 1996; Bourinbaiar et al., 1996; Centola, G.M., 1998). Das Polypeptid Gramacidin ist ein spezifischer Kalium (K) Chelator. Nach dessen Zugabe zum Ejakulat kommt es zu einer irreversiblen Hemmung der Motilität (Bourinbaiar et al., 1996; Centola, G.M., 1998). Wobei der zugrundeliegende Mechanismus hierfür noch nicht letztendlich geklärt ist. Die Bindung von Vanadium durch Chelatoren führt zu einer Reduktion der Motilität und Vitalität (D`Cruz, 1998).

Gemeinsam ist den bis hierher besprochenen Chelatoren, daß sie durch die Bindung der entsprechenden Metallionen zu einer Supression der Motilität der Spermatozoen führen. Untersuchungen an Hamsterspermatozoen zeigten, daß durch die Chelatoren DL-Penicillamin, L-Histidin und L-Cystein die Kapazitation induziert werden kann. Hierbei soll insbesondere die Bindung von Zink eine herausragende Rolle spielen (Andrews, 1989). Dies wird hier durch eine im Vergleich zu den andern Chelatbildnern hohe Komplexbildungskonstante von DL-Penicillamin für Zink erklärt. Bereits 1967 wurden von Saito et al. erste Untersuchungen mit Chelatoren an Spermatozoen von Hunden und Ratten bezüglich deren Einflußnahme auf die Motilität durchgeführt. 1974 (Danscher & Rebbe) wurden diesbezüglich die ersten Versuche mit humanen Spermatozoen unternommen. Hier sollte ebenfalls Zink mit Hilfe eines Chelators gebunden und somit den Spermatozoen entzogen werden. In diesen Versuchen wurde mit dem membranpenetrierenden Zinkchelator ”Diethyldithiocarbamat (DEDTC)“ eine Immobilisierung der Spermatozoen erreicht. In einer Arbeit von Stoltenberg et al. (1997b) konnte dieser motilitätshemmende Einfluß von DEDTC bestätigt werden. Neuere Daten weisen darauf hin, daß es einen Unterschied zwischen der extra- und intrazellulären Bindung von Zink gibt. Der intrazelluläre Zinkchelator DEDTC, der unter anderem an das mitochondriale Zink der Spermatozoen bindet, führt zu einer Reduktion der Motilität (Danscher & Rebbe, 1974 ; Stoltenberg et al., 1997b; Sorensen et al., 1999b). Bindet man das

extrazelluläre Zink, zum Beispiel mit dem Chelator "Calzium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)", so führt dies zu einer Erhöhung der VSL-Motilität (Huacuja et al., 1973; Sorensen et al., 1999b). Von Carpino et al. (1998) wurde vermutet, daß eine Erhöhung des extrazellulären Zink zu einer Erniedrigung der Progressivmotilität führt, was durch die Beobachtungen von Sorensen et al. (1999b) gestützt wird. Diese Untersuchungen zeigen, daß Zink seine Wirkung an unterschiedlichen Orten auf unterschiedliche Weise entfalten muß. Einerseits scheint es eine wichtige Funktion bei der Energiegewinnung der Spermatozoen, an den Mitochondrien, zu erfüllen, da es bei der Bindung des dort vorhandenen Zinkes durch Chelatoren zu einer Supression der Motilität kommt. Andererseits muß es noch eine hemmende Funktion auf die Spermatozoenmotilität und insbesondere auf die Progressivmotilität besitzen. Eine wichtige Rolle könnte hierbei den zinkreichen Mantelfasern zukommen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Chelatoren DL-Penicillamin, DMSA, DMPS und eines Oligopeptids von Metallothionein auf die Motilitätsparameter von gewaschenen und durch Swim-up selektierten humanen Spermatozoen untersucht. Weil der Einfluß des Oligopeptids von Metallothionein auf die Motilität der Spermatozoen nur gering war, wurden die Versuche mit dieser Substanz nach zehn untersuchten Ejakulaten abgebrochen. Eine Begründung für die schwächere Wirkung des Oligopeptids könnte eine niedrigere Komplexbildungskonstante gegenüber den anderen Chelatbildnern sein. Diese Konstante gibt Auskunft über das Verhältnis von chelatgebundenem Metall zu freiem Metall und freiem Chelatbildner und gehorcht dem Massenwirkungsgesetz.

Die anderen drei Chelatbildner, DMPS, DMSA und DL-Penicillamin, verursachten eine signifikante Änderung der Motilitätsparameter. Dafür, daß das Wirkprinzip bei allen drei Chelatbildnern gleich ist, spricht, daß alle drei die Motilität der Spermatozoen in die gleiche Richtung beeinflussen haben, egal bei welcher Konzentration oder zu welcher Inkubationszeit. Der Anteil nichtlinear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen wurde durch die Einflußnahme der Chelatoren im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Im Gegensatz dazu wird der Anteil linear motiler Spermatozoen an den motilen Spermatozoen durch den Einfluß der Chelatoren gesteigert. Bei der Progressivgeschwindigkeit (VSL) der motilen Spermatozoen wird durch den Einfluß der Chelatoren eine höhere Geschwindigkeit als in der Kontrollgruppe erreicht. Bei einem Vergleich der Chelatoren untereinander (3.3.1. - 3.3.3.) zeigte sich, daß lediglich bei der Progressivgeschwindigkeit der motilen Spermatozoen ein signifikanter Unterschied zwischen DMSA und DL-Penicillamin besteht (zweiseitige

Signifikanz $p = 0,011$). Bei allen anderen Vergleichen fand sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Substanzen bezüglich ihrer Wirkung auf die Motilität der Spermatozoen. Auffällig ist jedoch, daß während es zu einer Abnahme der "Nichtlinear motilen Spermatozoen" kommt, die Fraktion der "Linear motilen Spermatozoen" zunimmt. Diese Daten weisen darauf hin, daß durch die Einflußnahme der Chelatoren eine Änderung des Bewegungsmusters der Spermatozoen verursacht wird. Es kommt offensichtlich bei einigen Spermatozoen zum Wechsel von einem "Nichtlinear motilen"- zu einem "Linear motilen"- Bewegungsmuster mit einer Erhöhung der Progressivgeschwindigkeit. Ein sehr ähnlicher Wandel des Bewegungsmusters der Spermatozoen wird auch *in vivo* vollzogen. Es kommt während des Prozesses der Reifung im Nebenhoden zu einer Änderung des Bewegungsmusters der Spermatozoen (siehe auch Kapitel 4.6). Dieses ändert sich von einem nicht progressivmotilen Flagellumschlag im Rete testis und Caput epididymis (Mohri & Yanagimachi, 1980; Cooper, 1986; Methieu et al., 1992) zu einem progressivmotilen Flagellumschlag im Bereich von Corpus und Cauda epididymis (Bedford, 1973; Bork et al., 1988; Chevrir & Dachieux, 1988; Haidl et al., 1994).

Eine weitere Veränderung, die sich während der Nebenhodenpassage ereignet und im Zusammenhang mit dem Erlangen der Progressivmotilität gesehen wird, ist die Reduktion des Zinkgehaltes der Spermatozoen um ungefähr 60% (Srivastava et al., 1983; Kaminska et al., 1987). Dabei wird davon ausgegangen, daß es durch einen Zinkentzug zu einer Ausbildung von Disulfidbrücken in den Mantelfasern, und damit zu einer Erhöhung der Rigidität derselben kommt (Abbildung 28). Dies erhöht die Steifigkeit der Mantelfasern. Da die Mantelfasern unmittelbar mit den Mikrotubuli des Axonem verbunden sind und als Bindeglied der Kraftübertragung zwischen Axonem und der Basis des Flagellum fungieren, hat eine Veränderung ihrer Rigidität unmittelbaren Einfluß auf das Bewegungsmuster (Lindemann, 1996). Durch die Erhöhung der Steifigkeit der Mantelfasern kommt es zu einer geringeren Amplitude des Flagellumschlages. Eine geringe Amplitude des Flagellumschlages findet sich vor allem bei progressiv motilen Spermatozoen, wie sie im Schwanz des Nebenhoden, bzw. bei ejakulierten Spermatozoen, anzutreffen sind. In dieser Arbeit ist es ebenfalls zu einer Änderung des Bewegungsmusters der Spermatozoen, hin zu einem progressiv motilen, gekommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind daher mit dem geschilderten Mechanismus sehr gut vereinbar. Letztendlich konnte bei dieser Untersuchung jedoch die Frage, ob Zink das zweiwertige Kation ist, welches durch die Chelatoren gebunden wird, nicht zufriedenstellend

geklärt werden, da eine Zinkreduktion im Spermatozoon in der mit der AAS durchgeführten Untersuchung nicht nachweisbar war. Versucht man, die hier gefundenen Daten in die bisher veröffentlichte Literatur einzuordnen, so deutet doch eine ganze Menge darauf hin, daß Zink das Element sein muß, welches durch die Chelatoren gebunden wird. Dem Chelator DL-Penicillamin wurde in Versuchen mit Hamsterspermatozoen bereits eine zinkbindende Eigenschaft zugeschrieben (Andrews, 1989). In dieser Arbeit erfolgte erstmals die Verwendung von DL-Penicillamin an humanen Spermatozoen. Für die Chelatoren DMSA und DMPS existieren in der Literatur keine Daten bezüglich ihrer Wirkung auf Spermatozoen. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß DMSA und DMPS in der Lage sind Motilitätsparameter von humanen Spermatozoen zu beeinflussen. Die große Synergie in der Wirkung aller drei Chelatoren läßt vermuten, daß der Wirkmechanismus bei allen drei Substanzen der gleiche ist.

Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet, sprechen auch einige Argumente für Zink als Kation, welches durch die Chelatoren gebunden wird und somit wahrscheinlich auch für die Änderung der Motilitätsparameter verantwortlich ist. Denn betrachtet man Untersuchungen mit Chelatoren bezüglich anderer Kationen, wie Kalzium, Kalium und Vanadium, so fällt ins Auge, daß der Einfluß der hierfür verwendeten Chelatoren die Motilität reduziert (Ashizawa, 1995; Luconi et al., 1996; Bourinbaiar et al., 1996; Centola, G.M., 1998; D`Cruz, 1998). Untersuchungen mit zinkbindenden Chelatoren haben ergeben, daß der intrazelluläre Zinkchelator DEDTC zur Immobilisierung der Spermatozoen führt (Danscher & Rebbe, 1974; Stoltenberg et al., 1997b; Sorrensen et al., 1999b). Extrazelluläre Zinkchelatoren, wie z.B. EDTA, sollen jedoch zu einer Erhöhung der VSL - Motilität führen (Huacuja et al., 1973; Sorrensen et al., 1999b). Im Vergleich der hier verwendeten Chelatoren mit denen in der Literatur beschriebenen, findet sich bezüglich deren Wirkung auf die Parameter der Motilität die größte Ähnlichkeit mit einem extrazellulären Zinkchelator, wie z.B. EDTA. Auch diese Tatsache spricht sehr dafür, daß die Einflußnahme der Chelatoren DL-Penicillamin, DMSA und DMPS auf die Motilität der Spermatozoen über eine Bindung von Zink erfolgt.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, daß die getesteten Chelatbildner in der Lage sind die Motilität von Spermatozoen zu beeinflussen. Der Nachweis, daß Zink das durch die Chelatoren komplexierte Metall war, wie von uns vermutet, ist mittels der AAS nicht gelungen. Für die Klärung des Wirkmechanismus sind deshalb weitere Untersuchungen, auch mit anderen Methoden, notwendig. Ein Ansatzpunkt wäre zusätzlich durch die Zugabe eines

Reduktionsmittels Zink aus der relativ stabilen Mercaptidbindungen zu lösen und damit den Vorgang der Chelatbildung zu vereinfachen. Dies könnte zu einem schnelleren oder ausgeprägteren Wirkungseintritt führen. Auch eine größere Differenz des Zinkgehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe wäre damit denkbar. Ein weiterer Aspekt, der zu klären wäre ist, ob die in dieser Arbeit gefundene Zunahme der Progressivmotilität durch eine Zunahme der Schlagfrequenz, mit einer Erhöhung des Energiestoffwechsels, oder durch eine Modifikation des Bewegungsmusters zustandekommt. In beiden Fällen wäre eine ursächliche Beteiligung von Zink denkbar. Bei der Zunahme des Energiestoffwechsels könnte Zink als Bestandteil essentieller Enzyme eine entscheidende Rolle spielen. Bei einer Erhöhung der Progressivmotilität durch eine Änderung des Bewegungsmusters mit einer Zunahme der Rigidität der Mantelfasern würde die Rolle von Zink als Weichmacher der Mantelfasern zum tragen kommen. Diese Fragen werden sicher Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

5. Zusammenfassung

Die Bedeutung der Motilität von Spermatozoen für die Befruchtung steht außer Frage. Ist ein Spermatozoon immotil, so kann es die Eizelle nicht erreichen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben lediglich bei ungefähr 50% der in ihrer Motilität gestörten Spermatozoen ein morphologisches Korrelat finden können. Für die andere Hälfte ist anzunehmen, daß die Ursache für die Minderung der Motilität wahrscheinlich in physiologischen und biochemischen Dysfunktionen und/oder Interaktionen zu suchen ist.

Ein Element, welches im männlichen Reproduktionstrakt in außergewöhnlich hoher Konzentration vorkommt, ist Zink. Es wurde sowohl im Spermatozoon, als auch im Seminalplasma nachgewiesen. Seine Funktion scheint vielseitig zu sein. Neben protektiven Eigenschaften gegenüber Oxidation und bakteriellen Infektionen, wird diesem Element immer wieder ein starker Einfluß auf die Motilität der Spermatozoen zugeschrieben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Substitution von Zinksulfat zu gewaschenen und durch Swim-up selektionierten humanen Spermatozoen durchgeführt. Als Kulturmedium wurde HTF-HSA-Medium verwendet. Ansätze wurden erstellt mit den Konzentrationen 1 mol/l $ZnSO_4$, 10 mol/l, 100 mol/l, 1 mmol/l und ein jeweiliger Kontrollansatz. Mit Hilfe der "Computer assisted Semen analysis (CASA)", wurde direkt nach dem Ansetzen der Probe, sowie nach der Inkubationszeit 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden eine Bestimmung der Motilitätsparameter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten keine eindeutige Beeinflussung der Motilitätsparameter der Spermatozoen durch die Zugabe von Zinksulfat.

Diese Arbeit beschäftigt sich im Weiteren mit der Substitution von Metallchelatoren zu gewaschenen und durch Swim-up selektionierten humanen Spermatozoen. Verwendung fanden hierbei die Substanzen "meso-2,3-Dimercapto Acid (DMSA)", "2,3-Dimercapto-1-Propansulfonsäure (DMPS)", DL-Penicillamin und das Oligopeptid "Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala". Die Substanzen DMSA, DMPS und das Oligopeptid haben in diesem Zusammenhang vorher noch nie Verwendung gefunden. In der ersten Versuchsreihe wurden die Spermatozoen von einem Ejakulat so verteilt, daß Ansätze mit 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und ein Kontrollansatz für jeden der Chelatoren entstand. Es erfolgte die Messung der Motilitätsparameter direkt nach dem Ansetzen, sowie nach 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 6 Stunden mit Hilfe der CASA.

Aufgrund der relativ schwach ausgeprägten Wirkung wurden die Versuche mit dem Oligopeptid nach der Untersuchung von 10 Ejakulaten abgebrochen. Bei den anderen Chelatoren wurden 20 Ejakulate untersucht. Es zeigte sich, daß es durch den Einfluß aller drei Chelatoren zu einer signifikanten Änderung der Motilität zu einem progressiv motileren Bewegungsmuster kam. Diese zeigte sich bei den Motilitätsparametern "Nichtlinear motile Spermatozoen", "Linearmotile Spermatozoen" und der "Progressivgeschwindigkeit (VSL) der motilen Spermatozoen", sowohl für jede der getesteten Konzentrationen, als auch zu jedem untersuchten Inkubationszeitpunkt. Durch den Einfluß der Chelatoren kam es zu einer Abnahme der "Nichtlinear motilen Spermatozoen", zu einer Zunahme der "Linear motilen Spermatozoen" und zu einer Erhöhung der "Progressivgeschwindigkeit (VSL) der motilen Spermatozoen".

In der zweiten Versuchsreihe wurden Spermatozoen von insgesamt 21 Ejakulaten auf die gleiche Weise präpariert wie in der Ersten. Es wurden Ansätze mit DMSA, DMPS und DL-Penicillamin mit einer Konzentration 100 µmol/l und ein Kontrollansatz hergestellt. Diese wurden zum Inkubationszeitpunkt 2 Stunden mit Hilfe der CASA bezüglich ihrer Motilitätsparameter analysiert. Direkt nach der Messung mit der CASA erfolgte die Weiterverarbeitung der Ansätze für die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS).

Bezüglich der Analyse der Motilitätsparameter zeigten die Chelatoren die gleiche Wirkung wie in der ersten Versuchsreihe. Bei einem Vergleich der Chelatoren untereinander zeigte sich lediglich bei dem Motilitätsparameter "Progressivgeschwindigkeit (VSL) der motilen Spermatozoen" eine signifikant stärkere Wirkung von DL-Penicillamin gegenüber DMSA. Bei der Ermittlung der Zinkkonzentration der Spermatozoen zeigten sich im Vergleich der Ansätze mit Chelatoren kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die gefundenen Zinkkonzentrationen lagen im Mittelwert zwischen 27,8 ng/10⁶ Spermatozoen (DL-Penicillamin) und 30,7 ng/10⁶ Spermatozoen (Kontrollgruppe). Damit liegen diese Werte in einem Bereich der in der Literatur bereits beschrieben wurde (25 ng/10⁶ Spermatozoen bis 55,3 ng/10⁶ Spermatozoen).

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zeigen, daß die Motilitätsparameter von humanen Spermatozoen durch die Substitution der Chelatoren DMSA, DMPS und DL-Penicillamin zu beeinflussen sind. Letztlich konnte der genaue Mechanismus für diese Beeinflussung jedoch nicht aufgezeigt werden. Bei der Einordnung der hier gefundenen Daten in die bisher publizierte Literatur spricht aber vieles dafür, daß die Wirkung über eine Bindung von Zink an die Chelatoren zustande kommt. Besonders die Funktion von Zink als Weichmacher der

Mantelfasern würde vor dem Hintergrund des „geometric-Clutch“-Modell die Veränderung des Bewegungsmusters durch den Entzug von Zink erklären.

6. Literatur

- Abbasi, A., Prasad, A., Rabbani, P. and DuMouchelle, E. (1980) Experimental zinc deficiency in man. *J. Lab. Clin. Med.* **96**: 544-546
- Abou-Shakra, F.R., Ward, N.I. and Everard, D.M. (1989) The role of trace elements in male infertility. *Fertil. Steril.* **52**: 307-310
- Acott, T.S., Katz, D.F. and Hoskins, D. (1983) Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* **29**: 389-399
- Afzelius, B.A. (1988) Microtubules in the spermatides of stick insects. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.* **98**: 94-102
- Afzelius, B.A. and Eliasson, R. (1979) Flagellar mutants in man: On the heterogeneity of the immotile - cilia syndrom. *J. Ultrastruct. Res.* **69**: 348-356
- Albe, X., Auger, J., Margules, S. and Bisconte J.C. (1988) Measurement of spermatozoal motility over prolonged periods of time using image analysis. *Comput Biomed Res* **21**: 276-288
- Amann, R.P. (1987) Function of the epididymis in bulls and rams. *J. Reprod. Fertil.* **34**: 115-131
- Ando, S., Carpino, A., Buffone, M. Maggiolini, M. Giacchetto, C., Seidita, F. (1990) Fructose, prostatic acid, phosphatase and zinc levels in the seminal plasma of varicoceles. *Int. J. Fert.* **35**: 249-252
- Andrews, J.C. and Bavister, B.D. (1989) Capacitation of hamster spermatozoa with the divalent cation chelators D-Penicillamine, L-Histidine and L-Cysteine in a protein-free culture medium. *Gamete Research* **23**: 159-170
- Arver, S. and Sjoberg, H.E. (1982) Calcium fractions in seminal plasma and functional properties of human spermatozoa. *Acta Physiol. Scand.*, **116**: 159-165
- Ashizawa, K., Magome, A. and Tsuzuki, Y. (1995) Stimulation of motility and respiration of intact fowl spermatozoa by calyculin A, a specific inhibitor of protein phosphatase-1 and -2A, via a Ca^{2+} -dependent mechanism. *J. Reprod. Fertil.* **105**: 109-114
- Baccetti, B., Pallini, V. and Burrini, A.G. (1976a) The accessory fibres of the sperm tail. III. High – sulfur and low – sulfur components in cephalopods and mammals. *J. Ultrastruct. Res.* **57**: 289-308
- Baccetti, B., Pallini, V. and Burrini, A.G. (1976b) The accessory fibers of the sperm tail. II: Their role in binding zinc in mammals and cephalopods. *J. Ultrastruct. Res.* **54**: 261-275
- Baltz, J.M., Williams, P.O. and Cone, R.A. (1990) Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* **43**: 485-491

- Bedford, J.M. and Calvin, H.I. (1974) Changes in -S-S-linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J. Exp. Zool.* **187**: 181-204
- Bedford, J.M., Calvin, H.I., and Cooper, G.W. (1973) The maturation of spermatozoa in the human epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* 18, Suppl. **109**: 199-213
- Bedwal, R.S., Edwards, M.S., Katoch, M., Bahuguna, A. and Dewan, R. (1994) Histological and biochemical changes in testes of zinc deficient BALB/c strain of mice. *Indian J. Exp. Biol.* **32**: 243-247
- Behne, D., Gessner, H., Wolters, G. and Brotherton, J. (1988) Selenium, rubidium and zinc in human semen fractions. *Int. J. Androl.* **11**: 415-423
- Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G.M. and Kvist, U. (1986) The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *Int. J. Androl.* **9**: 77-80
- Björndahl, L. and Kvist, U. (1990) Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int. J. Androl.* **13**: 232-237
- Bork, K., Chevier, C., Paquignon, M., Jouannet, P. et Dacheux, J.L. (1988) Analyse de la motilité et du mouvement flagellaire des spermatozoïdes de ver rat au cours du transit epididymaire. *Reprod. Nutr. Develop.* **28**: 1307-1315
- Bourinbaiar, A.S. and Lee, C.-H. (1996) Synergistic effect of Gramicidin and EDTA in inhibiting sperm motility and cervical mucus penetration in vitro. *Contraception* **54**: 367-72
- Brito, M., Figueroa, J., Vera, J.C., Cortes, P., Hott, R. and Burzio, L. (1986) Phosphoproteins are structural components of bull sperm outer dense fibres. *Gamete Res.* **22**: 327-336
- Burfeind, P. and Hoyer-Fender, S. (1991) Sequence and developmental expression of a mRNA encoding a putative protein of rat sperm outer dense fibers. *Develop. Biol.* **148**: 195-204
- Burkman, L. (1990) Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: *Biological and chemical aspects*. CRC Press Boca Raton. Ann Arbor Boston, pp.: 303-329
- Burkman, L. (1991) Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility parameters in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil. Steril.* **55**: 363-371
- Caldamone, A.A., Freytag, M.K. and Cockett, A.T. (1979) Seminal zinc and male infertility. *Urology* **13**: 280-281
- Calvin, H.I. (1979) Electrophoretic evidence for the identity of the major zinc-binding polypeptides in the rat sperm tail. *Biol. Reprod.* **21**: 873-882

- Calvin, H.I. (1981) Comparative labelling of rat epididymal spermatozoa by intratesticularly administered $Zn^{65}Cl_2$ and $[35S]$ cysteine. *J. Reprod.* **61**: 65-73
- Calvin, H. and Bedford, J.M. (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **13**: 65-75
- Calvin, H.I. and Bleau, G. (1974) Zinc-thiol complexes in keratin like structures of rat spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **86**: 280-284
- Calvin, H.I., Hwang, F.H.-F. and Wohlrab, H. (1975) Localisation of zinc in a dense fiber-connecting piece fraction of rat sperm tails analogous chemically to hair keratin. *Biol. Reprod.* **13**: 228-239
- Calvin, H.I., Yu, C.C. and Bedford, J.M. (1973) Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **81**: 333-341
- Carpino, A., Siciliano, L., Petrone, M.F., De-Stefano, C., Aquila, S., Ando, S and Petrone, M.F. (1998) Low seminal zinc bound to high molecular weight proteins in asthenozoospermic patients: evidence of increased sperm zinc content in oligoasthenozoospermic patients. *Hum. Reprod.*, **13**: 111-114
- Carpino, A., Sisci, D., Aquila, S., Salerno, M., Siciliano, L., Sessa, M., and Ando, S. (1994) Adnexal gland secretion markers in unexplained asthenozoospermia. *Arch. Androl.* **32**: 37-43
- Carreras, A. and Mendoza, C (1990) Zinc levels in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* **22**: 279-283
- Centola, G.M. (1998) Dose-response effects of Gramicidin-D, EDTA, and Nonoxynol-9 on sperm motion parameters and acrosome status. *Contraception* **58**: 35-38
- Chevrier, C. et Dacheux, J.L. (1988) Maturation des spermatozoïdes de bélier. Etude préliminaire du mouvement flagellaire caractéristique des formes de transition du corps de lepididyme. *Reprod. Nutr. Dev.* **28**: 1301-1305
- Chvapil, M. (1973) New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life sciences*, **13**: 1041-1049
- Cooper, T.G. (1986) *The epididymis, sperm maturation and fertilisation.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag
- Cooper, T.G and Orgebin-Crist, M.C. (1975) The effect of epididymal and testicular fluids on the fertilising capacity of testicular and epididymal spermatozoa. *Andrologia*, **7**: 85-91
- Cornwall, G.A. and Chang, T.S.K. (1990) Characterisation of sulfhydryl proteins involved in the maintenance straightness in hamster spermatozoa. *J. Androl.* **11**: 168-181
- Cummins, J.M. and Woodall, P.F. (1985) On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fertil.* **75**: 153-175

- Dadoune, J.P. (1988) Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **3**: 311-318
- Danscher, G., Hammen, R., Fjerdingstad, E. and Rebbe, H. (1978) Zinc content of human ejaculate and the motility of sperm cells. *Int. J. Androl.* **1**: 576-581
- Danscher, G. and Rebbe, H. (1974) Effects of two chelating agents, oxine and diethyldithiocarbamate (Antabuse), on stainability and motility of human sperms. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 981-985
- DasGupta, S., Mills, C.L., and Fraser, L.R. (1993) Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* **99**: 135-143
- Davis, R.O., and Katz D.F. (1992) Standardisation and comparability of CASA instruments. *J. Androl.* **13**: 81 - 86
- D'Cruz, O.J., Gosh, P. and Uckun, F.M. (1998) Spermicidal activity of chelated complexes of Bis(cyclopentadienyl)vanadium(IV). *Molec. Hum. Reprod.* **4**: 683-693
- Detweiler, C. and Thomas, P. (1998) Role of ions and ion channels in the regulation of atlantic croaker sperm motility. *J. Exp. Zool.* **281**: 139-148
- Duncan, A.E. and Fraser, L.R. (1993) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an M_r 95000 phosphotyrosine-containing protein. *J. Reprod. Fert.* **97**: 287-299
- Eddy, E.M. (1988) The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (eds.). *The Physiology of Reproduction Vol. 1*, Raven Press, New York
- Eliasson, R. (1977) Seminal plasma accessory genital glands and fertility. In: Cockett, A.T. and Urry, R.L., *Male infertility: Workup, treatment and research*. New York: Grune & Stratton
- Eliasson, R. and Lindholmer, C. (1971) Zinc in human seminal plasma. *Andrologia* **3**: 147-153
- Eltohamy, M.M. and Younis, M. (1991) Response of testes, epididymidis and seminal vesicle of rabbits to zinc deficiency. *Arch. Exp. Veterinarmed.* **45**: 155-160
- Estler, C.J. (1994) *Pharmakologie und Toxikologie (4. Auflage)*. Stuttgart: Schattauer-Verlag
- Fair, W.R. and Wehner, N. (1976) The prostatic antibacterial factor: Identity and significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* **6**: 383-403
- Fawcett, D.W. (1975) The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* **44**: 394-436
- Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergsen, T. and Öian, P. (1993) Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum. Reprod.* **8**: 1863-1868
- Foresta, C., Rossato, M. and Di Virgilio, F. (1992) Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **267**: 19443-19447

- Fritsch, P. (1998) *Dermatologie und Venerologie*. Berlin: Springer Verlag
- Fritsch, P., Trenkwalder, B. und Schill, B.-W. (1985) *Venerologie und Andrologie*. Heidelberger Taschenbücher, Berlin: Springer Verlag
- Furuya, S., Endo, Y., Osumi, K., Oba, M. and Suzuki, S. (1993) Effects of modulators of protein kinase C on human sperm capacitation. *Fertil. Steril.* **59**: 1285-1290
- Gavella, M. and Lipovac, V. (1998) In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrologia* **30**: 317-327
- Gould, K.G. Young, L.A. and Hinton, B.T. (1988) Alterations in primate sperm motility with maturation and during exposure to theophylline. *Am. J. Primatol.* **15**: 325-336
- Glover, T.J., Suzuki, F. and Racey, P.A. (1974) The role of the epididymal cells in sperm survival. In: Afzelius, B.A., *The functional anatomy of the spermatozoon*. Oxford, New York: Pergamon Press, S. 359
- Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Whali, W. and Chambon, P. (1988) The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and the glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* **7**: 3037 - 3044
- Grunert, J.H., De Geyter, C. and Nieschlag E. (1990) Objective identification of hyperactivated human spermatozoa by computerized sperm motion analysis with Hamilton - Thorn sperm motility analyser. *Human Reproduction* **5**: 593 - 599
- Gupta, R.P., Verma, P.C., Sadana, J.R. and Gupta, R.K. (1988) Studies on the pathology of experimental zinc deficiency in guinea-pigs. *J. Comp. Pathol.* **98**: 405-413
- Gyorkey, F., Min, K.-W., Huff, J.A. and Gyorkey, P (1967) Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic and neoplastic. *Cancer Res.* **27**: 1348-1353
- Hafiez, A.A., el Kirdassy, Z.H., el Malkh, N.M. and el Zayat, E.M. (1990) Role of zinc in regulating the testicular function. III.: Histopathological changes induced by dietary zinc deficiency in testes of male albino rats. *Nahrung* **34**: 65-73
- Haidl, G., Badura, B., Hinsch, K.-D., Ghyczy, M., Gareiß, J. and Schill, W.-B. (1993) Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. *Hum. Reprod.* **8**: 1070-1073
- Haidl, G., Badura, B. and Schill, W.-B. (1994) Function of human epididymal spermatozoa. *J. Androl. Suppl.* **15**: 23-27
- Haidl, G. und Becker, A. (1991) Elektronenmikroskopische Befunde an menschlichen Spermatozoen mit Flagellumdefekten. *Hautarzt* 1991, **42**: 242-246
- Haidl, G., Becker, A. and Henkel, R. (1991a) Poor development of outer dense fibers as a major cause of tail abnormalities in the spermatozoa of asthenoteratozoospermic men. *Hum. Reprod.*, **6**: 1431-1438

- Haidl, G., Hofmann, N., Weidner, W. und Weiske, W.H. (1991b) Darstellung nebenhodenbedingter Motilitätsstörungen durch abnorme Anfärbbarkeit menschlicher Spermatozoenflagellen. *Fertilität* **7**: 25-30
- Hammerstedt, R.H., Keith, A.D., Hay, S., Deluca, N. and Amann, R.P. (1979) Changes in ram sperm membranes during epididymal transit. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**: 7-12
- Hedrick, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M. (1988) The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In: Shoemaker, S., Sonnet, P., Whitaker, J. (eds.) *Enzymes in Agricultural Biotechnology*, Washington, D.C.: ACS Books; 55-73
- Henkel, R., Baldauf, C., Bittner, J., Weidner, W. and Miska, W. (2001) Elimination of zinc from the flagella of spermatozoa during epididymal transit is important for motility. *Reprod. Technol.* **10**: 280-285
- Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Hüther, F. and Miska, W. (1999) Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil. Steril.* **71**: 1138-1143
- Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Schill, W.-B., Kleinstein, J. and Gips, H. (1995) Determination of the acrosin activity of human spermatozoa by means of a gelatinolytic technique. A simple, predictive method useful for IVF. *J Androl* **16**: 272-277
- Henkel, R., Stalf, T., Mertens, N., Miska, W. and Schill, W.-B. (1994) Outer dense fibers of human spermatozoa: partial characterisation and possible physiological functions. *Int. J. Androl.* **17**: 68-73
- Henkel, R., Stalf, T. and Miska, W. (1992) Isolation and partial characterisation of the outer dense fibers from human spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **373**: 685-689
- Herrmann, W.P. (1975) Nachweis zinkhaltiger Glycoproteine im menschlichen Spermaplasma. *Andrologia* **7**: 329-339
- Hesketh, J.E. (1982) Effects of dietary zinc deficiency on Leydig cell ultrastructure in the boar. *J. Comp. Pathol.* **92**: 239-247
- Holland, M. and White, G.I. (1988) Heavy metals and human spermatozoa III. The toxicity of copper ions for spermatozoa. *Contraception* **38**: 685-695
- Hommonai, Z.T., Matzkin, H., Fainman, N., Paz, G. and Kraicer, P.F. (1978) The cation composition of seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertil. Steril.* **29**: 539-542
- Hoshi, K., Sasaki, H., Yanagida, K., Sato, A. and Tsuiki, A. (1994) Localisation of fibronectin on the surface of human spermatozoa and relation to the sperm-egg interaction. *Fertil. Steril.* **61**: 542-547
- Hrudka, F. (1979) Cytochemistry of oxidoreductases in spermatozoa: the technique revisited. *Andrologia* **11**: 337-353

- Huajacuja, L., Sosa, A., Delago, N.M. and Rosado (1973) A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sciences* **13**: 1383-1394
- Janick, J., Zeitz, L., and Whitmore, W.F. (1971) Seminal fluid and spermatozoon zinc levels and their relationship to human spermatozoon motility. *Fertil. Steril.* **22**: 573-580
- Jasko, D.J., Lein, D.H. and Foote R.H. (1990) Comparison of two Computer-Automated Semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J. Androl.* **11**: 453-459
- Jones, R., Brown, C.R., Glos von, K.I. and Parker, M.G. (1980) Hormonal regulation of proteins synthesis in the rat epididymidis. Characterisation of androgen-dependent and testicular fluid-dependent protein. *Biochem. J.* **188**: 667-676
- Kaminska, B., Rozewicka, L., Dominiak, B., Mielnicka, M. and Mikulska, D. (1987) Zinc content in epididimal spermatozoa of Metoclopramid-treated rats. *Andrologia* **19**: 677-683
- Kanwar, U., Chadha, S., Batla, A., Sanyal, S.N. and Sandhu, R. (1988) Effect of selected metal ions on the motility and carbohydrate metabolism of ejaculated human spermatozoa. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **32**: 195-201
- Karacagil, M., Sade, M. and Türkyilmaz, R.K. (1985) The effect of zinc, arginine, fructose and seminal supernatant of normal semen on the tripple adenosine triphosphatase activities of the spermatozoa from males with oligoasthenozoospermia. *Andrologia* **17**: 383-388
- Katz, D.F., Morales, P., Samuels, S.J. and Overstreet, J.W. (1990) Mechanism of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus. *Fertil. Steril.* **54**: 513-516
- Kavanagh, J.P. (1982) The response of seven prostatic fluid components to prostatic disease. *Int. J. Reprod.* **5**: 487-496
- Kavanagh, J.P. (1985) Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrat and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *J. Reprod. Fert.* **75**: 35-41
- Knuth, U.A., Yeung, C.H. and Nieschlag E. (1987) Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is biased by subjective parameter settings. *Fertil. Steril.* **58**: 118-124
- Krause, W., Schönhärl, G. and Brake A. (1993) The variability of measuring sperm concentration and motility as determined by computer assisted image analysis and visual estimation. *Andrologia* **25**: 181-187
- Krausz, C.S., Gervasi, G., Forti, G. and Baldi, E. (1994) Effect of platet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **9**: 471-476
- Kruczynski, D. und Passia, D. (1986) Die Schwermetallverteilung im menschlichen Ejakulat - eine histochemische Studie. *Acta histochem.* **79**: 187-192

- Kuo, Y.L., Tzeng, W.L., Chiang, H.K., Ni, R.F., Lee, T.C. and Young, S.T. (1998) New system for long-term monitoring of sperm motility: EDTA effect on semen. *Arch. Androl.* **41**: 127-133
- Kvist, U. (1980) Reversible inhibition of nuclear chromatin decondensation (NCD) ability of human spermatozoa induced by prostatic fluid. *Acta Physiol. Scand.* **109**: 73-78
- Kvist, U., Björndahl, L., Kjellberg, S., Lindholmer, C. and Roomans, G. M. (1985a) Sperm nuclear zinc: its prostatic origin and its significance for human fertility. *Acta Physiol. Scand.* **125**: 297-303
- Kvist, U., Björndahl, L., Roomans, G.M. and Lindholmer, C. (1985b) Nuclear zinc in human epididymal and ejaculated spermatozoa. *Acta Physiol. Scand.* **125**: 297-303
- Kvist, U., Kjellberg, S., Björndahl, L., Soufir, J.-C. and Arver, S. (1990) Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int. J. Androl.* **13**: 245-252
- Kynaston, H.G., Lewis-Jones, D.I., Lynch, R.V. and Desmond, A.D. (1988) Changes in seminal quality following oral zinc therapy. *Andrologia* **20**: 21-22
- Lavon, U., Volcani, R. und Danon, D. (1971) The proteins of bovine spermatozoa from the caput and cauda epididymidis. *J. Reprod. Fertil.* **24**: 219-226
- Lewis-Jones, D.I., Aird, I.A., Biljan, M.M. and Kingsland, C.R. (1996) Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Hum. Reprod.* **11**: 2465-2467
- Lindemann, C.B. (1994a) A "geometric clutch" hypothesis to explain oscillations of the axoneme of cilia and flagella. *J. Theor. Biol.* **168**: 175-189
- Lindemann, C.B. (1994b) A model of flagellar and ciliary functioning which uses the force transverse to axoneme as the regulator of dynein activation. *Cell Motil. Cytoskelet.* **29**: 141-154
- Lindemann, C.B. (1996) Functional significance of the outer dense fibres of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric Clutch Model. *Cell Motil. Cytoskelet.* **34**: 258-270
- Lindemann, C.B. and Kanous, K.S. (1997) A Model for Flagellar Motility. *Int. Rev. Cytol.* **173**: 1-72
- Lindemann, C.B., Goltz, J.S. and Kanous, K.S. (1987) Regulation of activation state and flagellar wave form in epididymal rat sperm: evidence for the involvement of both Ca^{2+} and cAMP. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **8**: 324-332
- Lindholmer, C. (1974a) Studies on the effects of human seminal plasma on sperm motility and survival. Thesis, Univers. Stockholm
- Lindholmer, C. (1974b) Toxicity of zinc ions to human spermatozoa and the influence of albumin. *Andrologia* **6**: 7-16

- Lindholmer, C. and Eliasson, R. (1972) Zinc and magnesium in human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* **17**: 153-160
- Luconi, M., Krausz, C., Forti, G. and Baldi, E. (1996) Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **55**: 207-216
- Magnus, Ö., Brekke, I., Åbyholm, T. and Purvis, K. (1990) Effects of manganese and other divalent cations on progressive motility of human sperm. *Arch. Androl.* **24**: 159-166
- Mahadevan, M. and Baker, G. (1984) Assessment and prepartation of semen for in vitro fertilisation. In *Clinical in Vitro Fertilisation*. Wood, C., Trounson, A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 83-97
- Makler, A. (1980) The improved ten - micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil. Steril.* **33**: 337 - 338
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981) Male reproductive function and semen; Themes and trends in Physiology, Biochemistry and investigative Andrology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag
- Marmar, J.L., Katz, S., Praiss, D.E., and DeBenedictis, T.J. (1975) Semen zinc levels in infertile and postvasectomy patients and patients with prostatitis. *Fertil. Steril.* **26**: 1057-1063
- Martin, G.B., White, C.L., Markey, C.M. and Blackburny, M.A. (1994) Effects on dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. *J. Reprod. Fertil.* **101**: 87-96
- Mathieu, C., Guerin, J.F. Cognat, M. Lejeune, H. Pinatel, M.C. and Lornage, J. (1992) Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertil. Steril.* **57**: 871-876
- Mawson, C.A. and Fischer, M.I. (1953) Zinc and carbonic anhydrase in human semen. *Biochem. J.* **55**: 696-700
- Maynard, P.V., Elstein, M. and Chandler, J.A. (1975) The effect of copper on the distribution of elements in human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **43**: 41-48
- McClure, R. D., Brawer, J. and Robaire, B. (1983) Ultrastructure of immotile spermatozoa in an infertile male: a spectrum of structural defects. *Fertil. Steril.* **40**: 395-399
- McLaughlin, E.A. and Ford, W.C.L. (1994) Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. *Mol. Reprod. Dev.* **37**: 241-246
- Mohri, H. and Yanagimachi, R. (1980) Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **127**: 191-196
- Mortimer, D. (1994) *Practical Laboratory Andrology*. Oxford: University Press

- Morton, B., Harrigan-Lum, J., Albagli, L. and Joos, T. (1974) The activation of motility in quiescent hamster sperm from epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**: 372-379
- Nelson, L. (1958) Cytochemical studies with the electron microscope. I. Adenosine triphosphate in rat spermatozoa. *Biochem. Biophys. Acta* **27**: 634-641
- Neugebauer D.-Ch., Neuwinger, J., Jockenhövel, F. and Nieschlag, E. (1990) '9 + 0' Axoneme in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally spermatozoa associated with thickened sheath and short midpiece. *Hum. Reprod.* **5**: 981-986
- Nicolson, G.L. and Yanagimachi, R. (1979) Cell surface changes associated with epididymal maturation of mammalian spermatozoa. In: Fawcett, D.W. and Bedford, J.M., (eds.) *The spermatozoon Maturation, motility surface properties and comparative aspects.* Baltimore: Urban & Schwarzenberg, p. 187
- Nieschlag E. und Behre H.M. (1996) *Andrologie.* Springer Verlag, Berlin
- Noack-Füller, G., Beer, C. and Seibert, H (1993) Cadmium, lead, selenium and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia* **25**: 7-12
- Oka, N., Matsumoto, O. and Kamidono, S. (1988) Experimental studies of male infertility and zinc. *Hinyokika-Kijo* **34**: 1-10
- Olson, G.E. and Sammons, D.W. (1980) Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biol. Reprod.* **22**: 319-332
- Oteiza, P.I., Olin, K.L., Fraga, C.G. and Keen, C.L. (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testis. *J. Nutr.* **125**: 823 - 829
- Pallini, V. and Bacci, E. (1979) Bull sperm selenium is bound to a structural protein of mitochondria. *J. Submicrosc. Cytol.* **11**: 165-170
- Papadimas, J., Bontis, J., Ikkos, D. und Mantalenakis, S. (1983) Seminal plasma zinc and magnesium in infertile men. *Arch. Androl.* **10**: 261-268
- Pariset, C.C., Feinberg, J.M.F., Dacheux, J.L. and Weinman, S.J. (1985) Changes in calmodulin level and cAMP - dependent protein kinase activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **74**: 105-112
- Perez-Ramirez, B. and Castells, M. (1991) In vitro biosynthesis of rat sperm outer dense fiber components. *Life Science* **49**: 1549-1554
- Phillips, D.M. (1972) Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J. Cell. Biol.* **53**: 561-573
- Prasad, A.S. (1985) Clinical, endocrinological and biochemical effects of zinc deficiency. *Clin. Endocrinol. Metabol.* **14**: 567-589

- Prien, S.D., Lox, C.D., Messer, R.H. and Deleon, F.D. (1990) Seminal concentration of total and ionized calcium from man with normal and decreased motility. *Fertil. Steril.* **54**: 171-172
- Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. (1985) Improved pregnancy rate in human in vitro fertilisation with the use of medium based on the composition of human tubular fluid. *Fertil. Steril.* **44**: 493-498
- Reeves, P.G. (1990) Zinc deficiency and dipeptidyl carboxypeptidase activity. Comparative effects on epididymidis and testis of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **24**: 1-11
- Riffo, M., Leiva, S. and Astudillo, J. (1992) Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int. J. Androl.* **15**: 229-237
- Roomans, G. M., Lundevall, E., Björndahl, L. and Kvist, U. (1982) Removal of zinc from subcellular regions of human spermatozoa by EDTA treatment studied by X-ray microanalysis. *Int. J. Androl.* **5**: 478-486
- Roche „Roche Lexikon Medizin“ Urban & Schwarzenberg, 1984
- Ronquist, G., Brody, I., Gottfries, A., and Stegmayr, B. (1978a) An Mg^{2+} and Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I. *Andologia*, **10**: 261-272
- Ronquist, G., Brody, I., Gottfries, A., and Stegmayr, B. (1978b) An Mg^{2+} and Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part II.. *Andologia*, **10**: 427-433
- Root, A.W., Duckett, G., Sweetland, M. and Reiter E.O. (1979) Effects of zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats. *J. Nutr.* **109**: 958-964
- Rosado, A., Huajacuja, L., Delgado, N.M., Merchant, H. and Pancardo, R.M. (1977) Elemental composition of subcellular structures of human spermatozoa. A study by energy dispersive analysis of x-ray. *Life Sciences* **20**: 647-656
- Rotem, R., Paz, G.F. Homonnai, Z.T., Kalina, M., Lax, J., Breitbart, H. and Noar, Z. (1992) Ca^{2+} -Independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. *Endocrinology* **131**: 2235-2243
- Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Hughes, L. and Hendry, W.F. (1990) A survey of the ultrastructural defects associate with absent or impaired human sperm motility. *Fertil. Steril.* **53**: 556-560
- Saaranen, M., Suistomaa, U., Kantola, M., Saarikoski, S. and Vanha-Oerttula, T. (1987) Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: comparison with semen parameters and fertility. *Hum. Reprod.* **2**: 475-479
- Saito, S., Bush, I.M. and Withmore, W.F.J. (1967) Effects of certain metals and chelating agents on rat and dog epididymal spermatozoan motility. *Fertil. Steril.* **18**: 517-529
- Saito, S., Zeitz, L., Bush, I.M., Lee, R. and Withmore, W.F.jr. (1969) Zinc uptake in canine or rat spermatozoa. *Am. J. Physiol.* **4**: 1039-1043

- Samman, S. (1993) Dietary versus cellular zinc: the antioxidant paradox. *Free Radical Biol. Med.* **14**: 95-97
- Sanada, S. and Yoshida, O. (1985) Zinc concentrations and total amount of zinc in seminal plasma of infertile men with special reference to prostatic secretory function. *Hinyokika-Kyo* **31**: 1971-1987
- Schirren, C., Beltermann, R., Haensch, M., Köhn, D. und Lossin, J. (1964) Biochemische Untersuchungen am menschlichen Spermaplasma: Zink und Phosphexose-Isomerase-Aktivität. *Arch. Klein. Exp. Dermatol.* **218**: 323-338
- Schirren, C. und Bettendorf, G. (1987) Störung der Gonadenfunktion. In: Gross, R., Schölmerich, P. und Gerok, W., *Lehrbuch der inneren Medizin*, 7. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, p. 877
- Seibert, H. (1988) Messung der Bewegungsaktivität der Spermatozoen von Mensch und Rind mit Hilfe von Videomikrographie und Computerbildanalyse. *Fertilität* **4**: 215-218
- Serres, C., Escalier, D. and David, G. (1983) Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the length of the dense fibres. *Biol. Cell* **49**: 143-162
- Sieboldt, F., Achilles, W. und Krause, W. (1993) Zinkkonzentrationen im menschlichen Spermatozoon, Seminalplasma und proteinfreien Seminalplasma. Abstractband Dreiländertagung Fertilität und Sterilität, Lugano, Schweiz (06.-08.05.1993)
- Skandhan, K.P. (1981) Zinc in normal human seminal plasma. *Andrologia* **13**: 346-351
- Skandhan, K.P., Skandhan, S. and Mehta, Y.B. (1978) Semenelektrolytesin normale and infertile subjekts. II. Zinc. *Experientia* **34**: 1476-1477
- Sorensen, M.B., Bergdahl, I.A., Hjollund, N.H.I., Bonde, J.E.P., Stoltenberg, M. and Ernst E. (1999a) Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol. Hum. Reprod.* **5**: 331-337
- Sorensen, B.M., Stoltenberg, M., Danscher, G. and Ernst, E. (1999b) Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Molec. Hum. Reprod.* **5**: 338-341
- Srivastava, A., Chowdhury, A.R. and Setty, B.S. (1983) Zinc content of maturing spermatozoa in oestrogen treated rats. *Int. J. Androl.* **6**: 103-108
- Stalf, T., Henkel, R. und Miska, W. (1993) Weitere Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der Mantelfasern in menschlichen Spermatozoen. *Fertilität* **9**: 203-209
- Stancovic, H. and Mikac-Devic, D. (1976) Zinc and copper in human semen. *Clin. Chim. Acta*, **70**: 123-126
- Stanwell-Smith, R., Thompson S.G., Haines, A.P., Ward, R.J. Cashmore, G., Stedronska, J. and Hendry, W.F. (1983) A comparative study of zinc, copper, cadmium and lead levels in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* **40**: 670-677

- Stegmayr, B., Berggren, P.O., Ronquist, G. and Hellman, B. (1982) Calcium, magnesium and zinc contents in organelles of prostatic origin in human seminal plasma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **16**: 199-203
- Stoltenberg, M., Sorensen, M.B. and Danscher, G. (1997b) Histochemical demonstration of zinc ions in ejaculated human semen. *Int. J. Androl.* **20**: 229-236
- Stoltenberg, M., Sorensen, M.B., Danscher, G., Juhl, S., Andreassen, A. and Ernst, E. (1997a) Autometallographic demonstration of zinc ions in rat sperm cells. *Molec. Hum. Reprod.* **9**: 763-767
- Swaminathan, S., Seshadri, M.S., Srikrishna, G., Mathew, P. and Kanagasabapathy, A.S. (1993) Detection and elimination of preanalytical errors in the determination of zinc in biological samples. *Indian J. Med. Res. (B)* **98**: 199-201
- Takahara H., Cosentino, M.J. and Cockett, A.T. (1983) Effect of low-dose androgen and zinc sulfate on sperm motility and seminal zinc levels in infertile men. *Urology* **22**: 160-164
- Tesarik, J., Drahorád, J., Peknicová, J. (1988) Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil Steril* **50**: 133-141
- Thomas, P. and Meizel, S. (1988) An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res.* **20**: 397-411
- Tikival, M., Ajmera, R.L. and Mathur, N.K. (1987) Effect of zinc administration on seminal zinc and fertility of oligospermic males. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **31**: 30-34
- Toni, G., Gallicciotti, P., Coccia, P., Piffaretti-Yanez, A., Stamm, J. and Balerna, M. (1995) Computer-aided semen analysis: sperm concentration assessment by the Strömberg - Mika system. *Andrologia* **27**: 55 - 65
- Umeyama, T., Ishikawa, H., Yoshii, S., Takeshima, H. and Koiso, K. (1986) A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* **46**: 494-499
- Vantman, D., Zinaman, M., Koukoulis, G., Sherins, R.J. and Dennison, L. (1988) Computer assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil. Steril.* **49**: 510 - 515
- Welz, B. (1983) *Atomabsorptionsspektrometrie*, Verlag Chemie, Weinheim
- Whitmore, W.F.Jr. (1963) Comments on zinc in the human and canine prostates. In: *Biology of the prostate and related tissues*. Nat. Cancer Inst. Monograph **12**: 337-340
- Witkin, S.S. (1980) Properties of DNA polymerase from purified nuclei and DNA-synthesizing complexes of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **59**: 409-419

- Yanagida, K., Hoshi, K., Sato, A. and Burkman C. (1990) Automated semen analysis shows an increase in sperm concentration and motility with time in Makler chamber having excess sample volume. *Hum. Reprod.* **5**: 1993-1996
- Yanagimachi, R. (1981) Mechanisms of fertilisation in mammals. In Mastroianni, L. and Biggers, J.D. (eds), *Fertilisation and Embryonic development in Vitro*. Plenum Press, New York, pp. 81-182
- Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974) Calcium dependent of the acrosome reaction and activations of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **89**: 161-174
- Yeung, C.H., Bals-Pratsch, M., Knuth, U.A. and Nieschlag, E. (1988) Investigation of the cause of the low sperm motility in asthenozoospermic patients by multiple quantitative tests. *Int. J. Androl.* **11**: 289-299
- Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (1994) Study of the role of epididymal α -Glucosidase in the fertility of male rats by the administration of the enzyme inhibitor castanospermine. *J. Reprod. Fertil.* **102**: 401-410
- Yeung, C.H., Cooper, T.G., Oberpenning, H., Schulze, H., and Nieschlag, E. (1993) Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol. Reprod.* **49**: 274-280
- Yeung, C.H., Cooper, T.G. and Senge, T. (1990) Histochemical localisation and quantification of α -glucosidase in the epididymis of men and laboratory animals. *Biol. Reprod.* **42**: 669-676
- Yeung, C.H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E. and Cooper, T.G. (1994) Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.* **50**: 917-926
- Yeung, C.H., Oberländer, G. and Cooper T.G. (1992) Characterisation of the motility of rat spermatozoa by computer-aided objective measurement. *J. Reprod. Fertil.* **96**: 427-441
- Yoshinaga, T. (1974) Modified method of demonstration for zinc tissues and its mode of existence. *Acta histochem.* **50**: 273-277
- Yuan, Y.Y., Shi, Q.X. and Srivastava, P.N. (1995) Inhibition of rabbit sperm acrosomal enzymes by gossypol. *Mol. Reprod. Dev.* **40**: 228-232
- Zeitz, L. and Lee, R. (1966) Zinc analysis in biological specimens by x-ray fluorescence. *Anal. Biochem.* **14**: 191-204
- Zamboni, L. (1992) Sperm structure and its relevance to infertility. *Archs Pathol.* **116**: 325-343

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank für das Gelingen dieser Arbeit gilt:

- Herrn Professor Dr. Dr. med. habil. Schill, geschäftsführender Direktor des Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen, für seine Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, sowie für die Nutzung seiner Laboratorien, technischen Geräte und für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien.
- Herrn Privatdozenten Priv. Doz. Dr. Henkel, für die Vergabe des Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung in allen sich stellenden Fragen und Problemen, für ein immer offenes Ohr, sowie für das freundschaftliche, konstruktive Arbeitsverhältnis.
- Herrn Dr. Miska, für die freundliche Mithilfe und Unterstützung.
- Herrn Dr. Bittner, für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema.
- Herrn Dr. Hüther und Herrn Dr. Weber vom Fachbereich Physikalische Chemie – Kernchemie- der Phillips-Universität, Marburg, für das Bereitstellen und die Einarbeitung in die Atomabsorptionsspektometrie sowie für die immer freundliche Unterstützung bei auftretenden Problemen.
- Den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Informatik der JLU, Gießen, für die Hilfestellung und Beratung in statistischen Fragen.
- allen Mitarbeitern im andrologischen Forschungslabor, besonders Frau Anette Hanschke, für Ihre Hilfe und Unterstützung. Einen besonders herzlichen Dank dafür, daß mir durch das kameradschaftlich, kollegiale Arbeitsklima der Weg zu meinem Ziel sehr viel Freude bereitet hat.
- meiner liebsten Claudia, für Ihre liebevolle Unterstützung und Ihre manchmal stark strapazierten Nerven.
- Nicht zuletzt meinen Eltern, Petra und Klaus, für Ihren Glauben an mich, sowie für Ihre geistige und materielle Unterstützung.

8. Lebenslauf

Zur Person:

Name : Wroblewski
Vorname : Nicolai
Geburtsdatum : 20.10.1970
Geburtsort : Gießen, Deutschland
Anschrift : Friedhofsweg 4
35452 Heuchelheim
Telefon : 0641/61126
Vater: Klaus Wroblewski, Studiendirektor
Mutter: Petra Wroblewski, Fachärztin für
Allgemeinmedizin

Schulischer Werdegang :

1977-1981 Grundschule Gießen-West
1981-1986 Herderschule Gießen
1986-1990 Ricarda-Huch-Schule, Gießen
Aug. - Dez. 1987 Canyon High School, New Braunfels, Texas, USA
13.6.1990 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1.8.1990-31.3.1992 Mobiler Sozialer Hilfsdienst Gießen e.V.

Hochschulausbildung:

15.4.1992 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
8.9.1994 Ärztliche Vorprüfung
29.8.1995 Erster Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
2.4.1998 Zweiter Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
24.4.1999 Abschluß des Studiums der Humanmedizin

Beruflicher Werdegang:

1.8.1999 Arzt im Praktikum und Arzt am Zentrum für
Dermatologie und Andrologie der JLU-Gießen