

**Der Stellenwert und die Bedeutung der andrologischen Diagnostik für die  
Prognose der assistierten Reproduktion**

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

vorgelegt von Gesa Schalk, geb. Maaß  
aus Siegen

Gießen 2011

Aus dem Institut für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des  
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,  
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

1. Gutachter und Betreuer: Prof. Dr. med. Hans-Christian Schuppe
  2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Hinsch
- Tag der Disputation: 10.06.2011

**Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

Henkel, R., Maaß, G., Bödeker, R.-H., Scheibelhut, C., Stalf, T., Mehnert, C., Schuppe, H.-C., Jung, A., Schill, W.-B. (2005). Sperm function and assisted reproduction technology. *Reprod Med Biol* 4, 7-30.

Henkel, R., Maaß, G., Bödeker, R.-H., Scheibelhut, C., Stalf, T., Jung, A., Gips, H., Schill, W.-B. (2002). Do sperm function tests contribute to fertility prognosis? Invited lecture at the 14th Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, 05.-07.09.2002, Jena, Germany.

Henkel, R., Maaß, G., Bödeker, R.-H., Scheibelhut, C., Stalf, T., Jung, A., Mehnert, C., Schill, W.-B. (2002). Impact of different sperm functions on fertilization and pregnancy. Invited lecture at the First Asia-Pacific Forum on Andrology, 17.-21.10.2002, Shanghai, China.

**Weitere Publikationen i. R. des Dissertationsprojektes:**

Henkel, R., Maaß, G., Hajimohammad, M., Menkveld, R., Stalf, T., Villegas, J., Sánchez, R., Kruger, T.F., Schill, W.-B. (2003). Urogenital inflammation: Changes of leukocytes and ROS. *Andrologia* 35, 309-313.

Henkel, R., Maaß, G., Schuppe, H.-C., Jung, A., Schubert, J., Schill, W.-B. (2005). Molecular aspects of declining sperm motility in older men. *Fertil Steril* 84, 1430-1437.

Henkel, R., Maaß, G., Schuppe, H.-C., Jung, A., Schubert, J., Schill, W.-B. (2006). Seasonal changes of neutral  $\alpha$ -glucosidase activity in human semen. *J Androl* 27, 34-39.

Henkel, R., Maaß, G., Jung, A., Haidl, G., Schill, W.-B., Schuppe, H.-C. (2007). Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 9, 299-304.

Henkel, R., Maaß, G., Hajimohammad, M., Menkveld, R., Stalf, T., Villegas, J., Sánchez, R., Kruger, T.F., Schill, W.-B. (2002). Urogenital inflammation: Changes of leukocytes and ROS. Invited lecture at the Joint Meeting of the European Society of Andrological Urology and the European Society of Infection in Urology, 13.-14.09.2002, Giessen, Germany.

Henkel, R., Maaß, G., Schuppe, H.-C., Jung, A., Schubert, J., Schill, W.-B. (2005). High flagellar zinc concentration is responsible for decreased sperm motility in ageing men (Abstract). *Int J Androl* 28, 78.

# INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	8
1.1. Fertilität - ein historischer Überblick	8
1.2. Ethische Aspekte	12
1.3. Das menschliche Spermatozoon	12
1.3.1. Spermatogenese und Epididymalreifung	12
1.3.1.1. Chromatinkondensation	13
1.3.2. Bau der Spermatozoen	14
1.3.2.1. Spermatozoenkopf	15
1.3.2.2. Flagellum	15
1.4. Fertilisationsprozess	16
1.4.1. Transport und Motilität der Spermatozoen	17
1.4.2. Cumulus oophorus und Corona radiata	18
1.4.3. Kapazitation	19
1.4.4. Akrosomreaktion	20
1.4.5. Zona pellucida	22
1.4.6. Akrosin	23
1.5. Spermien-Eizell-Verschmelzung, frühe Embryonalzeit	23
1.6. Assistierte Reproduktion	24
1.6.1. Die In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer (IVF/ET)	25
1.6.2. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)	25
2. ZIEL DER ARBEIT	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1. Angaben zu den verwendeten Substanzen	28
3.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	29
3.3. Dokumentation andrologischer Befunde und Diagnostik	31
3.4. Klassische Ejakulatparameter	31
3.4.1. Spermienkonzentration	31
3.4.2. Motilität	32

3.4.3.	Morphologie	32
3.4.4.	Vitalität	33
3.5.	Spermatozoenfunktions tests	34
3.5.1.	Akrosomale Reaktion	34
3.5.2.	Akrosinaktivität	35
3.5.3.	Chromatinkondensation	37
3.6.	Assistierte Fertilisation	38
3.6.1.	Punktion	38
3.6.2.	Spermienaufbereitungsmethoden	39
3.6.2.1.	Swim-Up	39
3.6.2.2.	Glaswollfiltration und Swim-Up	40
3.6.2.3.	Die Dichtegradienten-Zentrifugation	40
3.6.2.3.1.	Die 1-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation	41
3.6.2.3.2.	Die 2-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation	41
3.6.2.4.	Die Migrations-Sedimentation	41
3.6.3.	IVF	42
3.6.3.1.	Standard-Methode	42
3.6.3.2.	Insemination im Mikrotropfen	42
3.6.4.	ICSI	43
3.6.5.	Pronukleus-Kontrolle	44
3.6.5.1.	Pronukleus-Kontrolle bei IVF	44
3.6.5.2.	Pronukleus-Kontrolle bei ICSI	44
3.6.6.	Embryokontrolle und –transfer	44
3.7.	Statistische Auswertung	45
3.7.1.	Deskriptive Auwertung	45
3.7.2.	Univariate Analyse: Einfluss männlicher Keimzellfunktionen auf Ergebnisse der assistierten Fertilisation	45
3.7.3.	Multivariate Analyse: Modellerstellung und Wertigkeitsüberprüfung der einzelnen Faktoren	46
3.7.4.	Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen	46
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Deskriptive Statistik	48

4.1.1.	Männliche Keimzellfunktion und IVF-Programm	48
4.1.2.	Männliche Keimzellfunktion und ICSI-Programm	49
4.2.	Univariate Analyse: Einfluss männlicher Keimzellfunktionen auf Ergebnisse der assistierten Fertilisation	51
4.2.1.	Einflussfaktoren männlicher Keimzellfunktionen auf die IVF	51
4.2.2.	Einflussfaktoren männlicher Keimzellfunktionen auf die ICSI	58
4.3.	Multivariate Analyse: Modellerstellung und Wertigkeitsüberprüfung der einzelnen Faktoren	62
4.3.1.	IVF	63
4.3.1.1.	Modell Fertilisationsrate	63
4.3.1.2.	Modell Schwangerschaft	64
4.3.1.3.	Modell Embryoscore	65
4.3.2.	ICSI	65
4.3.2.1.	Modell Fertilisationsrate	65
4.3.2.2.	Modell Schwangerschaft	66
4.3.2.3.	Modell Embryoscore	67
4.4.	Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen	68
4.4.1.	Deskriptive Statistik	68
4.4.2.	Spermienkonzentration, Morphologie, Gesamt- und Progressivmotilität	73
4.4.3.	Akrosomale Reaktion	75
4.4.4.	Akrosinaktivität	78
5.	DISKUSSION	81
5.1.	IVF	81
5.1.1.	Spermienkonzentration	82
5.1.2.	Motilität	83
5.1.3.	Morphologie	85
5.1.4.	Vitalität	89
5.1.5.	Akrosomale Reaktion	90
5.1.6.	Akrosinaktivität	92
5.1.7.	Chromatinkondensation	94
5.1.8.	Weitere Einflussgrößen	96

5.1.9.	Separationstechniken	96
5.1.10.	Modellerstellung und Gesamtbetrachtung	97
5.2.	ICSI	98
5.2.1.	Klassisches Spermogramm	99
5.2.2.	Spermienkonzentration	100
5.2.3.	Motilität	101
5.2.4.	Morphologie	102
5.2.5.	Vitalität	104
5.2.6.	Akrosomale Reaktion	105
5.2.7.	Akrosinaktivität	106
5.2.8.	Chromatinkondensation	106
5.2.9.	Weitere Einflussgrößen	107
5.2.10.	Modellerstellung und Gesamtbetrachtung	108
5.3.	Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen	109
6.	ZUSAMMENFASSUNG	113
7.	SUMMARY	116
8.	LITERATURVERZEICHNIS	118
9.	ABKÜRZUNGEN	170
10.	ERKLÄRUNG	173
11.	DANKSAGUNG	174

## **1. EINLEITUNG**

Diese Arbeit beschäftigt sich zum einen mit dem Zusammenhang zwischen männlichen Fertilitätsmerkmalen und Parametern der assistierten Reproduktion sowie mit der Erstellung sinnvoller Modelle zur Prognoseerstellung für die assistierte Fertilisation. Zum anderen wird der Einfluss des Faktors Zeit auf das Prognosepotential der Ejakulatqualität einschließlich verschiedener Spermatozoenfunktionsparameter untersucht, und die Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen in der andrologischen Diagnostik überprüft.

Im Folgenden wird vorab ein Überblick über die historischen, rechtlichen und biologischen Grundlagen gegeben:

### **1.1. Fertilität - ein historischer Überblick**

Fertilität ist per definitionem die von einer Population tatsächlich geleistete Produktion von Nachwuchs. In vielen Kulturen sind Fruchtbarkeit und Fortpflanzung Gegenstand religiöser Verehrung. Der Fruchtbarkeitszauber ist ein bei Naturvölkern weit verbreitetes Bemühen, mit magischen und rituellen Mitteln der Vermehrung von Mensch und Tier zu dienen. Dabei spielen in der Zauberhandlung Früchte, Teile von Mensch oder Tier sowie das Nachahmen von Tieren eine Rolle, denen man die Kraft von Fruchtbarkeit zuschreibt. Der Phallus, das erigierte Glied des Mannes, gilt als Zeichen besonderer Kraft und der Fruchtbarkeit, so in den Kulturen des Dionysos, der Demeter, des Osiris und als Linga im Kult der Schiwa. Auch im Alten Testament finden sich noch Spuren der einstigen Heiligkeit des Phallus, etwa beim Eidschwur (1. Moses 24,2): „Da sagte Abraham zu dem ältesten seiner Knechte im Hause, der seinen gesamten Besitz verwaltete: Lege Deine Hand unter meine Hüfte (das war die Gebärde des Schwures), ich will dir bei dem Herrn, dem Gott des Himmels und der Erde, einen Eid abnehmen. ...“. Dagegen stellen auf weiblicher Seite Felsspalten als Bildnis des weiblichen Genitales oder vielbrüstige Göttinnen (z.B. Artemis) als Sinnbild weiblicher Schöpfungskraft Gegenstände der Verehrung dar.

Der griechische Philosoph Anaxagoras (500 - 428 v. Chr.), entwickelte die Präformationstheorie, nach der ein Embryo bereits im Sperma vorgeformt wäre und sich in der Gebärmutter der Frau nur fertig entwickeln würde. Selbst die Bestimmung des Geschlechts war dabei bereits festgelegt. Man glaubte, dass Sperma des rechten Hodens

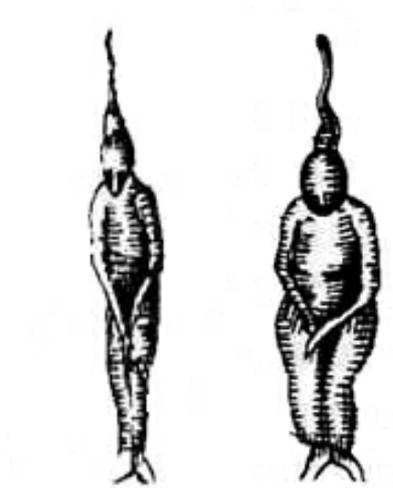
männliche, solches des linken Hodens weibliche Nachkommen hervorbringe. Bei Aristoteles wurde der männliche Samen mit der Schwimmprobe untersucht, dabei zerfloss der kranke Samen an der Wasseroberfläche und gesunder Samen sank auf den Boden (Maischein, 1976). Die Vorstellungen der Antike beeinflussten bis ins Mittelalter die Ansichten über Fertilität beim Menschen. Der Arzt und Naturforscher Paracelsus (1493 - 1541) vertrat die Auffassung, je eine Hälfte des Samens stamme von der Frau und vom Mann. Mit dieser These widersprach er den traditionellen medizinischen Autoritäten Aristoteles, Galen und Avizenna.

Erst die Erfindung des Mikroskops durch den Holländer Janssen 1590 stellte das nötige Werkzeug, um die am Befruchtungsvorgang beteiligten Strukturen genauer zu beschreiben. Gardinius vermutete 1623 „fertilisierende Partikel“ in der Samenflüssigkeit. Doch tiefer gehende Erkenntnisse über den Vorgang der Fertilisation gab es bis vor mehr als 300 Jahren noch nicht. Der niederländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek (1632 - 1723) erkannte dann die Existenz von „kleinen Tierchen“ im Wasser. Im Jahr 1677 konnte er so die Anwesenheit dieser „Animalcula“ in der Samenflüssigkeit von Fischen und Amphibien nachweisen (Dobell, 1958). Strittig war in der Folge, ob die „Samentierchen“ auf den Fertilisationsprozess überhaupt Einfluss hatten oder ob die „Homunkula“ nicht sogar Menschen in Miniaturform darstellten, wofür sie gerade im 17. und 18. Jahrhundert viele Forscher hielten. In Abbildung 1 sind zwei dieser kleinen präformierten „Menschlein“ dargestellt, wie sie A. van Leeuwenhoek sah. Die Nabelschnur wurde im Spermischwanz vermutet.

Dem holländischen Anatomen Reiniers de Graaf gelang 1672 die Beschreibung von Eibläschen (Follikel) im Ovar. Als Erster beschrieb der Königsberger Zoologe Carl Ernst von Baer die Säugetiereizelle und prägte 1827 den Begriff „Spermatozoon“. Die Frage nach der Interaktion männlicher und weiblicher Keimzellen beim Fertilisationsvorgang blieb jedoch noch länger ungeklärt. 1840 gelang dies einem der Begründer der Zellphysiologie, dem Schweizer Anatom Rudolf Albert von Kölliker (1817 - 1905), der durch die Untersuchung von Seeigeln bei der Befruchtung die direkte Kontaktaufnahme zwischen Eizelle und Spermatozoon postulierte.

Der Anatom und Biologe Oscar Hertwig (1849 - 1922) konnte 1875 – wiederum an Seeigeln – die Fusion der Zellkerne von Eizelle und Spermatozoon beobachten. Er beschrieb außerdem 1890 die Chromosomenreduktion bei der Reifeteilung und erkannte (mit Anderen) den Zellkern als Träger der Vererbung. Besonders seit der

Jahrhundertwende erfolgte vermehrt die Erforschung der anatomischen, physiologischen und biochemischen Zusammenhänge des Fertilisationsprozesses. Die Erfindung des Elektronenmikroskops in den 30er Jahren ermöglichte schließlich die Untersuchung selbst feinsten Strukturen und Formen.



*Abbildung 1: „Homunkula“, Darstellung aus dem 17. Jahrhundert (aus Ombet et al. (1995) Hum Reprod Update 1, 543-557).*

Schon Goethe beschäftigte sich mit der Vision vom künstlichen Menschen und beschreibt in seiner Faust-Legende die Schöpfung eines Homunculus im Reagenzglas und gibt erste Kochrezepte für die In-vitro Fertilisation. Im Jahre 1878 berichtete der Wiener S.L. Schenk von der künstlichen, extrakorporalen Fertilisation einer Säugetiereizelle auf einem Stück Uterusschleimhaut. So konnte er Kernveränderungen und auch die Bildung des ersten Polkörperchens beobachten.

Der erste erfolgreiche Embryotransfer gelang 1902: Walter Heape aus England entnahm einem Angora-Kaninchen Embryonen und übertrug sie in den Eileiter eines bereits zuvor begatteten anderen Kaninchens. Die erste In-vitro Fertilisation einer menschlichen Eizelle erfolgte 1944 (Hertig et al., 1956): J. Rock und M. F. Menkin fügten zu den von einer Patientin entnommenen Eizellen Spermien hinzu, die zuvor durch Zentrifugation gereinigt und in eine Suspension gebracht worden waren. Im Anschluss wurden die Eizellen bei Körpertemperatur im Serum der Patientin kultiviert. Die erfolgreiche Kultivierung von 4 Eizellen zu 2- bzw. 3-Zellern gab Anlass zur Hoffnung in der Therapie von infertilen Paaren. Allerdings gelang erst den Engländern Patrick Steptoe und Robert Edwards am 25.7.1978 der Durchbruch in dieser

Entwicklung: Louise Brown, das erste in vitro gezeugte Kind wurde geboren (Stephoe & Edwards, 1978; Edwards et al., 1980). Die erste intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI) durch den italienischen Wissenschaftler Palermo bedeutete 1992 einen weiteren Fortschritt in der Reproduktionsmedizin (Palermo et. al., 1992); sie stellte somit einen weiteren Meilenstein in der Therapie von Fertilitätsstörungen dar (Tarin, 1995). In Einzelfällen wurden Schwangerschaften nach Mikroinjektion von frühen Rundspermatiden (ROSI) und frühen elongierten Spermatiden (ELSI) berichtet (Tesarik & Mendoza, 1996; Tesarik et al., 1996), die Daten jedoch sehr kontrovers diskutiert und zugunsten von derzeit noch präklinischen Versuchen zur In-vitro-Maturation von Spermatozoen nicht weiter verfolgt.

## **1.2. Ethische Aspekte**

Die großen Erfolge der letzten Jahre, sowohl die tieferen Erkenntnisse der pathophysiologischen Zusammenhänge, als auch die Weiterentwicklung und Konsolidierung verschiedenster Methoden in der Reproduktionsmedizin, geben Anlass zur Hoffnung, stellen jedoch auch eine mögliche Gefahr dar. Bei Forschung in der Medizin muss der verantwortungsvolle Umgang mit menschlichem Leben an erster Stelle stehen. Das Embryonenschutzgesetz von 1990 sollte bestehende Errungenschaften in einem gesellschaftlich-ethischen, aber auch gesetzlichen Gesamtrahmen festigen. Diese Bemühungen setzen in den letzten Jahren die Bundesregierung, der Deutsche Ethikrat und die Bundesärztekammer im Hinblick auf ein zukünftiges Reproduktionsgesetz fort (Wagenitz, 2006; Bockenheimer-Lucius et al., 2008). Auch Geithövel et al. setzen sich intensiv mit dem Thema in verschiedenen Diskussionsbeiträgen auseinander (Geithövel et al., 2004a; Geithövel et al., 2004b).

## **1.3. Das menschliche Spermatozoon**

### **1.3.1. Spermatogenese und Epididymalreifung**

Der Vorgang der männlichen Keimzellentwicklung von den Spermatogonien zu den Spermatozoen, die Spermatogenese, findet in den Tubuli seminiferi statt. Die Spermatogonien sind an der Basalmembran der Tubuli zu finden. Zu unterscheiden sind nach Färbung die Spermatogonien Typ A pale, A dark und B. Nach mitotischer Teilung der Spermatogonien B entstehen die Spermatozyten I. Ordnung. Die Spermatozyten vollziehen die meiotische Teilung und setzen so den diploiden Chromosomensatz herab.

Aus einer Spermatozyte I ( $2n\ 4C$ ) entstehen zwei Spermatozyten II. Ordnung mit je einem haploiden Chromosomensatz mit 22 Autosomen und einem Geschlechtschromosom ( $1n\ 2C$ ) (Bergmann, 2006).

Danach findet eine sehr schnelle Reifeteilung statt, aus einer Spermatozyte II entstehen (am meisten lumenwärts) zwei Spermatiden; sie weisen 22 Autosomen, das Geschlechtschromosom und eine Chromatide auf ( $1n\ 1C$ ).

Als letzten Abschnitt der Spermatogenese durchlaufen die Spermatiden die Spermiogenese mit folgenden wesentlichen Punkten:

1. Kernkondensation
2. Akrosombildung aus dem Golgi-Apparat der Spermatiden
3. Elongation und Geißelbildung

Der Vorgang der Spermatogenese von der Spermatogonie bis zur Spermiation, d.h. der Freisetzung der Spermatozoen in das Tubuluslumen dauert etwa 74 Tage.

Vom Lumen der Samenkanälchen werden die Spermatozoen über das Rete testis zum Nebenhoden transportiert. Während dieser zwischen 12 und 16 Tagen dauernden Nebenhodenpassage finden weitere Reifungsprozesse statt (Amann, 1987; Bedford, 1990; Eddy & O'Brien, 1994), in der sie sich zu befruchtungskompetenten Spermatozoen entwickeln (Hinrichsen-Kohane et al., 1984). Unter anderem erwirbt das Spermatozoon in der Cauda epididymis die Fähigkeit zur Progressivmotilität und es kommt zur Optimierung der Koordination der Flagellumbewegung (Cooper, 1990). Im Nebenhoden erhalten die Spermien zudem Dekapazitationsfaktoren, die eine „Ruhigstellung“ der für die spätere Kapazitation notwendigen Membranmoleküle bewirken (s.u.). In der Cauda epididymidis schließlich werden die reifen Keimzellen eingelagert und bei ausbleibender Ejakulation wieder resorbiert.

#### **1.3.1.1. Chromatinkondensation**

Die Verdichtung des Chromatins (Kondensation) erfolgt in mehreren Schritten. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Fertilisation. *Kondensation* bedeutet, dass während der Spermiogenese und Samenzellreifung lysinreiche Histone gegen speziesspezifische Protamine ersetzt werden (Bedford, 1994). Zum einen stellt dieser Vorgang eine strukturelle Stabilisierung und damit gute Verpackung für den Transport dar. Zum anderen ist die Kondensation unerlässlich für die später stattfindende Dekondensation. Die Dekondensation des Chromatins wiederum muss nach vollzogener

Penetration der Eizelle bei der Vorkernbildung vollzogen werden (Haidl & Schill, 1994). Eine schlechte Verpackung und ein möglicher DNA-Schaden sind mitverantwortlich für mangelhafte Dekondensation und konsekutiv erfolglose Fertilisation (Sakkas et al., 1996) oder habituelle Aborte (Ibrahim et al., 1988). Henkel et al. (2001) konnten eine jahreszeitliche Rhythmik der Chromatinkondensation nachweisen.

Die histonreichen Nuklei unreifer Spermatozoen enthalten viel Lysin und nehmen deshalb Anilin-Blau auf. Die protaminreichen Nuklei reifer Spermatozoen enthalten viel Arginin und Cystein und relativ wenig Lysin und bleiben deshalb ungefärbt (Calvin, 1976; Gusse et al., 1986). So kann anhand der Anilinblau-Färbung auf den Differenzierungsgrad der Spermatozoen geschlossen werden. Evenson et al. (1980) berichten von einem reduzierten Anteil ungefärbter Spermatozoenköpfe bei primär infertilen Patienten.

### 1.3.2. Bau der Spermatozoen

Das menschliche Spermatozoon besteht bei einer Länge von ca. 60 µm aus zwei morphologisch und funktionell unterscheidbaren Regionen, Spermatozoonkopf und Flagellum. Abbildung 2 veranschaulicht den Aufbau eines menschlichen Spermatozoons schematisch:

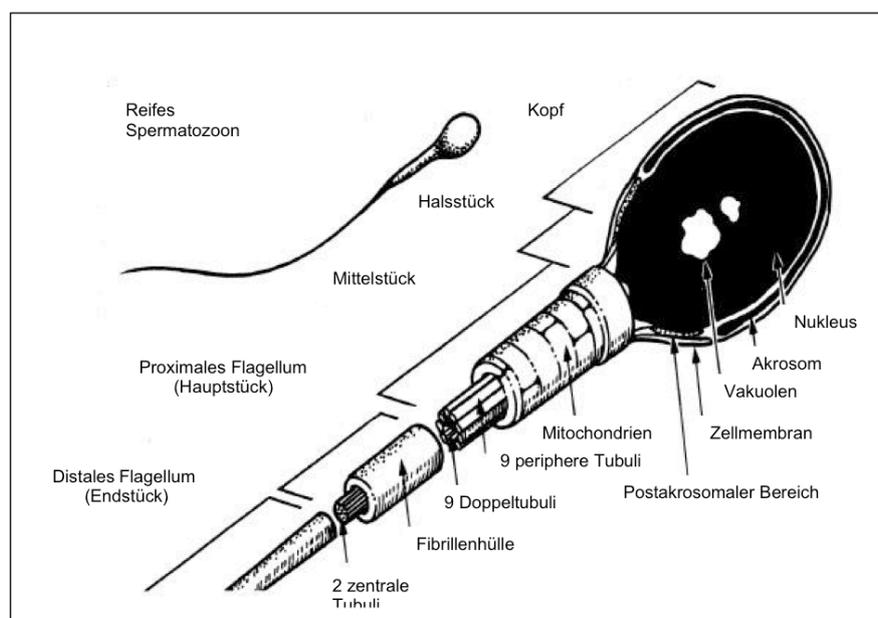


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines menschlichen Spermatozoons (nach Acosta & Kruger, 1996).

### 1.3.2.1. Spermatozoenkopf

Der Kopf des Spermiums enthält mit dem Zellkern das Erbmateriale und mit dem Akrosom eine grundlegende Struktur für Kapazitation und Befruchtungsvorgang. Er hat beim Menschen eine längsovale Form und ist 4,0 - 5,5  $\mu\text{m}$  lang und 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$  breit. Das Akrosom (griech. *akron* die Spitze, der Gipfel; *soma* der Körper) ist ein membrangebundenes Organell, das sich vom Golgi-Apparat ableitet. Es liegt an der Spitze des Kopfes und bedeckt diesen haubenförmig zu etwa zwei Dritteln (Leblond & Clermont, 1952; Fawcett, 1975; Bellve & O'Brian, 1983).

Das Akrosom kann in folgende Abschnitte unterteilt werden:

1. Der Kernmembran aufliegend, die *innere akrosomale Membran*
2. Als äußere Begrenzung unterhalb der Plasmamembran liegend, die *äußere akrosomale Membran*
3. Der Raum zwischen innerer und äußerer akrosomaler Membran, die *akrosomale Matrix*

### 1.3.2.2. Flagellum

Beim Menschen hat das Flagellum eine Länge von ca. 50 - 60  $\mu\text{m}$  und ist morphologisch in die vier Abschnitte Halsstück (ca. 1  $\mu\text{m}$ ), Mittelstück (ca. 6  $\mu\text{m}$ ), Hauptstück (ca. 45  $\mu\text{m}$ ) und Endstück (ca. 5  $\mu\text{m}$ ) differenzierbar (Cummins & Woodall, 1985).

Das Halsstück ist mit dem Kopf durch die Basalplatte verbunden. Das Mittelstück des Spermiums ist von durch 12 Windungen spiralg angeordneten Mitochondrien umgeben, die besonders bedeutsam für die Spermienmotilität sind (Van Deurs & Lastein, 1973). So kann auch aerob Energie bereitgestellt werden.

Im Querschnitt des Spermischwanzes ist elektronenmikroskopisch der charakteristische Aufbau einer Geißel mit zentral gelegenem Axonem zu sehen: Das „9+2-Muster“ ist erkennbar, eine charakteristische Anordnung der Tubuli des Axonems. Neun kreisförmig angeordnete doppelte Mikrotubuli, die untereinander durch Nexin und mit dem zentralen Mikrotubulipaar durch Radialspeichen verbunden sind, bilden das Axonem. Triebfeder der Flagellarbewegung sind äußere und innere Dyneinarme, die aus jedem Duplett, bestehend aus A- und B- Subtubulus, hervorgehen (Gibbons, 1981). Mittels ATPase wird ATP als chemische Energie aktiviert und erreicht durch eine Konformationsänderung der Dyneinarme eine Gleitbewegung der Dupletts in eine

Richtung und erfährt so eine Umwandlung kinetische Energie. Über diesen Auf- und Abbau kommt es zu einer Verschiebung der Tubuli gegeneinander und bei raschem Ablauf der Reaktion zur charakteristischen Geißelbewegung.

Die so genannten Mantelfasern finden sich über eine Länge von etwa 60 % des Flagellums, beginnend am Übergang von Hals- zu Mittelstück und endend im Hauptstück (Serres et al., 1983; Cummins & Woodall, 1985; Dadoune, 1988; Haidl & Becker, 1991).

Diese passiv-elastischen, nicht kontraktile Strukturen (Phillips, 1972; Stalf et al., 1993; Henkel et al., 1994b) erfüllen verschiedene Funktionen: Zum einen stellen sie einen Schutz vor Abknicken des Flagellums während der Ejakulation dar, das hierbei nicht geringen Scherkräften ausgesetzt ist (Baltz et al., 1990). Zum anderen sind die Mantelfasern an Mechanismen zur Steigerung der Energieausnutzung beteiligt, die vor allem zur Optimierung der Spermienmotilität benötigt wird (Lindemann, 1996; Lindemann & Kanous, 1997; Henkel et al., 2003).

In der modernen Fortpflanzungsmedizin besteht Einigkeit darüber, dass die Spermatozoenmorphologie eng mit dem Fertilisierungspotential korreliert. Sowohl normale als auch pathomorphe Formen sind in einer Ejakulatprobe zu finden (Hotchkiss, 1945; Joel, 1971; Ombelet et al., 1995). Es existieren verschiedene Techniken und/oder Klassifizierungen der Spermatozoenmorphologie. Bezüglich der in-vitro Fertilisation wird die Morphologie von vielen Quellen als positiv prädiktiv bezeichnet. Dies wird sowohl für die strikten Tygerberg-Kriterien (Kruger et al., 1988a; Grow et al., 1994; Ombelet et al., 1994), die WHO-Kriterien (Host et al., 1999) als auch für die Düsseldorfer Klassifikation (Hofmann et al., 1995) beschrieben.

#### **1.4. Fertilisationsprozess**

Der Fertilisationsprozess ist von dem Aufbau und den Funktionen der Spermatozoen abhängig. Abbildung 3 stellt die verschiedenen Parameter der Spermatozoen dar:

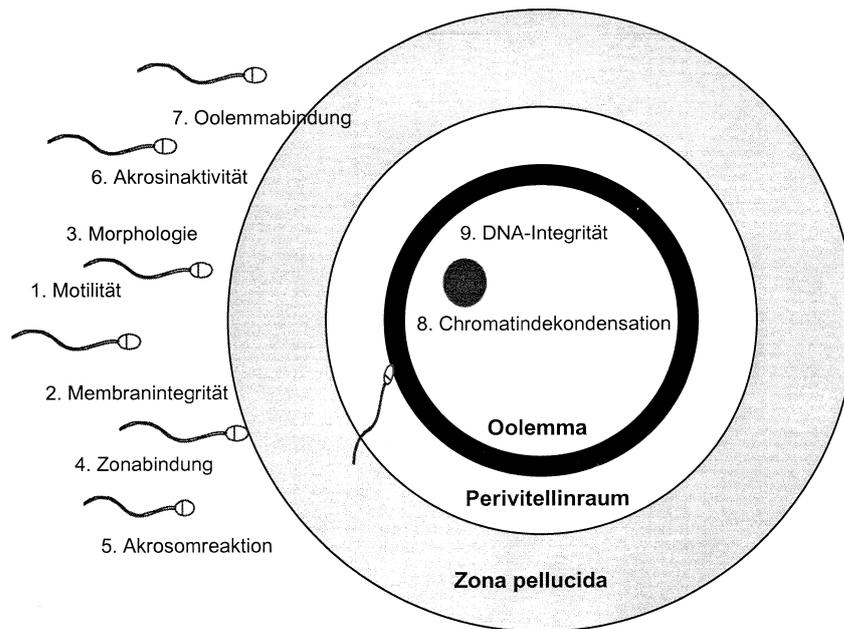


Abbildung 3: Schematische Darstellung funktioneller Parameter von Spermatozoen, die den Fertilisationsprozess beeinflussen (nach Henkel, 1998).

#### 1.4.1. Transport und Motilität der Spermatozoen

Die Motilität ist für die Spermatozoen wesentliche Voraussetzung, um zu den 12 - 15 cm entfernten Tuben zu gelangen, die Cumulus-Passage zu durchqueren und die Zona pellucida zu durchdringen. Nachdem die Keimzellen während der Spermatogenese und der epididymalen Reifungsphase die morphologischen und physiologischen Fähigkeiten zur Beweglichkeit und Befruchtung erhalten haben, treffen sie zum Zeitpunkt der Ejakulation auf das Seminalplasma. Durch enzymatische Spaltung der gelbildenden Eiweiße Semiglobin I und II sorgt das Seminalplasma für die progressive Motilität der Spermatozoen. Die Spermatozoen erhalten zudem aus den Bläschendrüsen und der Prostata dekapazitierende Faktoren, die eine Umhüllung der Plasmamembran bewirken. Die akrosomale Reaktion wird so durch das Seminalplasma gehemmt und die Motilität induziert. Die „sperm-coat“-Antigene bestehen aus Glykoproteinen, die das Akrosom stabilisieren und Akrosin hemmen, sowie anderen Oberflächenantigenen (Fraser et al., 1990).

Nach der Ejakulation müssen sich die Spermien bis in die Ampulle des Eileiters, dem Ort der Befruchtung, fortbewegen. Zunächst werden sie in der Vagina plaziert und dringen nach der Liquefizierung des Ejakulats bis in die Cervix vor. Außerhalb der Ovulationsphase sorgt der Mukus, den die zervikalen Krypten sezernieren, für

Undurchlässigkeit. Während dieser Phase unterstützen Glykoproteine des Mukus die Cervixpassage (Barratt & Cooke, 1991; Suarez & Pacey, 2006). Eine Beteiligung von Akrosin, einem spermatozoeneigenen Enzym, scheint ebenfalls über die Bildung von Kininen die Cervixmukuspassage zu erleichtern (Schill et al., 1979; Kaneko & Moriwaki, 1981; Schill & Miska, 1992).

Im Uterus findet dann der Transport in die Tuben vornehmlich passiv statt (Croxatto et al., 1978; Diaz et al., 1980; Suarez & Pacey, 2006). Durch Prostaglandine aus den Bläschendrüssen werden die Kontraktionen des Genitaltraktes zusätzlich angeregt. Es gilt hier ferner, anatomische und physiologische Barrieren wie den Uterus-Tuben-Winkel und den Zilienschlag des Tubenepithels zu bewältigen. Ist der Eileiter erreicht, hemmt die Tubenumgebung die Motilität der Spermatozoen, um sodann nach der Ovulation für eine neuerliche Zunahme der Beweglichkeit (Hyperaktivierung) zu sorgen (Suarez & Pacey, 2006). Nach neueren Befunden spielen Thermotaxis und Chemotaxis auch beim Menschen eine entscheidende Rolle bei zielgerichteter Bewegung der Spermatozoen zur befruchtungsbereiten Oocyte (Bahat et al., 2003; Eisenbach & Giojalas, 2006; Gakamsky et al., 2009; Teves et al., 2009).

In der Literatur wird der Zusammenhang zwischen Motilität und In-vitro-Fertilisation unterschiedlich beurteilt. Liu et al. konnten in mehreren Untersuchungen nur geringe Korrelationen der Keimzellbeweglichkeit mit dem IVF-Programm feststellen (Liu et al., 1987; 1988; 1989a; 1989b; Liu & Baker 1988; 1990). Es gibt jedoch einige Quellen, die von einem direkten Zusammenhang berichten (Ashkenazi et al., 1996; Duran et al., 1998; Obara et al., 2001).

#### **1.4.2. Cumulus oophorus und Corona radiata**

Am Ort der Fertilisation (in vivo in der Tuba uterina) haben die Spermatozoen noch mehrere Barrieren zu passieren, ehe sie auf die Oocyte treffen. Die beiden äußeren Schichten stellen der Cumulus oophorus und die Corona radiata dar, in denen auch eine beträchtliche Konzentration an Follikelflüssigkeit gefunden wird. (Die innerste Schicht ist die Zona pellucida (ZP) und wird später besprochen.) Diese Strukturen bilden Granulosazellen, die in einer viskös-elastischen, überwiegend aus Kohlenhydraten, Proteinen und Hyaluronsäure bestehenden extrazellulären Matrix liegen (Talbot, 1985; Dandekar et al., 1992). Nur kapazitierte Spermien können die wenige Minuten dauernde Cumulus-Passage durchqueren (Corselli & Talbot, 1987; Cummins & Yanagimachi,

1982; Barroso et al. 2009). Mehrere Enzyme der Spermienoberfläche wie beispielsweise die Hyaluronidase (auch im Akrosom enthalten) bewirken die Auflösung der beiden Hüllen, wobei die Corona einen dichteren Zellverband aufweist (Lin et al., 1994). Bei Durchquerung der beiden Schichten treffen die Spermatozoen auf eine Umgebung hoher hormoneller Konzentration, v.a. Progesteron wirkt hier induzierend auf Kapazitation und akrosomale Reaktion (Suarez et al., 1986; Blackmore et al., 1990; Miska et al., 1994; De Jonge 2005).

### **1.4.3. Kapazitation**

Die Kapazitation läuft über einen Zeitraum von einigen Stunden während der Wanderung der Spermien durch den weiblichen Geschlechtsstrakt ab und setzt ein, sobald die Spermien das Seminalplasma verlassen (Robertson et al., 1988; De Jonge 2005; Visconti, 2009). Dieser erste Schritt auf dem Weg zur Fusion des Spermiums mit der Oozyte ist essentiell für die Hyperaktivität der Spermien sowie die akrosomale Reaktion und stellt einen wichtigen Reifungsprozess der Spermienplasmamembran dar (Chang, 1951; Austin, 1952, 1985). Nur mit kapazitierten Spermatozoen kann eine Befruchtung stattfinden, auch bei Zusammenbringen beider Gameten *in vitro* (Yanagimachi, 1994; De Jonge 2005). Dabei wird der Mechanismus der Dekapazitation quasi umgekehrt, die inhibierenden Faktoren werden beseitigt durch Elimination oder Alteration der Dekapazitationsfaktoren, die mit der Zellmembran verbunden sind (Austin, 1960). Dieser Vorgang hat eine starke Membrandepolarisation zur Folge (Williams, 1972; Yanagimachi et al. 1973; Austin, 1975; Olson & Hamilton, 1978). Aus der Depolarisierung (Yanagimachi, 1974; Austin, 1975) und aus dem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Calcium-Ionen resultiert das Durchlaufen der akrosomalen Reaktion (AR) und die Hypermotilität der Spermatozoen (Bedford & Hoskins, 1990; Suarez, 2008). Die Spermien bewegen sich nicht mehr progressiv, sondern schlagen mit dem Kopf seitlich aus, weisen einen kräftigen Flagellenschlag auf und sind durch kurze nicht-lineare Bewegungsmuster gekennzeichnet (Burkman, 1990; Mbizvo et al., 1990). Die Aktivierung der Samenzellen unterstützt sie bei der Loslösung vom krypten- und faltenreichen Tubenepithel der isthmischen Region. Außerdem scheint dieser Bewegungsänderung ebenso beim Durchschwimmen der viskösen Tubenflüssigkeit wie auch bei der mechanischen Penetration des Cumulus-

Zellverbandes und der Zona pellucida eine Rolle zuzukommen (Bedford, 1983; Katz et al., 1993; Suarez & Pacey, 2006).

Die Modifikation der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und vor allem des Cholesterol:Phospholipid-Verhältnisses zuungunsten des Cholesterols ist bedeutsam für die Kapazitation, da sich Sterole sowie deren Sulfate in den Spermien und Sterolbindungsproteine in der Follikularflüssigkeit befinden. Diese werden während der Ovulation exprimiert (Ravnik et al., 1992). Die Alteration der Lipidzusammensetzung führt in der Folge zur Fluiditätssteigerung der Membran (Langlais & Roberts, 1985; Yanagimachi, 1994; Visconti et al., 1998).

Außerdem wird zum Kapazitationszeitpunkt Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) von den Spermatozoen sezerniert, was für die nun folgende Akrosomreaktion sowie der Zona-pellucida-Bindung von Bedeutung ist (Foresta et al., 1991; Köhn et al., 1995).

#### **1.4.4. Akrosomreaktion**

Die Bildung des Akrosoms, eines membrangebundenen Organells, findet während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat statt. Das Akrosom enthält zum überwiegenden Teil eine Anzahl hydrolytischer Enzyme wie Hyaluronidase, Akrosin, Glukuronidase und N-Acetyl-Glukosaminidase (Mack et al., 1983). Erst nach der Kapazitation sind Spermatozoen in der Lage, die Akrosomreaktion, einen exozytotischen und im Gegensatz zur Kapazitation nicht reversiblen Vorgang, durchzuführen (Saling et al., 1979; Seidel & Smith, 1986). Diese sollte im Regelfall nach Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle ausgelöst werden (Köhler et al., 1982; Barroso et al., 2009; Wassarman, 2009). Die akrosomale Reaktion (AR) stellt einen komplexen Vorgang dar, während dem es zur Freisetzung des akrosomalen Inhalts kommt. In der Folge von Kapazitation und physiologischem Stimulus kommt es zunächst zu Fusionen und Bildung von Hybridmembranvesikeln zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran und konsekutiv zur Perforation und Lyse größerer Akrosomabschnitte, akrosomale Inhaltsstoffe werden freigesetzt (Barros et al., 1967; Austin, 1975; Osman et al., 1989). Nicht inbegriffen in diesen Vorgang ist die äquatoriale Region, hier erfolgt eine Fusion von äußerer akrosomaler Membran mit der Plasmamembran und später wird sich hier der erste Spermien-Eizell-Kontakt vollziehen (Yanagimachi, 1994). Die innere akrosomale Membran stellt nun die freie vordere Spitze des Spermiums dar, hieran sind Akrosin-

und Proakrosinmoleküle eingangs fest geknüpft. Bei Penetration der Zona pellucida kann durch Aktivierung der Proteasen – insbesondere von Akrosin – diese durchdrungen werden (Tesarik et al., 1988; Barros et al., 1992, 1996; Moreno et al., 1998). Während dieses Vorgangs kommt es nicht nur zu den beschriebenen Veränderungen der Morphologie, sondern auch zu einem Funktionswandel. Spermatozoen können vor der akrosomalen Reaktion lediglich an die Zona pellucida (jedoch nicht an das Oolemma) und erst nach der akrosomalen Reaktion an das Oolemma (jedoch nicht mehr an die Zona) binden (Henkel et al., 1996; Barroso et al., 2009; Wassarman, 2009). So erklärt sich, dass lediglich akrosomreagierte Gameten die Zona erfolgreich penetrieren.

Die Signalübertragung bei der AR ist mittlerweile gut erforscht. So zeigten verschiedene Wissenschaftler (Harrison & Roldan, 1990; Rossato et al., 2001; Breitbart, 2002) als wichtigen Schritt den Calcium-Influx auf. „Second-messenger-pathways“ spielen ebenfalls eine Rolle, die z.B. durch Proteinkinasen und Guanylcyclase zu einer Erhöhung des Calcium-Spiegels führen (Zaneveld et al., 1991; Brucker & Lipford, 1995; Benoff, 1998; Jha et al., 2003).

Patienten mit gestörter oder fehlender Ausbildung des Akrosoms (und damit der Abwesenheit von Akrosin) sind sub- bzw. infertil (Schill et al., 1988; Schill, 1991). Rundkopfspermatozoen (= Globozoospermie) gelingt durch Fehlen des Akrosoms die Bindung und Durchdringung der Zona pellucida der Oozyte nicht (Schill et al., 1988; von Bernhardt et al., 1990; Dam et al., 2007). Bei Patienten mit Polyzoospermie und konsekutiv reduzierter Fertilität wurde nachgewiesen, dass ein großer Teil dieser Spermatozoen in vitro keine Akrosomreaktion zeigt (Töpfer-Petersen et al., 1987).

Bei der Frage nach Induktion der AR wurden in den letzten Jahren einige physiologische und nicht-physiologische Substanzen gefunden, die eine Induktion bewirken. Dabei zeigten sich als physiologische Induktoren u.a. Follikularflüssigkeit (Mukerjee & Lippes, 1972; Oliphant et al., 1977; Suarez et al., 1986; Miska et al., 1994), Serumalbumin (Cohen et al., 1982), Glykosaminoglykane (Handrow et al., 1982; Delgado et al., 1988), Glykoproteine der Zona pellucida (Bleil & Wassarman, 1983; Cross et al., 1988; Henkel et al., 1998a) und Progesteron (Osman et al., 1989; Blackmore et al., 1990; Morales et al., 1992; Fehl et al., 1995). Zu den nicht-physiologischen Induktoren auf chemischer Basis gehört beispielsweise Calcium-Ionophor A23187, mit dem Calcium die Zellmembran überwinden kann und so die AR

ausgelöst wird (Green, 1978; Jamil & White, 1981; Mortimer & Camenzind, 1989). Die Niedrigtemperatur (4°C) zählt zu den nicht-physiologischen Induktoren der AR auf physikalischer Basis (Mahi & Yanagimachi, 1973; Sánchez et al., 1991).

Es gibt unterschiedliche Aussagen zur Bedeutung der akrosomalen Reaktion für die IVF. Für White et al. (1990) gab es keinen Zusammenhang zwischen der AR und der Fertilisationrate normaler humaner Eizellen. Bei Smullen et al. (1992) und Pampiglione et al. (1993) bestand kein Zusammenhang zwischen spontaner bzw. induzierter Reaktion und IVF. Hingegen war die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei subfertilen Patienten signifikant reduziert oder fehlte vollkommen. Eine Reihe von Autoren diskutiert dies als eine Ursache der männlichen Subfertilität innerhalb der idiopathischen Sterilität (Cummins et al., 1991; Fenichel et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Henkel et al., 1993; Pampiglione et al., 1993).

#### **1.4.5. Zona pellucida**

Die Zona pellucida ist eine aus Glykoproteinen bestehende Membran, sie umgibt die Oozyte und wird von ihr gebildet. Die Zona pellucida fungiert als eine physiologische Barriere für die Spermatozoen bei der Fertilisation. Da auf molekularer Ebene die Basis zur Speziesspezifität liegt, stellt die Spermatozoen-Zona-Interaktion einen zentralen Schritt im Fertilisationsprozess dar (Swenson & Dunbar, 1982; Menkveld et al., 1991; Barroso et al., 2009). Charakteristischerweise ist die Zona pellucida beim Säuger im Wesentlichen aus drei Glykoproteinen aufgebaut, dies sind die Glykoproteine ZP1, ZP2 und ZP3 (Wassarman, 1987). Die azelluläre Matrix der Zona, die ihre Form beim Menschen vornehmlich aus dem ZP1 erhält (Greve & Wassarman, 1985), bindet über verschiedene Strukturen an einen „Zonarezeptor“ der Spermatozoenoberfläche und inhibiert gleichzeitig eine Polyspermie (Wolf, 1981; Sathananthan & Trounson, 1982). Besonders das Glykoprotein ZP3 scheint beim Menschen für die Bindung mit einigen Proteinen auf der Spermienoberfläche und Kohlenhydratgruppen innerhalb der Spermienmembran verantwortlich zu sein (Calvete et al., 1992) und löst zudem die Exozytose der AR aus (Kinloch & Wassarman, 1989; Miller et al., 1992). Als sekundärer Rezeptor fungiert ZP2 (Bleil & Wassarman, 1986), u.a. mit dem nicht-enzymatischen Anteil des Proakrosin.

#### **1.4.6. Akrosin**

Akrosin legt den Kanal für das penetrierende Spermium durch lokale Enzymreaktion frei (Urch et al., 1985a,b) und ist charakteristischerweise nur in Spermatozoen von Säugetieren vorzufinden (Stambaugh, 1978; Harrison et al., 1982; Hedrick et al., 1988; Zaneveld & De Jonge, 1991). Diese trypsinartige Serin-Protease unterstützt nicht nur die Zonabindung und -durchquerung (Rogers & Bentwood, 1982; Polakoski & Siegel, 1986; Töpfer-Petersen & Henschen, 1987; Tesarik et al., 1988a), sie scheint auch mitverantwortlich zu sein für die Überwindung des Cervixmucus, für die Kapazitation und für die Induktion der Akrosomreaktion (Marushige & Marushige, 1978; Meizel, 1985; Habenicht, 1987) und für den Ablauf der Chromatidekondensation während der Entstehung des männlichen Pronukleus (Habenicht, 1987; De Jonge et al., 1989; Nuzzo et al., 1990). Im Tierexperiment konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch Akrosin-Knock-out Mäuse fertilisieren, allerdings langsamer (Baba et al., 1994; Honda et al., 2002).

Klinisch gesehen scheint die Akrosinaktivität allerdings einen prädiktiven Charakter zu besitzen, was von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde (Liu & Baker, 1993; Sharma et al., 1993; Bartoov et al., 1994; Henkel et al., 1995).

#### **1.5. Spermien-Eizell-Verschmelzung, frühe Embryonalzeit**

Während der akrosomalen Reaktion kommt es neben den schon erwähnten Membranveränderungen auch zu zusätzlichen Proteinmodifikationen im äquatorialen und postakrosomalen Bereich des Spermatozoenkopfes. Dies ermöglicht in dieser Region die Fusion zwischen den Zellmembranen von männlicher und weiblicher Gamete (Rochweger et al., 1992). Sodann wird die Eizelle aktiviert, dies regt die Calciumfreisetzung an. Zuerst verursacht eine Membranveränderung durch Fusion kortikaler Granula die *vitelline Blockade gegen Polyspermie*, dann kommt es zur *zonalen Blockade gegen Polyspermie* durch die Exozytose dieser Granula, die die Glykoproteine ZP2 und ZP3 so verändern, dass eine Bindung an Spermien nicht mehr möglich ist (Wassarman, 1992).

Nach Aufnahme des Spermatozoons in die Eizelle findet die Kerndecondensation statt, die die Transkription der DNS erleichtert. Wie schon erwähnt, wurde während der Spermienreifung ein besonders hoher Grad an Kondensation erreicht, dies wird nun durch Lösen der Disulfidbrücken wieder rückgängig gemacht. In der Folge

dekondensiert der Spermienkopf und es formiert sich der männliche Vorkern. Gleichzeitig vollendet die Eizelle die zweite Reifeteilung unter Ausstoßung des zweiten Polkörperchens und es bildet sich aus dem haploiden Chromosomensatz der weibliche Vorkern.

Nach der Plasmogamie befinden sich beide Pronuklei nebeneinander in der Eizelle, jedoch noch ohne Karyogamie. Dieses sogenannte 2pn-Stadium ist deutliches Kennzeichen einer stattgehabten Fertilisation. Dann fusionieren der männliche und der weibliche Vorkern, die Chromosomen kondensieren innerhalb der Prophase der Syngamie und replizieren ihre DNS, dann lösen sich die Kernmembranen auf, die männlichen und weiblichen Chromosomen erscheinen und verschmelzen miteinander. Nach Beendigung der Gametenverschmelzung und Entstehung der Zygote ist die zelluläre Befruchtung vollzogen und es kommt zur ersten Furchungsteilung des neuen Individuums (Alberts et al., 1990).

#### **1.6. Assistierte Reproduktion**

Heutzutage existieren mehrere Möglichkeiten zur Behandlung der männlichen Infertilität, falls beim Mann zumindest in geringer Zahl Spermien im Ejakulat aufzufinden sind oder mittels operativer Verfahren aus Nebenhoden oder Hoden gewonnen werden können. Gerade die assistierte Reproduktion hat in den letzten Jahren zu mehr Kenntnissen über die Befruchtungskaskade beim Menschen geführt.

Die verschiedenen Techniken können in mehrere Gruppen geteilt werden (und stellen zum Teil logische Weiterentwicklungen der vorangegangenen Verfahren dar bzw. werden in Kombination verwendet):

1. Die Insemination mit Einbringen der Spermien in das innere Genitale der Frau; intrauterine Insemination (IUI)
2. Die In-vitro-Fertilisation mit extrakorporaler Befruchtung (IVF)
3. Die mikroassistierte Fertilisation mit Penetration der Hüllen der Oozyte; intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)
4. Die mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration (MESA)
5. Die testikuläre Spermienextraktion (TESE)

Im Folgenden sollen die Methoden, die bei dieser Arbeit untersucht wurden, genauer beleuchtet werden:

### **1.6.1. Die In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer (IVF/ET)**

Bei der IVF werden extrakorporal motile Spermatozoen mit einer oder mehreren in Kulturmedium befindlichen Eizellen zusammengebracht und befruchtet. Zuvor werden folgende Schritte vollzogen: Die Spermien werden vom Seminalplasma getrennt, um motile, befruchtungskompetente Spermien zu isolieren und die Kapazitation auszulösen. Die aufbereiteten Keimzellen werden in ein Kulturmedium mit Serum oder Albumin eingebracht. Eine mechanische oder chemische Lyse des Cumulus wird durchgeführt. Diese sollte sich nicht komplett und auch nicht zu frühzeitig ereignen, denn im Cumulus entstehen Proteoglykane, die sich vermutlich günstig auf die Reifung der Zona pellucida auswirken (Tesarik & Kopečný, 1986). Meist wird eine Ovulation der Ovarialfollikel mittels hormoneller Stimulation induziert. Die Eizellen werden laparoskopisch (Steptoe & Edwards, 1970) oder transvaginal unter sonografischer Kontrolle (Dellenbach et al., 1984) durch Punktion präovulatorischer Ovarialfollikel gewonnen. Zeigt die Fertilisation Erfolg und ist ca. 15-18 Stunden nach der Insemination das 2pn-Stadium eingetreten, werden die Eizellen im Pronukleusstadium (Ahuja et al., 1985), im frühen Embryonalstadium (Edwards, 1981) oder im Blastozystenstadium (Bolton et al., 1991) in den Genitaltrakt der Frau transferiert. Zumeist findet die Übertragung nach zwei Tagen im Zwei- bis Achtzellstadium statt. Der Embryotransfer wird transvaginal vorgenommen, die Option einer operativ-laparoskopischen Übertragung in den Eileiter wurde wieder verlassen..

Somit bietet die In-vitro-Fertilisation folgende Möglichkeiten:

- Bestimmte Auswahl an motilen Spermien
- Systematische Selektion reifer Eizellen
- Genaue Überwachung des Resultats
- Transfer von Embryonen in Uterus (oder Tube)

### **1.6.2. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)**

Die ICSI stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen IVF dar und erfordert deshalb ebenso eine ovarielle Stimulation, die Entnahme der weiblichen Gameten aus den Follikeln und den Transfer der erfolgreich fertilisierten Eizellen. Durch die ICSI, eine Form der mikroassistierten Fertilisation, kann die Penetration der Zona pellucida und auch die Fusion mit der Vitellinmembran überbrückt werden. Zunächst wird mittels Pipette die Oozyte aspiriert und fixiert, dann wird durch eine Glaspipette ein vitales

Spermatozoon mit dem Kopf zuvorderst in das Zytoplasma der Oozyte injiziert. Dabei sollte das erste Polkörperchen am unteren oder oberen Pol der weiblichen Keimzelle zu sehen sein, um eine Schädigung der meiotischen Spindelfigur zu vermeiden. Die Vitalität des Spermiums ist durch eine gewisse Motilität gekennzeichnet. Nach erfolgreicher Befruchtung wird - wie schon bei der IVF geschildert - der Embryotransfer durchgeführt. Somit stellt die ICSI eine Möglichkeit dar, u.a. folgende Schritte oder Störungen zu umgehen:

- Spermienkapazitation
- Akrosomale Reaktion
- Störungen der Morphologie, der Motilität oder der funktionellen Integrität des Spermiums
- Spermienkonzentration
- Funktionelle und anatomische Anomalien des Hodens, des Nebenhodens und der ableitenden Samenwege (mit Kombination von MESA oder TESE)

## 2. ZIEL DER ARBEIT

Zu den Aufgaben andrologischer Diagnostik im klinischen Alltag gehört

- die **Erkennung** männlicher Sub- oder Infertilität,
- mögliche **Ursachen** für die Infertilität festzustellen,
- **Therapieoptionen** zu geben,
- das jeweils **geeignete Reproduktionsverfahren** zu finden,
- eine **Vorhersage** für das Gelingen des Reproduktionsverfahrens treffen zu können.

In der andrologischen Labor-Diagnostik wurden in den letzten Jahren einige Methoden bzw. Assays entwickelt, die als Prädiktoren für Verfahren der assistierten Reproduktion herangezogen wurden. Darüber hinaus haben die klassischen Ejakulatparameter Spermatozoenkonzentration und -gesamtzahl, Motilität und Morphologie weiterhin ihren festen Platz.

Es existieren zahlreiche Studien, die den Einfluß männlicher Spermatozoenparameter auf die Ergebnisse assistierter Reproduktionstechniken untersuchen. Zumeist wird zur Berechnung der Prädiktivität der Parameter dasjenige Ejakulat berücksichtigt, das auch für die assistierte Reproduktion verwendet wird. Andererseits ist es in der klinischen Praxis wichtig, vor Durchführung einer Therapie schon das Resultat dieser Therapie **prognostizieren** zu können. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Basisejakulatuntersuchung und die spezielle Spermatozoen-Funktionsdiagnostik mit zeitlichem Abstand zur IVF- bzw. ICSI-Therapie gemessen, um zu erfassen, ob der Faktor **Zeit** einen Einfluss auf die Vorhersagequalität der Spermatozoenparameter hat.

In diesem Zusammenhang sollte durch Untersuchung der intra-individuellen Variabilität der Spermatozoenparameter auch die **Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen** überprüft werden.

Da die Befruchtung und die frühe Embryonalzeit komplexe Vorgänge darstellen, die **multifaktoriell** bestimmt sind, kann ein einzelner Test die Fertilisationskapazität nur unzulänglich charakterisieren. Zu einer guten Prognostik gehört deshalb die Erstellung sinnvoller **Modelle**, die auch andere Faktoren wie weibliche Einflussfaktoren mit einschließen. Dies wurde in dieser Arbeit in einem weiteren Schritt versucht.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Studie. Trotzdem soll in Kürze auf verwendete Materialien und die durchgeführte Ejakulatdiagnostik einschließlich Spermatozoenfunktions-tests sowie Methoden der assistierten Fertilisation eingegangen werden.

Die Ejakulatdiagnostik wurde im Rahmen der Andrologischen Sprechstunde an der Hautklinik Gießen und die Verfahren der assistierten Reproduktion in der Universitäts-Frauenklinik Gießen durchgeführt.

#### 3.1. Angaben zu den verwendeten Substanzen

Die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen, Chemikalien und Geräte fanden in der andrologischen Diagnostik und assistierten Reproduktion Verwendung:

*Tabelle 1: Substanzen der Tests, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden*

Substanz	Hersteller
0,8% Bismarckbraun	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
0,8% Rosé Bengal	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
4-Well-Schale	Nunc GmbH&Co. KG, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
5% Gelatine für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank Typ Gasboy	Labotec, Göttingen, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Fertigmedium Medicult = Universal IVF Medium	Medicult, Jyllinge, Dänemark
Frydman-Katheter	KB Biosystem Clédon, Tübingen, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
hCG	Menoigon, Ferring, Kiel, Deutschland
Hellfeldmikroskop Orthoplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Heparin	Roche, Basel, Schweiz
Hepes	Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland
hMG	Menogon, Ferring, Kiel, Deutschland
Humanalbumin 20%, Infusionsqualität	Stefan Gück-Zellkulturbedarf, Berlin, Deutschland
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
IVF-Medium-Medicult	Medicult, Jyllinge, Dänemark
Kulturröhrchen, Rundboden	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Luminol	Serva, Heidelberg, Deutschland

Makler-Zählkammer	Stefan Gück-Zellkulturbedarf, Berlin, Deutschland
Messkolben	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Messzylinder	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Mikrokitt	Kretschmer, Gießen, Deutschland
Mikrometerokular	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mineralöl	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
MKEL-1 Kit	Milenia Biotech, Bad Nauheim, Deutschland
MTP-Reader	Hamamatsu, Herrsching, Deutschland
Öl-Immersion	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Petrischalen	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Pipettenspitzen	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Polypropylenbecher	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon	Stefan Gück-Zellkulturbedarf, Berlin, Deutschland
Shorr-Farblösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sil-Select Lower Layer	Heike Janssen, Hamburg, Deutschland
Sil-Select Upper Layer	Heike Janssen, Hamburg, Deutschland
Spitzbodenröhrchen	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland
Suprecur	Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland
Trennsäulen für Glaswollfiltration	Mello Laborbedarf GmbH, Greifenstein, Deutschland
Umkehrmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Wärmeplatte	Medax Nagel, Kiel, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	Fisher Scientific GmbH, Nidderau, Deutschland

### 3.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

In die retrospektiv angelegte Studie wurden 4178 Patientenuntersuchungen von 2098 Patienten an der Hautklinik Gießen aus dem Zeitraum von Januar 1998 bis Januar 2000 einbezogen. Das Vorgehen steht in Einklang mit den zum Zeitpunkt der Erhebung geltenden Empfehlungen der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, ein gesondertes Votum war für das gewählte Studiendesign nicht erforderlich. Dabei waren die folgenden Parameter erhoben worden:

- Spermatozoenkonzentration (Mio./ml)
- Spermatozoengesamtzahl (Mio./Ejakulat)
- Gesamtmotilität (%)
- Progressive Motilität (%)
- Morphologische Normalformen (%)
- Vitalität (%)

- Akrosomale Reaktion (maximal/induziert, Induzierbarkeit) (%)
- Akrosinaktivität
  - Halodurchmesser ( $\mu\text{m}$ )
  - Formationsrate (%)
  - Index (Indexgröße)
- Chromatinkondensation (0=gestört, 1=nicht gestört)
- Reaktive Sauerstoffspezies (0=nicht erhöht, 1=erhöht, 2=deutl. erhöht)
- Peroxidase-positive Zellen (Mio./ml)
- Rundzellen (Mio./ml)
- Elastase (ng/ml)

Aufgrund fehlender Werte (die einzelnen Parameter wurden nicht bei jeder Untersuchung erhoben), hatten die Stichproben für die einzelnen Fragestellungen deutlich kleinere Umfänge. Bei ca. der Hälfte der Patienten wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums von zwei Jahren mehr als eine Ejakulatuntersuchung durchgeführt. Das erhaltene Gesamt-Kollektiv von 2098 Proben (= Patienten) wurde folgendermaßen schrittweise erhalten:

**Einschlusskriterien** für das Kollektiv waren:

- Alle Patienten wurden mit jeweils nur einem Spermogramm aufgenommen, bei mehrmaligen Untersuchungen wurde das erste verwendet.
- Alle Patienten, die mit ihren Partnerinnen am IVF-Programm der JLU Gießen in den Jahren 1998/99 teilgenommen hatten, wurden eingeschlossen. Hier wurde dann diejenige Ejakulatuntersuchung verwendet, die am nächsten zum Termin der In-vitro Fertilisation lag. Die Ergebnisse der IVF flossen in diese Arbeit mit ein.
- Ebenso wurden diejenigen Patienten ausgewählt, die mit ihren Partnerinnen am ICSI-Programm der JLU Gießen im angegebenen Zeitraum teilgenommen hatten. Dasjenige Ejakulat kam zur Auswertung, das am nächsten der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion lag, außerdem wurden die Resultate der ICSI mit in die Auswertungen eingeschlossen.

**Ausschlusskriterien** für das Kollektiv waren:

- Patienten, die zum Zwecke der Kryokonservierung Ejakulatproben abgaben

- Patienten mit Klinefelter-Syndrom
- Spermioogramme nach Ejakulataufbereitung

Das Ejakulat wurde durch Masturbation gewonnen. Die Abgabe der Ejakulate erfolgte in Polypropylenbechern. Bei einer Temperatur von 37°C nach einer 30-minütigen Inkubation und somit unmittelbar nach Liquefizierung begann die andrologische Diagnostik.

### **3.3. Dokumentation andrologischer Befunde und Diagnostik**

Seit 1998 wurden die wesentlichen Befunde der klinisch-andrologischen Untersuchung sowie die Ergebnisse der Labordiagnostik komplett in ein für die Andrologische Sprechstunde der Hautklinik Gießen entwickeltes Makro für MS Word 97 eingegeben. Alle Datensätze der andrologischen Diagnostik wurden dieser Datenbank entnommen und in geeigneter Weise anonymisiert.

### **3.4. Klassische Ejakulatparameter**

Zu den klassischen Ejakulatparametern zählen Spermienkonzentration, Morphologie und Motilität einschließlich der progressiven Beweglichkeit. Diese Parameter stellen ein wesentliches Element der andrologischen Diagnostik bei männlichen Fertilitätsstörungen dar.

#### **3.4.1. Spermienkonzentration**

Bei 400facher Vergrößerung lag der Durchmesser des Blickfeldes etwa zwischen 250 und 400 µm. Unter Zuhilfenahme eines Mikrometers oder dem Raster einer Neubauerkammer wurde der Durchmesser des Blickfeldes bemessen. Es ergab sich eine Spermienkonzentration von etwa  $10^6$ /ml über Durchmusterung des Objektträgers und die Schätzung der Spermienzahl pro Feld oder Teilfeld in der Größe von 1 nl. Danach wurde die Verdünnung für die Bestimmung der Spermienkonzentration mittels Zählkammermethode ausgewählt:

- <15 Spermien à Verdünnung 1:5
- 15-40 Spermien à Verdünnung 1:10
- 40-200 Spermien à Verdünnung 1:20
- >200 Spermien à Verdünnung 1:50

Die Spermienkonzentration wurde mit der Hämatozytometermethode („Neubauer improved“) nach Verdünnung des Ejakulates mit einer Verdünnungslösung (NaHCO<sub>3</sub>, Formalin, Gentiana-Violett) bestimmt. Durch die vorläufige Untersuchung der Spermienkonzentration (s.o.) wurde die Verdünnung festgelegt. Nur Spermatozoen, also morphologisch ausgereifte Keimzellen mit Schwanz, wurden ausgezählt. Die untere Grenze der noch relativ exakt bestimmbareren Spermienkonzentration ist 0,01 Millionen Spermien/ml. Geringere Spermienkonzentrationen wurden zunächst mit <0,01 Millionen Spermien/ml angegeben, in dieser Arbeit jedoch zur statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

### **3.4.2. Motilität**

Als ein wichtiger Parameter für die Erfassung der Spermienqualität ist die Motilität zu nennen. Sie gilt als einer der häufigsten Ursachen für männliche Infertilität (Aitken, 1989; Tesarik & Testart, 1989).

Hierzu wurde die Untersuchung nach den WHO-Kriterien (WHO 1992,1999) durchgeführt. In möglichst vielen Gesichtsfeldern wurden je 100 Spermien in zwei Präparaten bezüglich ihrer qualitativen Motilität systematisch untersucht und dann jedes Einzelne klassifiziert.

Die Gliederung stellte sich wie folgt dar:

- a. Schnelle progressive Beweglichkeit (WHO a)
- b. Langsame oder träge progressive Beweglichkeit (WHO b)
- c. Nicht progressive Beweglichkeit (WHO c) oder
- d. Immotilität (WHO d).

Die Anzahl der Spermatozoen jeder Kategorie wurde gezählt und eine prozentuale Verteilung angegeben. In dieser Arbeit wurde die Kategorie (a) „Schnelle progressive Beweglichkeit“ und die Kategorien (a) und (b) summiert (benannt als „Gesamtmotilität“) zur Berechnung verschiedenster Zusammenhänge verwendet.

### **3.4.3. Morphologie**

Nach Verflüssigung des Spermas wurde ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen, an der Luft getrocknet und mit 75%-igem Alkohol fixiert. Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurden die Ausstriche nach Shorr (Shorr, 1941)

gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung von 200 Spermatozoen fand bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion statt, bei besonderen Fragestellungen auch mit Grünfilter. Das Düsseldorfer Schema stellte die Grundlage für die Klassifizierung der Morphologie (Hofmann & Haider, 1985; Hofmann & Freundl, 1986; Hofmann et al., 1995) dar. Die Formstörungen der Spermatozoen sind unterteilbar in Überstreckungsstörungen, Akrosomdefekte, kombinierte Defekte des Kopfsegmentes sowie Mittelstück- und Flagellumdefekte. Entsprechend diesen Kriterien wurden die Mittelstück- und Flagellumstörungen folgendermaßen klassifiziert (Hofmann, 1988):

Störungen I. Grades, Schaftstörungen, mit 2 Untergruppen

- a) färberische Störungen strukturell normaler Flagella und Mittelstücke, die als Membranstörungen interpretiert werden und durch eine epididymale Reifungsstörung bedingt sind, sowie
- b) strukturelle Schaftstörungen testikulären Ursprungs

Störungen II. Grades

- a) Abknickungen sowie Abknickungen und Aufrollungen der Flagella
- b) Störungen der Mittelstücke

Störungen III. Grades

Schwere rudimentäre Anlagestörungen des gesamten terminalen Segmentes

*(modifiziert nach: Düsseldorfer Klassifikation, 1985)*

In dieser Arbeit wurde der prozentuale Anteil der Normalformen als Variable verwendet, um Zusammenhänge der Morphologie mit anderen Parametern festzustellen.

#### **3.4.4. Vitalität**

Bei Inkubation von Spermatozoen in einer Eosinlösung nehmen nur membrangeschädigte (= tote) Zellen den Farbstoff auf. So kann zwischen vitalen und avitalen Spermien unterschieden werden (WHO, 1992).

Ein Tropfen Ejakulat wurde mit einem Tropfen 0,5%iger Eosinlösung gemischt, nach ein bis zwei Minuten gestattete die Supravital-Färbung die Unterscheidung lebender

(Eosin-negativer, ungefärbter) und toter (Eosin-positiver, gefärbter) Spermien. Unter dem Mikroskop wurden pro Ausstrich 200 Spermatozoen entweder im Hellfeld oder Phasenkontrast entsprechend ihrer Färbung bestimmt und das Ergebnis dann prozentual angegeben.

### **3.5. Spermatozoenfunktions-tests**

#### **3.5.1. Akrosomale Reaktion**

Die Triple-Stain Methode nach Talbot & Chacon (1981) wurde angewendet, um den Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen in den Proben zu bestimmen. Die Spermatozoen wurden hierfür mit drei verschiedenen Farbstoffen gefärbt (Trypanblau, Bismarckbraun und Rosé Bengal). Vier Typen von Spermatozoen können unterschieden werden (s.u.). Zur physikalischen Induktion der akrosomalen Reaktion wurde die Niedrigtemperaturmethode (Sánchez et al., 1991) verwendet.

Zunächst wurden 500 µl Ejakulat mit 3 ml HTF-HSA für 10 Minuten bei 300 xg zentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde in 500 µl HTF-HSA resuspendiert. Die Proben wurden in zwei gleiche Teile à 250 µl aufgeteilt (Probe A und B) und Probe A (= Testwert) in verschlossenem Röhrchen bei 4°C über Nacht (16 Stunden) zur Induktion der Akrosomalen Reaktion inkubiert. Probe B (= Kontrollwert) wurde in verschlossenem Röhrchen bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden beide Proben zunächst zum Kapazitieren für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit jeweils 200 µl Trypanblau-Lösung vermischt und 15 Minuten bei wiederum 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 3 ml HTF ohne HSA zugegeben und 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl Glutardialdehyd-Lösung resuspendiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 3 ml HTF ohne HSA aufgefüllt, weitere 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 10µl abgenommen. Nun wurde das Pellet in 10 µl resuspendiert, auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete das Färben der Ausstriche in Bismarck-Braun-Färbelösung (0,8%) bei 40°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in destilliertem Wasser gewaschen. Die letzte Färbung mit Bengalrosa (0,8%) fand bei Raumtemperatur statt und dauerte 50 bis 60 Minuten. Danach wurden die Ausstriche nochmals dreimal in aqua dest. gewaschen, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96% Ethanol) und ggf. Xylol

entwässert und zum Schluss mit Mikrokitt eingedeckelt. Nach Verfestigung des Einschlussmittels wurden die Objektträger bei 1000facher Vergrößerung mit Öl-Immersion im Hellfeldmikroskop nach folgendem Schema beurteilt. Jeweils 400 morphologisch normale Spermatozoen wurden in zufällig gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt. Prozentual zur Gesamtzahl aller lebenden Zellen wurde der Anteil der lebend reagierten Spermatozoen angegeben. Nach Talbot & Chacon konnten folgende 4 Typen von angefärbten Spermatozoen unterschieden werden:

1. *Tote Spermatozoen mit intaktem Akrosom:*

postakrosomal graubraun - schwarz, akrosomale Region kräftig rosa

2. *Tote, degenerativ akrosom-reagierte Spermatozoen:*

postakrosomal graubraun - schwarz, akrosomale Region hellrosa - weiß

3. *Vitale, nicht reagierte Spermatozoen:*

postakrosomal hellbraun, akrosomale Region rosa

4. *Vitale, akrosom-reagierte Spermatozoen:*

postakrosomal hellbraun, akrosomale Region hellrosa - weiß

Folgende Parameter der Akrosomalen Reaktion wurden festgehalten und in dieser Arbeit ausgewertet:

- Spontane AR: Dieser Wert war der Kontrollwert und entstand aus Probe B. Die Akrosomale Reaktion wurde nicht induziert.
- Induzierte AR: Dieser Wert war der Testwert und entstand aus Probe A. Die Akrosomale Reaktion wurde durch die Niedrigtemperaturmethode induziert.
- Induzierbarkeit der AR: Dieser Wert stellt die Differenz zwischen induzierter und spontaner Akrosomaler Reaktion dar.

Als Normalwerte der einzelnen Parameter galten >13% für die induzierte AR und >7,5% für die Induzierbarkeit der AR (Henkel et al., 1993).

### **3.5.2. Akrosinaktivität**

Für eine erfolgreiche Befruchtung scheint das Akrosin, eine trypsinähnliche Serinprotease (Stambaugh & Buckley, 1970; Stambaugh, 1976; Srivastava et al., 1979), eine unerlässliche Rolle bei der Zonabindung und -penetration zu spielen (Schill et al., 1988). Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um die Akrosinaktivität zu

bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Gelatinolysetechnik angewendet, die 1970 erstmals von Gaddum und Blandau beschrieben wurde. Welker et al. führten 1988 diese Technik für menschliche Spermatozoen ein. Für die andrologische Diagnostik wurde die von Henkel et al. (1995) modifizierte Methode verwendet.

Samenzellen werden auf dem Gelatine-beschichteten Objektträger ausgestrichen und in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Gelatine wird durch die proteolytische Wirkung des Akrosins gelöst und um die Samenzellköpfe herum ein kreisrunder Hof (= Lysehöfe) erzeugt.

Die Größe der Lyseplaques ist dabei der Akrosinaktivität des zentral gelegenen Spermatozoons proportional.

Die Objektträger wurden folgendermaßen mit Gelatine beschichtet: Bei 56°C wurden im Wasserbad je 200 mg 5%ige Gelatine in 4 ml aqua dest. gelöst. Dann wurde 40 µl dieser Gelatinelösung auf einen Objektträger gegeben und ein zweiter Objektträger darauf gelegt, um die Gelatine gleichmäßig und luftblasenfrei zu verteilen. Als nächster Schritt wurden die Objektträger für mindestens 18 Stunden horizontal in einem feuchten Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für zwei Minuten in 0,05% Glutaraldehyd in Phosphat-Puffer (2,0 g NaCl; 1,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,023 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; je 1000 ml bidest. H<sub>2</sub>O; pH 7,8) fixiert, zweimal für je 15 Sekunden in Phosphat-Puffer ohne Glutaraldehyd gewaschen und zum Schluss für 20 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. So waren die fixierten Objektträger bei 4°C im feuchten Kühlschrank für etwa 2 Wochen haltbar.

Der für den Test benötigte Probenpuffer (Henkel et al., 1995) wurde mit 300 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und die Osmolarität auf 280 mOsmol/l eingestellt. Anschließend wurden bei Normozoospermie 900 µl des Probenpuffers und bei Oligozoospermie 400 µl des Probenpuffers in Eppendorfgefäß aliquotiert. Je 100 µl des Ejakulates wurden hinzugegeben und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Nachdem die fixierten Objektträger aus dem Kühlschrank genommen und kurzzeitig auf Raumtemperatur erwärmt worden waren, wurden 20 µl der Spermisuspension auf den Objektträger gegeben, vorsichtig ausgestrichen und bei 37°C in einer feuchten Kammer für zwei Stunden inkubiert.

Bei 400-facher Vergrößerung wurde bei 10 Spermatozoen der Halodurchmesser mit einem Mikrometerokular ausgemessen und daraus der Mittelwert berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 2,5 wurde der *Halodurchmesser* in µm

erhalten. Außerdem wurden bei 160-facher Vergrößerung 100 Spermatozoen ausgezählt und so der prozentuale Anteil der Spermatozoen mit Halo bestimmt (= *Haloformationsrate*).

Der *Akrosinaktivitätsindex* berechnete sich folgendermaßen: Das Produkt aus Halodurchmesser und Haloformationsrate dividiert durch 100.

Als Normalwerte der einzelnen Parameter galten mindestens 60% für die Haloformation und > 10 µm für den Halodurchmesser.

### **3.5.3. Chromatinkondensation**

Durch das weitgehende Ersetzen der lysinreichen Histone durch Protamine während der Spermiogenese wird eine enge Kondensation der Chromosomen erreicht. Da Histone saures Anilinblau binden, kann über die Intensität der Blaufärbung auf die Reife der Spermatozoen geschlossen werden (Terquem & Dadoune, 1983; Dadoune & Alfonsi, 1986).

Zur Durchführung des Tests wurde nach Terquem und Dadoune (1983) zunächst 0,2 molarer Phosphatpuffer, 3%-ige Glutaraldehydlösung und 5%-ige Anilinblaulösung in 4%-iger Essigsäure hergestellt. Dann wurde das Ejakulat auf einem Objektträger ausgestrichen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Spermatozoen erst für 30 Minuten in der Glutaraldehydlösung fixiert und dann kurz in aqua dest. gewaschen. Mit der Anilinblaulösung wurde zum Schluss für 5 Minuten die Färbung der Spermisuspension ausgeführt.

Die Auswertung schließlich fand nach folgendem Schema statt:

- 0 = keine Anfärbung des Spermatozoenkopfes
- 1+ = nur schwache Anfärbung, der akrosomale Ring ist sichtbar, weniger als die Hälfte des Spermatozoenkopfes ist angefärbt.
- 2+ = mittelstarke bis starke Anfärbung über den akrosomalen Ring hinaus
- 3+ = tiefblaue Färbung des gesamten Spermatozoons

Eine gestörte Chromatinkondensation wurde angenommen, wenn 25% oder mehr der Spermatozoen als 2+ oder 3+ klassifiziert wurden. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse in *gestört* und *nicht gestört* eingeteilt.

### 3.6. Assistierte Fertilisation

Alle Verfahren der assistierten Reproduktion wurden in der Universitäts-Frauenklinik der JLU Gießen von Herrn Prof. Dr. med. H. Gips, Herrn Dr. rer. nat. T. Stalf, Herrn Dipl. biol. H. Turley und den Medizinisch-Technischen Assistenten Frau Ott und Frau Seefeld-Schmidt durchgeführt. Als Indikationen für eine IVF- oder ICSI- Behandlung sind eingeschränkte tubare Funktionsfähigkeit, Tubenverschluss, Vorliegen einer Endometriose, polyzystische Ovarien, Zyklusstörungen, konkrete andrologische Ursachen sowie idiopathische Infertilität zu nennen.

Folgende Parameter wurden bei den einzelnen Schritten der Insemination festgehalten und nach Anonymisierung in dieser Arbeit ausgewertet:

- **Schwangerschaft** (0=nein, 1=ja):  
Eine Schwangerschaft ist gegeben bei Überschreiten des hCG-Wertes > 30 IU/ml im Blutserum zwei Wochen nach Punktion.
- **Embryoscore** (Score=Zahl, je höher desto besser):  
Beinhaltet als Variablen die Blastozystenanzahl (je mehr, desto besser, wobei beispielsweise 4 Blastomeren am Tag 2 nach der Punktion sehr gut sind) und Fragmentierungsgrad (Klasseneinteilung A - D; Zahlenwert A = 4; B = 3; C = 2; D = 1). Aus Multiplikation der Blastomerenanzahl mit dem Fragmentierungsgrad ergibt sich der Embryoscore.
- **Fertilisationsrate (in %)** wird folgendermaßen berechnet:  
$$\frac{(\text{Anzahl inseminierter Eizellen im 2PN-Stadium} \times 100)}{\text{Anzahl inseminierter Eizellen}}$$
- **Alter der Frau** (Jahre).
- **Anzahl der Embryonen** (0 – 3).

#### 3.6.1. Punktion

Um möglichst viele Eizellen zu gewinnen, wurde gemäß standardisierter Protokolle eine ovarielle Stimulation mit hMG und Suprecur<sup>®</sup> (Firma Hoechst) durchgeführt. Die Ovulation wurde durch Gabe von 10.000 IU hCG ausgelöst und die Follikel 36 Stunden danach unter vaginalsonografischer Sicht mit einer hohlen Nadel punktiert. Der Eingriff wurde ambulant in allgemeiner Sedierung oder leichter Narkose vorgenommen.

Die benötigten Medien wurden am Tag vor der Punktion vorbereitet. Für die IVF wurden zwei 4-Well-Schalen mit IVF-Medium-Medicult der Firma Medicult und zwei

Röhrchen mit jeweils 10 ml HTF-Medium ohne HEPES (incl. 0,15 ml 20%igem Serum-Albumin) versetzt. Für die ICSI wurde eine 4-Well-Schale mit IVF-Medium Medicult, ein 4-Well-Dish mit HAMS-F10 ohne HEPES und mit Serum und ein Röhrchen mit 10 ml HAMS-F10 ohne HEPES (incl. 0,15 ml 20%igem Serum-Albumin) versetzt. Diese Medien wurden in einen mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt.

Nachdem die Punktion von einem Arzt durchgeführt worden war, wurde die punktierte Follikelflüssigkeit in Röhrchen erneut in den begasten CO<sub>2</sub>-Brutschrank gestellt. Das Punktat wurde dann in eine Petrischale mit dem am Vortag hergestellten Medium gegeben und unter einer Stereolupe nach Eizellen abgesucht. Die aufgefundenen Eizellen wurden mit einer Pasteurpipette mit möglichst wenig Follikelflüssigkeit aufgenommen und in Spülmedium gewaschen. Das Spülmedium enthielt für die IVF HTF-HEPES-Medium mit 6200 I.E. Heparin/Liter und für die ICSI HAMS-F10-HEPES-Medium mit 6200 I.E. Heparin/Liter. Danach wurden die Eizellen in eine 4-Well-Schale gesetzt und bis zur Insemination in einem begasten Brutschrank aufbewahrt.

### **3.6.2. Spermienaufbereitungsmethoden**

Um für die assistierte Reproduktion die Spermienqualität zu verbessern und einen höheren Anteil an motilen und funktionellen Spermatozoen zu erlangen, werden verschiedenste Aufbereitungstechniken angewandt. In dieser Arbeit fand die Spermienaufbereitung etwa 2 - 3 Stunden nach der Punktion statt, danach wurde die Insemination durchgeführt.

#### **3.6.2.1. Swim-Up**

Um Spermatozoenfraktionen für die In-vitro Fertilisation zu gewinnen, wird sowohl bei gynäkologischer als auch bei andrologisch bedingter Subfertilität diese älteste Spermien-separationstechnik durchgeführt. Der Swim-Up beruht auf der aktiven Einwanderung von Spermatozoen in ein über das Ejakulat geschichtetes Medium (Mahadevan & Baker, 1984).

Das Nativejakulat wurde aus dem Probenbecher in ein Spitzbodenröhrchen gebracht und mit HTF-Medium auf ca. 8 ml aufgefüllt. Bei 300 xg wurde für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit etwa 8 ml frischem HTF-

Medium resuspendiert. Dann wurde erneut bei 300 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml HTF-Medium überschichtet. Diese Aufbereitung wurde für 20 - 30 Minuten in einen mit 5%-CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank gestellt, während dieser Inkubationsphase wanderten die motilen Spermatozoen aktiv in das Medium ein, die schlecht beweglichen oder toten Zellen blieben am Gefäßboden zurück. Die durch die eingewanderten Spermien getrübbte obere Schicht wurde abpipetiert und für die Insemination verwendet.

### **3.6.2.2. Glaswollfiltration und Swim-Up**

Diese Spermioseparationstechnik wird verwendet, wenn eine IVF durchgeführt werden soll und das Ejakulat viele Agglutinationen, viele Rund-, bzw. Fremdzellen und/oder hohen Anteil immotiler Spermatozoen enthält. Dabei muss eine Konzentration von mindestens 30 Millionen Spermien/ml gegeben sein. Die Trennmethode der Glaswollfiltration beruht auf der Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen und der Filtrationswirkung der Glaswollfasern (Paulson & Polakoski, 1977; Van der Ven et al., 1988)

Eine Trennsäule mit Glaswolle wurde in 1 - 2 ml HTF-Medium gewaschen und die Trennsäule in ein Spitzbodenröhrchen gestellt. Nach der Verdünnung des Nativejakulats mit etwas Medium wurde die Suspension durch das Glaswollröhrchen laufen gelassen und mit HTF-Medium ohne HEPES (incl. 0,15 ml 20%igem Serum-Albumin) auf mind. 8 ml aufgefüllt. Danach wurde das Filtrat bei 300 xg 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit ca. 8 ml frischem HTF-Medium verdünnt und erneut bei 300 xg 10 Minuten lang zentrifugiert und danach Überstand abgenommen. Auf das Pellet wurde vorsichtig 1 ml HTF-Medium gegeben und im begasten Brutschrank, wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben, der Swim-Up durchgeführt. Der Überstand mit den beweglichen Spermien wurde zur Insemination verwendet.

### **3.6.2.3. Die Dichtegradienten-Zentrifugation**

Dieses erstmals von Bolton & Braude (1984) erwähnte Verfahren kann in die 1-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation und die 2-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation unterteilt werden.

#### **3.6.2.3.1. Die 1-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Diese Spermioseparationsmethode für die IVF wird bei grenzwertigen Spermioogrammen durchgeführt, also bei geringer Spermienkonzentration, schlechter Motilität und/oder ein geringer Anteil an morphologischen Normalformen.

Als erster Schritt wurde das Nativejakulat nach Spermiogrammerstellung in ein Spitzbodenröhrchen gefüllt und in einem anderen Spitzbodenröhrchen ein Dichtegradient erstellt: Mit einer Spritze wurde 1 ml Sil-Select Lower Layer auf den Boden gegeben und das Ejakulat darüber geschichtet. Der Inhalt des Röhrchens wurde für 30 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit ca. 5 ml HTF-Medium ohne Hapes aufgefüllt und bei 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit maximal 500 µg HTF-Medium resuspendiert und mit der Aufbereitung die Insemination durchgeführt.

#### **3.6.2.3.2. Die 2-Phasen-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Wenn weniger als 2 progressiv motile Spermien/Blickfeld sichtbar sind oder wenn sehr viele Leukozyten auftreten, wird diese Technik verwendet.

In einem Spitzbodenröhrchen wird mit 1 ml Sil-Select Lower Layer und 1 ml Sil-Select Upper Layer ein Dichtegradient hergestellt und dann das Ejakulat darauf geschichtet. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen und auf das Pellet ca. 5 ml HAMs-F10 mit Hapes und HSA (0,15 ml 20%iges Serum-Albumin) gegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde wiederum für 10 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und danach je nach Pellet der Überstand bis auf maximal 100 µl abgenommen und das Pellet darin resuspendiert. Dann konnte die ICSI durchgeführt werden.

#### **3.6.2.4. Die Migrations-Sedimentation**

Diese von Tea et al. (1984) entwickelte Methode wird vor Durchführung einer ICSI angewandt, falls in der Zählkammer mindestens 2 - 3 progressiv motile Spermien/Blickfeld gezählt werden.

Zunächst wurde das Nativejakulat für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und so auf etwa 0,5 ml eingengt. In das Migrations-Sedimentations-Röhrchen wurde bis knapp über den Trichterrand HAMs-F10-Medium ohne Hapes (mit 0,15 ml 20% Albumin)

gefüllt. Das Zentrifugat wurde in die Rinne um den Trichter hinzu pipettiert und das Röhrchen 2 bis 3 Stunden in den begasten Brutschrank gestellt. Nun wurde der Trichterinhalt, der die beweglichen Spermatozoen enthielt, vorsichtig abpipettiert und in ein Spitzbodenröhrchen gefüllt. Wenn nötig, wurde das Volumen mittels Zentrifugation (10 Minuten bei 300 x g) eingeeengt, danach konnte die ICSI durchgeführt werden.

### **3.6.3. IVF**

Die IVF folgt im Anschluss an die Spermaaufbereitung etwa 3 - 4 Stunden nach der Punktion, dabei wird zwischen der Standard-Methode und der Insemination im Mikrotropfen unterschieden:

#### **3.6.3.1. Standard-Methode**

Die für die Standardmethode benötigte Konzentration beträgt etwa 100000 Spermatozoen/ml. Nachdem die Spermien gewaschen und aufbereitet worden waren, wurde ein Teil des Überstandes (s.o.) mit einer Pasteurpipette aufgenommen. Ein Tropfen wurde in die Mitte einer 4-Well-Schale gesetzt, um die Spermienkonzentration abzuschätzen. Ein weiterer Tropfen wurde in eine Makler-Zählkammer gegeben, um nach der Insemination die Konzentration zu messen. Nun wurde die Spermiesuspension maximal tropfenweise zu den Eizellen gegeben und in der Schale gut durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Spermien zu erreichen. Danach wurde die 4-Well-Schale über Nacht in einen mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank gestellt.

#### **3.6.3.2. Insemination im Mikrotropfen**

Die Insemination im Mikrotropfen wurde verwendet, wenn das Ejakulat nicht für die Standardmethode ausreichte. Um eine optimale Spermienkonzentration zu erreichen, wurde die Aufbereitung soweit wie möglich bzw. wie nötig eingeeengt.

Dann wurden die Eizellen folgendermaßen denudiert: In einer 4-Well-Schale wurde in die 1. Vertiefung Hyaluronidase mit einer Konzentration von 80 U/l gegeben, in die 2. und 3. Vertiefung HAMs-F10 mit HEPES 0,15 ml Serum-Albumin. In der Hyaluronidase wurden mit einer schwach ausgezogenen Pipette die Cumuluszellen entfernt und die Eizelle so „grob denudiert“. Nachdem die Eizellen mit möglichst wenig Flüssigkeit sofort in die 2. Vertiefung gegeben worden waren, wurden im nächsten

Schritt die Coronazellen mit einer dünn ausgezogenen Pipette entfernt und die Eizellen so „fein denudiert“. In der 3. Vertiefung wurden die Eizellen dann gewaschen und in die bereits am Vortag vorbereitete 4-Well-Schale mit IVF-Medicult-Medium in die 1. Vertiefung gegeben. Von der Spermisuspension, die 2 - 3 Millionen Spermien/ml enthalten sollte, wurden 50 µl in eine Petrischale gegeben und mit Mineralöl überschichtet. Dann wurden die denudierten Eizellen in den Mikrotropfen gegeben und über Nacht in den 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank gestellt.

#### **3.6.4. ICSI**

Die ICSI fand ca. 3 - 4 Stunden nach der Punktion statt. Zuvor wurden die Eizellen nach demselben Prinzip wie in Abschnitt 3.6.3.2. beschrieben denudiert.

Auf die Innenseite einer Petrischale wurden ein 5 µl-Tropfen PVP und ein 5 µl-Tropfen HAMs-F10 (mit HEPES) gegeben. In die PVP-Tropfen wurde 1 µl Spermaaufbereitung gesetzt und mit Öl überschichtet. Anschließend wurde unter einer Stereolupe jeweils eine Eizelle in die Medientropfen gegeben.

Auf einer auf 37° C erwärmten Heizplatte fand dann die Mikroinjektion statt, dazu wurde das ICSI/Umkehrmikroskop verwendet: Einem normal geformten, gut beweglichem Spermium wurde mit einer Injektionspipette, die über einen Mikromanipulator bewegt wurde, über das Flagellum gestreift, um es unbeweglich zu machen. Dann wurde das Spermium mit dem Flagellum zuvorderst in die Injektionspipette aspiriert. Da sich der Polkörper der Eizelle in der Nähe der Teilungsspindel befindet, war bei Einspannen des Eizelltropfens in die Haltekapillare zu beachten, dass sich der Polkörper in 6<sup>00</sup> oder 12<sup>00</sup> befand, um die Teilungsspindel so nicht zu verletzen. Anschließend wurde an der Eizelle der genaue Gegenpunkt zur Haltekapillare ausgemacht und dort die Eizelle mit der Injektionspipette angestochen und aspiriert, bis man einen Ruck sah. Danach konnte das Spermium zügig, mit möglichst wenig PVP in die Eizelle injiziert werden. Zum Schluss wurde die Injektionspipette rasch aus der Eizelle gezogen. Nach Insemination aller reifen Eizellen wurden sie zurück in die 4-Well-Schale gegeben. Die nicht injizierten bzw. unreifen Eizellen blieben in der 1. Vertiefung, ein kurzer Waschgang fand in der 2. Vertiefung statt und zur Inkubation über Nacht befanden sich die inseminierten Eizellen in der 3. Vertiefung mit HAMs-F10-Medium (mit HEPES und HSA).

### **3.6.5. Pronukleus-Kontrolle**

Die Pronukleus-(PN)-Kontrolle fand einen Tag nach der Insemination statt. Zu unterscheiden waren Eizellen im 1-, 2- und 3PN-Stadium und polyploide Eizellen.

Außerdem kamen folgende Kriterien zum Tragen:

- Die Eizellen sollten alle gleich groß und rund sein.
- Die Vorkerne (= Pronuklei) sollten direkt nebeneinander liegen und deutlich sichtbar sein.
- Das Cytoplasma sollte homogen und hell erscheinen.
- Ein heller „Halo-Effekt“ sollte sichtbar sein.

#### **3.6.5.1. Pronukleus-Kontrolle bei IVF**

Einen Tag nach der Insemination wurden die noch nicht denudierten Eizellen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette denudiert. Nach der Denudierung wurden die Eizellen in eine neue 4-Well-Schale gesetzt und die Befruchtung kontrolliert. Es wurden maximal drei 2PN-Stadien in die 3. Vertiefung der 4-Well-Schale gesetzt und der Rest verworfen. Sowohl polyploide Eizellen und 1PN-Stadien sowie abnormal entwickelte Eizellen wurden verworfen.

#### **3.6.5.2. Pronukleus-Kontrolle bei ICSI**

Am Tag nach der Insemination wurde kontrolliert, wie viele Eizellen sich im 1-, 2- oder 3PN-Stadium befanden. In der 1. Vertiefung der 4-Well-Schale wurde kontrolliert, wie viele der Eizellen nachgereift waren und aus der 3. Vertiefung maximal drei der intakt befruchteten Eizellen in die 4. Vertiefung gesetzt.

### **3.6.6. Embryokontrolle und -transfer**

Achtundvierzig Stunden nach der Insemination fanden die Embryokontrolle und der Transfer statt.

Zunächst wurden die Embryonen im 2- und 4- Zellstadium nach dem folgendem Schema beurteilt:

- A: Gleiche Blastomere, keine Fragmentierung
- B: Leichte (<20%) Fragmentierung oder ungleiche Blastomere
- C: Mittlere (20-50%) Fragmentierung
- D: Starke (>50%) Fragmentierung

E: Degeneriert

Für den Transfer wurden die Embryonen mit einer 1 ml-Spritze unter einer Stereolupe in einen Frydman-Katheter gezogen. Nun wurde der Katheter von einem Arzt in die Gebärmutter eingeführt und dort entleert.

### **3.7. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten wurde von Herrn Dr. H. Boedeker und Frau C. Scheibelhut am Institut für Medizinische Informatik, JLU Gießen durchgeführt. Sie erfolgte mit dem Statistikprogramm V8 der Firma SAS Institute, Cary, NC.

#### **3.7.1. Deskriptive Auswertung**

Da aufgrund der grafischen Verteilung - transformiert und nicht transformiert - von einer Normalverteilung nicht auszugehen war, wurde aus den Einzeldaten der Untersuchungsergebnisse Minimum, Maximum, die Quartile und der Median berechnet.

#### **3.7.2. Univariate Analyse: Einfluß männlicher Keimzellfunktion auf Ergebnisse der assistierten Fertilisation**

Die Ejakulat- bzw. Spermatozoenfunktionsparameter wurden mittels univariater Analyse auf Zusammenhänge mit den Zielparametern von ICSI bzw. IVF untersucht.

Dabei wurden folgende nicht-parametrische Verfahren angewandt:

- Wenn Zusammenhänge für stetige mit stetigen Parametern gesucht wurden, wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient verwendet.
- Bei Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen stetigen und diskreten Parametern wurde mit dem Wilcoxon-Test gearbeitet. Dieser Test fordert Gleichheit der Verteilungsform, das heißt Gleichheit zwischen der Verteilungsform der Gruppen. Davon kann bei den Parametern nicht ausgegangen werden. Deshalb wurde gleichzeitig der
- Median-Test verwendet, der nicht Gleichheit der Verteilungsform fordert.
- Um Unterschiede zwischen Gruppenbeziehungen stetiger mit diskreten Parametern zu finden, wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis verwendet.
- Zusammenhänge zwischen diskreten und diskreten Parametern wurden mittels Chi-Quadrat getestet.

### **3.7.3. Multivariate Analyse: Modellerstellung und Wertigkeitsüberprüfung der einzelnen Faktoren**

Im nächsten Schritt wurden explorativ ganze (multivariate) Modelle gesucht. Die Fragestellung lautete, wie wahrscheinlich das Auftreten eines Zielparameters (= Fertilisationsrate, Embryoscore oder Schwangerschaft) bei Vorliegen bestimmter Parametergrößen ist. Diese funktionellen Abhängigkeiten wurden durch logistische Regression beschrieben. Zusätzlich zu den Parametern der männlichen Keimzellfunktion wurden ebenfalls die assistierte Fertilisation beeinflussende Parameter der Partnerin aufgenommen. Von klinischer Relevanz ging man bei folgenden Parametern aus:

- Das Alter der Frau beeinflusst den Embryoscore und das Auftreten von Schwangerschaft.
- Die Anzahl der transferierten Embryonen beeinflusst die Inzidenz von Schwangerschaft.

Bei der Modellerstellung wurde beachtet, dass die Parameter möglichst wenig redundant waren, d.h. sie durften sich in ihren Aussagen nicht überschneiden oder einander bedingen. Da von Nichtlinearität auszugehen war, wurden folgende Parameter nach ihrem jeweiligen Median dichotomisiert:

- Fertilisationsrate
- Embryoscore
- Spermatozoenkonzentration
- Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen
- Spermatozoen-Gesamtmotilität (WHO a + b)
- Akrosinaktivität der Spermatozoen (Haloformationsrate)
- akrosomale Reaktion der Spermatozoen (maximal/induziert).
- Alter der Frau

### **3.7.4. Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen**

Hier wurden Berechnungen zu intra- und interindividuellen Variabilitäten verschiedener Ejakulat- bzw. Spermatozoenfunktionsparameter durchgeführt. Um die Voraussetzung der Normalverteilung eher zu erfüllen, wurde für die beobachteten Werte eine logarithmische Transformation durchgeführt. Mit Zuhilfenahme der Varianzkomponentenzerlegung (VKZ) konnte aus den Daten ein fehlerfreier Schätzwert

für die inter- und intraindividuellen Variabilitäten gewonnen werden. Um eine Verfälschung zu vermeiden, wurde mit Hilfe der einzelnen Niveaus der Beobachtungszeitpunkte die interindividuelle Variabilität geschätzt. Das dabei verwendete Modell beinhaltet als zufällige Faktoren den Patienten und die Beobachtungswiederholung. Dabei ist die Beobachtungswiederholung von Patienten abhängig. Nach Transformation und erfolgter Retransformation können die zu schätzenden intra- und interindividuellen Variabilitäten nicht mehr durch einen einzelnen Schätzwert, sondern nur durch das dem 2s-Intervall entsprechende Intervall geschätzt werden.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Deskriptive Statistik

Das zu untersuchende Kollektiv schloss 2098 Patienten ein, die von Januar 1998 bis Januar 2000 die andrologische Ambulanz der Hautklinik der JLU aufgesucht hatten. Da die einzelnen Parameter nicht bei jeder Untersuchung erhoben wurden, hatten die Stichproben für die einzelnen Fragestellungen kleinere Umfänge.

#### 4.1.1. Männliche Keimzellfunktion und IVF-Programm

Von den initial 2098 in die Studie eingeschlossenen Patienten durchliefen 161 Patienten mit ihren Partnerinnen das IVF-Programm der Justus-Liebig Universität in Gießen. Der Abstand zwischen Spermogrammuntersuchung und IVF-Programm betrug 12 bis maximal 190 Tage, im Median 93 Tage.

Die Tabellen 2 bis 4 zeigen die deskriptive Auswertung der statistischen Untersuchung. Hier ist unter anderem die starke interindividuelle Streuung der verschiedenen Ejakulat- bzw. Spermatozoenfunktionsparameter ersichtlich.

*Tabelle 2: Deskriptive Auswertung der Spermogramme und des IVF-Programms mit stetigen Parametern. AA=Akrosinaktivität; AR=Akrosomale Reaktion.*

Parameter	Patienten	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
Spermienkonzentration (Mio./ml)	161	4,4	32,0	67,4	128,0	540,0
Gesamtzahl Spermien (Mio.)	161	14,1	91,0	230,0	480,0	3744,0
Gesamtmotilität (%; WHO a+b)	161	11,0	44,0	52,0	58,0	75,0
Progressivmotilität (%; WHO a)	161	8,0	10,0	46,0	54,0	70,0
Normalformen (%)	156	0,0	20,0	28,0	38,5	68,0
Vitalität (% gefärbte = tote)	71	8,0	16,0	22,0	28,0	60,0
Akrosinaktivitäts (AA) – Index	69	0,0	7,4	9,4	11,6	22,5
AA – Formationsrate (%)	69	0,0	62,0	68,0	78,0	92,0
AA – Halodurchmesser (%)	69	0,0	11,8	13,8	16,3	25,0
AR maximal/induziert (%)	69	7,0	18,0	24,0	31,0	80,0
AR Induzierbarkeit (%)	69	0,0	8,0	11,0	15,0	32,0
Alter der Frau (Jahre)	161	23,0	30,3	33,0	36,7	46,0
Fertilisationsrate (%)	161	0,0	20,0	57,1	77,8	100,0
Embryoscore	161	0,0	5,0	11,0	16,0	24,0

*Tabelle 3: Deskriptive Statistik, wie vielen Patientinnen des IVF-Programms jeweils wie viele Embryonen transferiert wurden.*

Anzahl Embryonen	Anzahl Patientinnen	Anteil (%)
<b>Gesamt</b>	161	100
<b>0</b>	28	17,39
<b>1</b>	32	19,88
<b>2</b>	37	22,98
<b>3</b>	64	39,75

*Tabelle 4: Deskriptive Statistik, wie viele Patienten des IVF-Programms eine gestörte und wie viele eine nicht gestörte Chromatinkondensation aufwiesen. CK=Chromatinkondensation.*

Variable	Patienten	Anteil (%)
<b>Gesamt</b>	7	100
<b>gestörte CK</b>	2	28,57
<b>Nicht gestörte CK</b>	5	71,43

Bei 133 Patientinnen wurde die Entscheidung zwischen schwanger und nicht schwanger getroffen (bei den restlichen 28 Patientinnen kam es gar nicht erst zum Embryonentransfer). Es wurden 44 Patientinnen schwanger, das sind 33,08% gegenüber 66,92%, die nicht schwanger wurden (89 Patientinnen).

#### **4.1.2. Männliche Keimzellfunktion und ICSI-Programm**

Es nahmen von den anfangs 2098 in die Studie eingeschlossenen Patienten 226 Paare am ICSI-Programm der Justus-Liebig Universität in Gießen teil. Dabei lagen zwischen Spermogrammuntersuchung und ICSI-Programm zwischen 3 und 190 Tagen (Median 91). Die deskriptive Auswertung ist in den Tabellen 5 bis 7 zusammenfassend dargestellt.

Bei 211 Patientinnen wurde die Entscheidung zwischen schwanger und nicht schwanger getroffen (bei den restlichen 15 Patientinnen kam es gar nicht erst zum Embryonentransfer). Es wurden 71 Patientinnen schwanger, das sind 33,65% gegenüber 66,35%, die nicht schwanger wurden (140 Patientinnen).

Tabelle 5: Deskriptive Auswertung der Spermioogramme und des ICSI-Programms mit stetigen Parametern.

Parameter	Patienten	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
Spermienkonzentration (Mio./ml)	220	0,0	1,7	7,5	25,1	325,0
Gesamtzahl Spermien (Mio.)	219	0,0	5,8	27,5	83,7	1137,0
Gesamtmotilität (%; WHO a+b)	164	0,0	16,0	28,0	42,0	68,0
Progressivmotilität (%; WHO a)	169	0,0	7,0	18,0	31,0	65,0
Normalformen (%)	155	0,0	3,0	8,0	19,0	58,0
Vitalität (% gefärbte = tote)	142	9,0	20,0	26,0	37,0	96,0
Akrosinaktivitäts (AA) - Index	36	0,0	0,0	5,8	8,5	14,7
AA - Formationsrate (%)	42	0,0	9,5	11,6	14,5	18,3
AA - Halodurchmesser (%)	36	0,0	0,0	49,0	65,5	84,0
AR maximal/induziert (%)	40	0,5	15,0	20,0	32,0	66,0
AR Induzierbarkeit (%)	40	0,0	3,0	7,5	10,5	25,0
Alter der Frau (Jahre)	226	21,0	29,3	32,0	34,8	42,0
Fertilisationsrate (%)	225	0,0	60,0	75,0	100,0	100,0
Embryoscore	226	0,0	9,0	13,0	17,0	24,0

Tabelle 6: Deskriptive Statistik, wie vielen Patientinnen jeweils wie viele Embryonen transferiert wurden.

Embryonen	Patientinnen	Anteil (%)
<b>Gesamt</b>	226	100
<b>0</b>	15	6,64
<b>1</b>	33	14,6
<b>2</b>	45	19,91
<b>3</b>	133	58,85

Tabelle 7: Deskriptive Statistik, wie viele Patienten eine gestörte und wie viele eine nicht gestörte Chromatinkondensation aufwiesen. CK=Chromatinkondensation.

CK	Patienten	Anteil (%)
<b>Gesamt</b>	6	100
<b>gestört</b>	2	33,33
<b>nicht gestört</b>	4	66,67

## **4.2. Univariate Analyse: Einfluss männlicher Keimzellfunktion auf Ergebnisse der assistierten Fertilisation**

Zunächst wurden die einzelnen Parameter univariat bezüglich des Auftretens bestimmter Zielparameter der assistierten Fertilisation untersucht.

### **4.2.1. Einflussfaktoren männlicher Keimzellfunktionen auf die IVF**

Bei folgenden Spermatozoenparametern konnten aufgrund der Wahrscheinlichkeiten ( $p < 0,19$ ) Hinweise auf Zusammenhänge mit Parametern der assistierten Fertilisation erkannt werden:

- Gesamtmotilität mit Fertilisationsrate (Spearman:  $p=0,10$ ) und Schwangerschaft (Wilcoxon:  $p=0,05$ )
- Progressivmotilität mit Fertilisationsrate (Spearman:  $p=0,08$ ), Schwangerschaft (Wilcoxon:  $p=0,08$ ) und Embryoscore (Wilcoxon:  $p=0,10$ )
- Konzentration mit Fertilisationsrate (Spearman:  $p=0,01$ )
- Vitalität mit Schwangerschaft (Median:  $p=0,13$ )
- Morphologische Normalformen mit Fertilisationsrate (Spearman:  $p=0,04$ ), Schwangerschaft (Median:  $p=0,14$  bzw. Wilcoxon:  $p=0,17$ ) und Embryoscore (Spearman:  $p=0,17$ )

Alle anderen Spermatozoenparameter (Gesamtzahl Spermien, Akrosinaktivität, akrosomale Reaktion, Chromatinkondensation) konnten nicht als mögliche Einflussgröße für die Parameter der in-vitro-Fertilisation identifiziert werden.

Die Tabellen 8 und 9 stellen die Korrelation zwischen Spermatozoenparametern und Parametern der *In-vitro* Fertilisation dar. Die dabei verwendeten statistischen Tests (Spearman's Korrelationskoeffizient, Wilcoxon-Test und Median-Test) und ihre Ergebnisse (Wahrscheinlichkeit  $p$  und Korrelationskoeffizient  $r$ ) sind ebenfalls den Tabellen zu entnehmen.

Falls es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Spermatozoenparametern und Parametern der IVF gab (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,19$ ), wurden in Box-and-Whisker-Plots in den Abbildungen 4 bis 9 diese Zusammenhänge grafisch dargestellt. Hierbei wurde die Fertilisationsrate in  $< 50\%$  bzw.  $\geq 50\%$  geteilt. Die Mediane der beiden jeweiligen Gruppen (Fertilisationsrate  $< 50\%$  bzw.  $\geq 50\%$  und "Schwanger" bzw. "Nicht schwanger") wurden mittels Median-Test, Wilcoxon-Test oder Spearman's Korrelationskoeffizient verglichen (die jeweils verwendeten Tests sind in der Abbildung

abzulesen). Die Verteilung der Werte wurde in einem gruppierten Boxplot dargestellt. Hier repräsentiert die innere Linie den Median. Die Box wird vom 1. und 3. Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt. Die äußeren Horizontallinien stellen den kleinsten bzw. größten Wert dar, der nicht zu den Ausreißern zählt. Die Boxlänge charakterisiert die Variabilität des jeweils verglichenen Spermatozoenparameters. Die Lage des Medians gibt einen Eindruck von der Lage der zentralen Tendenz innerhalb der Box und damit von der Symmetrie der Verteilung.

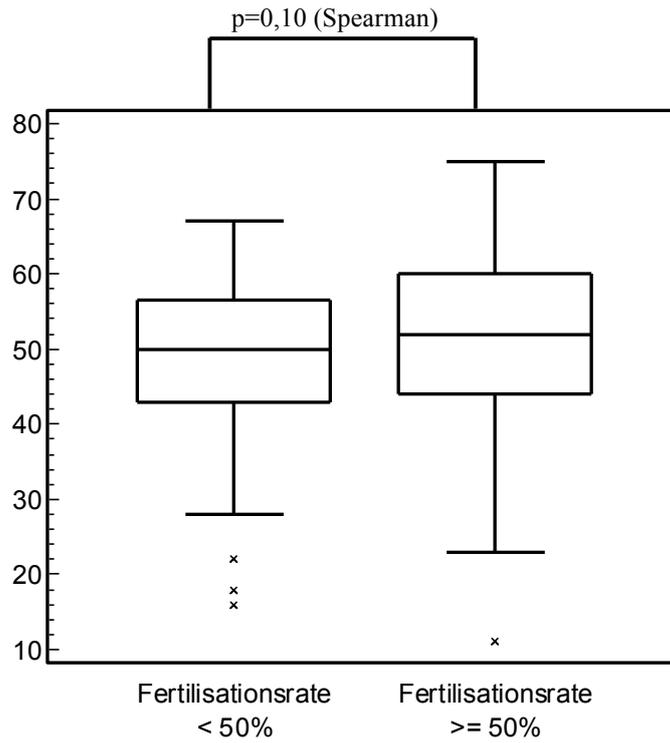
*Tabelle 8: Zusammenhang der klassischen Ejakulatparameter mit Parametern der in-vitro Fertilisation. Zusätzlich dazu verwendete statistische Tests und Ergebnisse .*

Spermatozoen-Variable	IVF-Variable	P	P	R
<b>Gesamtmotilität (n=161)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,10</b>	<-- Spearman	0,13
	Embryoscore	0,25		0,09
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Progressivmotilität (n=161)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,08</b>	<-- Spearman	0,14
	Embryoscore	<b>0,10</b>		0,13
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Spermienkonzentration (n=161)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,01</b>	<-- Spearman	0,21
	Embryoscore	0,19		0,10
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Vitalität (n=71)</b>	Fertilisationsrate	0,90	<-- Spearman	-0,01
	Embryoscore	0,83		-0,03
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Normalformen (n=156)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,04</b>	<-- Spearman	0,16
	Embryoscore	<b>0,17</b>		0,11
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
		<b>0,17</b>	<b>0,14</b>	

Tabelle 9: Zusammenhang Spermatozoenfunktions-parameter mit Parametern der in-vitro Fertilisation und dazu verwendete statistische Tests.

Spermatozoen-Variable	IVF-Variable	P	P	R
<b>Akrosomale Reaktion maximal/induziert (n=69)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,16</b>	<-- Spearman	-0,17
	Embryoscore	0,50		-0,08
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosomale Reaktion Induzierbarkeit (n=69)</b>	Fertilisationsrate	0,57	<-- Spearman	-0,07
	Embryoscore	0,44		0,09
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Halodurchmesser (n=69)</b>	Fertilisationsrate	0,96	<-- Spearman	-0,02
	Embryoscore	0,40		0,09
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Index (n=69)</b>	Fertilisationsrate	0,84	<-- Spearman	0,02
	Embryoscore	0,57		0,07
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Formationsrate (n=69)</b>	Fertilisationsrate	0,20	<-- Spearman	0,16
	Embryoscore	0,68		0,05
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Ergebnis (n=69)</b>	Fertilisationsrate	0,31		
	Embryoscore	0,70		
	Schwangerschaft	0,57	<-- Chi-Squ.	
<b>Chromatinkondensation Ergebnis (n=7)</b>	Fertilisationsrate	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
	Embryoscore	0,43	0,51	
	Schwangerschaft	0,55	0,82	
		0,62	<-- Chi-Squ.	

A



B

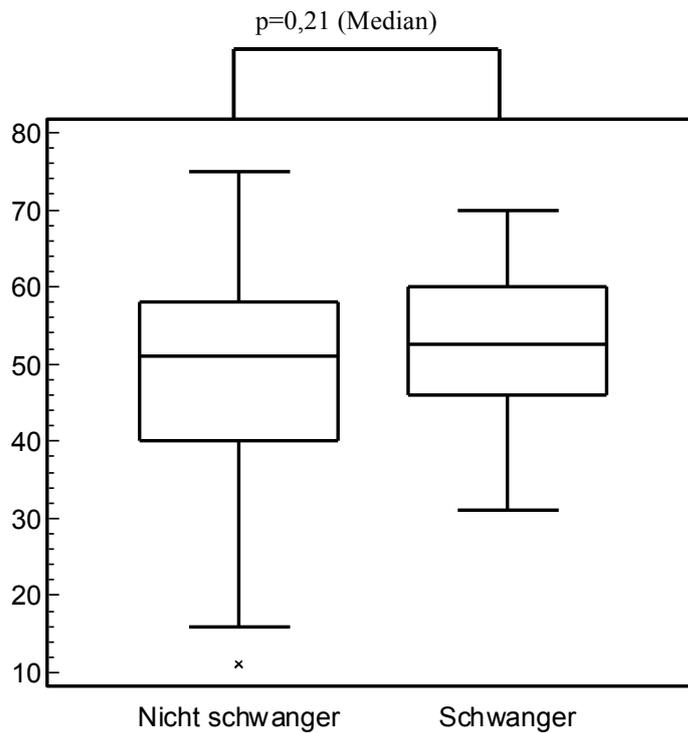
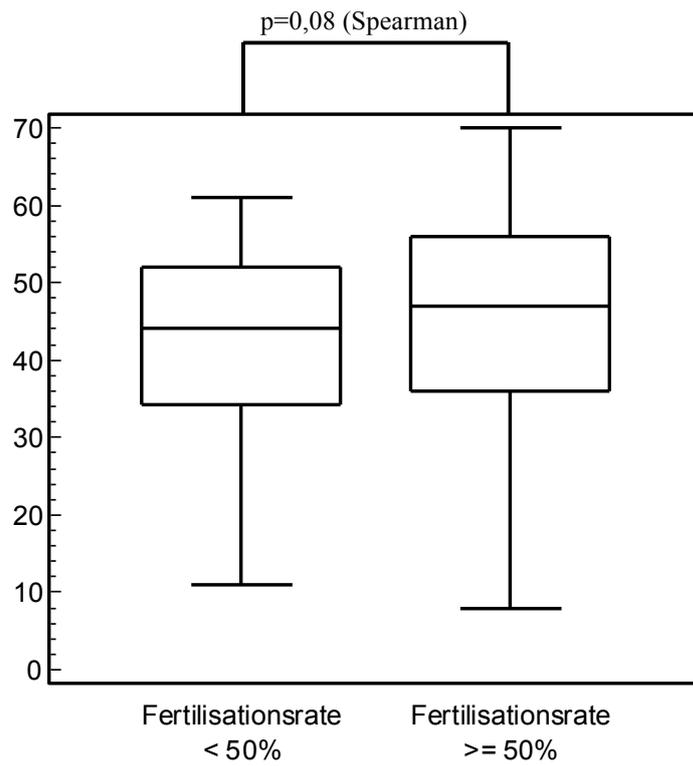


Abbildung 4: Zusammenhang Gesamtmotilität (y-Achse) in % mit

A) Fertilisationsrate (<50%; ≥50%); n=160; p=0,10 (Spearman)

B) Schwangerschaft (ja/nein); n=140; p=0,05 (Wilcoxon) / 0,21 (Median)

**A**



**B**

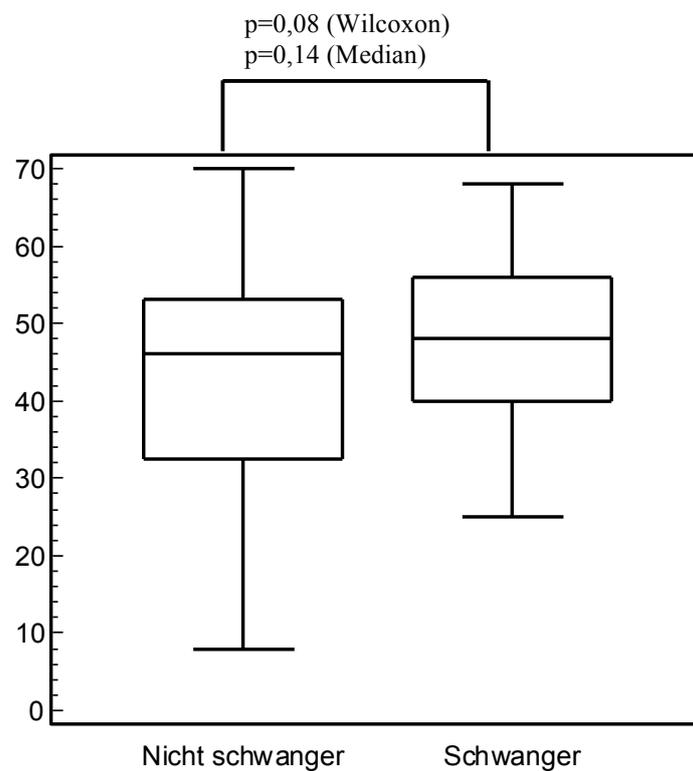


Abbildung 5: Zusammenhang Progressivmotilität (y-Achse) in % mit

A) Fertilisationsrate (<50%; ≥ 50%); n=160; p=0,08 (Spearman)

B) Schwangerschaft (ja/nein); n=140; p=0,08 (Wilcoxon) / 0,14 (Median)

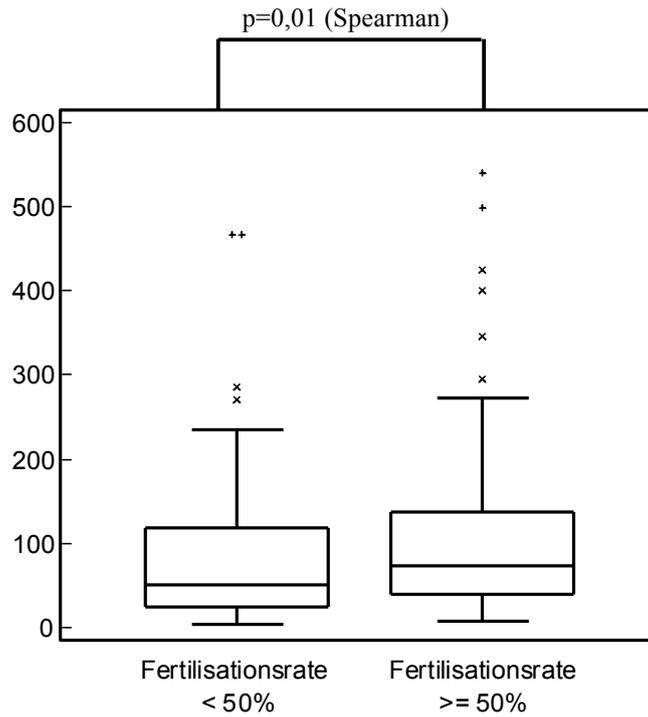


Abbildung 6: Zusammenhang Spermienkonzentration (y-Achse) in Mio./ml mit Fertilisationsrate (<50%;  $\geq$  50%);  $n=160$ ;  $p=0,01$  (Spearman)

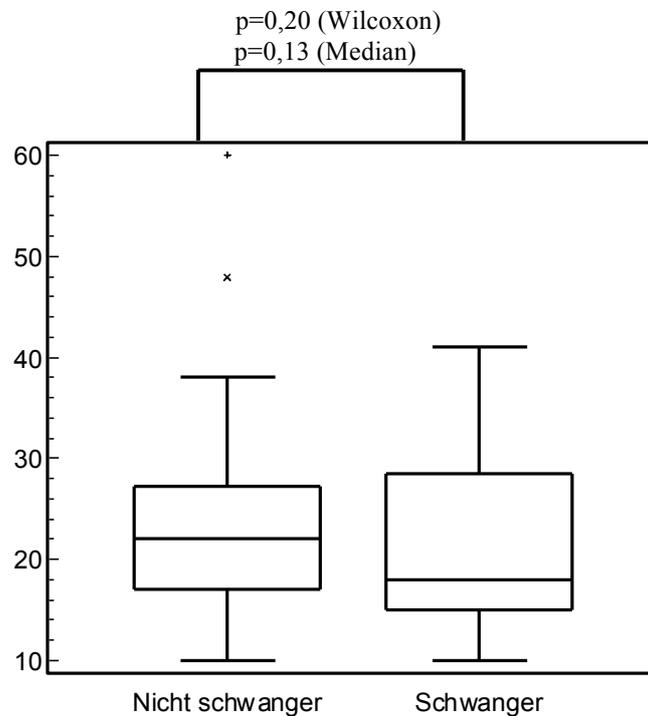
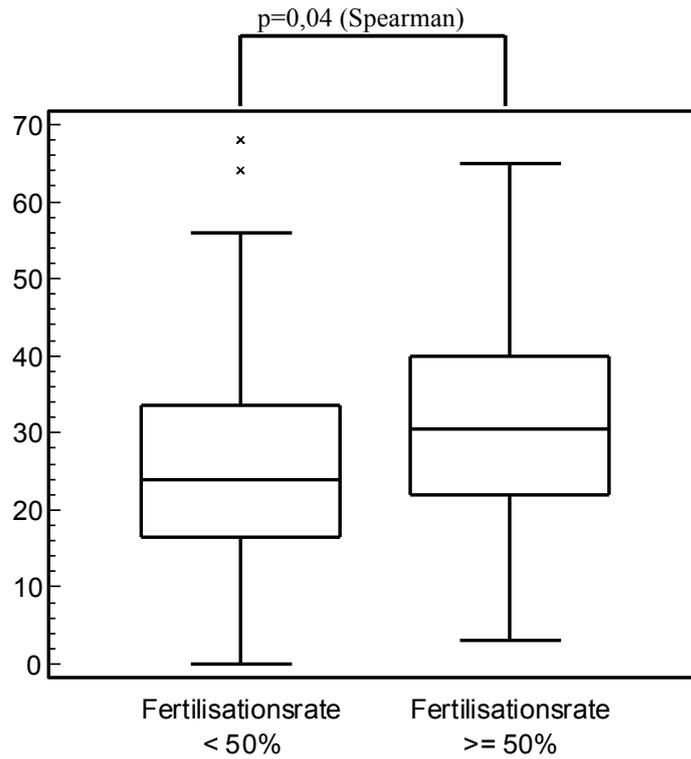


Abbildung 7: Zusammenhang Vitalität (y-Achse) in % mit Schwangerschaft (ja/nein);  $n=60$ ;  $p=0,20$  (Wilcoxon) /  $0,13$  (Median)

**A**



**B**

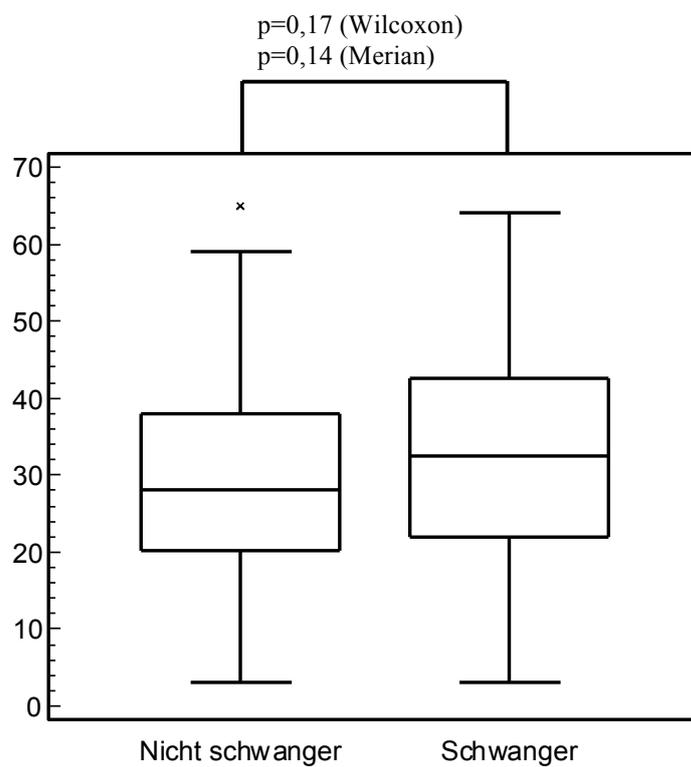


Abbildung 8: Zusammenhang Morphologische Normalformen (y-Achse) in % mit

A) Fertilisationsrate (<50%; ≥ 50%); n=155; p=0,04 (Spearman)

B) Schwangerschaft (ja/nein); n=135; p=0,17 (Wilcoxon) / 0,14 (Median)

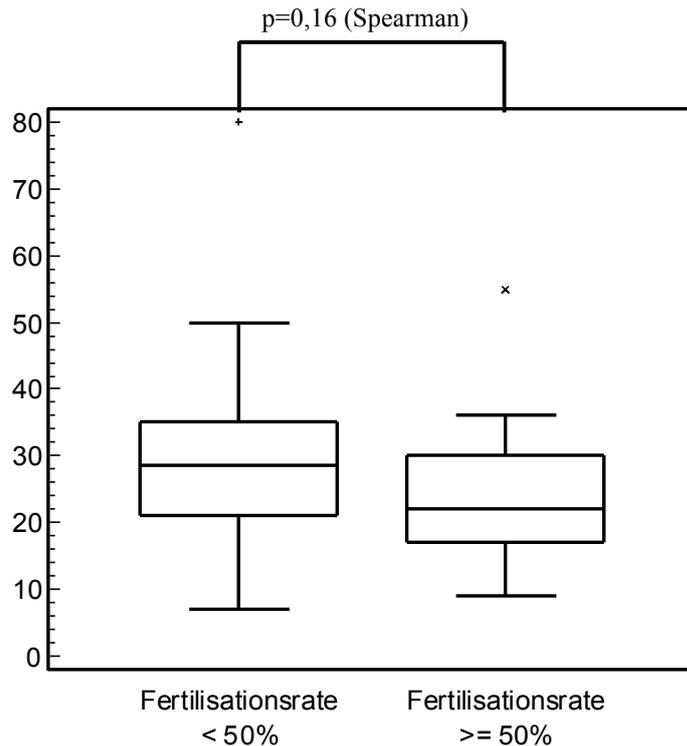


Abbildung 9: Zusammenhang Akrosomale Reaktion maximal/induziert (y-Achse) in % mit Fertilisationsrate (<50%;  $\geq$  50%); n=68; p=0,16 (Spearman)

#### 4.2.2. Einflussfaktoren männlicher Keimzellfunktionen auf ICSI

Nach Durchführung der statistischen Auswertung bestand aufgrund der Ergebnisse bei folgenden Parametern der Verdacht, dass ein Einfluss auf die Resultate der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion vorliegt.

- Gesamtmotilität mit Schwangerschaft (Median: p=0,15)
- Konzentration mit Fertilisationsrate (Spearman: p=0,02) und Embryoscore (Spearman: p=0,11)
- Morphologische Normalformen mit Fertilisationsrate (Spearman: p=0,02) und Embryoscore (Spearman: p=0,13)
- Akrosinaktivitätsindex mit Embryoscore (Spearman: p=0,15)
- Chromatinkondensation mit Fertilisationsrate (Median: p=0,11)

Allen anderen Spermatozoenparametern konnte kein Einfluss auf die Ergebnisse der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion nachgewiesen werden.

Die Korrelation zwischen den Spermatozoenparametern und den Variablen der intrazytoplasmatischen Mikroinjektion und die jeweils verwendeten Tests sind für die

stetigen Parameter in Tabelle 10 und für die Funktions-Spermatozoenparameter in Tabelle 11 dargestellt.

Falls eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,19$  vorlag, wurden mittels Box-and-Whisker-Plots die Zusammenhänge der Spermatozoenparameter und der Parameter der ICSI grafisch in den Abbildungen 10 bis 12 dargestellt. Die Werte der Fertilisationsrate wurden hierfür in  $< 50\%$  bzw.  $\geq 50\%$  geteilt. In den Box-and-Whisker-Plots sind der Median, die 25. und 75. Perzentile, Maximum und Minimum der Verteilung zu sehen, außerdem die Wahrscheinlichkeit für diese Verteilung.

*Tabelle 10: Einfluss der klassischen Ejakulatparameter auf ICSI-Parameter. Ebenso ersichtlich die dazu verwendeten statistischen Tests.*

Spermatozoen-Variable	ICSI-Variable	P	P	R
<b>Gesamtmotilität (n=163)</b>	Fertilisationsrate	0,32	<-- Spearman	-0,08
	Embryoscore	0,25		0,09
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i> <b>0,15</b>	
<b>Progressivmotilität (n=168)</b>	Fertilisationsrate	0,70	<-- Spearman	-0,03
	Embryoscore	0,31		0,08
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i> 0,32	
<b>Spermienkonzentration (n=219)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,02</b>	<-- Spearman	0,16
	Embryoscore	<b>0,11</b>		0,11
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i> 0,31	
<b>Vitalität (n=141)</b>	Fertilisationsrate	0,29	<-- Spearman	-0,09
	Embryoscore	0,81		0,02
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i> 0,69	
<b>Normalformen (n=154)</b>	Fertilisationsrate	<b>0,02</b>	<-- Spearman	0,18
	Embryoscore	<b>0,13</b>		0,12
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i> 0,29	

Tabelle 11: Zusammenhang Spermatozoenfunktionsparameter mit ICSI-Parametern, außerdem verwendete statistische Tests.

Spermatozoen-Variable	ICSI-Variable	P	P	R
<b>Akrosomale Reaktion maximal/induziert (n=39)</b>	Fertilisationsrate	0,56	<-- Spearman	-0,09
	Embryoscore	0,94		-0,01
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosomale Reaktion Induzierbarkeit (n=39)</b>	Fertilisationsrate	0,80	<-- Spearman	-0,03
	Embryoscore	0,56		0,09
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Halodurchmesser (n=33)</b>	Fertilisationsrate	0,77	<-- Spearman	-0,03
	Embryoscore	0,29		0,19
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Index (n=33)</b>	Fertilisationsrate	0,93	<-- Spearman	-0,01
	Embryoscore	<b>0,15</b>		0,24
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Formationsrate (n=33)</b>	Fertilisationsrate	0,97	<-- Spearman	-0,01
	Embryoscore	<b>0,13</b>		0,25
	Schwangerschaft	<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	
<b>Akrosinaktivität Ergebnis (n=42)</b>	Fertilisationsrate	<i>Kruskal-Wallis</i>	<i>Median</i>	
	Embryoscore	0,76	0,94	
	Schwangerschaft	0,23	<b>0,09</b>	
<b>Chromatinkondensation Ergebnis (n=6)</b>	Fertilisationsrate	0,49	<-- Chi-Squ.	
	Embryoscore	0,49		
	Schwangerschaft	0,54		
		<i>Wilcoxon</i>	<i>Median</i>	

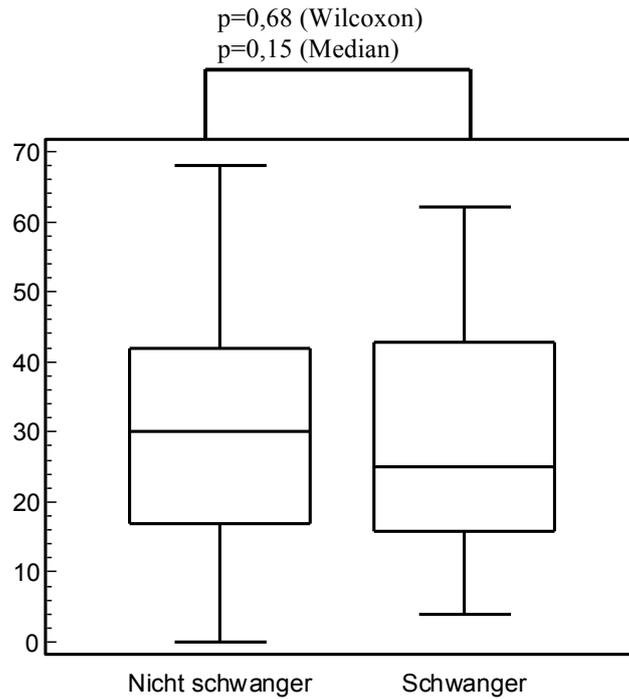


Abbildung 10: Zusammenhang Gesamtmotilität (y-Achse) in % mit Schwangerschaft (ja/nein); n=161; p=0,68 (Wilcoxon) / 0,15 (Median)

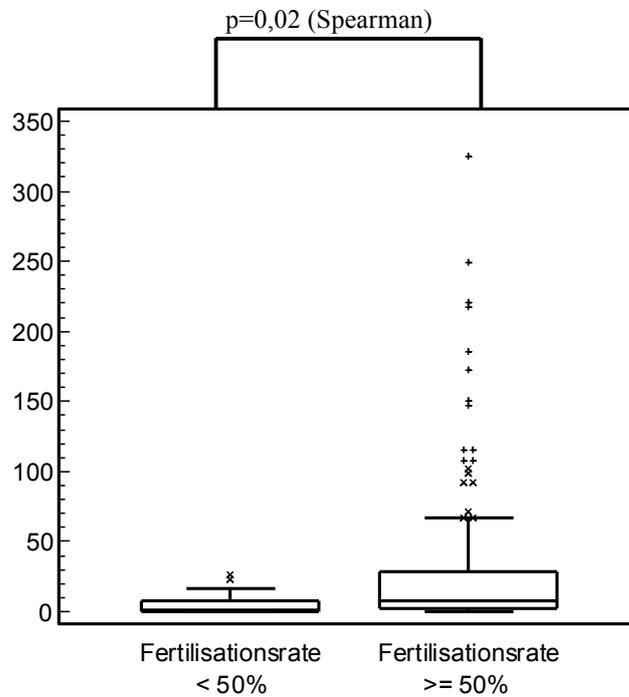


Abbildung 11: Zusammenhang Spermienkonzentration (y-Achse) in Mio. Spermien/ml mit Fertilisationsrate (<50%; ≥ 50%); n=219; p=0,02 (Spearman)

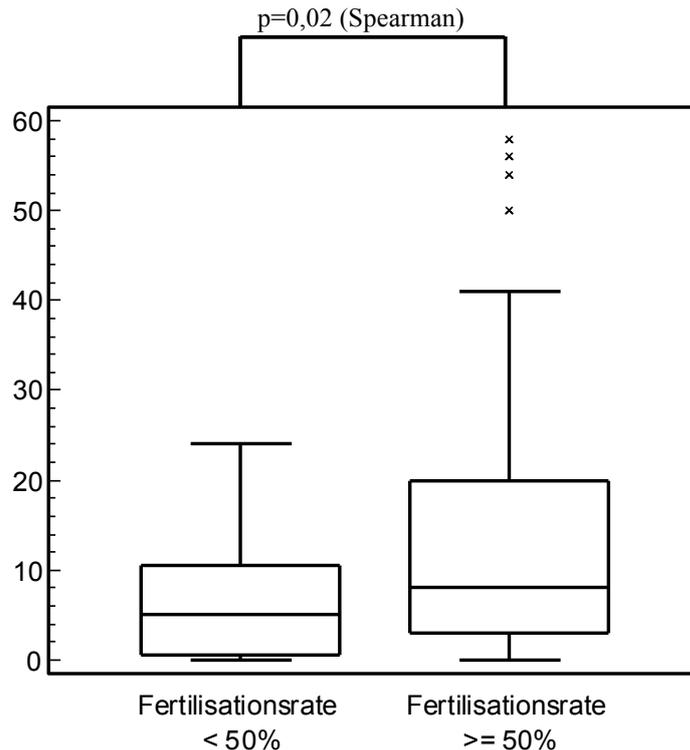


Abbildung 12: Zusammenhang Morphologische Normalformen (y-Achse) in % mit Fertilisationsrate (<50%; ≥ 50%); n=154; p=0,02 (Spearman)

#### 4.3. Multivariate Analyse: Modellerstellung und Wertigkeitsüberprüfung der einzelnen Faktoren

Die eventuell relevante Informationen enthaltenden Parameter wurden genauer untersucht. Die Grenze dafür wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,19$  gesetzt. Bei  $p > 0,19$  wurde die Wahrscheinlichkeit, dass ein Einfluss der Spermatozoenparameter auf die Resultate der Fertilisation erwartet werden kann, als zu gering eingestuft. Aufgrund der zuvor univariat erhaltenen Ergebnisse wurden nun multivariat für die jeweiligen Zielparameter Modelle festgelegt.

Bei der IVF waren dies folgende Ejakulat-Parameter: Gesamtmotilität mit Fertilisationsrate und Schwangerschaft, Progressivmotilität mit Fertilisationsrate, Schwangerschaft und Embryoscore, Konzentration mit Fertilisationsrate, Vitalität mit Schwangerschaft, morphologische Normalformen mit Fertilisationsrate, Schwangerschaft und Embryoscore.

Bei der ICSI waren dies folgende: Gesamtmotilität mit Schwangerschaft, Konzentration mit Fertilisationsrate und Embryoscore, morphologische Normalformen

mit Fertilisationsrate und Embryoscore, Akrosinaktivitätsindex mit Embryoscore, Chromatinkondensation mit Fertilisationsrate.

In den folgenden Tabellen 12 bis 17 sind der Schätzwert (odds ratio), die 95% Konfidenzintervalle und  $p_{wald}$  (=Irrtumswahrscheinlichkeit) für die Einzelparameter der jeweiligen Modelle dargestellt.  $P_{likelihood-ratio}$  gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für das gesamte Modell wieder.

### 4.3.1. IVF

#### 4.3.1.1. Modell Fertilisationsrate

Zunächst wurde nach einem sinnvollen Modell für den Zielparameter „Schwangerschaft“ gesucht. Der Einzelanalyse zu entnehmen war ein Zusammenhang mit der Progressivmotilität ( $p=0,08$  mit Spearman), der Spermienkonzentration ( $p=0,01$  mit Spearman), der Morphologie ( $p=0,04$  mit Spearman) und der maximal induzierten Akrosomalen Reaktion ( $p=0,16$  Spearman).

Demnach konstituierte sich das Modell für die multivariate Analyse folgendermaßen:

$$\text{Fertilisationsrate} = f(\text{Progressivmotilität, Spermienkonzentration, morphologische Normalformen, Akrosomale Reaktion maximal/induziert})$$

Das Modell hat bei einer Gesamt-Irrtumswahrscheinlichkeit  $p_{likelihood\ ratio}$  von 0,05 Aussagekraft auf die Fertilisationsrate. Anzunehmen ist, dass dies im Einzelnen auch eng mit der Morphologie zusammenhängt (bei  $p_{wald}=0,03$ ). Die anderen Parameter weisen deutlich höhere Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeiten auf.

*Tabelle 12: Multivariate Analyse, Zusammenhang IVF und Fertilisationsrate =  $f(\text{progressive Motilität, Konzentration, Morphologie, AR maximal/induziert})$ ;  $n=67$ .*

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenz-intervall	$P_{wald}$
Progressivmotilität	0,72	[0,25; 2,07]	0,54
Spermienkonzentration	2,24	[0,74; 6,77]	0,15
Morph. Normalformen	3,35	[1,14; 9,84]	<b>0,03</b>
AR maximal/induziert	0,63	[0,21; 1,90]	0,41
Modell	<b>P likelihood ratio</b>		<b>0,05</b>

### 4.3.1.2. Modell Schwangerschaft

Ein Modell für den Zielparameter „Schwangerschaft“ wurde nun anhand folgender Einzelparameter erstellt:

- Progressivmotilität mit  $p=0,08$  (Wilcoxon) bzw.  $p=0,14$  (Median) in der Einzelanalyse
- Morphologische Normalformen mit  $p=0,17$  (Wilcoxon) bzw.  $p=0,14$  (Median) in der Einzelanalyse
- Akrosomale Reaktion maximal/induziert mit  $p=0,16$  (Spearman)

Allgemein akzeptiert als Parameter, die die Schwangerschaftsrate beeinflussen, sind die Anzahl der transferierten Embryonen und das Alter der Frau. Diese Parameter flossen ebenfalls in die multivariate Analyse ein.

Folgende Formel wurde für das Modell aufgestellt und untersucht:

$$\text{Schwangerschaft} = f(\text{Progressivmotilität, morphologische Normalformen, Alter der Frau, Anzahl der transferierten Embryonen})$$

In Tabelle 13 ist zu sehen, dass mit Hilfe des Modells bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p_{\text{likelihood ratio}}$  von 0,17 keine sichere Aussage hinsichtlich des Zielparameters „Schwangerschaft“ gemacht werden kann. Zudem ist zu beachten, dass die Anzahl der Embryonen bei einer Wahrscheinlichkeit  $p_{\text{wald}}=0,13$  das Modell eventuell stärker beeinflussen als die anderen Parameter, die größere Wahrscheinlichkeiten aufweisen.

*Tabelle 13: Multivariate Analyse, Zusammenhang IVF und Schwangerschaft = f (Progressivmotilität, morphologische Normalformen, Alter der Frau, Anzahl der transferierten Embryonen); n=128.*

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenz-intervall	$P_{\text{wald}}$
Progressivmotilität	1,51	[0,69; 3,31]	0,3
Morph. Normalformen	1,32	[0,61; 2,87]	0,48
Alter Frau	0,67	[0,31; 1,44]	0,3
Anzahl Embryonen	1,81	[0,84; 3,90]	0,13
Modell	$P_{\text{likelihood ratio}}$		0,17

### 4.3.1.3. Modell Embryoscore

Im ersten Teil wiesen folgende Parameter niedrige Irrtumswahrscheinlichkeiten (mit Spearman untersucht) auf und wurden deshalb in die multivariate Analyse für den Zielparameter Embryoscore aufgenommen:

- Progressivmotilität mit  $p=0,10$  in der Einzelanalyse
- Spermienkonzentration mit  $p=0,19$  in der Einzelanalyse
- Morphologie mit  $p=0,17$  in der Einzelanalyse

Da das Alter der Frau als Einflussfaktor für den Embryoscore allgemein anerkannt ist, wurde dieser Parameter ebenfalls in das Modell mit einbezogen. Es wurde für den Zielparameter „Embryoscore“ folgendes Modell erstellt

$$\text{Embscore} = f(\text{Progressivmotilität, Spermienkonzentration, Morphologie, Alter der Frau})$$

Wie in Tabelle 14 ersichtlich, könnte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,03 das untersuchte Modell eine sinnvolle Aussage darstellen. Die Höhe des Embryoscores könnte so eventuell vorausgesagt werden. Bei ansonsten höher ausfallenden Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeiten scheint hier ein begünstigender Faktor ein jüngeres Alter der Frau zu sein (bei  $p_{\text{wald}}=0,03$ ).

*Tabelle 14: Multivariate Analyse, IVF und Embscore = f (Progressivmotilität, Spermienkonzentration, morphologische Normalformen, Alter der Frau); n=156.*

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenz-intervall	P <sub>wald</sub>
Progressivmotilität	1,55	[0,79; 3,03]	0,2
Spermienkonzentration	0,89	[0,46; 1,71]	0,72
Morph. Normalformen	1,6	[0,82; 3,14]	0,17
Alter Frau	0,48	[0,25; 0,92]	<b>0,03</b>
Modell	P likelihood ratio		<b>0,03</b>

### 4.3.2. ICSI

#### 4.3.2.1. Modell Fertilisationsrate

Die univariate Analyse mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman im ersten Teil der Untersuchung ergab Anhaltspunkte auf einen Zusammenhang der Spermatozoendichte ( $p=0,02$ ) und der Morphologie ( $p=0,02$ ) auf die Fertilisationsrate

bei intrazytoplasmatischer Spermieninjektion. Folgendermaßen stellt sich das Modell für die multivariate Analyse dar:

$$\text{Fertilisationsrate} = f(\text{Konzentration, Morphologie})$$

Nach statistischer Prüfung des Modells kommt es, wie in Tabelle 15 ersichtlich, zu keiner zufriedenstellenden Aussage in Bezug auf die Fertilisationsrate. Weder die Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeiten der Teilkomponenten ( $p_{\text{wald}}=0,33$  beim Parameter „Dichte“ bzw.  $p_{\text{wald}}=0,85$  beim Parameter „Morphologische Normalformen“) noch die Gesamt-Irrtumswahrscheinlichkeit  $p_{\text{likelihood ratio}}=0,58$  scheinen einen Einfluss auf den Zielparameter „Fertilisationsrate“ zu haben.

*Tabelle 15: Multivariate Analyse, ICSI und Fertilisationsrate = f (Spermienkonzentration, morphologische Normalformen); n=154.*

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenzintervall	P <sub>wald</sub>
Spermienkonzentration	1,41	[0,71; 2,80]	0,33
Morph. Normalformen	1,06	[0,56; 2,02]	0,85
Modell	P likelihood ratio		0,58

#### 4.3.2.2. Modell Schwangerschaft

Für das Modell mit dem Zielparameter „Schwangerschaft“ wurde die Gesamtmotilität bei  $p=0,15$  (mit Median-Test) bzw.  $p=0,68$  (mit Wilcoxon-Test) in der Einzelanalyse als Parameter verwendet. Zusätzlich mit einbezogen wurden das Alter der Frau und die Anzahl der transferierten Embryonen.

$$\text{Schwangerschaft} = f(\text{Gesamtmotilität, Alter, Anzahl Embryonen})$$

Tabelle 16 zeigt die multivariate Analyse dieses Modells. Wegen der  $p_{\text{likelihood ratio}}$  von 0,37 ist davon auszugehen, dass das Modell keine Aussage bezüglich seines Zielparameters geben kann. Höchstens die Gesamtmotilität mit  $p=0,08$  könnte in diesem Modell eine Auswirkung auf die Schwangerschaft haben, wobei jedoch die Gesamtmotilität folgende, nicht erwartete Wirkung auf Schwangerschaft hat: So ist das Auftreten einer Schwangerschaft seltener bei einer hohen Gesamtmotilität der Spermatozoen.

Tabelle 16: Multivariate Analyse, ICSI und Schwangerschaft = f (Gesamtmotilität, Alter, Anzahl Embryonen); n=152.

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenz-intervall	P <sub>wald</sub>
Gesamtmotilität	0,55	[0,28; 1,07]	<b>0,08</b>
Alter Frau	1,08	[0,55; 2,11]	0,82
Anzahl Embryos	1,03	[0,50; 2,10]	0,94
Modell	P likelihood ratio		0,37

#### 4.3.2.3. Modell Embryoscore

Aufgrund der Einzelanalyse sind folgende Parameter bezüglich des Zielparameters „Embryoscore“ untersucht worden:

- Morphologie mit p=0,13 (Spearman)
- Spermienkonzentration mit p=0,11 (Spearman)
- Akrosinaktivität Formationsrate mit p=0,13 (Spearman)

Zusätzlich wurde das Alter der Frau als Einzelparameter berücksichtigt.

Embryoscore = f(Spermienkonzentration, morphologische Normalformen, Akrosinaktivität Formationsrate, Alter der Frau)

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 17 ersichtlich, ist in diesem Datensatz mittels eines Modells keine befriedigende Darstellung des Embryoscore möglich. Weder die Gesamtirrtumswahrscheinlichkeit (p<sub>likelihood ratio</sub>=0,87) noch die Irrtumswahrscheinlichkeiten der einzelnen Parameter (p<sub>wald</sub> von 0,39 bis 0,69) geben darauf Hinweise.

Tabelle 17: Multivariate Analyse, ICSI und Embscore = f (Spermienkonzentration, morphologische Normalformen, AA Formationsrate, Alter der Frau); n=36.

Einflussparameter	Schätzwert (odds ratio)	95% Konfidenz-intervall	P <sub>wald</sub>
Spermienkonzentration	0,59	[0,04; 8,23]	0,69
Morph. Normalformen	0,5	[0,10; 2,42]	0,39
AA Formationsrate	1,72	[0,32; 9,16]	0,53
Alter Frau	1,72	[0,35; 8,38]	0,5
Modell	P likelihood ratio		0,87

#### **4.4. Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen**

Nachdem sinnvolle Modelle wider Erwarten nur in zwei Fällen ansatzweise gelangen und auch univariate Analysen nicht die erwünschte Aussagekraft in Bezug auf Vorhersage besaßen, wurde nach einer Ursache hierfür gesucht. Bei sehr vielen der insgesamt 2.098 Patienten wurden häufiger als nur einmal Ejakulate untersucht. Dies ergab die Gelegenheit, die intraindividuelle Variabilität verschiedener Parameter zu bestimmen. Bei Durchsicht der Daten fällt die große Variabilität auf, die zwischen den Patienten zu den einzelnen Zeitpunkten und auch innerhalb eines Patienten über die verschiedenen Zeitpunkte beobachtet werden kann. Diese große intra- und interindividuelle Variabilität kann mit eine Ursache der ~~schlechten~~ schwachen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern bzw. zwischen den Effekt- und erklärenden Variablen sein.

##### **4.4.1. Deskriptive Statistik**

Zum besseren Verständnis dieser Streubreite werden im Folgenden die Patienten mit einer mindestens zweimaligen Untersuchung ihrer Parameter deskriptiv beschrieben. Bei diesem Kollektiv wurde das Vorliegen einer Therapie nicht nachgeprüft. Tabelle 18 beschreibt deskriptiv die Anzahl der Patienten, bei denen mindestens zweimal eine Messung der verschiedenen Tests durchgeführt worden ist und die Verteilung der jeweils gemessenen Werte (Minimum, Median und Maximum, 1. und 3. Quartil).

*Tabelle 18: Deskriptive Aufstellung Patienten mit zweimaliger Messung der verschiedenen Ejakulat- bzw. Spermatozoenfunktionsparameter*

Parameter	Anzahl Probanden	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
Spermienkonzentration (Mio./ml)	1.100	0,0	4,5	24,8	70,6	740,0
Normalformen (%)	853	0,0	9,0	19,0	32,0	77,0
Gesamtmotilität (%; WHO a+b)	909	0,0	30,0	44,0	54,0	78,0
Progressivmotilität (%; WHO a)	990	0,0	16,0	34,0	48,0	75,0
AR spontan (%)	183	1,0	7,0	12,0	18,0	81,0
AR maximal/induziert (%)	183	4,0	12,0	16,0	24,0	88,0
AR Induzierbarkeit (%)	182	0,0	2,0	4,0	6,0	28,0
AA - Halodurchmesser (%)	170	0,0	0,0	10,5	12,5	55,0
AA - Formationsrate (%)	148	0,0	0,0	32,0	48,0	89,0
AA - Index	149	0,0	0,0	3,4	5,8	28,3

Um grafisch die große Variabilität der zweimal gemessenen Werte zu demonstrieren, folgen nun für die einzelnen Variablen Grafiken. Die erste Messung in den Jahren 1998 oder 1999 stellt auch den ersten Wert in den Grafiken dar. Der Abstand zwischen erster und zweiter Messung beträgt maximal 90 Tage (=etwa ein Spermatozyklus).

Auf den nun folgenden Abbildungen 13 bis 15 sind die Wiederholungsmessungen aufgetragen, die erste Messung wurde auf der x-Achse aufgetragen und die zweite Messung auf der y-Achse. Die hier dargestellte Streubreite demonstriert die große Variabilität bei Wiederholungsmessungen.

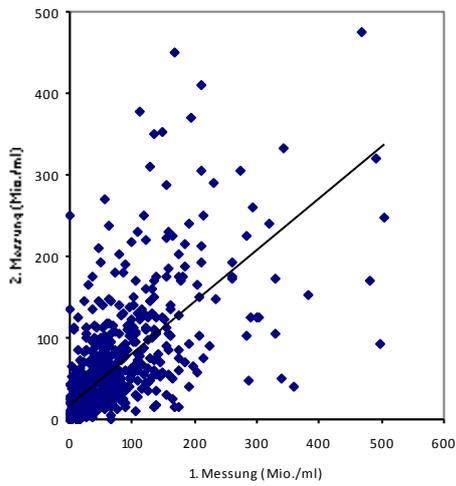
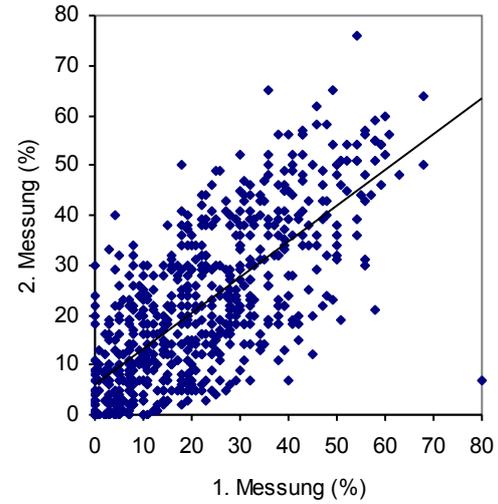
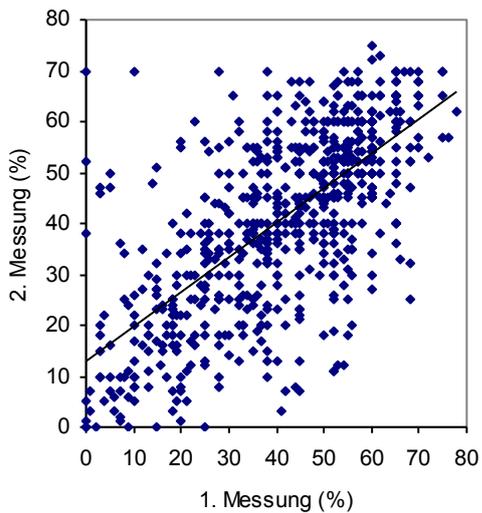
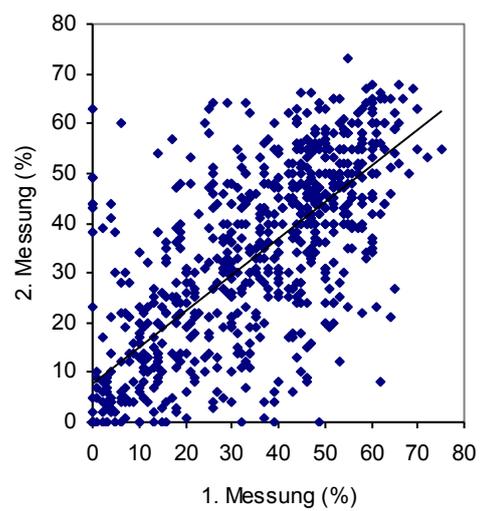
**A****B****C****D**

Abbildung 13: Wiederholungsmessungen, klassische Ejakulatparameter, zweimal gemessen, jeweils mit linearer Trendlinie

A) Spermienkonzentration (Mio./ml), Zeitraum: 2 - 90 Tage. n=858.

B) Morphologische Normalformen (%), Zeitraum 2 - 90 Tage. n=658.

C) Gesamtmotilität (%), Zeitraum 1 - 90 Tage. n=708.

D) Progressivmotilität (%), Zeitraum 1 - 90 Tage. n=767.

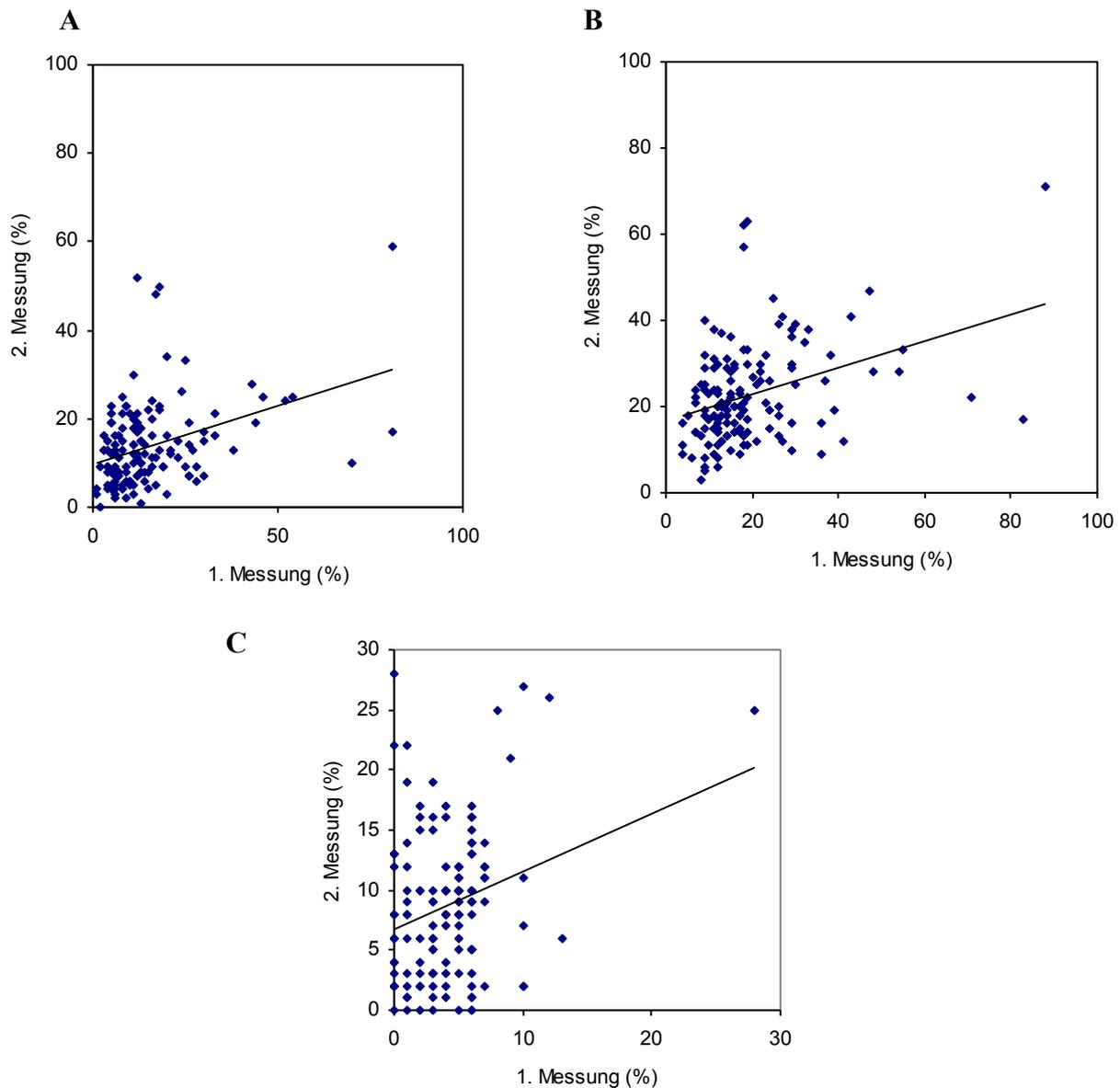


Abbildung 14: Wiederholungsmessungen, Akrosomale Reaktion:

- A) Akrosomale Reaktion spontan (%), zweimal gemessen, Zeitraum 15 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 141. Lineare Trendlinie.
- B) Akrosomale Reaktion maximal / induziert (%), zweimal gemessen, Zeitraum 15 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 141. Lineare Trendlinie.
- C) Akrosomreaktion Induzierbarkeit (%), zweimal gemessen, Zeitraum 15 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 141. Lineare Trendlinie.

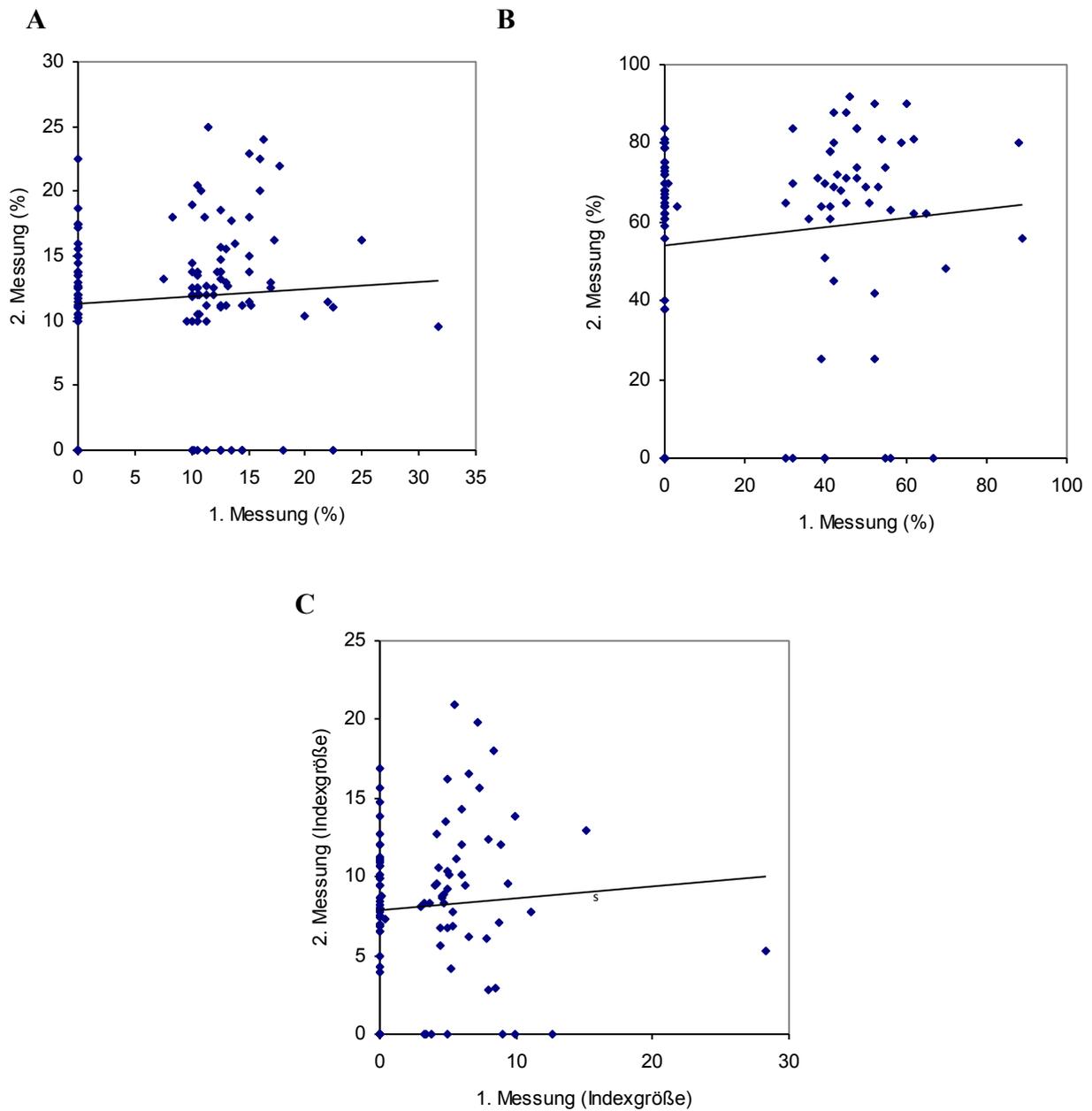


Abbildung 15: Wiederholungsmessungen, Akrosinaktivität:

- A) Akrosinaktivität, Halodurchmesser (%), zweimal gemessen, Zeitraum 20 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 123. Lineare Trendlinie.
- B) Akrosinaktivität Formationsrate (%), zweimal gemessen, Zeitraum 20 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 123. Lineare Trendlinie.
- C) Akrosinaktivität Index, zweimal gemessen, Zeitraum 20 - 90 Tage, Anzahl Patienten: 123. Lineare Trendlinie.

#### 4.4.2. Spermienkonzentration, Morphologie, Gesamt- und Progressivmotilität

Um die klassischen Ejakulatparameter Spermienkonzentration, Gesamtmotilität, Progressivmotilität und Morphologie auf inter- und intraindividuelle Variabilität zu untersuchen, wurden 26 Patienten ausgewählt, bei denen mindestens fünf Mehrfachmessungen der jeweiligen Spermatozoenparameter vorlagen. Aus diesem Kollektiv wurden zur Untersuchung der intraindividuellen Variabilität dann fünf Patienten ausgewählt, bei denen bei fünf Messzeitpunkten und in der dazwischenliegenden Zeit keine Therapie stattgefunden hatte.

Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen des jeweiligen Parameters für diese Patienten sind in Tabelle 19 enthalten, sie stellt die Verteilung der Parameter zum Zeitpunkt der ersten Messung mit logarithmierten Werten dar. Es zeigt sich deutlich, dass von Normalverteilung der einzelnen Parameter nicht auszugehen ist.

*Tabelle 19: Verteilung der Parameter zum Zeitpunkt der ersten Messung, klassische Ejakulatparameter, 26 Patienten, logarithmierte Werte.*

Parameter	Anzahl Patienten	geometrisches Mittel ( $\bar{x}$ )	2s-Intervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
Spermienkonzentration (Mio./ml)	26	21,07	2,12	209,13
Gesamtmotilität (%)	26	32,20	7,36	140,78
Progressivmotilität (%)	25	29,23	9,57	89,29
Morph. Normalformen (%)	24	14,70	1,86	115,99

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die große Variabilität wurde untersucht, ob sich Hinweise auf zeitliche Tendenzen aufzeigen lassen. Problematisch bei dieser Analyse war, dass die Abstände zwischen den einzelnen Untersuchungen innerhalb eines Patienten und zwischen den Patienten erheblich schwankten. Zur grafischen Darstellung der Verläufe von Patienten mit mindestens 5 Beobachtungszeitpunkten wurden X-Y-Plots erzeugt (x = Zeitachse, y = jeweiliger Parameter) (Abbildungen 16 A - D).

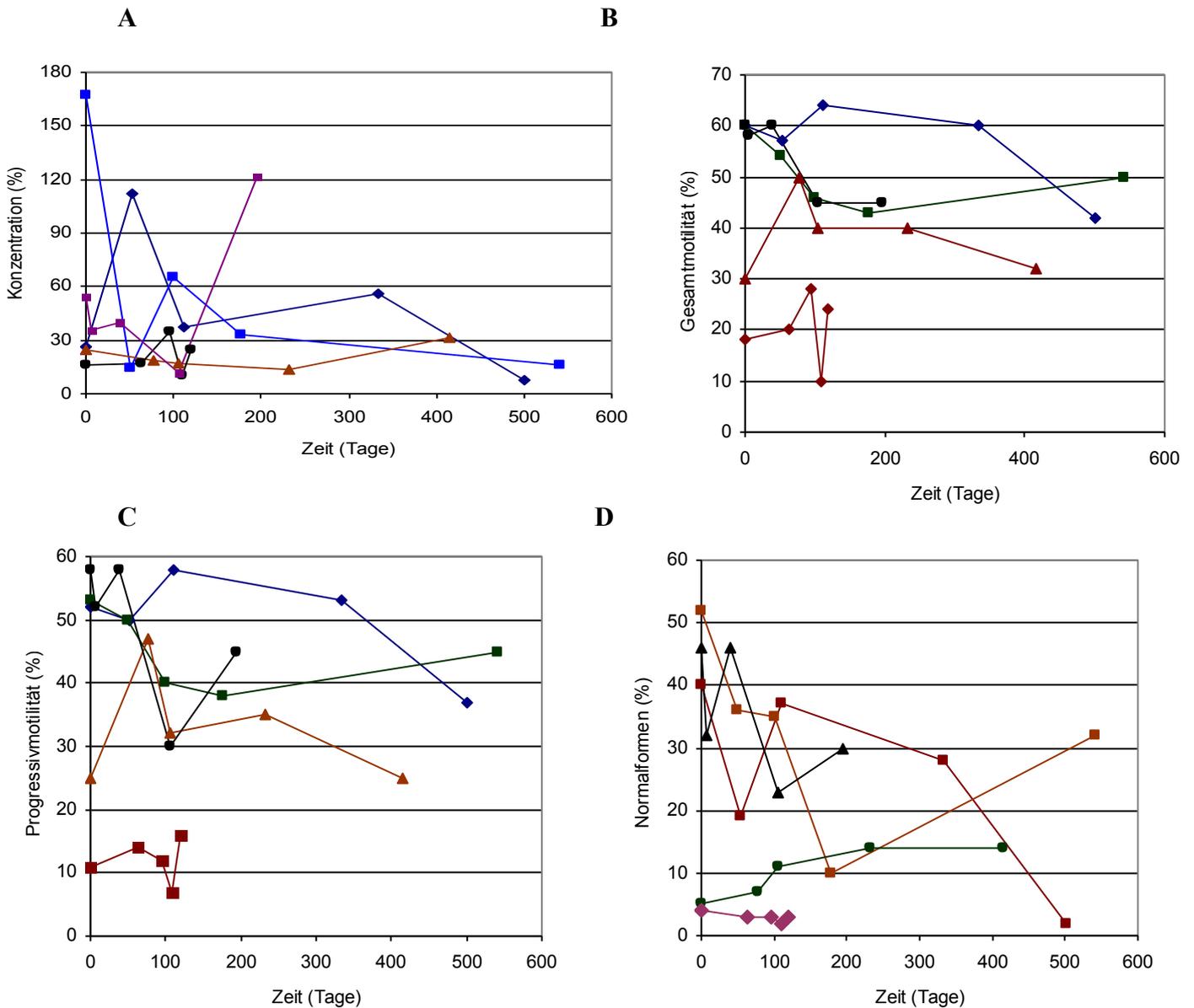


Abbildung 16: Klassische Ejakulatparameter, Werteverlauf bei 5 Wiederholungsmessungen, 5 Patienten jeweils ohne Therapie.

- A) Spermienkonzentration
- B) Gesamtmotilität
- C) Progressivmotilität
- D) Morphologische Normalformen

Wie den Darstellungen deutlich zu entnehmen ist, liefern sie keinen Hinweis auf irgendeine zeitliche Tendenz.

Im Folgenden wurde versucht, Schätzwerte für die inter- und intraindividuelle Variabilität zu finden. Von 5 Patienten mit 5 aufeinanderfolgenden Beobachtungszeitpunkten, für die innerhalb dieses Beobachtungszeitraums keine Therapie durchgeführt wurde, wurde die intra- und interindividuelle Variabilität geschätzt. Mit Hilfe der Varianzkomponentenzerlegung (VKZ) konnte aus den Daten ein fehlerfreier Schätzwert für die inter- und intraindividuellen Variabilitäten gewonnen werden. Das dabei verwendete Modell beinhaltete als zufällige Faktoren den Patienten und die Beobachtungswiederholung. Dabei war die Beobachtungswiederholung von Patienten abhängig. Da von Normalverteilung nicht auszugehen war, wurde für die beobachteten Werte der fünf Patienten mit den fünf Beobachtungszeitpunkten eine logarithmische Transformation durchgeführt (siehe Tabelle 20). Beim Vergleich der interindividuellen mit der intraindividuellen Variabilität ist festzustellen, dass die intraindividuelle Variabilität nicht, wie zu erwarten, deutlich kleiner als die interindividuelle Variabilität ist.

*Tabelle 20: Varianzkomponentenzerlegung der klassischen Ejakulatparameter, 5 Patienten mit 5 Wiederholungsmessungen, logarithmierte Werte.*

Parameter	Geometr. Mittel ( $\bar{x}$ )	Intraindividuelle Variabilität 2s-Intervall		Interindividuelle Variabilität 2s-Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze	Untere Grenze	Obere Grenze
Spermienkonzentration (Mio./ml)	28,91	6,02	138,81	22,79	36,68
Gesamtmotilität (%)	40,34	25,45	63,92	15,15	107,43
Progressivmotilität (%)	32,92	20,27	53,45	8,60	125,93
Morph. Normalformen (%)	13,68	3,53	52,98	1,63	114,48

#### 4.4.3. Akrosomale Reaktion

Von den 183 Patienten mit zweimaliger Messung der akrosomalen Reaktion in den Jahren 1998/99 wurde bei 15 die akrosomale Reaktion dreimal bestimmt, diese wurden als eigene Untergruppe ebenfalls nochmals untersucht. In Tabelle 21 ist die Verteilung der Variablen zum Zeitpunkt der ersten Messung dargestellt.

*Tabelle 21: Deskriptive Beschreibung, akrosomale Reaktion: Verteilung der Parameter zum Zeitpunkt der ersten Messung, 15 Patienten.*

<b>Parameter</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Minimum</b>	<b>1. Quartil</b>	<b>Median</b>	<b>3. Quartil</b>	<b>Maximum</b>
AR spontan (%)	15	8,0	12,0	14,0	23,0	46,0
AR maximal/induziert (%)	15	9,0	14,0	18,0	32,0	47,0
AR Induzierbarkeit (%)	15	0,0	1,0	2,0	6,0	20,0

Zur Illustration der zeitlichen Schwankungen innerhalb und zwischen den Patienten wurden in Grafiken diejenigen Patientenwerte aufgetragen, deren dritter Messzeitpunkt maximal 200 Tage vom ersten Messzeitpunkt entfernt war. Abbildung 17 A-C nach zu urteilen, schwanken die Messungen sowohl intraindividuell als auch interindividuell erheblich.

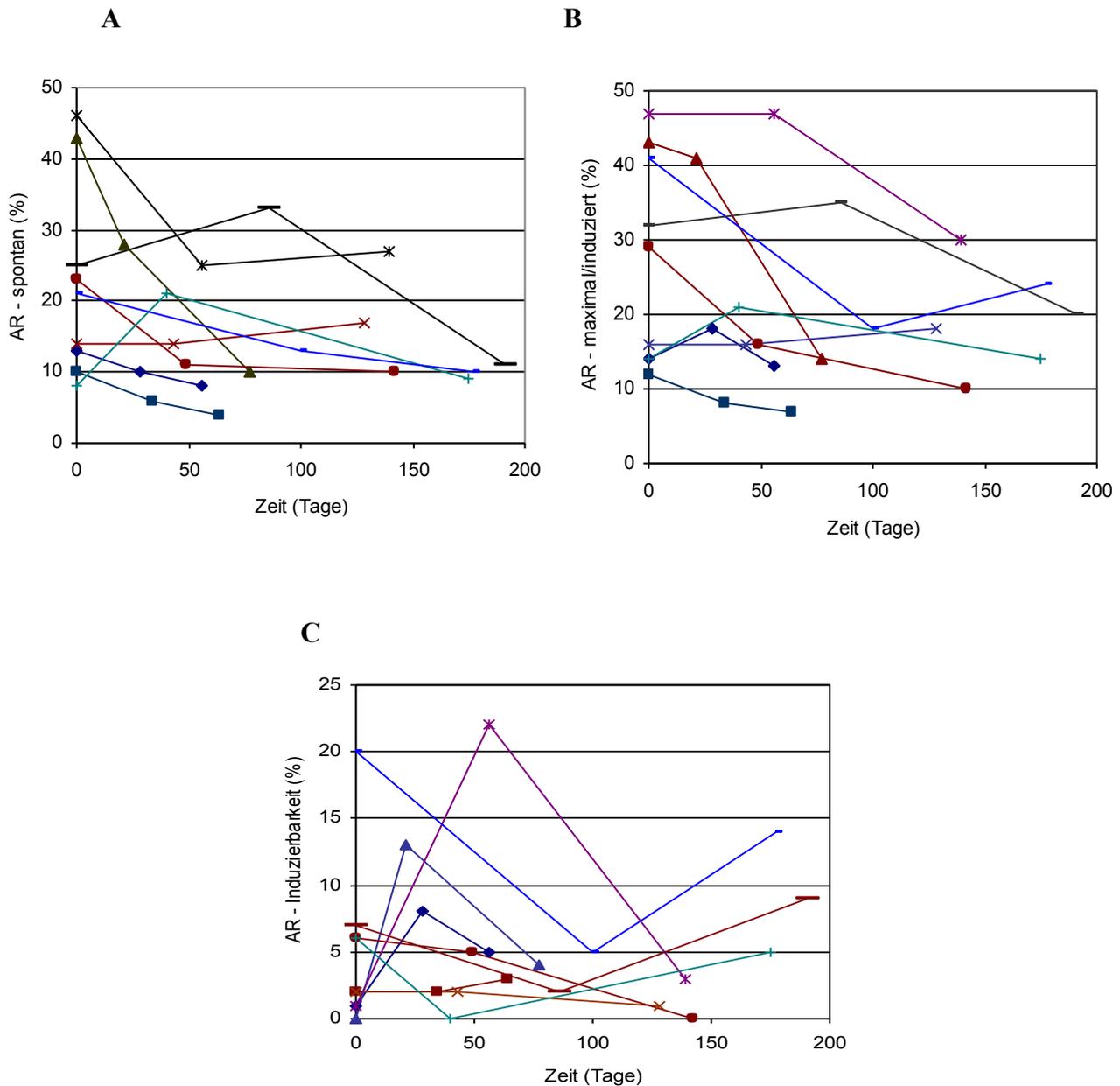


Abbildung 17: Akrosomale Reaktion, Werteverlauf bei 3 Wiederholungsmessungen innerhalb von 200 Tagen, 9 Patienten.

- A) Akrosomale Reaktion, spontan
- B) Akrosomale Reaktion, maximal/induziert
- C) Akrosomale Reaktion, Induzierbarkeit

Nun wurde die Variabilität genauer untersucht, es sollten Schätzwerte für die inter- und interindividuelle Variabilität gefunden werden. Dies geschah wiederum mittels Varianzkomponentenzerlegung.

Als Problem stellte sich jedoch dar, dass aufgrund der Datenlage eine Transformation mittels Logarithmierung nicht möglich war („Null“ als Wert nicht logarithmierbar) und von einer Normalverteilung auf keinen Fall auszugehen war. Dies erschwerte eine Aussage bezüglich der Variabilität. Trotzdem kann ein kleiner Ausblick gegeben werden, zur besseren Übersichtlichkeit werden in Tabelle 22 (wie schon bei den klassischen Spermatozoenparametern) bei der Darstellung der Varianzkomponentenzerlegung 2s-Intervalle angegeben.

*Tabelle 22: VKZ, 15 Patienten, 3 Wiederholungsmessungen, unlogarithmierte Werte.*

Parameter	$\bar{x}$	Intraindividuelle Variabilität		Interindividuelle Variabilität	
		2s-Intervall		2s-Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze	Untere Grenze	Obere Grenze
AR spontan (%)	17,73	-1,19	36,66	4,15	31,32
AR maximal/induziert (%)	23,71	4,47	42,95	4,90	42,52
AR Induzierbarkeit (%)	5,93	-5,01	16,88	2,31	9,56

Auch bei diesen Parametern ist keine eindeutig kleinere intraindividuelle als interindividuelle Variabilität ersichtlich.

#### 4.4.4. Akrosinaktivität

Zur Überprüfung der Variabilität der Akrosinaktivität dienten als Ausgangskollektiv die Daten der 170 Probanden, die innerhalb der Jahre 1998/99 zwei Messungen der Akrosinaktivität erhalten hatten. Aus dieser Gruppe wurden 7 Patienten gesondert untersucht, bei denen alle drei Parameter der Akrosinaktivität mindestens dreimal gemessen wurden. Tabelle 23 stellt die deskriptive Auswertung der Parameter zum ersten Messzeitpunkt dar.

*Tabelle 23: Deskriptiv, Akrosinaktivität: Verteilung der Parameter zum Zeitpunkt der ersten Messung, 7 Probanden.*

Parameter	Anzahl Probanden	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
AA Halodurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	7	9,5	10,0	12,5	16,3	18,0
AA Formationsrate (%)	7	3,0	32,0	42,0	50,0	55,0
AA Index	7	0,5	3,2	4,4	7,3	9,9

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigt sich eine große Variabilität. Anzumerken ist, dass die Messungen sowohl innerhalb als auch zwischen den Patienten in verschiedenen Abständen gemessen wurden.

Um die intra- und interindividuellen Schwankungen zu veranschaulichen, wurden in Abbildung 18 A – C die Verläufe dieser Patienten grafisch dargestellt. Die Anzahl der Patienten unterscheidet sich je nach Parameter, da bei manchen Patienten nicht sämtliche Variablen bestimmbar waren.

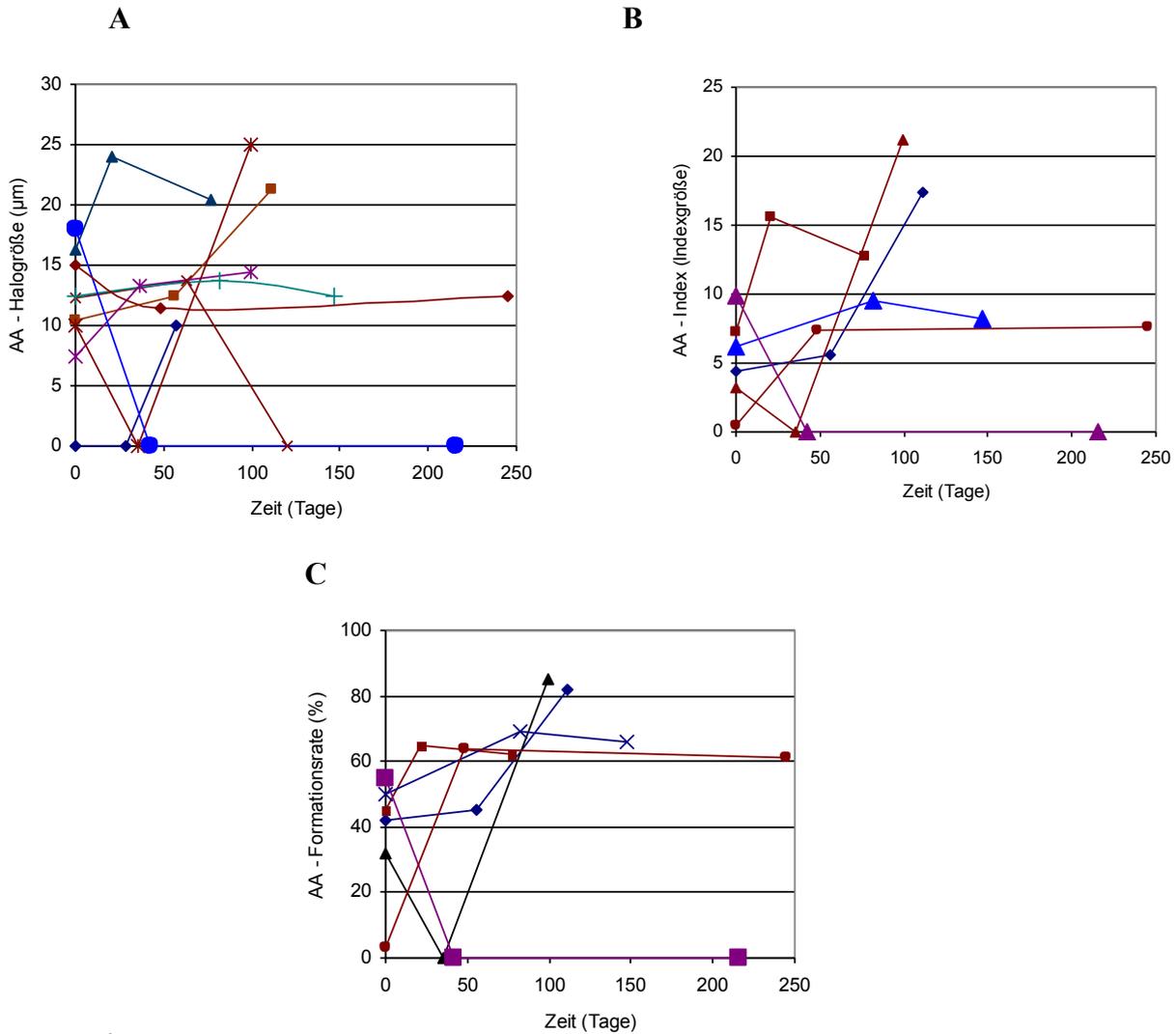


Abbildung 18: Akrosinaktivität, Werteverlauf bei 3 Wiederholungsmessungen innerhalb von 250 Tagen.

- A) Akrosinaktivität-Halodurchmesser, 9 Patienten
- B) Akrosinaktivität-Formationsrate, 6 Patienten.
- C) Akrosinaktivität-Index, 6 Patienten.

Wie ersichtlich ist, können die Darstellungen keinen Anhaltspunkt auf intraindividuelle Zusammenhänge geben.

Die Schätzung der intra- und interindividuellen Variabilität war aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs nicht möglich. Trotzdem kann die deskriptive sowie die grafische Beschreibung als ein Richtungsweiser für die fehlende Zuverlässigkeit von Wiederholungsmessungen gesehen werden.

## 5. DISKUSSION

Das im Rahmen dieser Arbeit erhobene klassische Spermiogramm wurde anhand der WHO-Kriterien (WHO 1992, 1999) und der Düsseldorf-Klassifikation zur Beurteilung der Spermienmorphologie (Hofmann & Haider 1985; Hofmann et al., 1995) bewertet. Zusammen mit den funktionellen Spermatozoenparametern stellt dies die Basisdiagnostik der Andrologie dar.

### 5.1. IVF

Die konventionelle *in-vitro* Fertilisation ist ein weltweit etabliertes Verfahren zur Behandlung männlicher oder weiblicher Infertilität. Dabei sind die klassischen Ejakulatparameter Konzentration, Motilität und Morphologie Basisparameter zur Beurteilung männlicher Infertilität (Dohle et al., 2005; Devroey et al., 2009). Die Diagnostik in der Andrologie erhält in den letzten Jahren auch wertvolle Informationen durch die Spermatozoenfunktionsdiagnostik (Henkel & Schill, 2000; Lefièvre et al., 2007; Barroso et al., 2009; Zini & Sigman 2009). Zwei große Aufgaben der andrologischen Diagnostik sind zum einen die Beurteilung, welche Technik für die assistierten Reproduktion im Einzelfall die beste ist und zum anderen die Voraussage des Erfolgs der dann gewählten Technik.

In zahlreichen Studien wurde der prognostische Stellenwert der oben genannten Parameter für den IVF-Erfolg aus demselben Ejakulat ermittelt, das dann auch für die IVF-Behandlung verwendet wurde. Allerdings braucht die klinische Praxis vor allem Tests, mit deren Hilfe noch vor Therapiebeginn z.B. der Erfolg der IVF vorhergesagt und nötigenfalls eine alternative Behandlungsmethode wie die ICSI empfohlen werden kann. Wie zuvor dargestellt, sollte aufgrund des zeitlichen Ablaufs im klinischen Alltag die Auswirkung des Faktors *Zeit* in dieser Arbeit untersucht werden. Der Abstand zwischen Untersuchung der Ejakulatparameter und der IVF betrug 12 bis maximal 190 Tage, im Median 93 Tage.

Die Ergebnisse unterschieden sich zum Teil erheblich von der vorliegenden Literatur bezüglich Voraussagequalität der Spermatozoenparameter für die Resultate der IVF. Deshalb wurde in der Diskussion ein ganzer Abschnitt diesem Thema gewidmet und separat über den Faktor *Zeit* und die intra-individuelle Variabilität diskutiert.

### 5.1.1. Spermienkonzentration

Es ist allgemein anerkannt, dass die Spermienkonzentration signifikante Zusammenhänge zum Fertilisationspotential *in vivo* aufweist (Bostofte et al., 1982; Ayala et al., 1996; Bonde et al., 1998; Guzick et al., 2001). Dabei wandelten sich im Laufe der Zeit die Referenzwerte von höheren zu niedrigeren Werten (Macomber & Sanders, 1929:  $\geq 60$  Mio./ml; MacLeod & Gold, 1951:  $\geq 40$  Mio./ml; WHO, 1992 und 1999:  $\geq 20$  Mio./ml; Cooper et al., 2010:  $\geq 15$  Mio./ml). Für die letztgenannte Revision der WHO-Referenzwerte wurden erstmals Daten von über 4.500 Männern aus 14 Ländern (4 Kontinenten) analysiert, als wesentliche Referenz-Population dienten Väter, bei deren Partnerinnen weniger als 12 Monate bis zum Eintritt der Schwangerschaft vergangen waren (Cooper et al., 2010). Für die Berechnung der unteren Referenzgrenzen der klassischen Ejakulatparameter wurde jeweils die 5. Perzentile zugrunde gelegt, obere Referenzgrenzen sind bei der Beurteilung der Ejakulatqualität nicht relevant. Andererseits belegen zahlreiche Studien signifikante Unterschiede hinsichtlich der Spermatozoenkonzentration zwischen fertilen und infertilen Männern (David et al., 1979; Silber, 1989; Ombelet et al., 1997; Guzick et al., 2001), wobei auch über Fälle erfolgreicher Fertilisation bei extremer Oligozoospermie berichtet wurde (Sokol & Sparkes, 1987). Ebenso kann eine Polyzoospermie mit reduzierter Fertilität einhergehen, weil *in vitro* nur vereinzelt die akrosomale Reaktion abläuft und eine reduzierte Akrosinaktivität vorliegt (Töpfer-Petersen et al., 1987). Für die vorliegende Arbeit wurde der im Beobachtungszeitraum geltende Grenzwert der WHO ( $\geq 20$  Mio./ml; WHO 1992, 1999) verwendet.

Die durchschnittliche Spermienkonzentration der Männer, die am IVF-Programm teilnahmen, lag bei 67,4 Mio. Spermien/ml (Spannweite 4,4 - 540 Mio./ml). Ungeachtet einer geringen Korrelation zur Fertilisationsrate ( $r=0,21$ ), wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,01$  ein signifikanter Zusammenhang zur Fertilisationsrate gefunden. Der Embryoscore sowie die Schwangerschaftsrate wiesen dagegen keinen Zusammenhang mit der Spermienkonzentration auf. Mittels Box-and-Whisker-Plots wurde die Variable Fertilisationsrate dichotomisiert. Als klinisch relevant gilt eine Unterteilung in 0 - 49% und 50 - 100%. In der zweiten Gruppe sind insgesamt höhere Spermatozoenkonzentrationen zu erkennen.

Auch Wolf et al. (1984) fanden eine signifikant niedrigere Fertilisationsrate bei reduzierter Spermatozoenkonzentration. Ergebnisse von Ashkenazi et al. (1996),

Hammadeh et al. (1997), Duran et al. (1998) und Obara et al. (2001) bestätigten diesen Zusammenhang. Bei einer Dichte von < 20 Mio. Spermien/ml wiesen Hirsch et al. (1986) eine signifikant reduzierte Fertilisationsrate nach, wohingegen Gibbons et al. (1987) bei einer Spermiedichte unter 10 Mio. Spermien/ml einen signifikanten Effekt auf die Fertilisationsrate postulierten.

Enginsu et al. (1991) und MacLeod et al. (1994) konstatierten der Spermatozoenkonzentration hingegen nur ein limitiertes Potential als Prädiktor für IVF-Erfolg. Ebenso argumentierten Hinting et al. (1992), die das Vermögen der Variable *Spermatozoenkonzentration*, Erfolg und Misserfolg einer IVF-Behandlung vorhersagen zu können, niedriger einschätzen als es *in vivo* der Fall ist.

Zu betonen ist, dass in der vorliegenden Arbeit keine Aufbereitungstechniken zur Bestimmung der Konzentration verwendet wurden und dies eine mögliche Begründung für die geringe Korrelation darstellt. Für die IVF werden *immer* aufbereitete Spermien eingesetzt. So beschrieben Hammadeh et al. (2001b), dass durch Anwendung von SpermPrep eine signifikant höhere Spermatozoenkonzentration erreicht wird. Bei Henkel et al. (1994a) bewirkte die Glaswollfiltration ebenfalls eine starke Anhebung der Spermatozoenkonzentration.

Im Unterschied zu den hier zitierten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit - wie bereits erwähnt - ein zeitlicher Abstand zwischen Spermogramm und IVF von 12 bis 190 Tagen vor.

### **5.1.2. Motilität**

Die Motilität ist von essentieller Bedeutung für den Fertilisationsvorgang. Dabei müssen die Spermien nicht nur die Fähigkeit haben, den weiblichen Reproduktionstrakt bis zu den Tuben zu durchqueren, sondern auch ein bestimmtes Bewegungsmuster für das Durchqueren sowohl der Cumulus-Passage als auch der Zona pellucida aufweisen (Drobnis et al., 1988a; 1988b; Suarez & Pacey, 2006; Suarez, 2008).

Verschiedene Autoren wiesen in Langzeit- sowie Querschnittstudien einen signifikanten Zusammenhang zwischen prozentualer Motilität der Spermatozoen und erfolgreicher Schwangerschaft *in vivo* nach (Bostofte et al., 1982; Ayala et al.; 1996; Ombelet et al., 1997; Guzick et al., 2001; Günalp et al., 2001; Jedrzejczak et al., 2008). Zaini et al. (1988) widersprechen diesen Erkenntnissen, sie fanden nur eine geringe Korrelation der Motilität mit der Fertilisation *in vivo*.

Nach bisherigen WHO-Kriterien (WHO, 1999) gilt ein Patient mit einer Gesamtmotilität (Kategorien WHO a + b) von <50% bzw. einer Progressivmotilität (Kategorie WHO a) von <25% der Spermatozoen als subfertil. Von einigen Arbeitsgruppen wurde nicht nur der prozentuale Anteil der Gesamt- oder Progressivmotilität als Prädiktor für den IVF-Erfolg verwendet, sondern auch der *TMSC*, d.h. die totale Anzahl motiler Zellen in Mio. Spermien, sowie der *TPMC*, d.h. die totale Anzahl progressiv motiler Spermien in Millionen (Repping et al., 2002; Rhemrev et al., 2001). Mortimer & Menkveld (2001) bezeichneten allerdings den *TPMC*-Index als „Nonsense-Index, da seine Variablen in Kombination keine neuen Informationen erbringen. Darüber hinaus sind nach der o.g. Revision auch für die Motilität die unteren Referenzgrenzen zu korrigieren (Cooper et al., 2009).

Die Durchschnittsmotilität des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkollektivs lag im Median bei 52,0% bzw. 46,0% (Gesamt- und Progressivmotilität).

Für die Gesamtmotilität konnte ein Zusammenhang mit der Fertilisationsrate ( $p=0,10$ ) gefunden werden. Ein relevanter Zusammenhang mit der Schwangerschaftsrate ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,21$  nach dem Median-Test (trotz einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,05$  nach Wilcoxon) unwahrscheinlich. Anhand der Box-and-Whisker-Plots für Gesamtmotilität und Fertilisationsrate bzw. Schwangerschaftsrate lassen sich tendenziell höhere Werte bei erfolgreicher Fertilisation bzw. Schwangerschaft erkennen. Für den Parameter progressive Motilität werden positive Zusammenhänge zwischen allen drei Zielgrößen aufgezeigt ( $p=0,08$  resp.  $0,10$  resp.  $0,08$ ), die sich auch in den Box-and-Whisker-Plots bestätigen.

Der Einfluss der Spermienmotilität auf den IVF-Erfolg wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. So verbuchten Ford et al. (2001) einen signifikanten Zusammenhang der prozentualen Progressivmotilität mit dem IVF-Erfolg, allerdings nach Percoll-Präparation. In einer anderen Studie versuchten Rhemrev et al. (2001), Variablen zu finden, die in der Lage sind, einige Tage vor Beginn des IVF-Programms den totalen Fertilisationsmisserfolg (= TFF) zu prognostizieren, so dass man dann nötigenfalls eine ICSI durchführen kann. Dabei stellten sich die Anzahl der vorhandenen Follikel sowie der *postwash TPMC* als relevante Prädiktoren heraus.

Green et al. (1988) argumentierten, dass langsame Spermatozoen die Zona pellucida nicht penetrieren können und dies zu einer Verschlechterung des Fertilisationspotentials

führt. Laut Bollendorf et al. (1996) aber ist bei Abwesenheit von Spermatozoen der Kategorie (a) nach WHO-Motilitätskriterien die Fertilisationsrate nach IVF signifikant reduziert, jedoch unterscheidet sich die klinische Schwangerschaftsrate nicht signifikant. Dagegen waren nach Percoll-Separation sowohl Fertilisations- als auch Schwangerschaftsrate in Abwesenheit von schnell progressiven Spermatozoen signifikant erniedrigt. Auch Ashkenazi et al. (1996), Duran et al. (1998) und Obara et al. (2001) stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Motilität im Nativejakulat und der Fertilisationsrate fest.

Für Acosta et al. (1988) ist die Spermien-Motilität dagegen kein adäquater Prädiktor für die Fertilisationsrate *in vitro*, nachdem sie Gruppen mit verschiedenen Anteilen motiler Spermien verglichen und keine signifikanten Unterschiede in den Resultaten der IVF fanden. Cohen et al. (1985), Enginsu et al. (1991) und Vawda et al. (1996) bestätigten diese Beobachtung. Auch die Forschungsgruppe um Liu et al. (Liu et al., 1987; 1988; 1989a; 1989b; Liu & Baker, 1988; 1990) und MacLeod et al. (1994) fanden in verschiedenen Studien nur geringe Korrelationen zwischen Motilität und den Resultaten der *in-vitro* Fertilisation. In einer multiplen Regressionsanalyse stellte sich bei Van Voorhis et al. (2001) der *TMSC* als für den IVF-Erfolg prognostisch nicht relevant heraus.

In der Literatur wird gehäuft eine bessere Korrelation zwischen verschiedenen Parametern der Motilität mit Resultaten der *in-vitro* Fertilisation nach Anwendung diverser Separationstechniken beobachtet. Eine Erklärung hierfür ist, dass auch der IVF-Vorgang mit präpariertem Samen stattfindet und so die Motilität quasi unter IVF-Bedingungen gemessen wird. Auch Bollendorf et al. (1996) befürworteten die Verwendung bereits präparierten Samens für Prädiktionszwecke. Für Rhemrev et al. (2001) ist besonders der *TPMC* (= total progressively motile sperm count) nach Präparation ein wichtiger Prädiktor für den Erfolg der *in-vitro*-Fertilisation.

### **5.1.3. Morphologie**

Der dritte der klassischen Ejakulatparameter ist die Morphologie. Sie stellt einen wichtigen Einfluss auf die männliche Fertilität dar. Akzeptiert ist die These, dass bei fertilen Männern der Anteil morphologischer Normalformen höher ist als bei infertilen (Bostofte et al., 1982; Ombelet et al., 1997; Guzick et al., 2001; Günalp et al., 2001). Gleichzeitig wird anerkannt, dass normale und pathologische Formen nebeneinander im

Ejakulat vorkommen (Joel, 1971). In mehreren Studien postulierten Menkveld und Kollegen, dass der Anteil an morphologischen Normalformen insgesamt abgenommen hat, und das nicht nur, weil die Morphologie gerade in den letzten Jahren strikter beurteilt wird (Menkveld et al., 1986; 1997a; Menkveld, 1987).

Im letzten Jahrhundert wurden verschiedene Klassifikationen zur Beurteilung der Morphologie entwickelt (Ombelet et al., 1995; Haidl & Schuppe, 2006). Die Spermienmorphologie wird heute nicht mehr nach Prioritäten beurteilt (Kopf > Mittelstück > Schwanz), sondern zumeist multiparametrisch, d.h. jeder morphologische Defekt pro Spermatozoon wird gezählt. Nachfolgend sind in Tabelle 24 stichwortartig die Charakteristika einiger wichtiger Klassifikationen dargestellt:

*Tabelle 24: Morphologie-Klassifikationen, Quellen, Charakteristika*

KLASS.	QUELLEN	CHARAKTERISTIKA, BESONDERHEITEN
<b>Williams</b>	Williams et al., 1934	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unterteilung des Spermatozoons in vier Abschnitte: Kopf, Hals, Mittelstück, Schwanz</li> <li>• Erstbeschreibung des Akrosoms</li> </ul>
<b>MacLeod</b>	MacLeod & Gold, 1952 MacLeod, 1964, 1970	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unterteilung des Spermatozoons in sechs Abschnitte</li> <li>• Färbung: Papanicolaou</li> </ul>
<b>Eliasson</b>	Eliasson et al., 1970 Eliasson & Treichl, 1971 Eliasson, 1971	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modifikation MacLeod</li> <li>• Nomenklatur der Störungen</li> <li>• genaue Definition „normales Spermatozoon“</li> <li>• Grenz-Formen = normal</li> <li>• Größe Spermatozoon, Länge und Breite des Kopfes</li> <li>• Färbung: Papanicolaou</li> </ul>
<b>Düsseldorf</b>	Hofmann et al., 1985, 1995 Hofmann & Haider, 1985 Hofmann, 1987	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anwendung nur in wenigen deutschen Zentren</li> <li>• Überstreckungsdefekte; Akrosomdefekte; Schwanzdefekte</li> <li>• Morphologische Defekte basieren auf Reifungsstörungen der Spermatogenese, Gewicht auf Art und Ursachen der Störungen</li> <li>• Färbung: Papanicolaou &amp; Shorr</li> </ul>
<b>Tygerberg Strict Criteria</b>	Kruger et al., 1986 Menkveld, 1987 Menkveld et al., 1990	<ul style="list-style-type: none"> <li>• genaue Beschreibung „normales Spermatozoon“</li> <li>• 7 Kategorien: Kopf-, Hals-, Mittelstück-, Schwanzdefekte</li> <li>• Grenz-Formen = anormal</li> <li>• Grenzwerte: 0 - 4%; 5 - 14%; &gt; 14% Normalformen</li> <li>• Färbung: Papanicolaou</li> </ul>
<b>WHO '92 (dritte Ausgabe)</b>	World Health Organization, 1992	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 Defektkategorien: Abnorme Form/Größe Spermienkopf; Defekt Hals- und Mittelstück; Schwanzdefekt; Zytoplasmatrophen</li> <li>• Grenzformen = abnormal</li> <li>• Teratozoospermie-Index</li> <li>• Grenzwerte: &lt; 30% Normalformen</li> <li>• Färbung: Papanicolaou</li> </ul>
<b>WHO '99 (vierte Ausgabe)</b>	World Health Organization, 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integration WHO '92 und Tygerberg Strict Criteria</li> <li>• Grenzwerte: &lt; 15% Normalformen</li> <li>• Färbung: Papanicolaou</li> </ul>

Es ist nachvollziehbar, dass es aufgrund dieser verschiedenen Systeme sehr schwierig ist, Ergebnisse zu vergleichen (Haidl & Schuppe, 2006). Schon geringfügige Abwandlung der Klassifizierung und/oder der Technik kann zu drastischer Änderung des Anteils der morphologischen Normalformen führen. Solange es kein einheitlich akzeptiertes und standardisiertes Verfahren gibt, das weltweit in den Laboratorien

angewandt wird, ist der prognostische Wert der Morphologie, obwohl häufig als Eckpfeiler der andrologischen Diagnostik bezeichnet, begrenzt (Davis & Gravance, 1994). Horte et al. (2001) konnten ebenfalls zeigen, dass die große Variabilität der morphologischen Untersuchungsverfahren eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dezimiert. In ihrer Studie, die Éjakulate aus den Jahren 1980 bis 1994 erneut untersuchte, konnten sie zeigen, dass nicht, wie ursprünglich angenommen, sich die Morphologie der Spermien in den Jahren verändert hat, sondern die Technik und Kriterien der Morphologieerhebung.

In verschiedenen Studien wurde die Zuverlässigkeit des *Sperm morphology analyzer* (IVOS; Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA) in Bezug auf Wiederholbarkeit und Präzision überprüft, so dass einige Autoren die Verwendung entsprechender Geräte in der Praxis zur Routine-Ejakulatanalyse empfahlen (Kruger et al., 1995; Coetzee et al., 1999; Coetzee et al., 2001) bzw. auf den prädiktiven Wert für die *In-vitro*-Fertilisation hinwiesen (Marnet et al., 2000). In der klinischen Routine hat sich jedoch die Computer-assistierte Analyse der Spermatozoenmorphologie aufgrund zahlreicher Limitationen bisher nicht durchgesetzt.

Der Anteil morphologischer Normalformen lag bei der vorliegenden Arbeit im Nativsperma bei 28,0% im Median (Spannweite 0 - 68%). Es wurde ein Zusammenhang mit der Fertilisationsrate gefunden ( $p=0,04$ ), der auch anhand des dazugehörigen Box-and-Whisker-Plots bekräftigt wird - bei erfolgreicher Fertilisation ist der Anteil morphologischer Normalformen deutlich höher als bei der Gruppe mit einer Fertilisationsrate unter 50%. Bei Embryoscore und Schwangerschaftsrate liegen die Irrtumswahrscheinlichkeiten für einen Zusammenhang mit der Morphologie zwischen 0,14 und 0,17; man könnte also von einer Tendenz sprechen, dies ist ebenfalls ersichtlich aus den Box-and-Whisker-Plots (Abb. 8). Unsere Ergebnisse decken sich trotz des Zeitabstandes zwischen Morphologie-Bestimmung und IVF mit einigen anderen Studien.

Die Forschungsgruppe um Kruger beschrieb 1986 die sog. strikten Kriterien ("Tygerberg-Kriterien") und konnte in verschiedenen Studien auch eine gute Korrelation der morphologischen Normalformen mit der Fertilisationsrate *in vitro* nachweisen (Baker, 1987; Kruger et al., 1988a; 1988b). Liu et al. (1988a), Enginsu et al. (1991), O'Shea et al. (1993), Hofmann et al. (1995), Vawda et al. (1996) und Duran et al. (1998) bestätigten die guten Vorhersagewerte für die *strict criteria*. Kruger &

Coetzee (1999) und Obara et al. (2001) beobachteten einen signifikanten Zusammenhang der Morphologie im Nativejakulat nach Evaluierung nach strikten Kriterien mit der Fertilisationsrate *in vitro*, während sie keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von klinischer Schwangerschaft feststellen. Nikolettos et al. (1999) bestätigten den guten Voraussagewert der Morphologie für die Fertilisationsrate *in vitro*, sie diskutieren jedoch auch das Problem des Pleomorphismus (griechisch pleion = mehr, morphe = Gestalt), das bei der Spermienuntersuchung mit dem Lichtmikroskop entsteht.

Bei Oehninger et al. (1988a) wurden die Ejakulate parallel jeweils nach WHO-Kriterien und nach den strikten Tygerberg-Kriterien untersucht. Dabei wurden Misserfolge der *in vitro* Fertilisation durch die strikten Kriterien signifikant besser erklärt. Für Grow et al. (1994) und Ombelet et al. (1994) ist die Morphologie nach *strict criteria* ein exzellenter Biomarker für die Spermienfertilisationskapazität, zudem unabhängig von Motilität und Konzentration. Donnelly et al. fanden 1998 bei der Korrelation von Fertilisations- und Schwangerschaftsraten nach IVF mit dem Anteil der Normalformen nach *strict criteria* einen signifikanten Zusammenhang sowohl vor als auch nach Präparation des Ejakulats mit PureSperm (Fertilisationsrate:  $r=0,37$ ;  $p<0,0001$  bzw.  $r=0,39$ ;  $p<0,0011$ ; Schwangerschaftsrate:  $r=0,31$ ;  $p<0,005$  bzw.  $r=0,30$ ;  $p<0,005$ ).

Für Host et al. (1999) allerdings war die Beurteilung der Morphologie nach (früheren) WHO-Kriterien ein besserer Prädiktor für die Fertilisationsrate *in vitro* als Krugers *strict criteria*. Sie bestätigten, dass die Morphologie keine Wirkung auf Embryonalentwicklung, Embryonenqualität und Schwangerschaftsrate hat. Coetzee et al. (1998) beschrieben dagegen in einem Review (ausgewertete Artikel von 1978 bis 1996), dass in 35 von 43 untersuchten Artikeln die Morphologie positiv prädiktiv für die Fertilisationsrate *in vitro* war. Hierbei war es unabhängig, welche Klassifikation und welche Methode dabei verwendet wurden. Einige Studien zeigten auch die Unabhängigkeit von anderen Spermatozoenparametern (Mahadevan & Trouson, 1984; Kruger et al., 1986; Liu & Baker, 1990; Grow et al., 1994). Als Nachteil der (früheren) WHO-Klassifikation werden die sich im Laufe der Zeit ändernden Kriterien genannt, wohingegen die Tygerberg *strict criteria* in den Jahren konstant geblieben seien.

Trotz der viel versprechenden Berichte gibt es einige Studiengruppen, die keine Korrelation zwischen der Spermatozoenmorphologie und der Fertilisationsrate *in vitro* gefunden haben (Alper et al., 1985; Hirsch et al., 1986; Morgentaler et al., 1995). Auch

Bartoov et al. (1993) und Robinson et al. (1994) sahen eine eher limitierte Aussagekraft der Morphologie bezüglich der Fertilisation *in vitro*. Wie bereits zuvor erwähnt, könnten jedoch die Differenzen der Ergebnisse auch von Unterschieden der Färbetechnik, der Separationsprotokolle und morphologischen Klassifikationssysteme resultieren (Kruger et al., 1986; Menkveld et al., 1990).

Hofmann et al. (1995) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Morphologie untersucht nach Düsseldorfer Kriterien und den Resultaten der IVF. Wurden die Spermatozoen mittels Düsseldorfer Klassifikation nach strikten Kriterien beurteilt, ergab sich eine gute Vorhersagequalität.

#### **5.1.4. Vitalität**

Die Beurteilung der Spermatozoenvitalität ist eines der Basiselemente der Samenanalyse und mit der Eosin-Färbetechnik gibt es ein gutes Verfahren, um den Anteil lebensfähiger männlicher Keimzellen zu ermitteln. So nehmen bei Inkubation nur membrangeschädigte (= tote) Zellen den Farbstoff auf und es kann zwischen toten Spermien und immotilen, aber lebensfähigen Spermien unterschieden werden (Eliasson, 1971; Eliasson & Treichl, 1971; Eliasson, 1981; WHO, 1992). Die Vitalfärbung mit Eosin ist zudem eine einfache und kostengünstige Methode, um Informationen über die physikalische Integrität der Plasmamembran zu erhalten. Überdies kann die Ermittlung eines hohen Prozentsatzes immotiler, aber vitaler Zellen als wichtiges Zeichen für eventuell vorliegende Strukturdefekte des Spermatozoenflagellums gedeutet werden.

Der Eosin-Test ist eine allgemein anerkannte Technik und wird routinemäßig mit den anderen Spermatozoentests angewendet. Untersuchungen über die den prädiktiven Wert bezüglich der Fertilisationskapazität der Spermien wurden jedoch noch nicht durchgeführt. Deshalb wurde dieser Test aufgegriffen und in dieser Arbeit nach einem Zusammenhang der Supravitalfärbung und der Fertilisationstechnik gesucht.

In der vorliegenden Arbeit lag der durchschnittliche Anteil ungefärbter (also vitaler) Spermatozoen bei 22,0% (von 8 - 60%). Ein Zusammenhang der Spermatozoenvitalität war bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,13$  (nach Median-Test) und  $p=0,20$  (nach Wilcoxon) allenfalls mit der Schwangerschaftsrate zu erkennen.

Für Parinaud et al. (1996) eignet sich die Vitalität im Modell mit Morphologie, Motilität und akrosomaler Reaktion sehr gut zur Voraussage für die In-vitro Fertilisation.

### 5.1.5. Akrosomale Reaktion

Gemeinsam mit den konventionellen Spermatozoenparametern, der Membranintegrität, der Akrosinaktivität und Membranfusionsfähigkeiten, gilt die Akrosomreaktion als ein essentieller Schritt des Fertilisationsvorgangs, sie hat zentrale Bedeutung bei der Eizellpenetration der Spermien.

Da das Akrosom für eine direkte lichtmikroskopische Untersuchung zu klein ist, existieren verschiedene andere Techniken, das Akrosom nachzuweisen und seine Funktion zu beurteilen. Nachfolgend sind in Tabelle 25 einige aufgezählt:

Tabelle 25: Techniken zum Nachweis des Akrosoms mit dazugehöriger Quelle

Methoden	Quelle
Triple-Stain Technik	Talbot et al., 1981
Indirekter Immunfluoreszenz Assay	Wolf et al., 1985
Chlortetraacyclin Fluoreszenz Assay	Lee et al., 1987
Fluorescein-iso-thiocyanat (FITC)-gekoppelte Lektine, z.B. Pisum sativum agglutinin	Cross et al., 1986; Köhn et al., 1996; 1997
Elektronenmikroskopie	Flaherty & Olson, 1991; Longo et al., 1995; Zeginiadou et al., 2000

Die *in vitro* Induktion der Akrosomreaktion kann - nach Anwendung diverser Waschtechniken - auf verschiedene Art und Weise ausgelöst werden (siehe Einleitung). Da die physiologischen Induktoren, insbesondere menschliche Zona pellucida, kaum zur Verfügung stehen, werden die nicht-physiologischen Induktoren in der klinischen Praxis bevorzugt.

Bei der Akrosomreaktion kann man eine spontane, eine maximale und eine induzierbare Reaktion unterscheiden. Die spontane Reaktion stellt den Zustand vor und die maximale Reaktion den Zustand nach Induktion dar. Die induzierbare Reaktion ergibt sich aus der Differenz zwischen maximaler und spontaner Reaktion. Nach 24-stündiger *in vitro* Inkubation liegt der Anteil der spontanen akrosomalen reagierten Spermatozoen bei höchstens 15 - 20% aller Spermatozoen im Ejakulat normaler, fertiler Männer (Plachot et al., 1984; Stock & Fraser, 1987). Tesarik (1989) konstatierte, dass ein erhöhter Anteil akrosomreagierter für eine erfolgreiche Fertilisation *in vitro* gefordert ist, also die spontane Akrosomreaktion der kapazitierten Spermatozoen von ca. 4 - 10% (Cummins et al., 1991) für die Fertilisation nicht ausreichend ist.

In der vorliegenden Arbeit betrug der durchschnittliche Anteil lebend akrosomreagierter Spermatozoen 24,0%. Der Median der Spermatozoen mit Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch Kälteinduktion lag bei 11,0%; beide Parameter lagen damit also über dem empfohlenen Mindestwert von 13,0% bzw. 7,5% (Henkel et al., 1993). Im Gegensatz zu Henkel et al. (1993) wiesen weder die maximale Akrosomreaktion noch die induzierbare Akrosomreaktion einen Zusammenhang mit der *In-vitro* Fertilisation auf. Bei Betrachtung der Box-and-Whisker-Plots scheint die maximale Akrosomreaktion eher negativ mit der Fertilisationsrate zusammenzuhängen (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,16$  nach Spearman). Es muss jedoch erneut betont werden, dass es sich bei dem verwendeten Ejakulat nicht um das zur Fertilisation eingesetzte Ejakulat handelte und dies erhebliche Auswirkungen auf unsere Ergebnisse zu haben scheint. Die meisten Forschungsgruppen, die sich mit dem Zusammenhang der akrosomalen Reaktion mit der IVF beschäftigen, kommen zu anderen Resultaten.

In verschiedenen Studien wurde die Korrelation der induzierten Akrosomreaktion mit der Fertilisation *in vitro* wiederholt nachgewiesen (Oehninger et al., 2000). Für einige Autoren weist dabei der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion (also die maximale AR) keinen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate auf (Pampiglione et al., 1993; Henkel et al., 1993). Trotzdem ergibt sich bei Verwendung der Kälteinduktionsmethode ein Grenzwert von 13% lebend akrosom-reagierter Spermatozoen, da bei Unterschreitung dieses Wertes die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation abnimmt. Bei höheren Werten wird kein Zusammenhang zur Fertilisation *in vitro* gefunden (Henkel et al., 1993). Die *Induzierbarkeit* der AR korreliert jedoch signifikant mit der Fertilisation *in vitro* (Mortimer et al., 1990; Cummins et al., 1991; Fenichel et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Henkel et al., 1993; Pampiglione et al., 1993). Dass eine normale akrosomale Reaktion und vor allem eine normale Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (indiziert mit verschiedenen Induktoren) gute Prediktoren für Erfolg im IVF-Programm sind, wird auch in jüngeren Arbeiten berichtet (Calvo et al., 1994; Yovich et al., 1994; Parinaud et al., 1995; Brandelli et al., 1995; Carver-Ward et al., 1996; Krausz et al., 1996; Rufas et al., 1998; Esterhuizen et al., 2001; Liu & Baker, 2003; Bastiaan et al., 2003). Liu und Baker (2003) beobachteten an Patienten mit ungeklärter Infertilität und normalem Spermogramm eine signifikante Korrelation zwischen Zona-pellucida-induzierter Akrosomreaktion und der Fertilisationsrate *in vitro*. Der Anteil der Patienten mit gestörter Zona-pellucida-

induzierter Akrosomreaktion am Patientengut betrug 29% und wies keine oder sehr geringe Fertilisationsraten auf. Über ähnliche Ergebnisse berichteten Bastiaan et al. (2003), die in der Zona-pellucida-induzierten Akrosomreaktion einen sensitiven Parameter zur Voraussage für Fertilisationsmisserfolg sahen.

Gleichwohl ist die Vergleichbarkeit der Studien sicherlich begrenzt. Oehninger et al. untersuchten 2000 in einer Meta-Analyse acht verschiedene Studien zur *Akrosomreaktion* und stellten verschiedene Inkonsistenzen fest: Induktionstechniken, Grenzwerte, Kapazitationskonditionen und auch Evaluationsmethoden wurden unterschiedlich beschrieben. Trotzdem ergab sich für die Induktion der Akrosomreaktion im Ganzen gute Voraussagequalität für die *In-vitro* Fertilisation. Des ungeachtet sollten Bestrebungen zu besserer Vergleichbarkeit, Reliabilität und Validität führen.

Henkel et al. (1998b) registrierten im Vergleich der Induktion der Akrosomreaktion zum einen mit Kälte, einem physikalischen Induktor, und zum anderen mit menschlicher Follikularflüssigkeit, einem physiologischen Induktor, hoch signifikante Korrelationen sowohl der maximalen als auch der induzierbaren Akrosomreaktion. Aufgrund dieser Resultate stellt sich die Frage, ob diese beiden Induktionsmethoden denselben biochemischen Weg zur Induktion nutzen. Diese Tatsache wäre von großem Vorteil, da der Test dann ohne großen Aufwand einen biologischen Vorgang gut imitieren könnte. In jüngster Zeit orientieren sich die Bestrebungen in der Entwicklung neuer Evaluationsverfahren mehr und mehr in Richtung physiologisch-orientierter Induktion der Akrosomreaktion (Chapman & Barratt, 1996; Hinsch et al., 1998).

#### **5.1.6. Akrosinaktivität**

Das Akrosin wird neben einer Vielzahl hydrolytischer Enzyme während der akrosomalen Reaktion freigesetzt (Talbot et al., 1985). Nach seiner Aktivierung durch Proakrosin-Spaltung soll dieses proteolytische Enzym bei Penetration und Durchdringung der Zona pellucida eine wichtige Funktion einnehmen (Habenicht et al., 1987; Tesarik et al., 1988) und ist außerdem an Kapazitation, Akrosomreaktion und Chromatindekondensation während Formation des paternalen Pronukleus beteiligt (Tummon et al., 1991). Überdies scheint das Akrosin durch Kininfreisetzung die Motilität der Spermatozoen während ihrer Passage durch den weiblichen Reproduktionstrakt zu stimulieren (Schill & Miska, 1992).

Mohsenian et al. (1982) beobachteten eine signifikant niedrigere Akrosinaktivität bei einem Kollektiv infertiler Männer als bei einem Kollektiv fertiler Männer. Auch Koukoulis et al. (1989), Nakagawa et al. (1997) und Cui et al. (2000) berichteten von einer reduzierten Akrosinaktivität bei infertilen Männern. Eine Patientengruppe mit Polyzoospermie weist eine bis zu 60% niedrigere Akrosinaktivität als eine gesunde Kontrollgruppe auf (Schill & Feifel, 1984; Schill, 1990).

Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um die Aktivität des Akrosins nachzuweisen bzw. zu messen. Im klinischen Alltag sind, wie in Tabelle 26 dargestellt, folgende Techniken üblich:

*Tabelle 26: Techniken zur Messung der Akrosinaktivität mit dazugehöriger Quelle*

Methoden	Quelle
Fluorometrischer Assay	Harrison et al., 1982
Spektrophotometrischer Assay mit Benzoyl-Arginin-Ethylester (BAEE)	Schill, 1973; Schill, 1990
Spektrophotometrischer Assay mit N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid	Kennedy et al., 1989; Tummon et al., 1991; DeJonge et al., 1993
Proteolytischer Platten Assay / Gelatinolyse Assay	Gaddum & Blandau, 1970; Schill, 1974; Wendt et al., 1988; Henkel et al., 1995

In der vorliegenden Arbeit wurde die einfache und kostengünstige Gelatinolyse-Methode untersucht, wobei die proteolytische Wirkung des Akrosins durch die Bildung von Lysehöfen („Halo“) um die Köpfe der Spermien nachgewiesen wird (Henkel et al., 1995). Dabei ist der Durchmesser der Lysehöfe der Akrosinaktivität des zentral gelegenen Spermiums proportional. Die Grenzwerte für die Einzelparameter liegen für den Halodurchmesser bei 10  $\mu\text{m}$ , für die Haloformationsrate bei 60% und für den Akrosinaktivitätsindex bei 6.

Für den Halodurchmesser wurde im Median 13,8  $\mu\text{m}$ , für die Haloformationsrate 68,0% und für den errechneten Akrosinaktivitätsindex 9,4 im Median berechnet. Keiner der drei Parameter zeigte einen Zusammenhang mit einer der Variablen der *In-vitro* Fertilisation. Auch der Box-and-Whisker-Plot zeigt gleichmäßige Verteilung auf. Auch hier muss nochmals auf die Besonderheit hingewiesen werden, dass das untersuchte Ejakulat nicht das Fertilisationsejakulat darstellte. Alle anderen bisher durchgeführten (und hier erwähnten) Studien verwendeten dasselbe Ejakulat, das auch für die *In-vitro* Fertilisation Anwendung fand.

Auch einige andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen der Akrosinaktivität und den Ergebnissen bei *In-vitro* Fertilisation feststellen (Kruger et al., 1988b; Liu & Baker, 1990; Baba et al., 1994). Yang et al. (1994) beobachteten zwar eine Steigerung der Fertilisationsrate bei höheren Akrosinwerten, jedoch war diese nicht statistisch signifikant.

Hingegen berichteten Liu & Baker (1993), DeJonge et al., (1993), Bartoov et al. (1994) und Henkel et al. (1995) von einer guten Korrelation zwischen der Akrosinaktivität und Fertilisationserfolg *in vitro*. Sharma et al. (1993) notierten eine besonders gute Korrelation der Parameter nach Percoll-Präparation. Auch konnten bestimmte Grenzwerte (verschiedener Methoden) festgelegt werden, ab denen die Fertilisationsrate signifikant ansteigt (Kennedy et al., 1989; Blackwell et al., 1992; Francavilla et al., 1992).

Im Mausmodell zeigten Akrosin-positive Mäuse einen signifikanten Vorteil gegenüber Akrosin-negativen Mäusen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten die Akrosin-positiven Spermatozoen die Oozyten schneller fertilisieren (Adham et al., 1997).

Henkel & Schill (2000) empfahlen, bei schwerer Teratozoospermie einschließlich der Globozoospermie die Akrosinaktivität bestimmen zu lassen (Akrosinaktivität dann signifikant niedriger). Während in derartigen Fällen ohnehin eine primäre Indikation zur ICSI besteht, sollte vor Anwendung des IVF-Programms bei idiopathischer Sterilität ein akrosomaler Defekt mittels Akrosinbestimmung ausgeschlossen werden.

Es muss betont werden, dass auch bei genauerer Betrachtung dieses Spermatozoenparameters große Unterschiede bezüglich der Einschätzung der Aussagekraft hervortreten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Tatsache die große Bandbreite an Protokollen, Spermienpräparationen und Techniken reflektiert.

#### **5.1.7. Chromatinkondensation**

Durch Kernkondensation während der Spermiogenese wird das Chromatin Schritt für Schritt verdichtet. Sie ist wesentliche Bedingung für die später ablaufende Befruchtung und ist deshalb für einige Autoren eine gute Hilfestellung zur Unterscheidung fertiler und infertiler Männer (Auger et al., 1990, Hammadeh et al., 1998; 2001). Überdies beurteilte Haidl 1996 die Messung der Chromatinkondensation als einen der wichtigsten Spermatozoenfunktionstests.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der Chromatinkondensation die einfache und kostengünstige Anilinblau-Färbung verwendet. Dadoune et al. (1988) forderten als Normwert einen Anteil von mindestens 75% Anilinblau-negativen Spermien, daneben beobachteten sie, dass der Anteil ungefärbter Keimzellen bei Vorliegen morphologischer Anomalien höher ist. Verschiedene Forschungsgruppen postulierten verschiedene Grenzwerte, jedoch wird ein Grenzwert von maximal 25% gefärbten Spermatozoen insgesamt anerkannt (Hammadeh et al.; 1998: 20%; Haidl & Schill; 1994: 28%).

Das in dieser Arbeit verwendete Patientenkollektiv war mit sieben Patienten sehr klein. Eine gestörte Kondensation wurde angenommen, wenn 25% der Spermatozoen mittelstark bis stark über den akrosomalen Ring hinaus oder das gesamte Spermium tiefblau angefärbt waren. In dieser Arbeit fand die statistische Auswertung der Ergebnisse nach Dichotomisierung in *gestört* und *nicht gestört* statt. Es wurde keinerlei Zusammenhang zwischen der Chromatinkondensation und den Parametern der In-vitro Fertilisation festgestellt. Die Box-and-Whisker-Plots der Variablen Fertilisationsrate und Embryoscore zeigen niedrigere Erfolgswerte bei gestörter Kondensation.

Der Einfluss der Chromatinkondensation wird in der Literatur zum großen Teil einheitlich beurteilt. Hammadeh et al. (1998) heben den guten Vorhersagewert der Anilinblau-Färbung hervor und empfehlen, den Test vor jeder assistierten Reproduktion durchzuführen. Auch bei Jeulin et al. (1986), Haidl & Schill (1994) und Nasr-Esfahani et al. (2001) korrelierte die Chromatinkondensation (gemessen mit Anilinblau) signifikant mit den Erfolgsraten bei der *In-vitro* Fertilisation. Es berichten lediglich einige wenige Forschungsgruppen von besseren Ergebnissen mit anderen Kernreifungstests. So erbrachte bei Liu & Baker (1992) eine logistische Regressionsanalyse der Spermatozoenparameter und der Reifungstests die Erkenntnis, dass trotz univariater Korrelation Anilinblau eine abhängige Variable ist und die Fertilisation nicht unabhängig beeinflusste. Der Anteil pathomorpher Zellen und der Kernreifungstest mit *CMA3* waren die einzigen Faktoren, die unabhängig den Erfolg der Fertilisation *in vitro* beeinflussten. Neuere Testverfahren wie der "Sperm Chromatid Structure Assay" (SCSA) und andere heben ebenfalls auf die DNA-Integrität der Spermatozoen ab, ihr prognostischer Stellenwert kann jedoch noch nicht abschließend beurteilt werden (Zini & Sigman 2009).

### **5.1.8. Weitere Einflussgrößen**

Bei Erstellung des logistischen Regressionsmodells wurden neben andrologischen Faktoren auch weibliche und unabhängige Faktoren mit einbezogen. Der Zielparameter Embryoscore wird auch vom Alter der Frau entscheidend beeinflusst und für den Parameter Schwangerschaft ebenfalls das Alter der Frau und (nachvollziehbar) die Anzahl der transferierten Embryos. Diese Zusammenhänge werden allgemein anerkannt (Federation CECOS, 1982; Collins, 1987; Ashkenazi et al., 1996; Deutsches IVF-Register, 2009).

So untersuchten beispielsweise Terriou et al. (2001) bei 10.000 Embryo-transfers den Einfluss sowohl maternaler als auch paternaler und embryonaler Parameter auf das Auftreten einer *Schwangerschaft* bei IVT-ET (hCG-Messung 14 Tage nach Embryo-Transfer  $\geq 100$  IU/ml). Dabei zeigte kein einziger der klassischen Spermatozoenparameter (i.e. Konzentration, Progressivmotilität, Morphologie) eine signifikante Assoziation. Kritisch anzumerken ist, dass in der Studie der Zeitpunkt der Untersuchung der paternalen Parameter nicht erwähnt ist. Im Gegensatz dazu zeigte sowohl das Alter der Frau ( $p < 0,001$ ) als auch die Anzahl der transferierten Embryos ( $p < 0,001$  bei einem bis sechs Embryos) einen signifikanten Zusammenhang. In der multivariaten Analyse war jedoch der Embryoscore (wie auch bei Giorgetti et al., 1995) am besten mit der Schwangerschaft assoziiert.

### **5.1.9. Separationstechniken**

Alle verwendeten Ejakulatproben wurden nativ ausgewertet. Es ist bekannt, dass die verwendeten Separationstechniken teilweise erhebliche Auswirkungen auf die Spermatozoenparameter und konsekutiv die Erfolge bei IVF haben (Van der Zwalmen et al., 1991; Meschede et al., 1993; Henkel et al., 1994a; Sanchez et al., 1996; Prakash et al., 1998; Hammadeh et al., 2001a; 2001b). Es muss deshalb beachtet werden, dass die Voraussage mit Nativejakulat zum Teil schlechtere Qualität besitzt als nach Präparation. Auch diese Tatsache ist bekannt und in vielen Studien beschrieben (Berger et al., 1985; Aitken, 1988; Ng et al., 1992; Yue et al., 1995; Yao et al., 1996; Mortimer, 1999). Wie in Material und Methoden beschrieben, stellt sich die Indikation den jeweiligen Wirkungen der Separationstechniken entsprechend dar. Beispielsweise wird die Glaswollfiltration bei Kontamination des Ejakulats mit Agglutinationen, Rund- bzw. Fremdzellen und/oder bei Vorhandensein vieler immotiler Spermien verwendet.

### 5.1.10. Modellerstellung und Gesamtbetrachtung

Der Fertilisationsprozess ist ein sehr komplexer biologischer Vorgang, der von einer Vielzahl männlichen und weiblichen Parameter beeinflusst wird. Deshalb wurde versucht, ein logistisches Regressionsmodell mit mehreren Parametern zu entwickeln, um die Erfolgsparameter der *In-vitro* Fertilisation (i.e. Fertilisationsrate, Embryoscore, Schwangerschaft) zu beschreiben.

Der dieser Arbeit zugrundeliegende Datensatz erbrachte bei separater Untersuchung für die *Fertilisationsrate* nur gute bis moderate Wechselbeziehungen bei den Parametern *Spermien-Konzentration*, *Progressivmotilität*, *morphologische Normalformen* und *maximale Akrosomreaktion*. Trotz der Resultate der univariaten Analyse und einer akzeptablen Irrtumswahrscheinlichkeit des Modells ( $p_{\text{Modell}}=0,05$ ) stellte sich lediglich die normale Morphologie als wichtiger Parameter für das Modell heraus ( $p=0,03$ ). Damit wird eine Gesamtbedeutung des Modells hinfällig.

Für den Zielparameter *Embryoscore* wurden aufgrund der Resultate in der univariaten Analyse die Parameter *Spermien-Konzentration*, *Progressivmotilität* und *morphologische Normalformen* hinzugenommen. Das *Alter der Frau* wurde aufgrund der allgemeinen Kenntnis des Einflusses auf die Embryonenqualität eingeschlossen. Das Gesamtmodell zeigte eine gute Assoziation zum Embryoscore, jedoch ist anzunehmen, dass der Einzelanteil *Alter der Frau* (bei  $p=0,03$ ) dafür verantwortlich ist und nicht die Spermatozoenparameter ( $p=0,15$  bis  $0,54$ ).

Der Versuch, für den Parameter *Schwangerschaft* ein Modell mit den Parametern *Progressivmotilität*, *morphologische Normalformen*, *Alter der Frau* und *Anzahl der transferierten Embryos* zu erstellen, schlug fehl ( $p_{\text{modell}}=0,17$ ).

Insgesamt konnte in dieser Arbeit also lediglich die Morphologie als Einzelparameter den Erfolg bei IVF voraussagen, und zwar nur die Fertilisationsrate.

Für jeden einzelnen Spermatozoenparameter ist in der Literatur von verschiedenen Forschungsgruppen wiederholt prognostische Bedeutung für die *In-vitro*-Fertilisation aufgezeigt worden. Dies machte die Wichtigkeit sowohl der klassischen Spermatozoenparameter als auch der Funktionstests deutlich. Allerdings wurden diese Studien mit Spermatozoen aus demselben Ejakulat, das auch für die Insemination verwendet wurde, durchgeführt.

Die Resultate dieser Arbeit mit andrologischer Diagnostik bis zu 190 Tagen vor bzw. nach der IVF-Behandlung werfen große Probleme bezüglich der Erfolgsvoraussage bei *In-vitro* Fertilisation auf. Da die Studie von erfahrenen Kollegen und MTA's und unter ständiger Qualitätskontrolle durchgeführt wurde, zeigen unsere Ergebnisse, dass der andrologische Status zum Zeitpunkt der IVF nicht in zwingender Weise den andrologischen Status beim zuvor erfolgten klinischen Setup darstellt. Für die Zukunft der andrologischen Diagnostik im klinischen Alltag bedeutet dies, dass geeignete Parameter gefunden werden müssen, die zuverlässig und reliabel eine Vorhersage für das Gelingen eines Reproduktionsverfahrens treffen können.

## **5.2. ICSI**

Bis jetzt ist die intrazytoplasmatische Spermieninjektion die einzige Mikrofertilisationstechnik mit reproduzierbar hohen Fertilisationsraten und Methode der Wahl bei der Behandlung schwerer männlicher Infertilität (Gordts et al., 1998). Die ICSI stellt eine erfolgreiche Methode für Paare mit (z.T. wiederholten) fehlgeschlagenen Versuchen bei der konventionellen IVF-Technik dar (Palermo et al., 1993). Die (Muster-) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Durchführung der assistierten Reproduktion (Wagenitz, 2006) enthält entsprechende Hinweise zur Anwendung der ICSI, die vom Gemeinsamen Bundesausschusses (G-BA) vorgegeben Grenzwerte der Ejakulatqualität zur Indikationsstellung für ICSI stellen jedoch keine biologisch-medizinisch validierten Daten dar und sind somit wissenschaftlich nicht verwertbar. In verschiedenen Studien der letzten Jahre wurde vorgeschlagen, ICSI nur bei Vorliegen bestimmter Faktoren anzuwenden (Bhattacharya et al., 2001; George et al., 2003). Dazu werden geeignete Prädiktoren als Entscheidungshilfen gesucht, welche Technik der assistierten Reproduktion bei bestimmten männlichen bzw. weiblichen Parametern erfolgversprechend einzusetzen ist.

Da der gesamte Fertilisationsprozess einen sehr komplexen Vorgang darstellt, gibt es auch kein Universal-Kriterium, das eine genaue Angabe über die Fertilisationskapazität machen könnte (Haidl & Schill, 1993). Die hier ausgewerteten Daten ergaben im Median eine Fertilisationsrate von 75% und eine Schwangerschaftsrate von 33,65%. Diese Ergebnisse sind mit den 1996 von Schill und Weidner veröffentlichten Ergebnissen vereinbar, die eine Fertilisationsrate von 50-70% und eine mittlere Schwangerschaftsrate von etwa 25-30% beschrieben. Die Erfolgsrate von ICSI scheint

von vielen Faktoren beeinflusst zu sein, so zum Beispiel der Qualität der Oozyten (Alikani et al., 1995; Serhal et al., 1997; Xia, 1997; Loutradis et al., 1999), der Spermienqualität (Nagy et al., 1998; Strassburger et al., 2000), der verwendeten Technik (Catt & O'Neill, 1995; Payne, 1995; Svalander et al., 1995; Carrillo et al., 1998; Joris et al., 1998; Van der Westerlaken et al., 1999; Blake et al., 2000; Stoddart & Fleming, 2000) und der Qualität und Anzahl der transferierten Embryos (Hsu et al., 1999).

### **5.2.1. Klassisches Spermogramm**

Mehrere Forschungsgruppen sprechen den Parametern des klassischen Spermogramms Einfluss auf die Resultate der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion ab. So zeigten Bourne et al. (1995), Mansour et al. (1995), Oehninger et al. (1995), Palermo et al. (1996) und Koppers et al. (1998), dass die Schwangerschaftsrate nach ICSI nicht mit Konzentration, Motilität oder Morphologie der Spermatozoen korrelierte. Auch Mercan et al. (1998b) sahen keine Korrelation zwischen den klassischen Ejakulatparametern und der Schwangerschaftsrate bei ICSI, jedoch beschrieben sie eine signifikante Korrelation zwischen Spermienkonzentration und der Fertilisationsrate. Die Resultate nach ICSI unterschieden sich laut van Steirteghem (1993a, b) bei Patienten mit einer schlechten Spermatozoengesamtzahl, Motilität und/oder Morphologie nicht von denen mit einer günstigeren Ejakulatanalyse. Trotz einiger Assoziationen zwischen den konventionellen Ejakulatparametern und den Ergebnissen nach ICSI, konstatierten Palermo et al. (1993), dass die Zusammenhänge zu gering sind, als dass man sie als Prädiktoren verwenden könnte. Für die Spermatozoen-Morphologie wurde dies aktuell nochmals von French et al. (2010) bestätigt. Darüber hinaus ist die Bedeutung des konventionellen Spermogramms auch aus verfahrenstechnischer Überlegung heraus eher skeptisch zu betrachten. Es findet bei Ausführung der ICSI eine subjektive Selektion statt, bei der möglichst morphologisch intakte und progressiv motile Spermien ausgewählt werden. Dieses „*search for the fittest*“ nahmen auch Lundin et al. (1997) und French et al. (2010) als Begründung, warum Konzentration, Motilität und Morphologie - im klassischen Spermogramm sind die Durchschnittswerte dargestellt - nicht für eine Beurteilung der letzten Endes verwendeten Spermatozoen geeignet sind.

### 5.2.2. Spermienkonzentration

Die durchschnittliche Spermatozoenzahl im Ejakulat der Patienten bei der hier vorliegenden Arbeit lag bei 7,5 Mio. Spermien/ml (von 0 - 325 Mio./ml), also waren die Patienten im Durchschnitt nach bisheriger sowie aktueller WHO-Definition oligosperm. Einen Hinweis auf Zusammenhänge zwischen Spermienkonzentration und ICSI-Erfolg gab die statistische Untersuchung mit der Fertilisationsrate mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p=0,02$ . Jedoch zeigte sich weder für Embryoscore ( $p=0,11$ ) noch für Schwangerschaftsrate ( $p=0,38$  bzw.  $0,31$ ) einen deutlicher Zusammenhang mit der Spermienkonzentration. Die Box-and-Whisker-Plots der entsprechenden Variablen bestätigten dies. Unsere Beobachtungen decken sich - trotz Zeitabstandes von maximal 190 Tagen zwischen Bestimmung der Konzentration und Durchführung der ICSI - mit den Aussagen der meisten Autoren.

Vorangestellt werden muss, dass viele Studiengruppen anstatt des Parameters *Konzentration* (Mio. Spermien/ml) den Parameter *Gesamtzahl* (Mio. Spermien) verwenden. So untersuchten Nagy et al. (1995) die Gesamtzahl der Spermatozoen bezüglich der ICSI- Resultate, indem sie die Ejakulate in drei verschiedene Gruppen einteilten (Null Spermien bis  $> 5$  Mio.). Die durchschnittliche Fertilisationsrate unterschied sich in der Gruppe mit den schlechtesten Werten signifikant zu der Kontrollgruppe. Jedoch stellen für die Autoren die 12% Differenz der Fertilisationsrate keine klinisch relevanten Ergebnisse dar, da auch keine Konsequenzen für die Embryoentwicklung oder die Schwangerschaftsrate festgestellt wurden. Shibahara et al. (1999) gaben an, dass die Dichte der Spermatozoen auf die Fertilisationsrate keinen signifikanten Einfluss hat. Shoukir et al. (1998) berichteten, dass sie im Hinblick auf Blastozystenentwicklung keine Korrelation mit der Spermatozoendichte feststellen konnten. Auch Palermo et al. (1993) gaben keine genaue Aussage bezüglich Spermienkonzentration, eventuell kann dies aber auch mit der Art des Studienaufbaus erklärt werden, da Patienten mit extremer Oligozoospermie nicht untersucht wurden. Zudem ist zu beachten, dass durch Aufbereitungsmethoden die Konzentration der Spermatozoen künstlich erhöht wird und deshalb die Bewertung des Parameters „Konzentration“ schon rein logisch gesehen schwer fällt. Außerdem erschwert die Technik der ICSI - nur ein einziges Spermium wird injiziert - eine sinnvolle Erklärung für einen Zusammenhang.

In einer Studie von Strassburger et al. aus dem Jahre 2000 jedoch wurde der Einfluss der Spermatozoenzahl untersucht, indem man vier Gruppen mit verschiedenen Spermatozoenzahlen erstellte (Kryptozoospermie bis Normozoospermie). Bei Patienten mit Kryptozoospermie wurden im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant niedrigere Fertilisationsraten erreicht; bei Kryptozoospermie war die Embryoqualität außerdem signifikant niedriger im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Zudem war die Abortrate bei Patienten mit Kryptozoospermie höher als bei allen anderen Gruppen, diese Aussage deckt sich mit den Erkenntnissen von Nagy et al. (1995). Dass bei extremer Oligozoospermie so niedrige Fertilisationsraten gefunden werden, erklärten Harari et al. (1995) und Tasdemir et al. (1997) mit der Schwierigkeit, bei einer so geringen Dichte überhaupt normalgeformte Spermien zu entdecken.

Eine hohe Frequenz an DNA-Fragmentation korreliert laut Lopes et al. (1998) negativ mit der Fertilisationsrate bei intrazytoplasmatischer Spermieninjektion. De Braekeleer & Dao (1991), Baker et al. (1993) und Reijo et al. (1996) postulierten eine hohe Inzidenz chromosomaler Aberrationen und abnormer Karyotypen bei schwerer Oligozoospermie. Entsprechend wird im Rahmen der andrologischen Diagnostik bei Patienten mit weniger als 10 Mio. Spermien/ml eine humangenetische Diagnostik und Beratung empfohlen (Strassburger et al., 2000; Tüttelmann et al., 2008).

### **5.2.3. Motilität**

In der vorliegenden Arbeit lag die durchschnittliche Gesamtmotilität der ICSI-Patienten bei 28,0%, die Progressivmotilität bei durchschnittlich 18,0% (jeweils im Nativejakulat) und somit beide Parameter unterhalb den Richtlinien der WHO für Normwerte der Motilität ( $\geq 50\%$  Gesamtmotilität bzw.  $\geq 25\%$  Progressivmotilität). Für die Parameter Gesamtmotilität und Progressivmotilität konnte kein Zusammenhang mit dem ICSI-Erfolg gefunden werden. Da ein Zusammenhang der Variable *Gesamtmotilität* mit der Variable *Schwangerschaft* sowohl mittels Wilcoxon-Test als auch mittels Median-Test gesucht wurde, scheint die Wahrscheinlichkeit  $p=0,15$  im Median-Test bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p=0,68$  kein relevantes Ergebnis darzustellen. Dies wird auch sehr anschaulich durch den entsprechenden Box-and-Whisker-Plot verdeutlicht. Das für die Bestimmung der paternalen Parameter verwendete Ejakulat wurde mit einem Zeitabstand von drei bis 190 Tagen vor bzw. nach der ICSI abgenommen.

Wie bereits in Punkt 5.2.1. beschrieben, postulieren viele Autoren, dass von einer Korrelation der drei konventionellen Spermatozoenparameter Konzentration, Motilität und Morphologie nicht ausgegangen werden kann. Eine Untermauerung der Ergebnisse könnten Veröffentlichungen von Michelmann (1995) und Tucker et al. (1996) darstellen, die bei Fällen, in denen zumindest einige motile Spermien auffindbar waren, keine Relevanz zwischen den klassischen Spermatozoenparameter feststellen konnten. Bei Nagy et al. (1995) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Ejakulaten mit kompletter Asthenozoospermie und Ejakulaten mit >50% motilen Spermien bezüglich der Wirkung auf die Fertilisationsrate beschrieben, doch gehen sie aufgrund der Datenlage davon aus, dass es ganz besonders wichtig ist, ob ein motiles oder ein immotiles und somit eventuell totes Spermium in die Oozyte injiziert wird. Diese Befunde wurden in einer neueren Giessener Studie bestätigt (Stalf et al., 2005).

Shen et al. (2003) berichteten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Motilität und der Fertilisationsrate nach ICSI. Die Analyse der multiplen linearen Regressionsgleichung zeigte, dass ein Anstieg der Spermienmotilität um 20% (etwa eine Standardabweichung) einen Anstieg der Fertilisationsrate um 2,4% bewirken würde. Shoukir und Mitarbeiter (1998) beobachteten für Oozyten, die mit Spermatozoen von Ejakulaten mit einer hohen Progressivmotilität injiziert wurden, eine signifikant höhere Chance, das Blastozystenstadium zu erreichen. In dieser Studie wurde auch eine signifikante Korrelation zwischen progressiver Motilität und Blastozystenentwicklung innerhalb der ersten sechs Tage gefunden. Eine gute Progressivmotilität könnte ein Indikator adäquater metabolischer Aktivität und Lebensfähigkeit der Spermatozoen sein und somit auch Auskunft über die Eignung einer Verwendung bei der intrazytoplasmatischer Spermieninjektion geben. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum bei Verwendung lebensfähiger, aber immotiler Spermatozoen die resultierenden Embryos von minderer Qualität waren und auch ein mangelhaftes Entwicklungspotential aufwiesen (Nijs et al., 1996).

#### **5.2.4. Morphologie**

Als dritter der klassischen Spermatozoenparameter wurde die Morphologie auf Zusammenhänge bezüglich der ICSI untersucht. Der Anteil morphologischer Normalformen im Nativejakulat nach der Düsseldorfer Klassifikation (Hofmann et al., 1985, 1995; Hofmann & Haider, 1985; Hofmann, 1987) lag beim Patientenkollektiv

dieser Arbeit bei durchschnittlich 8,0%. Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p=0,02$  konnte ein Zusammenhang der Morphologie mit der Fertilisationsrate festgestellt werden. Eventuell ist auch ein tendenzieller Zusammenhang zwischen Morphologie und dem Embryoscore zu erkennen (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p=0,13$ ), jedoch kein Einfluss der Spermienmorphologie auf die Schwangerschaftsrate ( $p=0,37$  bzw.  $p=0,29$ ). Die Relevanz der Morphologie auf das ICSI-Ergebnis wird von verschiedenen Forschungsgruppen sehr heterogen diskutiert.

Anzumerken sei, dass keine vergleichbaren Studien über den Einfluss der Düsseldorfer Klassifikation auf den ICSI-Erfolg vorlagen, sondern alle Studien über die Korrelation zwischen ICSI und der Morphologie nach den *strict criteria* erfolgten. Diese Tatsache weist zum wiederholten Male auf die Dringlichkeit einer Standardisierung bei der Bestimmung der Morphologie hin bzw. dass die Düsseldorfer Klassifikation evaluiert werden muss.

Bei Untersuchungen über die Beeinträchtigung der ICSI-Resultate durch Oligoasthenoteratozoospermie fanden Mercan et al. (1998a) bei gleichen Chancen auf Schwangerschaft und Geburt eine signifikant niedrigere Fertilisationsrate bei Patienten mit schwerem OAT-Syndrom. Tasdemir et al. (1997) beschrieben eine direkte Korrelation zwischen extremer Teratozoospermie mit 100% abnormalen Kopfformen und beeinträchtigter Implantations- und Schwangerschaftsrate. Eine ganz ähnliche Beobachtung machten Osawa et al. (1999), die bei der Gruppe 0 - 4% morphologischer Normalformen nach *strict criteria* eine niedrigere Fertilisationsrate in Fällen feststellten, in denen schwere Kopfdeformitäten vorherrschten. Andere Autoren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Subgruppen der Morphologie nach *strict criteria* hinsichtlich Fertilisations-, Schwangerschafts-, Embryoentwicklungs- und Transferrate feststellen (Nagy et al., 1995). Die Globozoospermie ist dagegen mit signifikant schlechteren Resultaten der ICSI assoziiert (Liu et al., 1995; Dam et al., 2007). Da die Schwangerschafts- und Frühabortraten sich nicht signifikant bei verschieden stark ausgeprägter Morphologieabnormalität unterscheiden, kann impliziert werden, dass die morphologische Abnormalität der Spermatozoen die genetische Abnormalität der männlichen Gameten nicht so sehr widerspiegelt wie vermutet.

Viele zuvor veröffentlichte Studien postulierten, dass das ICSI-Resultat nicht durch die Morphologie nach strikten Kriterien beeinflusst wird (Hammadeh et al., 1996; Mansour

et al., 1995; Küpker et al., 1995; Nagy et al., 1995; Svalander et al., 1996; Lundin et al., 1997; Küpker et al., 1998; Sukcharoen et al., 1998; Nikolettos et al., 1999). De Vos et al. (2003) fanden bei Injektion eines abnormalen Spermiums sowohl eine signifikante Senkung der Fertilisationsrate als auch der Schwangerschaftsrate verglichen mit der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate bei Injektion eines normalen geformten Spermiums. Aber wie schon zuvor angemerkt, scheint dies nicht aus den Durchschnittswerten der Morphologie zu resultieren, da bei verschiedenen Gruppen der Morphologie (0%; 1 - 4%; 5 - 14%; >14% Normalformen) sehr ähnliche Ergebnisse bezuglich Fertilisationsrate, Fragmentationsgrad der Embryos, Schwangerschaftsrate und Implantationsrate gefunden wurden. Shoukir et al. (1998) konstatierten, dass die Morphologie keinen Einfluss auf die Blastozystenentwicklung der ersten sechs Tage habe. Selbst bei akrosomlosen und immotilen, schwanzlosen Spermatozoen werden Fälle von erfolgreicher Fertilisation und Schwangerschaft beschrieben (Lundin et al., 1994; Fishel et al., 1995; Stalf et al., 1995; Coetzee et al., 2001).

#### **5.2.5. Vitalität**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen Vitalität der Spermien und dem ICSI-Erfolg untersucht. Die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen wurde dabei mittels der Eosin-Färbemethode nach Eliasson getroffen (Eliasson & Treschl, 1971; Eliasson, 1981; WHO, 1992). Es konnte keine Relevanz festgestellt werden, keiner der ICSI-Parameter wies Zusammenhänge zur Supravitalf rbung auf.

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die konkret den Zusammenhang der Vitalität mit dem ICSI-Erfolg untersuchen und beschreiben. Koppers et al. fanden 1998 keine relevante Assoziation zwischen der Vitalität der Spermatozoen und der Fertilisations- bzw. Schwangerschaftsrate nach ICSI. Unbestritten ist jedoch, dass bei totaler Nekrospermie der ICSI-Erfolg ausbleibt. Dies unterstützen beispielsweise Aussagen von Fishel et al. (1994), die postulierten, dass die intrazytoplasmatische Spermieninjektion generell unabhängig von qualitativen Faktoren der Spermatozoen, *mit Ausnahme* der Vitalität, anzusehen ist. Stalf et al. (2005) werteten eine zumindest ortsständige Motilität als Kriterium für die erhaltene Spermiovitalit t und fanden einen signifikanten Zusammenhang mit ICSI-Erfolgsraten.

### **5.2.6. Akrosomale Reaktion**

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung der akrosom-reagierten Spermatozoen war die Triple-Stain-Technik nach Talbot & Chacon (1981), die Induktion der Akrosomreaktion wurde mittels Niedrigtemperaturmethode nach Sanchez et al. (1991) durchgeführt. Die maximale / induzierte Akrosomreaktion lag im Median bei 20,0%, der Median der Induzierbarkeit dieses Patientenkollektivs lag bei 7,5%. Laut Henkel et al. (1993) liegen die empfohlenen Grenzwerte für die IVF bei >13,0% (maximale / induzierte AR) bzw. >7,5% (induzierbare AR).

Statistisch konnten in dieser Arbeit keinerlei Zusammenhänge zwischen der akrosomalen Reaktion (sowohl maximal / induziert als auch Induzierbarkeit) und den Ergebnissen der ICSI gefunden werden. Wie bereits mehrfach erwähnt, liegt ein zeitlicher Unterschied von maximal 190 Tagen zwischen Bestimmung der paternalen Parameter und Durchführung der ICSI.

Die Stellung der Akrosomreaktion im Fertilisationsprozess ist unbestritten, jedoch ist die Einschätzung des Einflusses auf ICSI-Erfolge in der Literatur sehr inkonsistent, was verschiedene Studiengruppen angeht.

Veröffentlichungen anderer Forschungsgruppen untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit. Wie bereits erwähnt, gelangen Liu et al. (1995) ICSI-Erfolge bei Patienten mit Globozoospermie. Andererseits konstatierten Köhn et al. (1998), dass die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion nicht mit der Fertilisationsrate korreliert, Osawa et al. (1999) konnten bei schweren Akrosomdefekten keine Minderung des ICSI-Erfolges feststellen. Für Liu & Baker (2002) waren die Spermatozoen-Funktionstests zur Prediktion des ICSI-Erfolges eher von marginaler Bedeutung, da mit Injektion eines einzigen Spermiums in das Cytoplasma der Oocyte sowohl die Akrosomreaktion als auch die Oolemma und Zona pellucida umgangen wird.

Dahingegen beschrieben Sathananthan et al. (1997) bei Versuchen mit Mäusen, dass sie eine höhere Fertilisationsrate bei akrosomal reagierten Spermien erreichten als bei nicht reagierten. Sie schließen daraus, dass die akrosomale Reaktion und die Deletion des Akrosoms möglicherweise Voraussetzungen für die Spermieninkorporation nach ICSI sind. Als Erklärung für eine geringere Fertilisationsrate wird u.a. genannt, dass der akrosomale Inhalt mit seinen Enzymen die Eizelle schädigt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Induktion der Akrosomreaktion positive Wirkung auf die

Formation der Pronuclei und auch die Weiterbildung zu Blastozysten zeigt (Lacham-Kaplan & Trounson, 1995; Lee et al., 1997; Sathananthan et al., 1997).

Andererseits beschreiben Gomez et al. (1997), dass die Induktion der Akrosomreaktion vor ICSI keinen Einfluss auf die Fertilisationsrate hat.

Die Inkonsistenz der Literatur weist darauf hin, dass sowohl noch genauere Erforschung der biologischen Abläufe vonnöten ist, als auch die Entwicklung der dazu benötigten Nachweismethoden.

### **5.2.7. Akrosinaktivität**

In der vorliegenden Arbeit lag der Median des Halodurchmessers bei 11,6 µm, das liegt im Normbereich für diesen Parameter (>10 µm); die Haloformationsrate betrug bei einem Normwert von mindestens 60% mit 49,0% im Median im Subfertilitätsbereich. Der Akrosinaktivitätsindex lag im Median bei 5,8. Die Bestimmung der Akrosinaktivität fand 3-190 Tage vor bzw. nach ICSI statt.

Die statistische Auswertung ergab keine Zusammenhänge der Akrosinaktivität mit den ICSI-Resultaten, höchstens der Embryoscore könnte mit dem Akrosinaktivitätsindex ( $p=0,15$ ) oder der Haloformationsrate ( $p=0,13$ ) in Beziehung stehen.

In der Literatur findet sich insgesamt sehr wenig Information über den Parameter Akrosinaktivität in Bezug auf ICSI. Abdul-Aziz et al. (1996) untersuchten den Einfluss von Hyaluronidase-Mangel auf die Ergebnisse in der ICSI. Hyaluronidase ist wie das Akrosin ein akrosomales Enzym, das bei konventioneller *In-vitro*-Fertilisation negativ mit den Ergebnissen korreliert. Jedoch wurde bei der ICSI kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den Parametern Fertilisations-, Embryotransfer- und Schwangerschaftsrate gefunden. Diese Arbeitsgruppe vermutete deshalb, dass dieser Defekt rein mechanischer Natur ist und keine schwerwiegende Abnormalität darstellt. Um zu genaueren Aussagen zu kommen, wird die weitere Erforschung der komplexen Zusammenhänge gefordert sein.

### **5.2.8. Chromatinkondensation**

Die Chromatinkondensation der Spermatozoen wurde mit Anilinblau bestimmt (Terquem & Dadoune, 1983). Dabei wurde bei einer Färbung ab 25% und mehr eine gestörte Chromatinstruktur des Zellkerns angenommen und die Ergebnisse in *gestört* und *nicht gestört* geteilt. Bei der Interpretation zu beachten ist die Tatsache des sehr

kleinen Datensatzes der vorliegenden Arbeit. Bei einem Patientenkollektiv von sechs Patienten hatten zwei Patienten eine gestörte Chromatinkondensation, das sind 33,33%. Nach statistischer Auswertung konnte mittels Median-Test ein tendenzieller Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Fertilisationsrate gezeigt werden ( $p=0,11$ ), wohingegen das Ergebnis des Wilcoxon-Tests dieser These widerspricht ( $p=0,49$ ). Die anderen Zielgrößen Schwangerschaft und Embryoscore zeigen keine Zusammenhänge mit der Chromatinkondensation.

Van Ranst et al. (1994) erkannten keinen signifikanten Voraussagewert der Chromatinkondensation für die Fertilisationskapazität, konsekutiv die Embryonalentwicklung, Implantations- und Schwangerschaftsraten im ICSI-Programm. Hammadeh et al. (1996; 1999) bestätigten diese Beobachtung. Überdies zeigten Yoshida et al. (1997), dass strukturelle autosomale Abnormalitäten der Spermatozoen weder die Fertilisationsrate noch die frühe Embryonalentwicklung nachteilig beeinflussten.

Razavi et al. (2003) hingegen beschrieben, dass ein Protaminmangel bei Spermatozoen nachteiligen Effekt auf die Fertilisationskapazität hat. Larson et al. (2000) und Benchaib et al. (2003) schilderten eine negative Korrelation von Chromatinstörungen mit den Befunden nach ICSI. Zudem ist ein hoher Anteil morphologisch abnormaler Spermatozoen mit einer erhöhten Heterogenität der Chromatinstruktur assoziiert (Evenson et al., 1984; Ballachey et al., 1987). Sakkas et al. (1996) postulierten, dass verminderte Chromatinqualität und/oder beschädigte DNA einen negativen Einfluss auf die Fertilisationskapazität nach ICSI haben. Die Gießener Arbeitsgruppe um Steger et al. (2001; 2002; 2003) berichtete von pathologischen RNA-Bindungsproteinen bei infertilen Männern. Diese gestörte Protamin-1 / Protamin-2 Protein-Ratio während der Chromatinkondensation schien bei Steger et al. in mehreren Studien für die ICSI einen möglichen prädiktiven Faktor darzustellen.

### **5.2.9. Weitere Einflussgrößen**

Bei der Suche nach passenden Modellen zur Voraussage des ICSI-Erfolges wurden auch maternale und unabhängige Faktoren berücksichtigt. So ist für den Zielparameter *Embryoscore* das Alter der Frau wichtig und für den Parameter *Schwangerschaft* das Alter der Frau sowie die Anzahl der transferierten Embryos.

In der Literatur besteht Übereinstimmung bezüglich der Bedeutung des Alters der Frau für den ICSI-Erfolg. Bei Oehninger et al. (1995), Terriou et al. (1995), Abdelmassih et al. (1996) und Mercan et al. (1998b) korrelierte das Alter der Frau negativ mit dem Auftreten einer Schwangerschaft nach ICSI. Auch Osmanagaoglu et al. (2002), George et al. (2003) und Nicopoullou et al. (2004) erkannten die negative Wirkung des Alters auf den ICSI-Erfolg. Entsprechende Daten finden sich im Deutschen IVF-Register (DIR; Ref. s.o.).

#### **5.2.10. Modellerstellung**

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels multivariater Analyse kein Modell gefunden werden, das die verschiedenen Zielgrößen der ICSI zufrieden stellend hätte voraussagen können. Das bestätigt insgesamt die Ergebnisse der univariaten Analyse. Trotz Hinzufügen der anderen wichtigen Einflussvariablen *Alter der Frau* und *Anzahl der transferierten Embryos* ergab sich kein nennenswerter Informationsgewinn. Erneut muss betont werden, dass bei der vorliegenden Arbeit nicht dasselbe Ejakulat ausgewertet wurde, das auch für die ICSI-Behandlung genommen wurde. Das unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit und die damit zusammenhängende Problematik einer Prognoseerstellung im Alltag. Die Resultate unserer Arbeit werden durch die Literatur gestützt, die bisher durchgeführten Studien allerdings berücksichtigten dasjenige Ejakulat zur Bestimmung der paternalen Parameter, das auch für die ICSI verwendet wurde.

Heute werden anstatt konventioneller Spermatozoenparameter oder Spermatozoenfunktions-tests chromosomale (Larson et al., 2000; Lewis, 2002; Benchaib et al., 2003; Steger, 2003; Razavi et al., 2003), maternale (teils hormonelle) Faktoren (Rienzi et al., 2003) oder die Qualität der frühen Zellteilung (Nagy et al., 2003; Bos-Mikich et al., 2001) als Prädiktoren für eine erfolgreiche ICSI bzw. ihre einzelnen Variablen postuliert.

Weitere Schwierigkeiten stellen die Zielparameter dar, die durch die Komplexität der biologischen Vorgänge vermutlich immer zugleich sowohl paternale als auch maternale Einflüsse beinhalten. Benötigt werden Zielparameter, die jeweils einzeln die maternalen oder paternalen Einflussnahme bemessen. Schlüsselement könnte dabei die Kenntnis des genauen Verlaufs der frühen Fertilisierung und konsekutiv die Identifikation neuer Zielparameter sein.

### 5.3. Zuverlässigkeit bei Wiederholungsmessungen

Im ersten und zweiten Teil der Diskussion wurde gezeigt, dass im vorliegenden Datensatz weder uni- noch multivariat eine Vorhersage für den Erfolg der assistierten Reproduktion getroffen werden konnte. Trotz eines niedrigen Korrelationskoeffizienten in der multiplen Regressionsanalyse präsentierte sich die Normalmorphologie als der zuverlässigste Parameter zur Vorhersage der Fertilisation *in vitro*.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollte nun die intra- und interindividuelle Variabilität der einzelnen Parameter beleuchtet werden.

Zunächst fiel deskriptiv die enorme Bandbreite der Werte aller Parameter auf, zudem konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, woraufhin die logarithmierten Werte der Parameter untersucht wurden. Um die intra- und interindividuelle Variabilität statistisch zu beurteilen, wurde eine Varianzkomponentenzerlegung (VKZ) durchgeführt. Für die klassischen Spermatozoenparameter Konzentration, Motilität (Gesamt- und Progressivmotilität) und Morphologie (Normalformen) wurden fünf Patienten ausgewählt, deren Ejakulat fünfmal untersucht wurde. Bei 15 Patienten wurde die Akrosomreaktion dreimal gemessen, allerdings konnte aufgrund der Datenlage keine Logarithmierung durchgeführt werden, was die Interpretation der Variabilität einschränkte. Doch gemeinsam mit den dazugehörigen Grafiken können diese Ergebnisse als Hinweis für die enorme Schwankungsbreite der Variabilität der AR genommen werden. Da beim Parameter Akrosinaktivität aufgrund der Datenlage keine statistische VKZ möglich war, verdeutlichen hier Grafiken die große intra- und interindividuelle Variabilität. Die Ergebnisse der VKZ aller Parameter zeigen, dass die 2s-Intervalle sowohl der intra- als auch der interindividuellen Variabilität sehr breit sind. Auch grafisch stellt sich diese starke Schwankung dar. Die Varianzkomponentenzerlegung bestätigt die Annahme, dass der Faktor *Zeit* die intraindividuelle Variabilität stark beeinflusst und konsekutiv eine valide Voraussage für den Erfolg einer assistierten Reproduktion nicht möglich ist. In den meisten Studien wurde versucht, die Beziehung zwischen diagnostischen Tests / Spermatozoenparametern und dem Fertilisationspotential *in vitro* zu bestimmen, indem man dasselbe Ejakulat auswertete, das auch für die assistierte Reproduktion verwendet wurde. Das hat einerseits den Vorteil, dass die Parameter direkt korreliert werden können und biologische Zusammenhänge erfasst werden können, andererseits werden die Effekte der inter-ejakulatorischen Variabilität mit diesem Vorgehen nicht beachtet

(Schwartz et al., 1979). Amann et al. (1989) und Amann & Hammerstedt (1993) räumen ein, dass die Erkennung von Zusammenhängen zwischen Spermatozoenparametern und Fertilität wichtig ist, betonen jedoch die immense Bedeutung spezifischer und präziser Tests, die die Fertilität valide voraussagen. Bei Untersuchungen desselben Ejakulates kann der Fertilisationsprozess an sich untersucht werden, nicht jedoch eine Vorhersage von Fertilisation und/oder Schwangerschaft getroffen werden.

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die die intraindividuelle Fluktuation von Spermatozoenparametern durchleuchten. Knuth et al. (1988) untersuchten die intraindividuellen Schwankungen von Morphologie, Motilität, Gesamtzahl und Konzentration der Spermien bei jungen Männern mit normalen Spermatozoenparametern. Es zeigte sich bei Gesamtzahl und Konzentration der Spermien die höchste intraindividuelle Variabilität. Auch bei Cooper et al. (1991) wiesen nach Analyse von Ejakulaten sicher fertiler Männer (Untersuchung von Standardsamenparametern) erneut Gesamtzahl und Konzentration der Spermatozoen die größte intraindividuelle Variabilität auf. Diese hohe Schwankungsbreite deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Sukcharoen et al. (1996) untersuchten den Einfluss der Zeit zwischen diagnostischem Setup und IVF. Bei 73 Paaren wurden verschiedene Spermatozoenparameter in einem durchschnittlichen Zeitabstand von  $137,3 \pm 11,0$  Tagen zum IVF-Beginn (vor und nach Samenpräparation mit Percoll) gemessen. Die untersuchten Parameter waren: Spermatozoendichte, Motilität (mit CASA), Morphologie (nach WHO 1992), Akrosomreaktion (mit Ionophore A23187), Chromatinkondensation (mit Acridinorange-Färbung) und ROS (im Luminometer). Im Nativejakulat zeigten Normalmorphologie ( $p < 0,001$ ) und Konzentration ( $p = 0,001$ ) einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate *in vitro*. Nach Percoll-Präparation korrelierten Normalmorphologie ( $p = 0,001$ ), einige Variablen der Bewegung und die ROS ( $p < 0,001$ ) mit dem Fertilisationserfolg *in vitro*. Außerdem wies eine multiple Regressionsanalyse mit verschiedenen Parametern einen Regressionskoeffizienten von  $r = 0,51$  auf. Um den Einfluss eines Zeitabstands zwischen Samenprobe und nachfolgender IVF zu untersuchen, wurde der Unterschied zwischen beobachteter und vorausgesagter Fertilisationsrate in der Regressionsanalyse auf den Zeitabstand bezogen. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang beobachtet ( $r = 0,147$ ;  $p = 0,234$ ), zeitlicher Abstand zwischen Setup und IVF schien hier nicht von großer Wichtigkeit zu sein. Da die

Normalmorphologie in unserer Arbeit noch der am besten verwertbare Parameter zur Vorhersage der Fertilisation war, bestätigen unsere Beobachtungen die Ergebnisse der Autoren in dieser Hinsicht. Auch Troup et al. (1994) berichteten von einer großen Variationsbreite bei der akrosomalen Reaktion (mit Ionophore Challenge).

Sanchez et al. (2000) untersuchten die intraindividuelle Variabilität an zwei gesunden Männern (je ein Proband mit zu niedrigen Werten und mit Normwerten im Ejakulat), indem innerhalb von drei Monaten je sechsmal ein Spermogramm erstellt wurde. Dabei fielen signifikante Schwankungen der Parameter Konzentration, Gesamtmotilität und Chromatinkondensation auf. Als einzig konstanter Parameter und mit geringer Schwankungsbreite bei beiden Probanden erwies sich die Morphologie. Diese Beobachtung unterstützt die Aussage von Bals-Pratsch (1999), dass die wiederholte Erhebung der Morphologie intraindividuell vergleichsweise beständige Werte ergibt, gegenüber größeren Schwankungen bei Konzentration und Motilität.

Um die intraindividuelle Variabilität der drei klassischen Spermatozoenparameter (Konzentration, Morphologie, Motilität) und der DNA-Integrität der Spermien (mit dem DNA-Strukturtest SCSA = „sperm chromatin structure assay“) zu bestimmen, wurden von Zini et al. (2001) Wiederholungsmessungen bei infertilen Männern durchgeführt. Die geringste Variabilität wurde bei der DNA-Integrität gemessen, es folgten Motilität und Konzentration. Hiermit bestätigten sich die Erfahrungen von Evenson et al. (1991), die von einer geringen Variabilität der Integrität der Chromatinstruktur bei unsortiertem Spendergut (i.e. fertile und unfertile) berichteten.

Ein anderer Aspekt ist die Variabilität zwischen den Labors und zwischen verschiedenen Untersuchern. Michelmann et al. (1997) diskutierten die verschiedenen Parameter, die einer geregelten Qualitätssicherung unterliegen sollten: Dies beinhaltet sowohl die Handhabung des Labormaterials, die Herstellung geeigneter Medien als auch die korrekte Samenanalyse, dazu zählen alle üblichen Techniken der Spermienpräparation und die Spermienfunktionstests. Es gibt einige Veröffentlichungen, die betonen, wie wichtig ein zuverlässiger Test (Mc Lachlan et al., 2003), erfahrene Untersucher (Franken et al., 2000), externe Qualitätskontrollen (Ombelet et al., 1998; Mc Lachlan et al., 2003) und strenge Definitionen und Standards (Jorgensen et al., 1997) für die Untersuchungstechniken sind. Dabei stellt sich vor allem die Morphologie als diffiziler Parameter dar (Dunphy et al., 1989; Auger et al., 2000). Wie bereits erwähnt, liegt die Begründung dafür sicher auch in der mangelnden

Standardisierung, allgemein anerkannten Kriterien (Baker & Clarke, 1987) und der Objektivität zur Beurteilung. Zudem braucht es besonders für die Einschätzung der Morphologie erfahrene Untersucher (Eustache & Auger, 2003; Franken et al., 2003). Inwieweit diese Aspekte trotz erfahrener Untersucher sowie interner und externer Qualitätskontrollen, denen sich die Klinik regelmäßig unterzieht, einen Einfluß auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hatten, ist fraglich.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In vielen Studien wird der Einfluss der Ejakulatqualität auf assistierte Reproduktionsverfahren untersucht. Die Bedeutung sowohl der klassischen als auch der funktionellen Spermatozoenparameter wird durch den mehrfachen Nachweis signifikanter Zusammenhänge verschiedener Forschungsgruppen unterstrichen. Um Zusammenhänge zu erkennen, wird in den meisten Studien allerdings dasjenige Ejakulat herangezogen, das auch für die assistierte Reproduktionstechnik Verwendung findet.

Wird dieser Zusammenhang jedoch, wie es für diagnostische Zwecke erforderlich ist, auf ein zeitlich anderes Ereignis bezogen, so gibt es Probleme bei der Vorhersage von Fertilisation und Schwangerschaft.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern der **Faktor Zeit** einen Einfluss für die Prädiktion von Fertilisation und Schwangerschaft darstellt oder ob trotz Zeitabstandes auch Korrelationen beschrieben werden können. Sämtliche Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Spermatozoenparametern und Ergebnissen der assistierten Reproduktion wurden anhand von Befunden durchgeführt, die jeweils mit zeitlichem Abstand zu Maßnahmen der assistierten Reproduktion erhoben worden waren.

Bei der Analyse der Einzel-Parameter bezüglich des Einflusses auf den Erfolg der **IVF** zeigten nur die klassischen Spermogrammvariablen Konzentration und Anteil normal geformter Spermatozoen jeweils Zusammenhänge mit der Fertilisationsrate, in der statistischen Bewertung allerdings mit einer relativ hohen Irrtumswahrscheinlichkeit und damit bei weitem nicht so gut, wie in vielen anderen Studien beschrieben. Keiner der Spermatozoenfunktions-tests wies einen signifikanten Zusammenhang mit den IVF-Ergebnissen auf. Ein Versuch der Modellerstellung zur Voraussage der drei Zielparameter misslang.

Bei Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Ejakulatparametern und Ergebnissen der **ICSI** zeigten wiederum Konzentration und Morphologie am ehesten eine Korrelation mit der Fertilisationsrate. Die Zielgrößen Embryoscore und Schwangerschaft ließen sich allerdings durch keinen der einbezogenen Spermatozoenparameter voraussagen. Eine Modellerstellung gelang für keine der drei

Zielvariablen. Über die Zusammenhänge zwischen Spermatozoenparametern und ICSI wird momentan kontrovers diskutiert (selbst wenn dasselbe Ejakulat für andrologische Diagnostik und ICSI eingesetzt wird).

Die Fertilisation ist ein **multifaktoriell** bestimmter Prozess, bei der Austestung definierter Spermatozoenfunktionen jedoch wird nur jeweils *ein* Parameter getestet.

In dieser Arbeit wurde versucht, mittels Kombination bestimmter Parameter sinnvolle Modelle zu erstellen, die diesen komplexen Vorgang vorherzusagen in der Lage sind. Die Spermatozoenparameter konnten den zu erwartenden Zusammenhang nicht bestätigen. Es wurde für keines der Reproduktionsverfahren ein Modell gefunden, das das Auftreten einer Schwangerschaft voraussagen könnte.

In einer Varianzkomponentenzerlegung wurden die einzelnen Parameter auf ihre **Reliabilität** hin untersucht. Es zeigte sich für alle getesteten Parameter eine starke intra-individuelle Variabilität. Unsere Ergebnisse bestätigen Mitteilungen anderer Autoren, dass über das Basis-Spermiogramm hinaus strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Spermatozoen und ihr prognostischer Stellenwert erforscht werden müssen.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen mit Zeitabständen von bis zu 190 Tagen zwischen andrologischer Diagnostik und assistierter Reproduktion auf die **Problematik einer zuverlässigen Prognose** der IVF bzw. ICSI in der klinischen Praxis hin. Ungeachtet der Tatsache, dass Untersuchungen bezüglich der komplexen Zusammenhänge der Fertilisation mit maternalen und paternalen Faktoren eminent wichtig sind, sind im klinischen Alltag solche Parameter gefordert, die schon **vor** der Durchführung einer Therapie das Resultat der Therapie prognostizieren können. Es besteht der dringende Bedarf an standardisierter Methodik, die auch dem Anspruch standhält, dass die Fertilisation als multifaktorieller Prozess prognostiziert werden kann. Es müssen zuverlässige, stabile Parameter gefunden werden, die im diagnostischen Setup des klinischen Alltags zuverlässig die Fertilisationskapazität voraussagen können. Da die hier verwendeten Daten von erfahrenen Untersuchern und unter ständigen Qualitätskontrollen durchgeführt wurden, belegen unsere Ergebnisse, dass der andrologische Zustand zum Zeitpunkt der Diagnostik nicht notwendigerweise demjenigen zum Zeitpunkt der assistierten Reproduktion entspricht.

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt die Grenzen der momentan in der klinischen Routine verfügbaren andrologischen Diagnostik auf.

Durch wachsenden Kostendruck im Gesundheitssystem muss heute auch die Reproduktionsmedizin deutlich effizienter und effektiver werden. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse besteht die Dringlichkeit weiterer Untersuchungen mit prospektivem Studiendesign, um diese auf Reliabilität zu prüfen. Falls sich Ergebnisse dieser Arbeit in weiteren Studien bestätigen sollten, müsste der Stellenwert andrologischer Diagnostik, was das im Vorfeld zu bestimmende prognostische Potential für die assistierte Reproduktion angeht, stark in Frage gestellt werden.

## 7. SUMMARY

Many studies have examined the influence of sperm quality on assisted reproduction procedures. The recurring evidence of a significant correlation, provided by numerous research groups, emphasizes the importance of both the classical and the functional semen parameters. In order to recognize this correlation, however, most studies use the ejaculate, which has already been used for assisted reproduction technology. However, if this correlation is based on a chronologically different event, as required for diagnostic purposes, the prediction of fertilization and pregnancy will be problematic.

The aim of this study is, to examine whether the **time factor** has an influence on the prediction of fertilization and pregnancy, or, whether a correlation can be described in spite of the time interval. All our research on the relationship between semen parameters and the outcome of assisted reproduction was conducted on results obtained with a time interval between the andrological diagnosis and assisted reproduction.

In the analysis of individual parameters with regard to their influence on the success of **IVF**, only the conventional semen parameter concentration and the percentage of normally shaped sperms correlated with the fertilization rate; indeed, in the statistical evaluation, with a relatively high probability of error and, thus, not nearly as well as described in many other studies. None of the sperm function tests showed a significant correlation with IVF outcome. An attempted model to predict the three target parameters (fertilization rate, pregnancy, embryo score) was not successful.

In the analysis of the correlation between sperm parameters and the results of **ICSI**, the concentration and morphology again showed the closest correlation with the fertilization rate. However, the target parameters, embryo score and pregnancy, could not be predicted by any of the analyzed semen parameters. Modeling was not possible for any of the three target parameters. There is an ongoing controversial debate on the relationship between semen parameters and ICSI (even if the same ejaculate is used for both andrological diagnosis and ICSI).

Fertilization is a **multifactorially** determined process, but, in testing spermatozoal functions, just one parameter is tested. This study tried to create useful models to predict this complex process, by using a combination of parameters. The semen

parameters could not verify the expected correlation. A model that could predict the occurrence of pregnancy could not be established for any of the reproduction methods.

In a variance components analysis, the individual parameters were examined with regard to their **reliability**. A large intra-individual variability was shown for all tested parameters. Our results confirm conclusions by other authors, that the structural and functional properties of spermatozoa and their prognostic significance have to be investigated.

The results of this study, with intervals of up to 190 days between andrological diagnosis and assisted reproduction, emphasize the **problems involved in a reliable prediction** of IVF or ICSI in clinical practice. Despite the fact that research into the complex relationships of fertilization with maternal and paternal factors is very important, in clinical practice parameters that can predict the result of the therapy **before** implementation are required. There is an urgent need for a standardized methodology that will do justice to the claim that fertilization can be predicted as a multifactorial process. Reliable, stable parameters, which can predict the fertilization capacity in the clinical diagnostic setup with certainty, have to be established. Since the data used here come from experienced researchers, and were collected under constant quality control, our results prove that the andrological status at the time of diagnosis is not necessarily identical with the status at the time of assisted reproduction.

This study demonstrates the limitations of the andrological diagnostics currently available in clinical routine. Against a background of growing cost pressures in health care, reproductive medicine also needs to become much more efficient and effective. On the basis of the results presented here, there is a great demand for further research, with prospective study design, in order to prove their reliability. If these results are confirmed by further studies, the importance of andrological diagnosis in determining the prognostic potential for assisted reproduction will be challenged.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelmassih, R., Sollia, S., Moretto, M., Acosta, A.A. (1996). Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 65, 573-577.

AbdulAziz, M., Meriano, J., Casper, R.F. (1996). Intracytoplasmic sperm injection for treatment of infertility due to acrosomal enzyme deficiency. *Fertil Steril* 65, 977-980.

Acosta, A.A., Kruger, T.F. (1996). *Human Spermatozoa in assisted Reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed., The Parthenon Publishing Group, New York, London.

Acosta, A.A., Kruger, T.F., Swanson, R.J., Ackerman, S. (1988). In vitro fertilization in male infertility. In Garcia, C.-R., Mastroianni, L. Jr., Dublin, L. (eds.) *Current Therapy of Infertility - 3*, pp. 233-239. (Philadelphia: B.C. Decker Inc.).

Adham, I.M., Nayernia, K., Engel, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 46, 370-376.

Ahuja, K.K., Smith, W., Tucker, M., Craft, I. (1985). Successful pregnancies from the transfer of pronucleate embryos in an outpatient in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 44, 181-184.

Aitken, R.J. (1988). Assessment of sperm function for IVF. *Human Reprod* 3, 89-95.

Aitken, R.J. (1989). Motility parameter and fertility. In: *Controls of sperm motility: biological and clinical aspects*, Gagnon C. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle*. 2. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, Basel, Cambridge, New York.

Alikani, M., Palermo, G., Adler, A., Bertoli, M., Blake, M., Cohen, J. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 3, 283-288.

Alper, M.M., Lee, G.S., Seibel, M.M., Smith, D., Oskowitz, S.P., Ransil, B.J., Taymar, M.L. (1985). The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a program of in vitro fertilization. *J in vitro Fert Embr Transf* 2, 217-223.

Amann, R.P. (1987). Function of the epididymis in bulls and rams. *J Reprod Fertil* 34, 115-131.

Amann, R.P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 10, 89-98.

Amann, R.P., Hammerstedt, R.H. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14, 397-406.

Ashkenazi, J., Orvieto, R., GoldDeutch, R., Feldberg, D., Dicker, D., Voliovitch, I., Ben-Rafael, Z. (1996). The impact of woman's age and sperm parameters on fertilization rates in IVF cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 66, 155-159.

Auger, J., Eustache, F., Ducot, B., Blandin, T., Daudin, M., Diaz, I., El Matribi, S., Gony, B., Keskes, L., Kolbezen, M., Lamarte, A., Lornage, J., Nomal, N., Pitaval, G., Simon, O., Virant-Klun, I., Spira, A., Jouannet, P. (2000). Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 15, 2360-2368.

Auger, J., Mesbah, M., Huber, C., Dadoune, J.P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 13, 452-462.

Austin, C.R. (1952). The „capacitation” of mammalian sperm. *Nature* 170, 326.

Austin, C.R. (1960). Capacitation and release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1, 310-311.

Austin, C.R. (1975). Membrane fusion events in fertilization. *J Reprod Fertil* 44, 155-166.

Austin, C.R. (1985). Sperm maturation in the male and female genital tracts. *Biology of fertilization*, Vol. 2 (eds. Metz, C.B.; Monroy, A.), Academic press, New York, pp. 121-155.

Ayala, C., Steinberger, E., Smith, D.P. (1996). The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. *J Androl* 17, 718-725.

Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 269, 31845-31849.

Baer von, C.E. (1827). *De ovi mammalium et hominis genesis. Epistolam ad Academiam Imperialem Scientarum Petropolitanam; Lipsiae Sumptibus Leopoldi Vossii (Leopold Voss), Leipzig.*

Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L.C., Breitbart, H., Eisenbach, M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med* 9, 149-150.

Baker, H.W.G., Clarke, G.N. (1987). Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clin Reprod Fertil* 5, 37-43.

Baker, H.W.G., Liu, D.Y., Bourne, H., Lopata, A. (1997). Diagnosis of sperm defects in selecting patients for assisted fertilization. *Hum Reprod* 8, 1779-1780.

Ballachey, B.E., Hohenbiken, W.D., Evenson, D.P. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *J Biol Reprod* 36, 915-926.

Bals-Pratsch, M. (1999). Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* für das Fach Gynäkologie und Geburtshilfe; Möglichkeiten und Grenzen der assistierten Fertilisation bei männlicher Infertilität. Münster (Westfalen).

Baltz, J.M., Pallini, V., Burrini, A.G. (1990). Dense fibres protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod* 43, 485-491.

Barratt, C.L.R., Cooke, I.D. (1991). Sperm transport in the human female reproductive tract – a dynamic interaction. *Int J Androl* 14, 394-411.

Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol* 34, C1-C5.

Barros, C., Capote, C., Perez, C., Crosby, J.A., Becker, M.I., De Ioannes, A. (1992). Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biol Res* 25, 31-40.

Barros, C., Crosby, J.A., Moreno, R.D. (1996). Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* 20, 33-39.

Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R., Avila, R., Avendaño, C., Oehninger, S. (2009). Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril* 92, 835-848.

Bartoov, B., Eltes, P., Pansky, M., Lederman, H., Caspi, E., Soffer, Y. (1993). Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod* 8, 65-70.

Bartoov, B., Reichart, M., Eltes, F., Lederman, H., Kedem, P. (1994). Relation of human sperm acrosin activity and fertilization in vitro. *Andrologia* 26, 9-15.

Bastiaan, H.S., Windt, M.L., Menkveld, R., Kruger, T.F., Oehninger, S., Franken, D.R. (2003). Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 79, 49-55.

Bedford, J.M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 28, 108-120.

Bedford, J.M. (1990). Sperm dynamics in the epididymis. In: Asch R.H., Balmaceda, J.P. and Johnson, I. (eds.), *Gamete physiology. Serone symposia*, Norwell, MA, USA, p. 53.

Bedford, J.M. (1994). The status and state of the human epididymis. *Hum Reprod* 9, 2187-2199.

Bedford, J.M., Hoskins, D.D. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming, G.E. (ed.) "Marshall's Physiology of Reproduction", Churchill Livingstone, Edinburgh-London-Melbourne-New York; Vol. 2, pp. 379-568.

Bellve, A.R., O'Brian, D. (1983). The mammalian spermatozoon. Structure and temporal assembly. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Hartmann J.F. (ed.) New York Academic, pp. 55-137.

Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guerin, J.F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18, 1023-1028.

Benoff, S. (1998). Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 4, 453-471.

Berger, T., Marrs, R.P., Moyer, D.L. (1985). Comparison of techniques for selection motile spermatozoa. *Fertil Steril* 43, 268-273.

Bergmann, M. (2006). Physiology of Spermatogenesis. In: *Andrology for the Clinician*. Schill, W.B., Comhaire, F.H., Hargreave, T.B. (eds.) Springer, Heidelberg Berlin New York Tokyo, pp. 272-281.

Bhattacharya, S., Hamilton, M.P., Shaaban, M., Khalaf, Y., Seddler, M., Ghobara, T., Braude, P., Kennedy, R., Rutherford, A., Hartshorne, G., Templeton, A. (2001). Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet* 357, 2075-2079.

Blackmore, P.F., Beebe, S.I., Danforth, D.R., Alexander, N. (1990). Progesterone and 17-Hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265, 1376-1380.

Blackwell, J., Kaminski, J.M., Bielfeld, P., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1992). Human sperm acrosin. Further studies with the clinical assay and activity in a group of presumably fertile men. *J Androl* 13, 571-578.

Blake, M., Garrisi, J., Tomkin, G., Cohen, J. (2000). Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 73, 31-37.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95, 317-324.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 102, 1363-1371.

Bockenheimer-Lucius, G., Thorn, P., Wendehorst, C. (2008). *Umwege zum eigenen Kind*. Göttinger Schriften zum Medizinrecht, Band 3, Universitätsverlag Göttingen.

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

Bolton, V.N., Braude, P.R. (1984). Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Arch Androl* 13, 167-176.

Bolton, V.N., Wren, M.E., Parsons, J.H. (1991). Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocytes. *Fertil Steril* 55, 830-832.

Bonde, J.P., Ernst, E., Jensen, T.K., Hjollund, N.H., Kolstad, H., Henriksen, T.B., Scheike, T., Giwercman, A., Olsen, J., Skakkebaek, N.E. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 10, 1172-1177.

Bos-Mikich, A., Mattos, A.L., Ferrari, A.N. (2001). Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 16, 2658-2661.

Bostofte, E., Serup, J., Rebbe, H. (1982). Relation between sperm count and semen volume and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int J Androl* 5, 267-275.

Bourne, H., Richings, N., Harari, O., Watkins, W., Speirs, A.L., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1995). The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev* 7, 237-245.

Brandelli, A., Miranda, P.V., Anon-Vazquez, M.G., Marin-Brigiler, C.I., Sanjurjo, C., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J.A., Tezon, J.G. (1995). A new predictive test for in-vitro fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by N-acetylglucosamine-neoglycoprotein. *Hum Reprod* 10, 1751-1756.

Breitbart, H. (2002). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J Reprod Immunol* 53, 151-159.

Brucker, C., Lipford, G.B. (1995). The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* 1, 51-62.

Burkman, L.J. (1990). Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects* (Gagnon, C., ed.) CRC Press Boca Raton; pp. 303-329.

Calvete, J.J., Sanz, L., Töpfer-Petersen, E. (1992). Carbohydrate-binding proteins involved in gamete interaction in the pig. In: Nieschlag, E. Habenicht, U.-F. (eds.) *Spermatogenesis, fertilization, contraception. Molecular cellular and endocrine events in male reproduction*. Springer, Heidelberg Berlin New York Tokyo, pp. 395-417.

Calvin, H.I. (1976). Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 434, 377-389.

Calvo, L., Dennison-Lagos, L., Banks, S.M., Dorfmann, A., Thorsell, L.P., Bustillo, M., Schulman, J.D., Sherins, R.J. (1994). Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 9, 1880-1886.

Carrillo, A.J., Atiee, S.H., Lane, B., Pridham, D.D., Risch, P., Silverman, I.H., Cook, C.L. (1998). Oolemma rupture inside the intracytoplasmic sperm injection needle significantly improves the fertilization rate and reduces oocyte damage. *Fertil Steril*, 70, 676-679.

Carver-Ward, J.A., Jaroudi, K.A., Hollanders, J.M., Einspinner, M. (1996). High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum Reprod* 11, 1923-1928.

Catt, J., O'Neill, C. (1995). Manipulation of sperm before intracytoplasmic sperm injection improves fertilization rates. *Fertil Steril* 64, 1210-1212.

Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.

Chapman, N.R., Barratt, C.L.R. (1996). The role of carbohydrate in sperm-ZP3 adhesion. *Mol Hum Reprod* 2, 767-774.

Coetzee, K., Bermes, N., Krause, W., Menkveld, R. (2001). Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia* 33, 159-163.

Coetzee, K., Kruger, T.F., Lombard, C.J. (1998). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 4, 73-82.

Coetzee, K., Kruger, T.F., Lombard, C.J. (1999). Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia* 31, 163-168.

Coetzee, K., Windt, M.L., Menkveld, R., Kruger, T.F., Kitshoff, M. (2001). An intracytoplasmic sperm injection pregnancy with a globozoospermic male. *J Assist Reprod Genet* 18, 311-313.

Cohen, J., Edwards, R., Fehilly, C., Fishel, S., Hewitt, J., Purdy, J., Rowland, G., Stepstone, P., Webster, J. (1985). In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertil Steril* 43, 422-432.

Cohen, J., Weber, R.F.A., van der Vijver, J.C.M., Zeilmaker, G.H. (1982). In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertil Steril* 37, 565-572.

Collins, J.A. (1987). Diagnostic assessment of the infertile male partner. *Curr Probl Obstet Gynecol Infert* 10, 177-224.

Cooper, T.G. (1990). In defense of a function for the human epididymis. *Fertil Steril* 54, 965-975..

Cooper, T.G., Jockenhövel, F., Nieschlag, E. (1991). Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod* 6, 859-866.

Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T., Vogelsong, K.M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16, 231-245.

Corselli, J., Talbot, P. (1987). In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev Biol* 122, 227-242.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J., Hanson, F. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 15, 213-226.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J., Hanson, F. (1988). Induction of acrosome reaction by human zona pellucida. *Biol Reprod* 38, 235-244.

Croxatto, H.B., Oritz, M.E., Diaz, S., Hess, R., Balmaceda, J., Croxatto, H.D. (1978). Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following the luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 132, 629-634.

Cui, Y.H., Zhao, R.L., Wang, Q., Zhang, Z.Y. (2000). Determination of sperm acrosin activity for evaluation of male fertility. *Asian J Androl* 2, 229-232.

Cummins, J.M., Pember, S.M., Jequier, A.M., Yovich, J.L., Hartmann, P.E. (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other semen parameters. *J Androl* 12, 98-103.

Cummins, J.M., Woodall, P.F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fert* 75, 153-175.

Cummins, J.M., Yanagimachi, R. (1982). Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 5, 239-256.

Dadoune, J.P. (1988). Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa. *Hum Reprod* 3, 311-318.

Dadoune, J.P., Alfonsi, M.F. (1986). Ultrastructural and cytochemical changes of the heads components of human spermatids and spermatozoa. *Gamete Res* 14, 33-46.

Dadoune, J.P., Mayaux, M.J., Guihard-Moscato, M.L. (1988). Correlations between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 20, 211-217.

Dam, A.H., Feenstra, I., Westphal, J.R., Ramos, L., van Golde, R.J., Kremer, J.A.. (2007). Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 13, 63-75.

Dandekar, P., Aggeler, J., Talbot, P. (1992). Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum Reprod* 7, 391-398.

David, G., Jouannet, P., Martin-Boyce, A., Schwartz, D. (1979). Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 31, 453-455.

Davis, R.O., Gravance, C.G. (1994). Consistency of sperm morphology classification methods. *J Androl* 15, 83-91.

De Braekeieer, M., Dao, T.N. (1991). Cytogenetic studies in male infertility: A review. *Hum Reprod* 6, 245-250.

De Graaf, R. (1668). *De virorum Organis Generationi Inserventibus, De Clysteribus Et De Usu Siphonis In Anatomis*. Lugd. Batan et Roterod. ex off. Hackiana.

DeJonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11, 205-214.

DeJonge, C.J., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1989). Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. *Gamete Res* 23, 387-397.

DeJonge, C.J., Tarchala, S.M., Rawlins, R.G., Binor, Z., Radwanska, E. (1993). Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 8, 253-257.

De Vos, A., Van de Velde, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Van Steirteghem, A. (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79, 42-48.

Delgado, N.M., Reyes, R., Mora-Galindo, J., Rosado, A. (1988). Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Sci* 42, 2177-2183.

Dellenbach, P., Nisand, I., Moreau, L., Feger, B., Plumere, C., Gerlinger, P., Brun, B., Rumpler, Y. (1984). Transvaginal, sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 30, 1467.

Deutsches IVF-Register (2009). Jahresbericht 2008. Deutsches IVF Register e.V. 2009.

Devroey, P., Fauser, B.C., Diedrich, K.; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008. (2009). Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 15, 391-408.

Diaz, S., Ortiz, M.E., Croxatto, H.B. (1980). Studies on the duration of ovum transport by the human oviduct. III. Time interval between the luteinizing hormone peak and recovery of ova by transcervical flushing of the uterus in normal women. *Am J Obstet Gynecol* 137, 116-121.

Dobell, C. (1958). *Antoni van Leeuwenhoek and his „little animals“*. Russell & Russell, New York.

Dohle, G.R., Colpi, G.M., Hargreave, T.B., Papp, G.K., Jungwirth, A., Weidner, W.; EAU Working Group on Male Infertility. (2005). EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 48, 703-711.

Donnelly, E.T., Lewis, S.E., McNally, J.A., Thompson, W. (1998). In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 70, 305-314.

Drobnis, E.Z., Yudin, A.I., Cherr, G.N., Katz, D.F. (1988a). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev Biol* 130, 311-332.

Drobnis, E.Z., Yudin, A.I., Cherr, G.N., Katz, D.F. (1988b). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res* 21, 367-383.

Dunphy, B.C., Kay, R., Barratt, C.L., Cooke, I.D. (1989). Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl* 10, 378-385.

Duran, E.H., Gürgan, T., Günalp, S., Enginsu, M.E., Yarali, H., Ayhan, A. (1998). A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 13, 1235-1239.

Eddy, E.M., O'Brien, D.A. (1994). The spermatozoon. In: Knobil, E. and O'Neill, J.D. (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition, Vol. 1, Raven Press, New York, pp. 29-78.

Edwards, R.G. (1981). Test-tube babies, 1981. *Nature* 293, 253-256.

Edwards, R.G., Steptoe, P.C. (1980). *A Matter of Life*. Hutchinson, London.

Eisenbach, M., Giojalas, L.C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 276-285.

Eliasson, R. (1971). Standards for investigation of human semen – Untersuchungsstandards für das menschliche Sperma. *Andrologie* 3, 49-64.

Eliasson, R. (1981). Analysis of semen. In: Burger, H., de Kretser, D. (eds) *The testis*. Raven, New York, pp 381-399.

Eliasson, R., Hellinga, F., Lübcke, F., Meyhöfer, W., Niermann, H., Steeno, O., Schirren, C. (1970). Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia* 2, 1257.

Eliasson, R. Treichl, L. (1971). Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril* 22, 134-137.

Enginsu, M.E., Domoulin, C.J.M., Pieters, M.H.E.C., Bras, M., Evers, J.L.H., Geraedts, J.P.M. (1991). Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum Reprod* 6, 854-858.

Esterhuizen, A.D., Franken, D.R., Lourens, J.G., van Rooyen, L.H. (2001). Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. *Hum Reprod* 16, 138-144.

Eustache, F., Auger, J. (2003). Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod* 18, 1018-1022.

Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity of fertility. *Science* 210, 1131-1133.

Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K., Turner, T.W., Schrader, S.M. (1991). Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 5, 115-125.

Evenson, D.P., Klein, F.A., Whitmore, W.F., Melamed, M.R. (1984). Flow cytometric evaluation of semen from patients with testicular carcinoma. *J Urol* 132, 1220-1225.

Fawcett, D.W. (1975). The Mammalian Spermatozoon. *Dev Biol* 44, 394-436.

Federation CECOS, Shwartz, D., Mayaux, M.J. (1982). Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *N Engl J Med* 306, 404-406.

Fehl, P., Miska, W., Henkel, R. (1995). Further indications of the multicomponent nature of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 42, 80-88.

Fenichel, P., Donzeau, M., Farahifar, D., Basteris, B., Ayraud, N., Hsi, B.L. (1991). Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 55, 994.

Fishel, S., Green, S., Bishop, M., et al (1995). Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatid. *Lancet* 345, 1641-1642.

Fishel, S.B., Timson, J., Lisi, F., Jacobson M, Rinaldi L, Gobetz L. (1994). Micro-assisted (MAF) fertilization with human gametes. *Hum Reprod* 9, 501-505.

Flaherty, S.P., Olson, G.E. (1991). Ultrastructural analysis of the acrosome reaction in a population of single guinea pig sperm. *Anat Rec* 229, 186-194.

Ford, W.C., Williams, K.M., Harrison, S., Rees, J.M., Ray, B.D., Mc Laughlin, E.A., Hull, M.G. (2001). Value of the hamster oocyte test and computerised measurements of sperm motility in predicting if four or more viable embryos will be obtained in an IVF cycle. *Int J Androl* 24, 109-119.

Foresta, C., Mioni, R., Rossato, M., Varotto, A., Zorzi, M. (1991). Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. *Int J Androl* 14, 333-339.

Francavilla, S., Palermo, G., Gabriele, A., Cordeschi, G., Poccia, G. (1992). Sperm acrosin activity and fluorescence microscopic assessment of proacrosin/acrosin in ejaculates of infertile and fertile men. *Fertil Steril* 57, 1311-1315.

Franken, D.R., Barendsen, R., Kruger, T.F. (2000). A continuous quality control program for strict sperm morphology. *Fertil Steril* 74, 721-724.

Franken, D.R., Menkveld, R., Kruger, T.F., Sekadde-Kigundu, C., Lombard, C. (2003). Monitoring technologist reading skills in a sperm morphology quality program. *Fertil Steril* 79, 1637-1643.

Fraser, L.R., Harrison, R.A.P., Herod, J.E. (1990). Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 89, 135-148.

French, D.B., Sabanegh, E.S. Jr., Goldfarb, J., Desai, N. (2010). Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril* 93, 1097-1103.

Gaddum, P., Blandau, R.J. (1970). Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on fixed gelatin membranes. *Science* 170, 749-751.

Gakamsky, A., Armon, L., Eisenbach, M. (2009). Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. *Hum Reprod* 24, 1152-1163.

Geisthövel, F., Frommel, M., Ludwig, M. (2004a). Aufklärung und Vereinbarungen für die In-vitro-Fertilisations-Therapie und die Kryokonservierung von Embryonen - ein Diskussionsbeitrag. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 1, 289-294.

Geisthövel, F., Frommel, M., Neidert, R., Nieschlag, E. (2004b). Debatte der DVR-Fachkommission "Recht und Aufklärung" - Thema: Embryonenschutzgesetz und Verbotsirrtum. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 1, 299-307.

George, S.S., Fernandes, H.A., Irwin, C., Chandy, A., George, K. (2003). Factors predicting the outcome of intracytoplasmic sperm injection for infertility. *Natl Med J India* 16, 13-15.

Gibbons, I.R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol* 91, 107-124.

Gibbons, W. (1987). In-vitro fertilization as therapy for male-factor infertility. *Urol Clin North Am* 14, 563-567.

Giorgetti, C., Terriou, P., Auquier, P., Hans, E., Spach, J.L., Salzmann, J., Roulier, R. (1995). Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 10, 2427-2431.

Gomez, M.C., Catt, J.W., Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M. (1997). Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 9, 665-673.

Gordts, S., Rombauts, L., Roziers, P., Serneels, A., Gaurois, B., Vercruyssen, M., Campo, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male subfertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 81, 207-211.

Green, D.P.L. (1978). The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci* 32,137-151.

Green, D.P.L. (1988). Sperm thrusts and the problem of penetration. *Biol Rev Camb Philos Soc* 63, 79-105.

Greve, J.M., Wassarman, P.M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* 181, 253-264.

Grow, D.R., Oehninger, S., Seltman, H.J., Toner, J.P., Swanson, R.J., Kruger, T.F., Muasher, S.J. (1994). Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vivo population. *Fertil Steril* 62, 559.

Günalp, S., Onculoglu, C., Gurgan, T., Kruger, T.F., Lombard, C.J. (2001). A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum Reprod* 16, 110-114.

Gusse, M., Sautiere, P., Belaiche, D. (1986). Purification and characterisation of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 884, 124-134.

Guzick, D.S., Overstreet, J.W., Factor-Litvak, P., Brazil, C.K., Nakajima, S.T., Coutifaris, C., Carson, S.A., Cisneros, P., Steinkampf, M.P., Hill, J.A., Xu, D., Vogel, D.L. (2001). National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345, 1388-1393.

Habenicht, U.-F. (1987). Akrosin - ein bedeutendes Enzym für die Fertilisation. *Fertilität* 3, 7-11.

Haidl, G. (1996). Andrologische Diagnostik Heute. *Fortschr Med* 114, 465-469.

Haidl, G., Becker, A. (1991). Elektronenmikroskopische Befunde am menschlichen Spermatozoen mit Flagellumdefekten. *Hautarzt* 42, 242-246.

Haidl, G., Schill, W.-B. (1993). Moderne Diagnostik in der Andrologie. Dt Ärztebl 90, 278-289.

Haidl, G., Schill, W.-B. (1994). Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. Arch Androl 32, 263-266.

Hammadeh, M.E., Al-Hasani, S., Doerr, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., Schmidt, W., Diedrich, K. (1999). Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. Hum Reprod 14, 363-367.

Hammadeh, M.E., Al-Hasani, S., Stieber, M., Rosenbaum, P., Küpker, D., Diedrich, K., Schmidt, W. (1996). The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod 11, 2468-2471.

Hammadeh, M.E., Kühnen, A., Amer, A.S., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (2001a). Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. Int J Androl 24, 360-368.

Hammadeh, M.E., Stieber, M., Haidl, G., Schmidt, W. (1998). Association between cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. Andrologia 30, 29-35.

Hammadeh, M.E., Zavos, P.M., Rosenbaum, P., Schmidt, W. (2001b). Comparison between the quality and function of sperm after semen processing with two different methods. Asian J Androl 3, 125-130.

Hammadeh, M.E., Zeginiadv, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W., Strehler, E. (2001c). Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. Arch Androl 46, 99-104.

Handrow, R.R., Lenz, R.W., Ax, R.L. (1982). Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1326-1332.

Harari, O., Bourne, H., McDonald, M., Richings, N., Speirs, A., Johnston, H.W., Baker, H.W.G. (1995). Intracytoplasmic sperm injection: a major advance in the management of severe male subfertility. *Fertil Steril* 64, 360-368.

Harrison, R.A.P., Fléchon, J.-E., Brown, C.R. (1982). The localization of acrosin and proacrosin in ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 66, 349-358.

Harrison, R.A.P., Roldan, E.R. (1990). Phosphoinositides and their products in the mammalian sperm acrosome reaction. *J Reprod Fert Suppl* 42, 51-67.

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; pp. 55-73.

Henkel, R., Defosse, K., Koyro, H.W., Weissmann, N., Schill, W.-B. (2003). Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility. *Asian J Androl* 5, 3-8.

Henkel, R., Franken, D.R., Habenicht, U.-F. (1998a). Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrologia* 30, 275-280.

Henkel, R., Franken, D.R., Lombard, C.J., Schill, W.-B. (1994a). Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? *J Assist Reprod Genet* 11, 395-400.

Henkel, R., Menkveld, R., Kleinhappl, M., Schill, W.-B. (2001). Seasonal changes in human sperm chromatin condensation. *J Assist Reprod Genet* 18, 371-377.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W. (1998b). Induction of the acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid. *Andrologia* 30, 159-161.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Gips, H., Schill, W.-B. (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive for fertilization in vitro. *Hum Reprod* 8, 2128-2132.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Schill, W.-B., Kleinstein, J., Gips, H. (1995). Acrosin activity of human spermatozoa by means of a simple gelatinolytic technique: A method useful for IVF. *J Androl* 16, 272-277.

Henkel, R., Schaller, J., Glander, H.J., Schill, W.-B. (1996). Low expression of adhesion molecules and matrix proteins in patients showing poor penetration in zona-free hamster oocytes. *Mol Hum Reprod* 2, 335-339.

Henkel, R., Schill, W.-B. (2000). Die Bedeutung funktioneller Spermatozoenparameter für den Fertilisationsprozeß. *Reproduktionsmedizin* 16, 81-89.

Henkel, R., Stalf, T., Mertens, N., Miska, W., Schill, W.-B. (1994b). Outer dense fibers of human spermatozoa. – Partial characterization and possible physiological functions. *Int J Androl* 17, 68-73.

Hertig, A., Rock, J., Adams, E. (1956). A description of 34 human ova within the first seventeen days of development. *Am J Anat* 98, 435-495.

Hinrichsen-Kohane, A.C., Hinrichsen, M.J., Schill, W.-B. (1984). Molecular events leading to fertilization – A review. *J Reprod Fert (Suppl.)* 42, 51-67.

Hinsch, E., Oehninger, S., Hinsch, K. (1998). ZP3-6 peptide and acrosome reaction. Semen evaluation, testing and selection: a new look in the 2000s. In *Andrology in the Nineties Precongress Training Course*, Gent, Belgium, April 22, pp 25-30.

Hinting, A., Comhaire, F., Vermeulen, L., Dhont, M., Vermeulen, A., Vandekerckhove, D. (1992). Value of sperm characteristics and the result of in-vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. *J Androl* 13, 59-66.

Hirsch, I., Gibbons, W., Lipshultz, L., Rossavik, K., Young, R., Poindexter, A., Dodson, M., Findley, W. (1986). In vitro fertilization in couples with male factor infertility. *Fertil Steril* 45, 659-664.

Hofmann, N. (1987). *Wege zur Andrologie. Einführung in die Praxis. Erster Teil.* Ditzgen Druck und Verlags-GmbH.

Hofmann, N. (1988). *Klinik der Fertilitätsstörungen des Mannes.* TAD Pharmazeutisches Werk GmbH, Cuxhaven, 13-15.

Hofmann, N., Freundl, G. (1986). Die mikroskopische Spermaanlyse. *Fertilität* 2, 135-143.

Hofmann, N., Freundl, G., Florack, M. (1985). Die Formstörungen der Spermatozoen im Sperma und Zervikalschleim als Spiegel testikulärer Erkrankungen. *Gynäkologe* 18, 189-192.

Hofmann, N., Haider, S.G. (1985). Neue Ergebnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogenesestörungen. *Gynäkologe* 18, 70-80.

Hofmann, N., Hilscher, B., Morchen, B., Schuppe, H.C., Bielfeld, P. (1995). Comparative studies on various modes of classification of morphology of sperm heads and results in in vitro fertilization - a preliminary report. *Andrologia* 27, 19-23.

Honda, A., Yamagata, K., Sugiura, S., Watanabe, K., Baba, T. (2002). A Mouse Serine Protease TESP5 is selectively included into Lipid Rafts of Sperm Membrane presumably as a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein. *J Biol Chem* 277, 16976-16984.

Horte, A., Vierula, M., Toppari, J., Suominen, J. (2001). Reassessment of sperm morphology of archival semen smears from the period 1980 - 1994. *Int J Androl* 24, 120-124.

Host, E., Lindenberg, S., Ernst, E., Christensen, F. (1999). Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. *Acta obstet et gynec Scand* 78, 526-529.

Hotchkiss, R.S. (1945). *Fertility in Men*. In: William Heinemann Medical Books, London.

Hsu, M., Mayer, J., Aronshon, M., Lanzendorf, S., Muasher, S., Kolm, P., Oehninger, S. (1999). Embryo implantation in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade and number of embryos transferred. *Fertil Steril* 72, 679-685.

Hunter, R.H.F. (1987). Human fertilization in vivo, with special reference to progression, storage and release of competent spermatozoa. *Hum Reprod* 2, 329-333.

Ibrahim, M.E., Moussa, M.A.A., Dedersen, H. (1988). Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor. *Arch Androl* 21, 219-133.

Jamil, K., White, G. (1981). Induction of the acrosome reaction with ionophore A23187 and calcium. *Arch Androl* 7, 283-292.

Jedrzejczak, P., Taszarek-Hauke, G., Hauke, J., Pawelczyk, L., Duleba, A.J. (2008). Prediction of spontaneous conception based on semen parameters. *Int J Androl* 31, 499-507.

Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C. (1986). Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 76, 735-744.

Jha, K.N., Kameshwari, D.B., Shivaji, S. (2003). Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cell Mol Biol* 49, 329-340.

Joel, C.A. (1971). Historical survey of research on spermatozoa from antiquity to the present. In: *Fertility Disturbances in Men and Women*, Joel, C.A. (ed), Kager, Basel, Schweiz, 3-47.

Jorgensen, N., Auger, J., Giwercman, A., Irvine, D.S., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Le Bon, C., MacDonald, E., Pekuri, A.M., Scheike, T., Simonsen, M., Suominen, J., Skakkeboek, N.E. (1997). Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. *Int J Androl* 20, 201-208.

Joris, H., Nagy, Z., Van de Velde, H., De Vos, A., Van Steirteghem, A. (1998). Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod* 13, 76-85.

Kaneko, S., Morikawi, C. (1981). Studies on acrosin. I. Purification and characterization of boar acrosin. *J Pharmacobiodyn* 4, 20-27.

Katz, D.F., Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W. (1993). Sperm motility measurement and hyperactivation. *Semin Reprod Endocrinol* 11, 27-39.

Kennedy, W.P., Kaminski, J.M., Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Reid, D.S., Blackwell, J., Bielfeld, P., Zaneveld, L.J.D. (1989). A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J. Androl.* 10, 221-231.

Kinloch, R.A., Wassarman, P.M. (1989). Profile of a mammalian sperm receptor gene. *New Biol* 1, 232-238.

Knuth, U.A., Kühne, J., Bals-Pratsch, M., Nieschlag, E. (1988). Intra-individual variation of sperm velocity, linearity, lateral head displacement and beat frequency in healthy volunteers. *Andrologia* 20, 243-248.

Köhler, J.K., De Curtis, I., Stechener, M.A., Smith, D. (1982). Interaction of human sperm with zona free hamster eggs. A freeze fracture study. *Gamete Res* 6, 371-386.

Köhn, F.M., Erdmann, I., Oeda, T., El Mulla, K.F., Schiefer, H.G., Schill, W.-B. (1998). Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia* 30 (Suppl. 1), 73-80.

Köhn, F.M., Mack, S.R., Hashish, Y.A., Anderson, R.A., Zaneveld, L.J. (1996). Paramagnetic beads coated with *Pisum sativum* agglutinin bind to human spermatozoa undergoing the acrosome reaction. *Andrologia* 28, 231-239.

Köhn, F.M., Mack, S.R., Schill, W.-B., Zaneveld, L.J. (1997). Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavlin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod* 12, 714-721.

Köhn, F.M., Miska, W., Schill, W.-B. (1995). Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *J Androl* 16, 259-265.

Koppers, B., Gassner, P., Meschede, D., Horst, J., Behre, H.M., Nieschlag, E. (1998). Prognostic value of male diagnostic profiles in intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl* 21, 227-232.

Koukoulis, G.N., Vantman, D., Dennison, L., Banks, S.M., Sherins, R.J. (1989). Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, or linearity. *Fertil Steril* 52, 120-127.

Krausz, C., Bonaccorsi, L., Maggio, P., Luconi, M., Criscuoli, L., Fuzzi, B., Pellegrini, S., Forti, G., Baldi, E. (1996). Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 11, 1661-1667.

Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmson, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F., Oehninger, S. (1988a). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49, 112-117.

Kruger, T.F., Coetzee, K. (1999). The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 5, 172-178.

Kruger, T.F., du Toit, T.C., Franken, D.R., Menkveld, R., Lombard, C.J. (1995). Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril* 63, 134-141.

Kruger, T.F., Haque, D., Acosta, A.A., Pleban, P., Swanson, R.J., Simmson, K.F., Matta, J.F., Morshedi, M., Oehninger, S. (1988b). Correlation between sperm morphology, acrosin and fertilization in an IVF program. *Arch Androl* 20, 337-345.

Kruger, T.F., Menkveld, R., Stander, F.S.H., Lombard, C.J., van der Merwe, J.P., van Zyl, J.A., Smith, K. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46, 1118-1123.

Küpker, W., Al-Hasani, S., Schulze, W., Kühnel, W., Schill, T., Felberbaum, R., Diedrich K. (1995). Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *J Assist Reprod Genet* 12, 620-626.

Küpker, W., Schulze, W., Diedrich, K. (1998). Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. *Hum Reprod* 13, 99-106.

Lacham-Kaplan, O., Trounson, A. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum Reprod* 10, 2642-2649.

Langlais, J., Roberts, D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12, 183-224.

Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15, 1717-1722.

Leblond, C.P., Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "Periodic Acid-Fuchsin Sulfurous Acid" technique. *Am J Anat* 90, 167-215.

Lee, D.R., Lee, J.E., Yoon, H.S., Roh, S.I. (1997). Induction of acrosome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 67, 315-320.

Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B., Wummer, N., Kopf, G.S., Blasco, L. (1987). Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48, 649-658.

Lefièvre, L., Bedu-Addo, K., Conner, S.J., Machado-Oliveira, G.S., Chen, Y., Kirkman-Brown, J.C., Afnan, M.A., Publicover, S.J., Ford, W.C., Barratt, C.L. (2007). Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? *Reproduction* 133, 675-684.

Lewis, S.E. (2002). Importance of mitochondrial and nuclear sperm DNA in sperm quality assessment and assisted reproduction outcome. *Hum Fertil* 5, 102-109.

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125, 1157-1163.

Lindemann, C.B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 34, 258-270.

Lindemann, C.B., Kanous, K.S. (1997). *Int Rev Cytol* 173, 1-72.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1988). The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact chromosomes detected with pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertil Steril* 50, 288-293.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1990). Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 5, 288-293.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992). Sperm nuclear chromatin normality: Relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 58, 1178-1184.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1993). Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod* 48, 340-348.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (2002). Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J Androl* 4, 281-285.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (2003). Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 79, 74-80.

Liu, D.Y., Clarke, G.N., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1989a). A sperm-zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52, 281-287.

Liu, D.Y., Du Plessis, Y.P., Nayudu, P.L., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1988). The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil Steril* 49, 272-277.

Liu, D.Y., Elton, R.A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1987). Spermatozoal nuclear chromatin decondensation in vitro: a test for sperm immaturity. Comparison with results of human in vitro fertilization. *Clin Reprod Fertil* 5, 191-201.

Liu, J., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1989b). Human sperm zona binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 4, 696-701.

Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A. (1995). Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod* 10, 626-629.

Longo, F.J., Ushiyama, A., Chiba, K., Hoshi, M. (1995). Ultrastructural localization of acrosome reaction-inducing substance (ARIS) on sperm of the starfish *Asterias amurensis*. *Mol Reprod Dev* 41, 91-99.

Lopes, S., San, J.G., Jurisicova, A., Meriano, J., Casper, R.F. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69, 528-532.

Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S., Michalas, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72, 240-244.

Lundin, K., Sjögren, A., Nilsson, L., Hamberger, L. (1994). Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 62, 1266-1267.

Lundin, K., Söderlund, B., Hamberger, L. (1997). The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 12, 2676-2681.

Mack, S., Bhattacharyya, A.K., Joyce, C., van der Ven, H., Zaneveld, L.J. (1983). Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod* 28, 1032-1042.

MacLeod, I.C., Irvine, D.S., Masterton, A., Taylor, A. (1994). Assessment of the conventional criteria of semen quality by computer-assisted image analysis. Evaluation of the Hamilton-Thorn motility analyser in the context of a service andrology laboratory. *Hum Reprod* 9, 310-319.

MacLeod, J. (1964). Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int J Fertil* 9, 281-295.

MacLeod, J. (1970). The significance of deviations in human sperm morphology. In: *The Human Testis*. Rosenberg, E., Paulsen, C.A. (eds), Plenum Press, New York, London, pp 481-494.

MacLeod, J., Gold, R.Z. (1951). The male factor in fertility and infertility. II. Sperm counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol* 66, 436.

MacLeod, J., Gold, R.Z. (1952). The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertil Steril* 2, 394-414.

Macomber, D., Sanders, M.B. (1929). The spermatozoa count. Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *N Engl J Med* 200, 981-1004.

Mahadevan, M.M., Baker, G. (1984). Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: *Clinical In Vitro Fertilization* Edited by: Wood, C., Trounson, A., Springer Verlag, Berlin; 83-97.

Mahadevan, M.M., Trounson, A.O. (1984). The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42, 400-405.

Mahi, C., Yanagimachi, R. (1973). The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fert* 35: 55-66.

Maischein, M. (1976). Über die Behandlung steriler Ehen und der darauffolgenden Schwangerschaft. (Med. Diss.). Frankfurt a.M. .

Mansour, R.T., Aboulghar, M.A., Serour, G.I., Amin, Y.M., Ramzi, A.M. (1995). The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 64, 982-986.

Marnet, B., Vieitez, G., Milhet, P., Richoilley, G., Lesourd, F., Parinaud, J. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *Int J Androl* 23, 22-28.

Marushige, Y., Marushige, K. (1978). Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochem Biophys Acta* 519, 1-22.

Mbizvo, M.T., Burkman, L.J., Alexander, N. (1990). Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril* 54, 708-713.

Mc Lachlan, R.I., Baker, H.W.G., Clarke, G.N., Harrison, K.L., Matson, P.L., Holden, C.A., de Kretser, D.M. (2003). Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathology* 35, 25-33.

Meizel, S. (1985). Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174, 285-302.

Menkveld, R. (1987). An Investigation of Environmental Influences on Spermatogenesis and Semen Parameters. [Ph.D. Dissertation] Faculty of Medicine, University of Stellenbosch, South Africa.

Menkveld, R., Coetzee, K., Smith, I., Kruger, T.F. (1997). Is male fertility potential on the decline? An investigation of semen analysis results over a 28-year period. *Hum Reprod* 12 (abstract book I), 136-137.

Menkveld, R., Kruger, T.F., Oettle, E.E., Swanson, R.J., Oehninger, S., Acosta, A.A. (1991). Basic principles and practical aspects. In: Atlas of Human Sperm Morphology. Menkveld, R., Oettle, E.E., Kruger, T.F., Swanson, R.J., Oehninger, S. (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1-6.

Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T.J.vW., Kruger, T.F., van Zyl, J.A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. *Hum Reprod* 5, 586-592.

Menkveld, R., Van Zyl, J.A., Kotze, T.J.vW., Kruger, T.F. (1986). Possible changes in male fertility over a 15-year period. *Arch Androl* 17, 143-144.

Mercan, R., Lanzendorf, S.E., Mayer, J., Nassar, A., Muasher, S.J., Oehninger, S. (1998a). The outcome of clinical pregnancies following intracytoplasmic sperm injection is not affected by semen quality. *Andrologia* 30, 91-95.

Mercan, R., Oehninger, S., Muasher, S.J., Toner, J.P., Mayer, J., Lanzendorf, S.E. (1998b). Impact of fertilization history and semen parameters on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 15, 39-45.

Meschede, D., Keck, C., Zander, M., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nieschlag, E. (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl* 16, 362-369.

Michelmann, H.W. (1995). Minimal criteria of sperm quality for insemination and IVF therapy. *Int J Androl* 18, 81-87.

Michelmann, H.W. (1997). Quality management in the andrology laboratory. *Int J Androl* 20 (Suppl. 3), 50-54.

Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D. (1992). Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357, 589-593.

Miska, W., Fehl, P., Henkel, R. (1994). Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Biochem Res Commun* 199, 125-129.

Mohsenian, M., Syner, F.N., Moghissi, K.S. (1982). A study of sperm acrosin in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 37, 223-229.

Morales, P., Llanos, M., Gutierrez, G., Hohen, P., Vigil, P., Vantman, D. (1992). The acrosome reaction-inducing activity of individual hFF samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum Reprod* 7, 646-651.

Moreno, R.D., Sepulveda, M.S., De Ioannes, A., Barros, C. (1998). The polysulphate binding domain of human proacrosin/acrosin is involved in both the enzyme activation and spermatozoa-zona pellucida interaction. *Zygote* 6, 75-83.

Morgentaler, A., Fung, M.Y., Harris, D.H., Powers, R.D., Alper, M.M. (1995). Sperm morphology and in vitro fertilization outcome: a direct comparison of World Health Organization and Tygerberg Methodologies. *Fertil Steril* 64, 1177-1182.

Mortimer, D. (1999). Structural management as a basic for cost effective infertility care. In: *The Male Gamete. From Basic Science to Clinical Applications* (ed. C. Gagnon), pp. 365-370. Cache River Presse, IL, USA.

Mortimer, D., Camenzind, A.R. (1989). The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum Reprod* 4, 169-174.

Mortimer, D., Curtis, E.F., Camenzind, A.R. (1990). Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Hum Reprod* 5, 99-103.

Mortimer, D., Menkveld, R. (2001). Sperm morphology assessment – Historical perspectives and current options. *J Androl* 22, 192-205.

Mukerjee, A.B., Lippes, J. (1972). Effect of human follicular and tubular fluids on human, mouse, and rat spermatozoa in vitro. *Can J Genet Cytol* 14, 167-174.

Nakagawa, H., Okada, H., Fujisawa, M., Matsumoto, O., Kamidono, S. (1997). Relationship of acrosin activity to sperm function tests. *Andrologia* 29, 103-108.

Nagy, Z.P., Dozortsev, D., Diamond M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R., Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 80, 67-74.

Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., Derde, P.M., Devroey, P., van Steirteghem, A.C. (1995). The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 10, 1123-1129.

Nagy, Z.P., Verheyen, G., Tournaye, H., Van Steirteghem, A.C. (1998). Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 13 (Suppl. 1), 143-154.

Nasr-Esfahani, M.H., Razavi, S., Mardani, M. (2001). Relation between human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 18, 219-225.

Ng, F.L., Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992). Comparison of Percoll, mini Percoll and Swim-up methods of sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 7, 261-266.

Nicopoulos, J.D., Gilling-Smith, C., Almeida, P.A., Ramsay, J.W. (2004). Effect of time since vasectomy and maternal age on intracytoplasmic sperm injection success in men with obstructive azoospermia after vasectomy. *Fertil Steril* 82, 367-373.

Nijs, M., Vanderzwalmen, P., Vandamme, B., Segal-Bertin, G., Lejeune, B., Segal, L., van Roosendaal, E., Schoysman, R. (1996). Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11, 2180-2185.

Nikolettos, N., Kupker, W., Demirel, C., Schopper, B., Blasig, C., Sturm, R., Felberbaum, R., Bauer, O., Diedrich, K., Al-Hasani, S. (1999). Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod* 14 (Suppl. 1), 47-70.

Nuzzo, N.A., Anderson, R.A., Jr., Zaneveld, L.J.D. (1990). Proacrosin activation and acrosin release during the guinea pig acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 25, 52-60.

Obara, H., Shibahara, H., Tsunoda, H., Taneichi, A., Fujiwara, H., Takamizawa, S., Idie, S., Sato, I. (2001). Prediction of unexpectedly poor fertilization and pregnancy outcome using the strict criteria for sperm morphology before and after sperm separation in IVF-ET. *Int J Androl* 24, 102-108.

Oehninger, S., Acosta, A.A., Kruger, T., Veeck, L., Flood, J., Jones, H.W., Jr (1988). Failure of fertilization in in vitro fertilization: the 'occult' male factor. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 5, 181-187.

Oehninger, S., Franken, D.R., Sayed, E., Barroso, G., Kolm, P. (2000). Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 6, 160-168.

Oehninger, S., Maloney, M., Veeck, L., Toner, J., Lanzendorf, S., Muasher, S. (1995). Intracytoplasmic sperm injection – achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil Steril* 64, 977-981.

Oliphant, G., Cabot, C.L., Singhas, C.A. (1977). Nature of the rabbit acrosome reaction-inducing activity of follicular fluid. *J Reprod Fert* 50, 245-250.

Ombelet, W., Bosmans, E., Janssen, M., Cox, A., Maes, M., Punjabi, U., Bleton, V., Gunst, J., Haidl, G., Wouters, E., Spiessens, C., Bornman, M.S., Pienaar, E., Menkveld, R., Lombard, C.J. (1998). Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl* 41, 103-114.

Ombelet, W., Bosmans, E., Janssen, M., Cox, A., Vlasselaer, J., Gyselaers, W., Vandeput, H., Gielen, J., Pollet, H., Maes, M., Steeno, O., Kruger, T. (1997). Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 12, 987-993.

Ombelet, W., Fourie, F.L., Vandeput, H., Bosmans, E., Cox, A., Janssen, M., Kruger, T. (1994). Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum Reprod* 9, 1479-1484.

Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., Steeno, O. (1995). Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update*. 1, 543-557.

Osawa, Y., Sueoka, K., Iwata, W., Shinohara, M., Kobayashi, N., Kuji, N., Yoshimura, Y. (1999). Assessment of the dominant abnormal form is useful for predicting the outcome of intracytoplasmic sperm injection in the case of severe teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 16, 436-442.

O'Shea, D.L., Odem, R.R., Cholewa, C., Gast, M.J. (1993). Long-term follow-up of couples after hamster egg penetration testing. *Fertil Steril* 60, 1040.

Osman, R.S., Andria, M., Jones, A.D., Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 823-833.

Osmanagaoglu, K., Tournaye, H., Kolibianakis, E., Camus, M., Van Steirteghem, A., Devroey, P. (2002). Cumulative delivery rates after ICSI in women aged >37 years. *Hum Reprod* 17, 940-944.

Palermo, G., Joris, H., Derde, M.P., Camus, M., Devroey, P., van Steirteghem, A.C. (1993). Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 59, 826-835.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17-18.

Palermo, G.D., Colombero, L.T., Schattman, G.L., Davis, O.K., Rosenwaks, Z. (1996). Evolution of pregnancies and initial follow-up of newborns delivered after intracytoplasmic sperm injection. *JAMA* 276, 1893-1897.

Pampiglione, J.S., Tan, S.L., Campbell, S. (1993). The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 59, 1280.

Parinaud, J., Richoille, G., Milhet, P., Moutaffian, H., Vieitez, G. (1996). Validation of a scoring method predicting the in-vitro fertilizing ability of human spermatozoa. *Int J Androl* 19, 18-22.

Parinaud, J., Vieitez, G., Moutaffian, H., Richoille, G., Labal, B. (1995). Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and in-vitro fertilization results. *Hum Reprod* 10, 2085-2089.

Paulson, J.D., Polakoski, K.L. (1977). A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril* 28, 178-181.

Payne, D. (1995). Intracytoplasmic sperm injection: instrumentation and injection technique. *Reprod Fertil Dev* 7, 185-196.

Phillips, D.M. (1972). Comparative analysis of mammalian sperm motility. *J Cell Biol* 53, 561-573.

Plachot, M., Mandelbaum, J., Junca, A.-M. (1984). Acrosome reaction of human sperm used in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42, 418-423.

Polakoski, K.L.K., Siegel, M.S. (1986). The Proacrosin-Acrosin System. In: Paulson, J.D., Negro-Vilar, A., Lucena, E., Martini, L. (eds.), *Andrology, Male Fertility and Sterility*. Academic Press, Orlando, FL; pp. 359-375.

Prakash, P., Leykin, L., Chen, Z., Toth, T., Sayegh, R., Schiff, I., Isaacson, K. (1998). Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril* 69, 722-726.

Razavi, S., Nasr-Esfahani, M.H., Mardani, M., Mafi, A., Moghdam, A. (2003). Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*, 35, 238-243.

Ravnik, S.E., Zarutskie, P.W., Muller, C.H. (1992). Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod* 47, 1126-1133.

Reijo, R., Alagappan, R.K., Patrizio, P., Page, D. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347, 1290-1293.

Repping, S., van Weert, J.M., Mol, B.W.J., de Vries, J.W.A., van der Veen, F. (2002). Use of the total motile sperm count to predict total fertilization failure in vitro fertilization. *Fertil Steril* 78, 22-28.

Rhemrev, J.P., Lens, J.W., Mc Donell, J., Schoemaker, J., Vermeiden, J.P. (2001). The postwash total progressively motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 76, 884-891.

Rienzi L., Ubaldi F., Martinez F., Iacobelli M., Minasi M.G., Ferrero S., Tesarik J., Greco E. (2003). Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 18, 1289-1293.

Robertson, L., Wolf, D.P., Tash, J.S. (1988). Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39, 797-805.

Robinson, J.N., Lockwood, G.M., Dokras, A., Egan, D.M., Nicholson, S.C., Ross, C. et al. (1994). Does isolated teratozoospermia affect performance in in vitro fertilization and embryo transfer? *Hum Reprod* 9, 870-874.

Rochweger, L., Cohen, D.J., Cuasnicu, P.S. (1992). Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol* 153, 83-90.

Rogers, B.J., Bentwood, B. (1982). Capacitation, acrosome reaction and fertilization. In: Zaneveld, L.J.D., Chatterton, R.T. (eds.), *Biochemistry of Mammalian Reproduction*, John Wiley, New York; 203.

Rossato, M., Di Virgilio, F., Rizzuto, R., Galeazzi, C., Foresta, C. (2001). Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod* 7, 119-128.

Rufas, O., Gilman, A., Fisch, B., Shalgi, R. (1998). Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 15, 84-89.

Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P.G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G., Campana, A. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11, 837-843.

Saling, P.M., Sowinski, J., Storey, B.T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J Exp Zool* 209, 229-238.

Sánchez, R., Pena, P., Miska, W., Henkel, R. (2000). Variability determination in chromatin condensation and seminal alpha glucosidase with relation with the spermogram. *Rev Med Chil* 128, 483-489.

Sánchez, R., Stalf, T., Khanaga, O., Turley, H., Gips, H., Schill, W.-B. (1996). Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet* 13, 228-233.

Sánchez, R., Töpfer-Petersen, E., Aitken, R.J., Schill, W.-B. (1991). A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 23, 197-203.

Sathananthan, A.H., Szell, A., Ng, S.C., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Trounson, A. (1997). Is the acrosome reaction a prerequisite for sperm incorporation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI)? *Reprod Fertil Dev* 9, 703-709.

Sathananthan, A.H., Trounson, A.O. (1982). Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res* 6, 225-234.

Schenk, S.L. (1878). *Das Säugetierei künstlich befruchtet außerhalb des Mutterleibes.* Mitt Embryol Inst Univ Wien, 107.

Schill, W.-B. (1973). Acrosin activity in human spermatozoa: methodological investigations. *Arch Dermatol Forsch* 248, 257-73.

Schill, W.-B. (1974). Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil Steril* 25, 703-712.

Schill, W.-B. (1990). Determination of active, non-zymogen acrosin, proacrosin and total acrosin in different andrological patients. *Arch Dermatol Res* 282, 335-342.

Schill, W.-B. (1991). Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum Reprod* 6, 669-678.

Schill, W.-B., Feifel, M. (1984). Low acrosin activity in polyzoospermia. *Andrologia* 16, 589-591.

Schill, W.-B., Miska, W. (1992). Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 24, 69-75.

Schill, W.-B., Preissler, G., Dittmann, B., Müller, W.P. (1979). Effect of pancreatic callicrein, sperm acrosin and high molecular weight (HMW) kininogen on cervical mucus penetration ability of seminal plasma-free human spermatozoa. In: *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 129B; Kinins-II. Systemic proteases and cellular function; Fujii, S.; Moriya, H., Suzuki, T. (eds.), Plenum Press New York, London, pp. 305-310.

Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E. (1988). The sperm acrosome: Functional and clinical aspects. *Hum Reprod* 3, 139-145.

Schill, W.-B., Weidner, W. (1996). Andrology Training Center of the European Academy of Andrology at the Justus Liebig University of Giessen, *Journal* pp: 881-887.

Schwartz, D., Laplanche, A., Jouannet, P., David, G. (1979). Within-subject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence. *J Reprod Fertil* 57, 391-395.

Seidel, G.E., Smith, A.L. (1986). Exposure to synthetic polymers induces attachment of spermatozoa to zonae pellucida but penetration occurs only after exposure to serum albumin in the mouse. *Biol Reprod* 34 (Suppl. 1), 191-199.

Serhal, P.F., Ranieri, D.M., Kinis, A., Marchant, S., Davis, M., Khadum, I.M. (1997). Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12, 1267-1270.

Serres, C., Escalier, D., David, G. (1983). Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol Cell* 49, 153-162.

Sharma, R., Hogg, J., Bromham, D.R. (1993). Is spermatozoan acrosin a predictor for fertilization and embryo quality in the human? *Fertil Steril* 60, 881-887.

Shen, S., Khabani, A., Klein, N., Battaglia, D. (2003). Statistical analysis of factors affecting fertilization rates and clinical outcome associated with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 79, 355-360.

Shibahara, H., Hamada, Y., Hasegawa, A., Wakimoto, E., Toji, H., Shigeta, M., Koyama, K. (1999). Relationship between sperm motility index assessed by the sperm quality analyzer and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 16, 540-545.

Shorr, E. (1941). A new technic for staining vaginal smears: III, A single differential stain. *Science* 94, 545-546.

Shoukir, Y., Chardonens, D., Campana, A., Sakkas, D. (1998). Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 13, 1632-1637.

Silber, S. (1989). The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. *Hum Reprod* 8, 947-953.

Smullen, L.A., Taylor, C.T., Ankers, L., Kingsland, C.R. (1992). Acrosome reaction and failed fertilization. *Hum Reprod* 7 (Suppl 2), 198.

Sokol, R.Z., Sparkes, R. (1987). Demonstrated paternity in spite of severe idiopathic oligospermia. *Fertil Steril* 47, 356-358.

Srivastava, P.N., Akruk, S.R., Williams, W.L. (1979). Dissolution of rabbit zona by sperm acrosomal extracts: effects of calcium (1). *J Exp Zool* 207, 521-529.

Stalf, T., Henkel, R., Miska, W. (1993). Weitere Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der Mantelfasern in menschlichen Spermatozoen. *Fertilität* 9, 203-209.

Stalf, T., Mehnert, C., Hajimohammad, A., Manolopoulos, K., Shen, Y., Schuppe, H.C., Diemer, T., Schill, W.B., Weidner, W., Tinneberg, H.R. (2005). Influence of motility and vitality in intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Andrologia* 37, 125-130.

Stalf, T., Sanchez, R., Köhn, F.-M., Schalles, U., Kleinstein, J., Hinz, V., Tielsch, J., Khanaga, O., Turley, H., Gips, H., Schill, W.-B. (1995). Pregnancy and birth after ICSI with spermatozoa from a patient with tail stump syndrome. *Hum Reprod* 10, 2112-2114.

Stambaugh, R. (1976). Acrosomal enzymes and fertilization. In: Moghissi, K.S., Hafez, E.S. (ed.) *Biology of mammalian fertilization and implanta*. Review.

Stambaugh, R. (1978). Enzymatic and morphological events in mammalian fertilization. *Gamete Res* 1, 65-85.

Stambaugh, R., Buckley, J. (1970). Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus, monkey, and human spermatozoa. *Biol Reprod* 3, 275-282.

Steger K. (2003). Possible predictive factors for ICSI? Molecular biology techniques in combination with therapeutic testicular biopsies. *Andrologia* 35, 200-208.

Steger, K., Fink, L., Failing, K., Bohle, R.M., Kliesch, S., Weidner, W., Bergmann, M. (2003). Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 9, 331-336.

Steger, K., Failing, K., Klonisch, T., Behre, H.M., Manning, M., Weidner, W., Hertle, L., Bergmann, M., Kliesch, S. (2001). Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA. *Hum Reprod* 16, 709-716.

Steger, K., Fink, K., Klonisch, T., Bohle, R.M., Bergmann, M. (2002). Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. *Histochem Cell Biol* 117, 227-234.

Stephens, P.C., Edwards, R.G. (1970). Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1, 683-689.

Stephens, P.C., Edwards, R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 12, 366.

Stock, C.E., Fraser, L.R. (1987). The acrosome reaction in human sperm of proven fertility. *Hum Reprod* 2, 109-119.

Stoddart, N.R., Fleming, S.D. (2000). Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o' clock during ICSI does not affect clinical outcome. *Hum Reprod* 15, 1580-1585.

Strassburger, D., Friedler, S., Raziel, A., Schachter, M., Kasterstein, E., Ron-El, R. (2000). Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 17, 431-436.

Suarez SS. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14, 647-657.

Suarez, S.S., Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 12, 23-37.

Suarez, S., Wolf, D.P., Meizel, S. (1986). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 14, 107-121.

Sukcharoen, N., Keith, J, Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1996). Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: The effect of the delay between testing and IVF. *Hum Reprod* 11, 1030-1034.

Sukcharoen, N., Sithipravej, T., Promviengchai, S., Chinpilas, V., Boonkasemsanti, W. (1998). Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69, 564-568.

Svalander, P., Forsberg, A.S., Jakobsson, A.H., Wikland, M. (1995). Factors of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. *Fertil Steril* 63, 828-837.

Svalander, P., Jakobsson, A.H., Forsberg, A.S., Bengtsson, A.C., Wikland, M. (1996). The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Hum Reprod* 11, 1019-1022.

Swenson, C.E., Dunbar, B.S. (1982). Specificity of sperm-zona interaction. *J Exp Zool* 219, 97-104.

Takahashi, K., Wetzel, A.M., Goverde, H.J., Bastaans, B.A., Janssen, H.J., Rolland, R. (1992). The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 57, 889.

Talbot, P. (1985). Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat* 174, 331-346.

Talbot, P., Chacon, R.S. (1981). A triple stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J Exp Zool* 215, 201-208.

Tarin, J.J. (1995). Subzonal insemination, partial zona dissection or intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 10, 165-170.

Tasdemir, I., Tasdemir, J., Tavukcuoglu, S., Kahraman, S., Beberoglu, K. (1997). Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 12, 1214-1217.

Tea, N.T., Jondet, M., Scholler, R. (1984). A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy* Edited by: Harrison, R.F., Bonnar, J., Thompson, W.; MTP Press Ltd., Lancaster 1, 17-120.

Terquem, A., Dadoune, J.P. (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: evaluation of nuclear maturation. In *The sperm cell*, André, (ed.). The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, pp 696-701.

Terriou, P., Giorgetti, C., Hans, E., Spach, J.L., Salzmann, J., Roulier, R. (1995). Intracytoplasmic sperm injection and embryo quality: comparison with conventional IVF. *Contracept Fertil Sex* 23, 471-473.

Terriou, P., Sapin, C., Giorgetti, C., Hans, E., Spach, J.L., Roulier, R. (2001). Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 75, 525-531.

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

Tesarik, J., Drahorad, J., Peknicova, J. (1988). Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 50, 133-141

Tesarik, J., Kopečný, V. (1986). Late preovulatory synthesis of proteoglycans by the human oocyte and cumulus cells and their secretion into the oocyte-cumulus-complex extracellular matrices. *Histochem* 85, 523-528.

Tesarik, J., Mendoza, C. (1996). Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 11, 772-779.

Tesarik, J., Rolet, F., Brami, C., Sedbon, E., Thorel, J., Tibi, C., Thebault, A. (1996). Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 11, 780-783.

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

Teves, M.E., Guidobaldi, H.A., Uñates, D.R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S.J., Morales Garcia, A.A., Giojalas, L.C. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One* 8: e8211.

Töpfer-Petersen, E., Henschen, A. (1987). Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serin proteinase. *FEBS Lett* 226, 38-42.

Töpfer-Petersen, E., Volcker, C.H., Heissler, E., Schill, W.-B. (1987). Absence of the acrosome reaction in polyzoospermia. *Andrologia* 19, 225-228.

Troup, S.A., Lieberman, B.A., Matson, P.L. (1994). The acrosome reaction to ionophore challenge test: assay reproducibility, effect of sexual abstinence and results for fertile men. *Hum Reprod* 9, 2079-2083.

Tucker, M.J., Morton, P.C., Wright, G., Sweitzer, C.L., Ingargiola, P.E., Chan, S.Y.W. (1996). Paternal influence on embryogenesis and pregnancy in assisted human reproduction. *J Br Fertil Soc* 1, 90-95.

Tüttelmann F, Gromoll J, Kliesch S. (2008). Genetik der männlichen Infertilität. *Urologe A* 47, 1561-1567, 1564-1567.

Tummon, I.S., Yuzpe, A.A., Daniel, S.A.J., Deutsch, A. (1991). Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 56, 933-938.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985a). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J Exp Zool* 233, 479-483.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985b). Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. *J Exp Zool* 236, 239-243.

Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasani, S., Tunnerhoff, A., Hoebbel, K., Diedrich, K., Krebs, D., Perez-Pelaez, M. (1988). Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Hum Reprod* 3, 85-88.

Van der Westerlaken, L.A.J., Helmerhorst, F.M., Hermans, J., Naaktgeboren, N. (1999). Intracytoplasmic sperm injection: position of the polar body affects pregnancy rate. *Hum Reprod* 14, 2565-2569.

Van der Zwalmen, P., Bertin-Segal, G., Geerts, L., Debauche, C., Schoysman, R. (1991). Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum Reprod* 6, 581-588.

Van Deurs, B., Lastein, U. (1973). Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. *J Ultrastruct Res* 42, 517-533.

Van Ranst, H., Bocken, G., Desmet, P. (1994). Chromatin condensation assessment in spermatozoa used for intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 9 (Suppl. 4), 24.

Van Steirteghem, A.C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., Derde, M.P., Van Assche, E., Devroey, P. (1993a). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report on a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8, 1055-1060.

Van Steirteghem, A.C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A., Devroey, P. (1993b). High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8, 1060-1066.

Van Voorhis, B.J., Barnett, M., Sparks, A.E., Syrop, C.H., Rosenthal, G., Dawson, J. (2001). Effect of total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 75, 661-668.

Vawda, A.L., Gumby, J., Younglai, E.V. (1996). Semen parameters as predictors of in vitro fertilisation: the importance of strict criteria morphology. *Hum Reprod* 11, 1445-1450.

Visconti PE. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 667-668.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19, 242-248.

Von Bernhardt, R., de Ioannes, A.E., Blanco, L.P., Herrera Bustos-obregon, E., Vigil, P. (1990). Round-headed spermatozoa: a model to study the role of the acrosome in early events of gamete interaction. *Andrologia* 22, 12-20.

Wagenitz, T. (2006). Bekanntmachungen: (Muster-)Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion – Novelle 2006 – Dtsch Arztebl 2006, 103, A-1392 / B-1188 / C-1140.

Wassarman, P.M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235, 553-560.

Wassarman, P.M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235, 553-560.

Wassarman, P.M. (1992). Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules. In: Nieschlag, E. Habenicht, U.-F. (eds.) *Spermatogenesis, fertilization, contraception. Molecular cellular and endocrine events in male reproduction*. Springer, Heidelberg Berlin New York Tokyo, pp. 345-366.

Wassarman, P.M. (2009). Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays* 31, 153-158.

Wendt, V., Leidl, W., Fritz, H. (1975). The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film methodical investigations. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356, 315-323.

White, D.R., Phillips, D.M., Bedford, J.M. (1990). The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film methodical investigations. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 356, 315-323.

Williams, W.L. (1972). Biochemistry of capacitation of spermatozoa. In: *Biology of mammalian fertilization*, Moghissi, K.S., Hafez, E.S.E. (eds.), CC thomas, Springfield, Illinois, pp. 43-60.

Williams, W.W., McGuigan, A., Carpenter, H.D. (1934). The staining and morphology of the human spermatozoa. *J Urol* 32, 201-212.

Wolf, D.P. (1981). The mammalian egg's block to polyspermy. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, pp. 183-197; Eds. Mastroinni, L., Biggers, J.D.; Raven Press, New York.

Wolf D.P., Bold, J., Byrd, W., Bechtol, K.B. (1985). Acrosome status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 32, 1157-1162.

World Health Organization (1992). *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 2nd edition. Cambridge, United Kingdom. Cambridge University Press.

World Health Organization (1999). Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd edition. Cambridge, United Kingdom. Cambridge University Press.

Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 12, 1750-1755.

Yanagimachi, R. (1974). Maturation and fertilization in vitro of guinea-pig ovarian oocytes. *J Reprod Fertil* 38, 485-488.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. Knobil, E., Neill, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition Raven Press, New York, pp. 189-317.

Yanagimachi, R., Nicolson, G.L., Noda, Y.D., Fujimoto, M. (1973). Electron microscopic observations on the distribution of anionic residues in hamster spermatozoa and eggs before and during fertilization. *J Ultrastruct Res* 43, 344-353.

Yang, Y.S., Chen, S.U., Ho, H.N., Chen, H.F., Lien, Y.R., Lin, H.R., Huang, S.C., Lee, T.Y. (1994). Acrosin activity of human sperm did not correlate with IVF. *Arch Androl* 32, 13-19.

Yao, Y.Q., Ng, V., Yeung, W.S., Ho, P.C. (1996). Profiles of sperm morphology and motility after discontinuous multiple-step Percoll density gradient centrifugation. *Andrologia* 28, 127-31.

Yoshida, A., Yasuhisa, A., Motoyama, M. (1997). Structural abnormalities of autosomal chromosomes in the male partner do not influence fertilization and early development of embryos after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12, 2499-2503.

Yovich, J.M., Edirisinghe, W.R., Yovich, J.L. (1994). Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 61, 902-910.

Yue, Z., Meng, F.J., Jørgensen, N., Ziebe, S., Nyboe Andersen, A. (1995). Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10, 1781-1785.

Zaini, A., Jennings, M.G., Baker, H.W.G. (1985). Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int J Androl* 8, 427-435.

Zaneveld, L.J.D., De Jonge, C.J. (1991). Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. In: Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. (eds.). *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. New York: Plenum Press; pp. 63-79.

Zaneveld, L.J.D., De Jonge, C.J., Anderson, R.A., Mack, S.R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 6, 1265-1274.

Zeginiadou, T., Papadimas, J., Mantalenakis, S. (2000). Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia* 32, 335-343.

Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J., Jarvi, K. (2001). Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. 58, 258-261.

Zini, A., Sigman, M. (2009). Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 30, 219-229.

## 8. ABKÜRZUNGEN

AA	Akrosinaktivität
Abs.	Absatz
ACE	Anti-Converting Enzyme
aqua dest.	aqua destillatum
AR	Akrosomreaktion
bidest.	bidistilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CK	Chromatinkondensation
d.h.	das heißt
Dipl.Biol.	Diplom-Biologe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dr. rer. nat.	Doctor rerum naturorum
Dr. med.	Doctor medicinae
DtESchG	Deutsches Embryonenschutzgesetz
ET	Embryotransfer
et al.	et alii
evtl.	eventuell
FR	Fertilisationsrate
griech.	griechisch
HAMs	Humanalbuminmikrosphäre
HCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
hFF	humane Follikularflüssigkeit
hMG	humanes menopausales Gonadotropin
HSA	Humanes Serum-Albumin
HTF	Medium nach Quinn et al. (1985), entspricht in der ionalen Zusammensetzung der menschlichen Tubenflüssigkeit (human tubal fluid)

H <sub>2</sub> O	Wasser
i. allg.	im allgemeinen
i. e.	id est
ICSI	intra-cytoplasmatic sperm injection, Mikroinjektion
I.E.	Internationale Einheiten
incl.	inclusive
IU	International Units
IVF	In-vitro Fertilisation
IVOS	Integrated visual optical system
JLU	Justus-Liebig-Universität
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium-Hydrogenphosphat
MESA	Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration
mind.	mindestens
Mio.	Million
Morph.	Morphologisch
MS	Microsoft
NaCl	Natrium-Chlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natrium-Hydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> EDTA	Natrium-Ethylenediaminetetraacetic Acid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natrium-Hydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NH <sub>4</sub> Cl	Ammonium-Chlorid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
Perox.	Peroxidase
pH	Potentia hydrogenii
PMN	Polymorphonuklearer Neutrophiler
pn	pronukleus (Vorkern)
Prof.	Professor
r	Korrelationskoeffizient
resp.	respektive
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s.o.	siehe oben

s.u.	siehe unten
Spearman CC	Spearman's Korrelationskoeffizient
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TMSC	Total motile sperm count
VKZ	Varianzkomponentenzerlegung
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zona pellucida
&	und

## **10. ERKLÄRUNG**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 31.10.2010

Gesa Schalk

## 11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die maßgeblich zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. R. Henkel für die Möglichkeit der Promotion, die Überlassung dieses Themas, sowie die gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. H.C. Schuppe möchte ich danken für die gute Betreuung auf den letzten Schritten der Dissertation.

Weiterhin danke ich Frau Blasevic vom Sekretariat der andrologischen Ambulanz sowie Frau Dr. C. Fischer und Herrn Prof. A. Jung für die Hilfe bei Erhebung der andrologischen Daten. Herrn Prof. Dr. med. Gips danke ich für die Möglichkeit, auf die Daten seines IVF-Programmes zurückgreifen zu dürfen. Dank gilt auch den Mitarbeitern/innen des Labors am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die reibungslose Kooperation und freundliche Unterstützung.

Schließlich danke ich Frau C. Scheibelhut und Herrn Dr. R.-H. Boedeker vom Institut für Medizinische Informatik der JLU Gießen für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ganz besonders danke ich meiner gesamten Familie und Freunden für die langjährige beharrliche Unterstützung und Hilfe; speziell möchte ich hier meine Tante Swanni Uszkoreit erwähnen, die mir gerade zum Schluss zur Seite stand.