

Intraindividuelle Schwankungen und Einflußfaktoren der akrosomalen Reaktion
menschlicher Spermatozoen

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

vorgelegt von Iris Erdmann
aus Diepholz

Giessen 2002

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

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. F.-M. Köhn

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Weidner

Tag der Disputation: 28. Oktober 2002

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1 Zielsetzungen der Arbeit	1
1.2 Aufbau des menschlichen Spermatozoons	1
1.3 Kapazitation	3
1.4 Akrosomale Reaktion	4
1.4.1 Strukturelle Veränderungen	4
1.4.2 Spontane akrosomale Reaktion	6
1.4.3 Induktion der akrosomalen Reaktion in vivo	7
1.4.4 Induktion der akrosomalen Reaktion in vitro	9
1.4.4.1 Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kälte	10
1.4.4.2 Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kalzium Ionophor A23187	10
1.5 Bedeutung der akrosomalen Reaktion für die männliche Fertilität	11
1.5.1 Bedeutung der spontanen akrosomalen Reaktion für die männliche Fertilität	12
1.5.2 Bedeutung der induzierbaren akrosomalen Reaktion für die männliche Fertilität	13

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten	14
2.1.1 Auswahl der Patienten	14
2.1.2 Erfassung der Patienten	14
2.2 Ejakulatanalyse	14
2.2.1 Volumen	14
2.2.2 pH-Bestimmung	15
2.2.3 Spermatozoenkonzentration	15
2.2.4 Motilität	15
2.2.5 Morphologie	15
2.2.6 Chromatinkondensation	16
2.2.7 α -Glukosidase	16
2.2.8 Anzahl peroxidase-positiver Zellen	17
2.2.9 Granulozytenelastase	17

2.3	Mikrobiologische Untersuchungen	17
2.3.1	Bakteriospermie	17
2.3.2	Bestimmung der Bakterienspezies und –konzentration	18
2.4	Patienten mit Nachweis von Ureaplasma urealyticum	18
2.4.1	Antibiotische Therapie bei Patienten mit Nachweis von Ureaplasma urealyticum	18
2.5	Patienten mit Nachweis von E.coli	18
2.5.1	Antibiotische Therapie bei Patienten mit Nachweis von E.coli	19
2.6	Induktion der akrosomalen Reaktion	19
2.6.1	Aufbereitung der Spermatozoen	19
2.6.2	Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kälte	19
2.7	Nachweis der akrosomalen Reaktion mit der Triple Stain Technik	20
2.8	Statistische Verfahren	21
3	ERGEBNISSE	
3.1	Prävalenz der verminderten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	22
3.2	Intraindividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	22
3.2.1	Intraindividuelle Schwankungen der Δ AR in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitraum	27
3.3	Jahreszeitliche Schwankungen	28
3.4	Schwankungen der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Untersucher des Ejakulates	30
3.5	Einflußfaktoren auf die akrosomale Reaktion	32
3.5.1	Ejakulatparameter	32
3.5.1.1	Spermatozoenkonzentration	32
3.5.1.2	Progressivmotilität (WHO a)	34
3.5.1.3	Morphologie (Normal, Akrosomale Störungen, Überstreckungen)	36
3.5.1.4	Anzahl peroxidase-positiver Zellen	38
3.5.1.5	Granulozytenelastase	40
3.5.1.6	α -Glukosidase	41
3.5.1.7	Chromatinkondensation	43

3.5.2 Bakterielle Samenwegsinfektion	44
3.5.2.1 Einfluß einer Infektion mit Ureaplasma urealyticum	44
3.5.2.2 Einfluß einer E.coli-Infektion	47
3.5.2.3 Einfluß einer antibakteriellen Therapie bei einer Ureaplasma urealyticum-Infektion	52
 4 DISKUSSION	
4.1 Prävalenz und Reproduzierbarkeit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	54
4.2 Jahreszeitliche Schwankungen der akrosomalen Reaktion	56
4.3 Einfluß der Ejakulatparameter auf die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	58
4.3.1 Spermatozoenkonzentration	58
4.3.2 Motilität	59
4.3.3 Morphologie	60
4.3.4 Entzündungsparameter	62
4.3.5 α -Glukosidase	63
4.3.6 Chromatinkondensation	64
4.4 Korrelation der bakteriellen Samenwegsinfektion mit der akrosomalen Reaktion	65
4.4.1 Einfluß von E.coli	65
4.4.2 Einfluß von Ureaplasmen	68
4.4.3 Einfluß einer antibiotischen Therapie	70
 5 ZUSAMMENFASSUNG	73
 6 LITERATURVERZEICHNIS	75
 7 ANHANG	
Danksagung	89
Lebenslauf	90

1 EINLEITUNG

1.1 Zielsetzungen der Arbeit

Anhand eines großen Kollektivs von Patienten der andrologischen Sprechstunde des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität (JLU) Giessen soll die Prävalenz einer eingeschränkten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und deren intra- und interindividuelle Schwankungen untersucht werden. Weiterhin soll der Einfluß verschiedener Faktoren auf die akrosomale Reaktion beurteilt werden. Dazu gehören die Standardsamenparameter, eine bakterielle Infektion des Ejakulates und deren anschließende antibiotische Therapie, Schwankungen der Messung der akrosomalen Reaktion durch verschiedene Untersucher und jahreszeitliche Schwankungen. Die aus den Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sind von klinischer Bedeutung, da die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion als Marker für die Fertilisierungskapazität menschlicher Spermatozoen verwendet wird.

1.2 Aufbau des menschlichen Spermatozoons

Bis zur Bildung einer Samenzelle werden im Keimepithel des Hodens verschiedene Reifungs- und Differenzierungsprozesse durchlaufen.

Hierbei kann die Spermatogenese von der Spermiogenese unterschieden werden. Die Bildung der Spermatozyten aus den basal gelegenen Spermatogonien wird als Spermatogenese bezeichnet, während die Spermiogenese die weitere Differenzierung der im Rahmen der zweiten Reifeteilung aus den Spermatozyten 2. Ordnung entstandenen Spermatiden zu testikulären Spermatozoen umfasst. Während der Spermiogenese entwickeln sich auch die akrosomalen Strukturen (Holstein und Roosen-Runge, 1981).

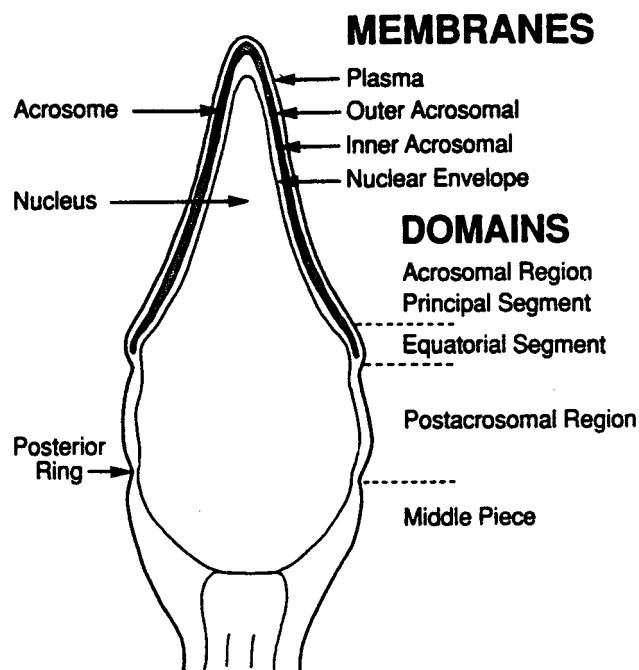
Das reife Spermatozoon ist eine freie und aktiv bewegliche Zelle. Die morphologischen Hauptkomponenten sind der Kopf mit dem Akrosom, das Hals- oder Verbindungsstück, sowie das Flagellum, welches aus drei Abschnitten besteht, einem mitochondrientragenden Mittelstück, sowie einem Haupt- und Endstück.

Der Kopf bildet die Hauptmasse des Spermatozoons. Er enthält den Zellkern, dessen Chromatin stark verdichtet ist. Apikal über dem Zellkern ist der Kopf in den vorderen zwei Dritteln vom Akrosom überzogen. Das Akrosom, welches auch als spezialisiertes Lysosom bezeichnet wird, enthält lysosomale Enzyme (Allison und Hartree, 1970). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Passage der Spermatozoen durch die Corona radiata und die Zona pellucida der Eizelle. Die wichtigsten spermien-spezifischen Enzyme sind das Akrosin und die Hyaluronidase.

Das Akrosom wird zum Zellkern durch die innere akrosomale Membran und nach außen durch die äußere akrosomale Membran begrenzt. Die äußere akrosomale Membran liegt direkt unter der Plasmamembran (Abbildung 1). Zwischen der inneren und der äußeren Membran befindet sich die akrosomale Matrix, die während der akrosomalen Reaktion freigesetzt wird.

Abbildung 1

Membranen und Regionen des Kopfes des menschlichen Spermatozoon (aus Eddy und O'Brian, 1994)



Zytoskelettale Strukturen, die das Akrosom stabilisieren, sind an drei Regionen des Kopfes lokalisiert, und zwar zwischen Akrosom und Zellkern, zwischen Akrosom und Plasmamembran und zwischen dem Zellkern und der postakrosomalen Plasmamembran (Eddy und O'Brien, 1994).

Das Akrosom besteht aus zwei Segmenten, dem anterioren Anteil und dem Äquatoralsegment (Eddy und O'Brien, 1994). Während der akrosomalen Reaktion verschmelzen die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran des anterioren Segmentes, während die innere akrosomale Membran und das äquatoriale Segment bestehen bleiben (Eddy und O'Brien, 1994). Nagae et al. (1986) zeigten, daß die Region, die unmittelbar apikal zum äquatorialen Segment liegt, eine wichtige Fusionsstelle für die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran während der akrosomalen Reaktion darstellt.

Die Plasmamembran, die das Äquatoralsegment bedeckt, spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion zwischen Spermatozoon und Eizelle (Bedford et al., 1979).

1.3 Kapazitation

Die Spermatozoen müssen nach der Ejakulation im weiblichen Genitaltrakt einen Aktivierungsprozeß durchmachen, der es ihnen ermöglicht, eine Eizelle zu befruchten. Dieser Prozeß wurde erstmals von Chang (1951) und Austin (1952) beschrieben und als Kapazitation bezeichnet. Der Kapazitationsprozeß führt nicht zu sichtbaren morphologischen Veränderungen. Er ist mit Membranveränderungen und biochemischen Prozessen verbunden, die gemeinsam Voraussetzung sind für die Zona-pellucida-induzierte akrosomale Reaktion, für die Zonapenetration und für die Fusion mit der Eizelle (Töpfer-Petersen et al., 1996). Wichtige Schlüsselereignisse sind hierbei die Entfernung von Cholesterin aus der Plasmamembran und ein Kalziumioneninflux in das Spermatozoon. Ein weiterer wichtiger Aspekt sind Veränderungen der Motilität, die während der Kapazitation auftreten können und als „Hyperaktivierung“ bezeichnet werden.

1.4 Akrosomale Reaktion

Die akrosomale Reaktion ist ein exozytotischer Prozeß, bei welchem die Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran verschmilzt. Anschließend werden die intraakrosomalen Enzyme freigesetzt, welche die Spermatozoen zur Penetration durch die Zona pellucida befähigen und somit die Voraussetzung für die Fertilisation der Eizelle schaffen (Lange et al., 1992).

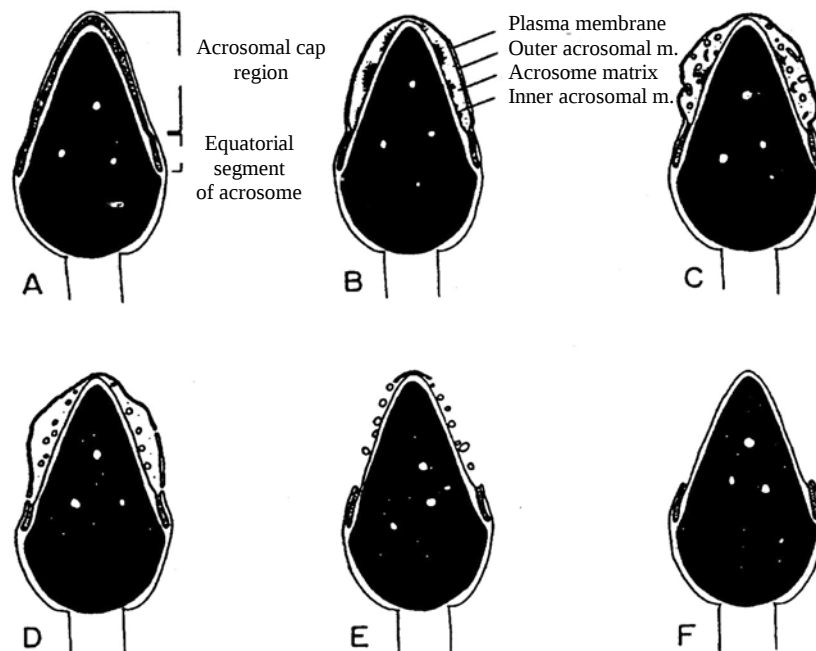
1.4.1 Strukturelle Veränderungen

Die ultrastrukturellen Veränderungen der akrosomalen Reaktion wurden erstmals von Barros et al. (1967) beschrieben. Eine akrosomale Reaktion kann in vivo nur bei kapazitierten Spermatozoen ablaufen. Russell et al. (1979) zeigten schon, daß es bei der akrosomalen Reaktion zu einem Verschmelzen der Plasmamembran mit der äußeren Membran kommt. Nagae et al. (1986) und später Stock und Fraser (1987) studierten elektronenmikroskopisch den Ablauf der akrosomalen Reaktion bei menschlichen Spermatozoen. Danach kann man die akrosomale Reaktion in fünf oder sechs morphologische, zeitlich aufeinanderfolgende Schritte unterteilen (Nagae et al., 1986; Stock und Fraser, 1987) (Abbildung 2). Ausgangspunkt ist das intakte Akrosom ohne morphologische Veränderungen. Zunächst schwillt die akrosomale Matrix an; Plasmamembran und äußere akrosomale Membran bleiben intakt. Später sind innerhalb der akrosomalen Matrix viele Vesikel zu beobachten, die vorwiegend durch Invaginationen der äußeren akrosomalen Membran gebildet werden und seltener durch Invaginationen sowohl der äußeren Membran, als auch der Plasmamembran. Gemäß Jamil und White (1981) spielt nur die äußere akrosomale Membran bei der Vesikelentstehung in menschlichen Spermatozoen eine Rolle. Ein gemeinsames Merkmal der Spermatozoen in diesem Schritt ist die „Kräuselung“ („ruffling“) der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran. Dann verschmelzen die Plasmamembran und die äußere Membran, vorwiegend im Bereich der akrosomalen Kappe und im vorderen Bereich des Äquatorialsegmentes, miteinander, so daß die akrosomale Matrix weitgehend freigesetzt wird.

Zuletzt fehlen die Plasmamembran, die äußere akrosomale Membran und die akrosomale Matrix, so daß die innere akrosomale Membran exponiert wird. Bei einigen Spermatozoen sind in der Nähe der inneren akrosomalen Membran Vesikel zu beobachten. Das Äquatorialsegment bleibt normalerweise erhalten.

Abbildung 2

Schematischer Verlauf der akrosomalen Reaktion bei menschlichen Spermatozoen (aus Nagae et al., 1986)



Die akrosomale Reaktion ist nicht nur dafür Voraussetzung, daß die Spermatozoen die Zona pellucida durchdringen können, sondern auch dafür, daß die Plasmamembran der Eizelle mit der Membran der Spermatozoen im Bereich des Äquatorialsegmentes verschmelzen kann (Yanagimachi, 1994). Akrosomal intakte Spermatozoen sind nicht in der Lage, mit der Eizelle zu verschmelzen.

1.4.2 Spontane akrosomale Reaktion

In-vitro-Untersuchungen an Spermatozoen verschiedener Spezies haben gezeigt, daß Spermatozoen auch ohne Kontakt mit physiologischen oder artifiziellen Induktoren akrosomal reagieren können (Yanagimachi, 1994). Diese Reaktion der Spermatozoen in einem Kapazitationsmedium ohne Stimulanzen wird als spontane akrosomale Reaktion bezeichnet. Wie bei der Zona-pellucida-induzierten akrosomalen Reaktion kommt es zu einem Verlust der Kopfkappe.

Untersuchungen an Mausspermatozoen zeigten, daß spontan akrosomal reagierte Spermatozoen nicht mehr an die Zona pellucida binden und somit die Oocyte nicht mehr befruchten können (Saling, 1989; Kopf und Gerton, 1991). Spontan akrosomal reagierte Spermatozoen vermögen nur noch Zona pellucida freie Oocyten zu befruchten (Naito et al., 1992). Tesarik (1989) hat an humanen Spermatozoen gezeigt, daß sich durch die spontane akrosomale Reaktion der Anteil an Spermatozoen verringert, die fähig sind, auf einen biologischen Stimulus zu reagieren. Die Inzidenz der spontanen akrosomalen Reaktion kann von verschiedenen Faktoren abhängen: der Spezies, der Zusammensetzung des Inkubationsmediums, der Inkubationsdauer, einer medikamentösen Behandlung und immunologischen Faktoren (Yanagimachi, 1994).

Stock und Fraser (1987) untersuchten menschliche Spermatozoen von gesichert fertilen, und nicht sicher fertilen Männern. Nach 24 Stunden unter Kapazitationsbedingungen waren die Spermatozoen von 9.7% der fertilen Männer und 10.5% der nicht sicher fertilen Männer komplett akrosomal reagiert. Der Anteil spontan akrosomal reagierter Spermatozoen war geringer, wenn sie 24 Stunden mit Seminalplasma inkubiert wurden (Cross, 1996). Pilikian et al. (1992) zeigten unter klassischen In-vitro-Bedingungen, daß fertile und subfertile Spermaproben bei Asthenozoospermie die gleiche Rate an spontan akrosomal reagierten Spermatozoen aufwiesen. Die Beurteilung der spontanen akrosomalen Reaktion allein ist also kein geeigneter Parameter, um die Fertilität zu evaluieren (Byrd und Wolf, 1986; Stock und Fraser, 1987; Aitken, 1990).

Zusammenfassend wird die spontane akrosomale Reaktion heute als unphysiologisch beurteilt. Als Fertilitätsparameter wird sie nicht verwendet.

1.4.3 Induktion der akrosomalen Reaktion in vivo

Nach derzeit gängiger Vorstellung wird die akrosomale Reaktion unter physiologischen Bedingungen bei Kontakt des Spermatozoons mit der Zona pellucida und dem Oocyten-Cumulus-Komplex induziert (Cross et al., 1988; Stock et al., 1989).

Auf ihrem Weg zur Eizelle passieren die Spermatozoen verschiedene Organe und Gewebe, welche die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen können. Die negativ regulierenden Faktoren haben die Aufgabe, eine frühzeitige akrosomale Reaktion zu verhindern, da Spermatozoen, die ihre akrosomalen Enzyme bereits freigesetzt haben, die Zona pellucida nicht mehr durchdringen können. So können Proteine des Nebenhodens, die an die Plasmamembran der Spermatozoen binden, die akrosomale Reaktion beeinflussen (Boué et al., 1996). Auch das Seminalplasma hat eine protektive Wirkung (Han et al., 1990). Aus dem Seminalplasma wurden entsprechende Faktoren isoliert, welche die akrosomale Reaktion inhibieren, unter anderem ein Akrosom stabilisierender Faktor (ASF) und ein die akrosomale Reaktion inhibierendes Glycoprotein (ARIG) (Thomas et al., 1986; Drisdell et al., 1995). Mori et al. (1993) untersuchten den Einfluß von Mannose und Fruktose, Bestandteile des Seminalplasmas, auf die akrosomale Reaktion der Spermatozoen. Demnach zeigte Fruktose im Gegensatz zur Mannose einen hemmenden Effekt auf die akrosomale Reaktion. Beide Zucker konnten die Penetration durch die Zona pellucida blockieren. Eine verfrühte akrosomale Reaktion wird auch verhindert durch Cholesterin, das in die Spermatozoenmembran eingebaut wird und stabilisierend wirkt (Cross, 1996; Töpfer-Petersen et al., 1996).

Weiterhin müssen Interaktionen zwischen Spermatozoen und Sekretionsprodukten oder Epithelien des weiblichen Genitaltraktes diskutiert werden (Fusi et al., 1994). Die Rolle des Zervixmukus auf die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ist teilweise umstritten, es wurden sowohl inhibitorische, als auch fördernde Wirkungen beschrieben (Hoshi et al., 1993; Perry et al., 1996). Nach Untersuchungen von Hoshi et al. (1993) kann der Zervixmukus allein die akrosomale Reaktion nicht stimulieren. Jedoch war die Zahl der Spermatozoen, die nach Stimulation durch Zona pellucida akrosomal

reagierten, erheblich höher, wenn die Spermatozoen den Zervixmucus passiert hatten. Der Mucus hätte demnach einen begünstigenden Effekt auf die Kapazitation. Dagegen zeigte sich in Studien von Perry et al. (1996), die menschliche Spermatozoen mit Zervixmucus inkubierten, die spontane und die durch Ionophor-induzierte akrosomale Reaktion niedriger als bei der Kontrollgruppe, die nicht mit Zervixmucus inkubiert wurden. Spermatozoen, die 72 Stunden nach dem Koitus aus dem Zervixmucus gewonnen wurden, wiesen nur eine leicht erhöhte Rate akrosomaler Reaktionen auf (10.6%), die ähnlich der nach 17 Stunden Inkubation gemessenen Zahl (9.6%) war (Bielfeld et al., 1992). Diese Ergebnisse deuten auf protektive Effekte des Mucus bezüglich der akrosomalen Reaktion hin.

Untersuchungen zur Stimulation der akrosomalen Reaktion durch das Endometrium wurden von Fusi et al. (1994) durchgeführt. Sie inkubierten Spermatozoen von 17 subfertilen Männern mit Endometriumzellen und beobachteten einen Anstieg spontan akrosomal reagierter Spermatozoen. Durch die Sekretion von Steroidhormonen und Proteinen scheint das Endometrium einen fördernden Einfluß auf die akrosomale Reaktion zu haben, wogegen ein Einfluß des Tubenepithels nicht nachweisbar ist (Bongso et al., 1993; Fusi et al., 1994; Banerjee und Chowdhury, 1995).

Follikularflüssigkeit, Granulosazellen, Cumuluszellen und die Zona pellucida können die akrosomale Reaktion induzieren (De Jonge et al., 1988; Yao et al., 2000). Bei der Auslösung der akrosomalen Reaktion durch Follikularflüssigkeit scheinen Progesteron und Proteine aus dem Cumulus oophorus eine wichtige Rolle zu spielen (Tesarik et al., 1988; Thomas und Meizel, 1988; Blackmore et al., 1990; Baldi et al., 1991; Minami et al., 1995).

Der wichtigste physiologische Stimulus der akrosomalen Reaktion ist die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida. Die Interaktion der Spermatozoen mit der Zona pellucida kann man nach Yanagimachi (1994) in drei Schritte einteilen. Zuerst kommt es zur Bindung der akrosomal intakten Spermatozoen (primäre Bindung), dann zur Bindung der akrosomal reagierenden und reagierten Spermatozoen (sekundäre Bindung) und

zuletzt zur Penetration der akrosomal reagierten Spermatozoen durch die Zona pellucida. In der Maus gilt das Glycoprotein ZP3 als Ligand der Rezeptoren in der Plasmamembran der Spermatozoen, welche die Kaskade der Signaltransduktion und somit die akrosomale Reaktion auslösen (Florman und Storey, 1982; Bleil und Wassarman, 1983). ZP3 kann die akrosomale Reaktion auch in rekombinanter Form auslösen (Van Duin et al., 1994; Brewis et al., 1996). Der Einfluß der Zona pellucida auf die akrosomale Reaktion ist vielfach untersucht worden (Cross et al., 1988; Coddington et al., 1990; Hoshi et al., 1993).

1.4.4 Induktion der akrosomalen Reaktion in vitro

Wegen der limitierten Verfügbarkeit der oben beschriebenen physiologischen Stimuli, wie z.B. Zona pellucida, wird für Routinezwecke die akrosomale Reaktion artifiziell ausgelöst. Diese kann z.B. durch Zugabe eines Kalzium Ionophors (A23187), welches den intrazellulären Kalziumspiegel erhöht, induziert werden (Talbot und Chacon, 1980). Ebenso können Analoga des cAMP, Phosphodiesterase-Inhibitoren, sowie Stimulatoren der Adenylatzyklase, Stimulatoren der Proteinkinase C und Progesteron eingesetzt werden (Kopf et al., 1983; Osman et al., 1989; De Jonge et al., 1991a und 1991b; Meizel et al., 1995).

Neben diesen pharmakologischen Stimuli kann auch Kälte als physikalischer Reiz die akrosomale Reaktion induzieren (Sánchez und Schill, 1991a und 1991b).

In dieser Arbeit wurde die akrosomale Reaktion durch Kälte induziert.

Bei der Beurteilung der akrosomalen Reaktion müssen insgesamt drei Parameter berücksichtigt werden, die spontane akrosomale Reaktion, die induzierte akrosomale Reaktion und die induzierbare akrosomale Reaktion (ΔAR), welche durch die Differenz zwischen dem Anteil spontan und induziert akrosomal reagierter Spermatozoen definiert wird.

1.4.4.1 Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kälte

Bereits 1983 fanden Bolanos und Katz, daß sich das Fertilisierungsverhalten menschlicher Spermatozoen im Hamster-Ovum-Penetrationstest durch eine 48-stündige Inkubation bei 2°C bis 5°C signifikant verbesserte. 1987 bestätigten Chan et al. diese Resultate ebenfalls für eine nur 24-stündige Inkubationsdauer. Auch Sánchez und Schill (1991b) zeigten im Hamster-Ovum-Penetrationstest, daß sich nach 24-stündiger Inkubation bei 4°C, gefolgt von einer 3-stündigen Inkubation bei 37°C, die durchschnittliche Penetrationsrate, die Anzahl dekondensierter Spermatozooköpfe und der Anteil an die Oocyte bindender Spermatozoen signifikant erhöhten. Die Inkubation über 24 Stunden bei 4°C erhöht auch den Prozentsatz akrosomal reagierter Spermatozoen signifikant. Henkel et al. (1993) zeigten weiterhin, daß die Fähigkeit zur kälteinduzierten akrosomalen Reaktion mit den Fertilisierungsraten im In-vitro-Fertilisations-Programm korrelierte. Sie definierten als cut-off-Level für die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion 7.5%.

1.4.4.2 Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kalzium Ionophor A23187

Das bivalente Kation Ionophor A23187 wird in der Präsenz von exogenem Kalzium häufig zur Induktion der akrosomalen Reaktion verwendet (Talbot et al., 1976; Smith et al., 1983). Dieses Ionophor bildet mit Kalziumionen einen lipophilen Komplex, welcher die Kalziumionen rasch durch die Plasmamembran der Spermatozoen transportiert und auf diese Weise die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigert. Die Erhöhung intrazellulärer Kalziumspiegel wird auch unter physiologischen Bedingungen bei der Induktion der akrosomalen Reaktion beobachtet (Kopf und Gerton, 1991). Die durch A23187 induzierte akrosomale Reaktion unterscheidet sich morphologisch nicht von der durch physiologische Stimuli induzierten akrosomalen Reaktion (Green, 1978; Peterson et al., 1978; Russell et al., 1979). Avrech et al. (1997) zeigten, daß die Fertilisierungsraten nach IVF mit der Δ AR durch A23187 und durch Follikularflüssigkeit positiv korrelierten. Im Gegensatz dazu scheint aber keine Korrelation zwischen der A23187 induzierten und der Zona-pellucida-induzierten akrosomalen Reaktion zu bestehen (Liu und Baker, 1996). Deshalb wird die physiologische Aussagekraft der

Kalzium Ionophor-induzierten akrosomalen Reaktion von einigen Arbeitsgruppen in Frage gestellt.

1.5 Bedeutung der akrosomalen Reaktion für die männliche Fertilität

In Deutschland bleiben etwa 15-20% aller Ehen ungewollt kinderlos. Infertilität ist dann gegeben, wenn nach ein bis zwei Jahren ungeschütztem Geschlechtsverkehr bei bestehendem Kinderwunsch keine Schwangerschaft eintritt. Die Ursachen der Sterilität, bzw. der Infertilität liegen zu je etwa 30 bis 40% bei der Frau, beim Mann oder bei beiden Partnern.

Bei 75 % der männlichen Patienten mit niedrigen Fertilisierungsraten sind die Ursachen Oligozoospermie, Teratozoospermie, Asthenozoospermie oder abnorme Akrosomen mit verminderter oder fehlender Fähigkeit, an die Zona pellucida zu binden (Liu und Baker, 1990; Liu und Baker, 1992a; Liu und Baker, 1992b). Bei den übrigen 25% der infertilen Patienten mit normalem Spermiogramm und normaler Zona pellucida Bindung muß die Ursache der Fertilitätsstörung in einem gestörten Prozeß **nach** der Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida liegen, d.h. es bestehen entweder Störungen der akrosomalen Reaktion, der Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida, der Spermatozoon-Oolemma-Interaktion oder Störungen der Spermatozoen DNA (Liu und Baker, 1994; Yanagimachi, 1994).

Das klassische Standardspermiogramm, bei welchem die Parameter Viskosität, Volumen, pH, Spermatozoenkonzentration, Spermatozoenanzahl pro Ejakulat, Motilität, Morphologie, Anzahl von Leukozyten und Fruktose gemessen wird, ist alleine zur Beurteilung der Fertilisierungskapazität von Spermatozoen nicht ausreichend. Aus diesem Grund sind weitere Spermatozoenfunktionsteste propagiert worden, um zusätzliche Informationen über die männliche Fertilität zu erlangen. Die Ergebnisse der In-vitro-Fertilisation (IVF) können herangezogen werden, um die Spermatozoenfunktionsteste zu evaluieren (Liu und Baker, 1992b). Dabei ist der akrosomale Status signifikant mit der Fertilisationsrate nach IVF korreliert. Die Differenz zwischen der

spontanen akrosomalen Reaktion und der induzierten akrosomalen Reaktion, die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Δ AR), zeigt signifikante Unterschiede zwischen Ejakulaten gut und schlecht fertilisierender Patienten (Henkel et al., 1992).

1.5.1 Bedeutung der spontanen AR für die männliche Fertilität

Eine Vielzahl von Studien haben Unterschiede in der akrosomalen Reaktion bei fertilen und infertilen Männern gezeigt. Es finden sich Unterschiede in der Kinetik der akrosomalen Reaktion (Töpfer-Petersen et al., 1985). Van Kooij et al. (1986) beobachteten, daß signifikant mehr Spermatozoen fertiler Männer akrosomal reagierten als die infertiler Männer. Reyes et al. (1984) fanden einen signifikant erniedrigten Prozentsatz akrosomal reagierter Spermatozoen im Ejakulat infertiler Männer, welcher auch mit erniedrigter Motilität korrelierte. Ebenso berichteten Fuse et al. (1993) bei Patienten mit Oligoasthenozoospermie über eine signifikant erniedrigte Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen. Akrosomale Störungen wurden auch bei Patienten mit Polyzoospermie gefunden (Schill et al., 1988).

Als alleiniger Parameter scheint die spontane akrosomale Reaktion jedoch ohne klare Voraussagekraft für die Fertilisierungskapazität menschlicher Spermatozoen zu sein (Fénichel, 1995). Sie korreliert nicht mit der Fertilisierungsrate nach IVF (Plachot et al., 1984; Henkel et al., 1993).

1.5.2 Bedeutung der induzierbaren AR für die männliche Fertilität

Im Gegensatz zur spontanen akrosomalen Reaktion korreliert die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Δ AR) deutlich mit der Fertilität.

Calvo et al. (1989) stellten bei 6 von 15 idiopathisch infertilen Männern eine reduzierte Δ AR nach Inkubation mit Follikularflüssigkeit fest und zeigten später an einem großen Patientenkollektiv ebenfalls eine im Vergleich zu fertilen Männern signifikant reduzierte Δ AR bei infertilen Patienten. Eine signifikante Korrelation besteht auch zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Kälte und der Fertilisationsrate. Patienten mit einer pathologisch erniedrigten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion wiesen reduzierte Fertilisationsraten in vitro auf (Henkel et al., 1993). Analog zeigten Cummins et al. (1991) und Pilikian et al. (1992) eine reduzierte Ionophor-induzierte akrosomale Reaktion bei infertilen Patienten. Auch die Progesteron induzierte AR eignet sich zur Voraussage der Fertilität (Tesarik und Mendoza, 1992; Oehninger et al., 1994).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

2.1.1 Auswahl der Patienten

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um Männer, welche die andrologische Ambulanz des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen wegen unerfülltem Kinderwunsch aufsuchten.

2.1.2 Erfassung der Patienten

Sämtliche Daten wurden in einer Tabelle (Excel 7.0) erfasst.

2.2 Ejakulatanalyse

Die Ejakulatgewinnung erfolgte durch Masturbation in der Klinik. Die Dauer der sexuellen Karenz betrug 3-6 Tage. Das Ejakulat wurde in Plastikbechern (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt.

Nach vollständiger Verflüssigung bei Raumtemperatur wurden die Ejakulatproben im Routinelabor gemäß den Richtlinien der WHO (1993) untersucht. Neben der Bestimmung der Standardsamenparameter wurden noch weitere Untersuchungen durchgeführt.

2.2.1 Volumen

Das Volumen besteht zu 95% aus den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und ist ein Maß für deren funktionelle Aktivität. Das Volumen wurde in kalibrierten Zentrifugenröhrchen gemessen, wobei ein Ejakulatvolumen von ≥ 2 ml als Normalwert gilt.

2.2.2 pH-Bestimmung

Ein Ejakulattropfen wurde auf ein Indikatorpapier (Merck, Darmstadt, pH 6.4-10.0) aufgetragen und nach 30 sec mit einem Kalibrationsstreifen verglichen. Der normale pH-Wert liegt bei 7.2-8.0.

2.2.3 Spermatozoenkonzentration

Das Ejakulat wurde 30 Minuten nach der Ejakulation mit 10% NaCl (1:20) verdünnt. Die Spermatozoenkonzentration wurde dann unter dem Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe des Neubauer-Hämozytometers ermittelt. Der Normbereich liegt bei einer Konzentration von $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$.

2.2.4 Motilität

Die Motilität wurde im Nativpräparat mikroskopisch untersucht. Dabei wurde in einem oder mehreren Blickfeldern die Motilität jedes Spermatozoons beurteilt, die nach der WHO in vier verschiedene Kategorien unterteilt wird: WHOa) schnelle und lineare progressive Beweglichkeit, WHOb) langsame, träge lineare oder nicht-lineare progressive Beweglichkeit, WHOc) nicht progressive Beweglichkeit und WHOd) Immotilität. In unseren Untersuchungen wurde nur die schnelle progressive Motilität (WHOa) berücksichtigt, wobei der Normalwert bei $\geq 25\%$ liegt.

2.2.5 Morphologie

Für die Beurteilung der Morphologie wurden 1-2 Tropfen Ejakulat auf einem Objektträger dünn ausgestrichen, nach der Shorr-Methode (modifiziert nach WHO, 1993) gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch beurteilt. Insgesamt wurden 100 Spermatozoen ausgezählt und neben den Normalformen auf a) Defekte des Spermienkopfes (akrosomale Störungen und/oder Überstreckungen), b) Defekte des Mittelstückes und c) Flagellumdefekte geprüft. In der vorliegenden Arbeit waren von besonderer Bedeutung die normale Morphologie, die akrosomalen Störungen und Überstreckungen. Ein Prozentsatz

von $\geq 30\%$ normal geformter Spermatozoen galt gemäss den vor 1999 gültigen Empfehlungen der WHO als Normalwert.

2.2.6 Chromatinkondensation

Die Köpfe der Spermatozoen, die Störungen der Chromatinkondensation aufweisen, lassen sich mit saurem Anilinblau anfärben. Spermatozoenausstriche wurden 30 Minuten in 3% Glutaraldehyd in 0.2 M Phosphatpuffer fixiert und anschließend 5 Minuten mit 5% Anilinblau bei einem pH von 3.5 gefärbt (Terquem und Dadoune, 1983).

Man unterscheidet zwei Färbeintensitäten: 1) absolut ungefärbte oder negativ gefärbte Spermatozoen mit einer geringfügigen Imprägnation der Umrisse; 2) vollständig oder partiell gefärbte Spermatozoen (Hofmann und Hilscher, 1991). Normalerweise lassen sich mindestens 75% der Spermatozoen der Gruppe 1 zuordnen.

2.2.7 α -Glukosidase

Der klinisch gebräuchlichste Nebenhodenmarker ist die α -Glukosidase. Es gibt zwei Isoformen der α -Glukosidase, die quantitativ überwiegende neutrale Form aus dem Nebenhoden und eine saure Form aus der Prostata. Die Messung der neutralen Form im Seminalplasma hat bei Verschlüssen der ableitenden Samenwege eine große diagnostische Bedeutung. Sie sollte immer im Zusammenhang mit den Hormonwerten und den Ejakulatparametern beurteilt werden. Für die Messung der α -Glukosidase wurde das Seminalplasma 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnt und 15 min in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. 10 μ l des Überstandes wurden mit 100 μ l PNPG (4-Nitrophenyl-alpha-D-glucopyranosid)-Substrat in einer Mikrotiterplatte 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion mit 0.2 M Natriumbikarbonat gestoppt. Das von der α -Glukosidase freigesetzte Nitrophenol wurde bei 405 nm in einen Spektrophotometer gemessen. Es gilt ein Normalwert von ≥ 20 mU/Ejakulat.

2.2.8 Anzahl peroxidase-positiver Zellen

Die Methode zur Leukozytenzählung im Ejakulat ist die Identifizierung bzw. Färbung der Peroxidaseaktivität in den polymorphkernigen Granulozyten (PMN). Es wurde eine Stocklösung mit 50 ml destilliertem Wasser, 50 ml 96% Ethanol und 125 ml Benzidin und eine Arbeitslösung mit 5 µl 30% H₂O₂ und 4 ml der Stocklösung hergestellt. 20 µl der Arbeitslösung wurden mit 20 µl Ejakulat gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Peroxidase-positive Zellen färben sich braun, während peroxidase-negative Zellen ungefärbt bleiben (WHO, 1993). Die Zellen wurden in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Normalerweise ist die Anzahl peroxidase-positiver Zellen $< 1 \times 10^6/\text{ml}$. Erhöhte Zahlen peroxidase-positiver Zellen deuten auf entzündliche Prozesse hin.

2.2.9 Granulozytenelastase

Die Granulozytenelastase ist in den azurophilen Granula der neutrophilen Leukozyten enthalten. Sie wird während einer Entzündung freigesetzt. Aus diesem Grund kann sie als Indikator der Granulozytenaktivität im Ejakulat gemessen werden (Schiessler et al., 1984). Die Elastase wurde mit Hilfe des ELISA im Seminalplasma bestimmt (PMN Elastase, Milenia, Fa. DPC-Biermann, Bad Nauheim). Es gilt ein Normalwert von $< 250 \text{ ng/ml}$.

2.3 Mikrobiologische Untersuchungen

2.3.1 Bakteriospermie

Ejakulate mit Erregerzahlen (aerobe Bakterien) von über 10^2 cfu (colony forming units) pro ml wurden in die Untersuchungen einbezogen.

2.3.2 Bestimmung der Bakterienspezies und -konzentration

Die Ejakulatproben wurden in sterilen Behältern aufgefangen. Zu weiteren mikrobiologischen Untersuchungen wurden zu 2 ml PPLO-Brühe (Becton Dickinson, NJ, USA) 100 µl Ejakulat gegeben und im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen (Prof. Dr. med. H. G. Schiefer) durch Kulturverfahren (Blutagarplatten, tryptische Sojabrühe) auf Bakterienspezies und Bakterienkonzentration (cfu/ml) untersucht (siehe auch Köhn et al., 1998).

2.4 Patienten mit Nachweis von *Ureaplasma urealyticum*

Bei 52 Patienten gelang der Nachweis von *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma (100 bis 80000 cfu/ml). Bei 33 der 52 Patienten wurde zudem die Granulozytenelastase und/oder peroxidase-positive Zellen als Entzündungsparameter gemessen.

2.4.1 Antibiotische Therapie bei Patienten mit Nachweis von *Ureaplasma urealyticum*

Bei 27 der 52 Patienten mit Nachweis von *Ureaplasma urealyticum* wurde eine antibiotische Therapie durchgeführt und die Werte der spontanen und induzierten akrosomalen Reaktion vor und nach der antibiotischen Therapie bestimmt. Die Mehrzahl (n=21) der Patienten wurde mit Doxycyclin (200 mg/d; 10 Tage) therapiert, jeweils 2 Patienten erhielten Erythromycin (3 x 500 mg/d; 10 Tage), Ofloxacin (2 x 200 mg/d; 10 Tage) oder Clarithromycin (2 x 250 mg/d; 10 Tage).

2.5 Patienten mit Nachweis von *E.coli*

Bei 31 Patienten gelang der Nachweis von *E.coli* im Seminalplasma (500 bis 100000 cfu/ml). Bei 26 der 31 Patienten wurde zudem die Granulozytenelastase und/oder peroxidase-positive Zellen als Entzündungsparameter gemessen.

2.5.1 Antibiotische Therapie bei Patienten mit Nachweis von E.coli

Bei 5 der 31 Patienten mit Nachweis von E.coli wurde eine antibiotische Therapie durchgeführt und zusätzlich die Werte der spontanen und induzierten akrosomalen Reaktion vor und nach der antibiotischen Therapie bestimmt. Drei Patienten wurden mit Doxycyclin (200 mg/d; 10 Tage) und 2 Patienten mit Sultamicillin (2 x 375 mg/d; 10 Tage). Aufgrund dieser geringen Zahl auswertbarer Fälle war eine weitergehende Untersuchung des Einflusses einer antibiotischen Therapie auf die akrosomale Reaktion bei Patienten mit E.coli-Infektionen nicht möglich.

2.6 Induktion der akrosomalen Reaktion

2.6.1 Aufbereitung der Spermatozoen

Die Ejakulate wurden zunächst durch Glaswollfiltration aufgearbeitet. Die Glaswolle (SpermFertil©, Mello Ltd., Exeter, UK) wurde zunächst durch Spülung mit 3 ml Medium gewaschen. Die Konzentration des Ejakulates wurde durch Verdünnung mit Medium auf unter $40\text{-}60 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. 1 ml des Ejakulates wurde über die Glaswolle geschichtet; bei Raumtemperatur sickerte es durch die Glaswolle. Die Glaswollsäulen wurden anschließend mit 0.4 ml Medium nachgespült. Die im Zentrifugenröhrchen aufgefangenen Spermatozoen wurden zweimal durch Zugabe von 3 ml Medium mit nachfolgender Zentrifugation bei $400\text{-}500 \times g$ für 5-10 Minuten gewaschen.

2.6.2 Induktion der akrosomalen Reaktion durch Kälte

Bei den Arbeitsschritten zur Bestimmung der akrosomalen Reaktion wurde ein HEPES-gepuffertes Biggers, Whitten, Whittingham Medium (BWW) verwendet (Biggers et al., 1971): 94.7 mM NaCl, 4.77 mM KCl, 1.71 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.19mM KH_2PO_4 , 1.19mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 25.04 mM NaHCO_3 , 5.55 mM Glukose, 21.42 mM Na-Lactat (60% Sirup), 0.25 mM Na-Pyruvat, 18.31 mM HEPES, pH 7.4, supplementiert mit 0.15 g/L Penicillin und 0.25 g/L Streptomycinsulfat. Das Medium enthielt zum Waschen und Kapazitieren noch 1% humanes Serumalbumin (HSA).

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde die akrosomale Reaktion durch Kälte induziert. Dabei wurde die Spermatozoensuspension 15 Stunden bei 4°C und anschließend drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kontrollproben wurden 15h lang bei Raumtemperatur und danach für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

2.7 Nachweis der akrosomalen Reaktion mit der Triple Stain Technik

Die Triple Stain Methode erfolgte nach Talbot und Chacon (1981). 500 µl Spermatozoensuspension wurden mit 200 µl Trypanblau-Lösung (2% in BWW) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Spermatozoen durch Zentrifugation mit 3 ml Medium bei 400 x g gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl Glutaraldehyd (3% in BWW) resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in BWW und Zentrifugieren bei 300 x g wurden 10 µl des Pellets auf einem Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Spermatozoen für 5 Minuten bei 40°C in einer Bismarckbraun-Lösung (0.8% in 15.8 mM HCl, pH 1.8) gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde anschließend durch Eintauchen in ein Wasserbad entfernt. Zuletzt wurden die Spermatozoen mit Bengalrosa (0.8% in 0.1 M Tris-Puffer, pH 5.6%) für 40 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Entfernung von nichtgebundenen Farbstoff mit Aqua dest. und Dehydrierung mit Äthanol (50, 70, 96%) wurden die Objektträger mit Xylol gereinigt und luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung in Öl-Immersionstechnik im Lichtmikroskop, wobei mindestens 200 Spermatozoen pro Objektträger untersucht wurden.

Man unterscheidet nach Talbot und Chacon (1981) vier Färbemuster:

- A. Lebende Spermatozoen mit intaktem Akrosom zeigen eine rötliche Färbung der vorderen Kopfreion und eine hellbraune Färbung der postakrosomalen Region.
- B. Lebende akrosomal reagierte Spermatozoen zeigen eine weiße Färbung der vorderen Kopfreion und eine hellbraune Färbung der postakrosomalen Region.
- C. Tote Spermatozoen mit intaktem Akrosom zeigen eine rötliche Färbung der vorderen Kopfreion und eine blau bis blauschwarze Färbung der postakrosomalen Region.
- D. Tote Spermatozoen ohne Akrosom zeigen eine weiße Färbung der vorderen Kopfreion und eine blau bis blauschwarze Färbung der postakrosomalen Region.

Als Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (ΔAR in %) bezeichnet man die Differenz zwischen der Spontanreaktion (%) und dem Anteil akrosomal reagierter Spermatozoen nach Kälteinduktion (%). Eine $\Delta AR < 7.5\%$ ist mit reduzierten Fertilisationsraten in-vitro assoziiert (Henkel et al., 1993).

2.8 Statistische Verfahren

Die Daten wurden im Institut für Medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Giessen ausgewertet (Herr Pabst). Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman für rangierte Stichproben aus beliebigen Verteilungen berechnet. Unverbundene Stichproben wurden, bei Annahme einer zugrundeliegenden Normalverteilung, mittels t-Test (Student-Verteilung) auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Bei unbekannter zugrundeliegender Verteilung wurden die Stichproben mittels des Mann-Whitney-Tests verglichen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Prävalenz der verminderten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion

Bei 279 Patienten der andrologischen Ambulanz am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, bei denen die akrosomale Reaktion zum ersten Mal gemessen wurde, wurde die Prävalenz der pathologisch verminderten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ermittelt.

Bei 31% der Patienten wurde eine erniedrigte Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ($< 7.5\%$) festgestellt, bei 69% der Männer eine normale Induzierbarkeit ($\geq 7.5\%$) (Tabelle 1).

Tabelle 1

Prävalenz einer pathologisch verminderten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei 279 Männern der andrologischen Ambulanz

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	Andrologische Patienten	
	n	%
$\geq 7.5\%$	192	69%
$< 7.5\%$	87	31%

3.2 Intraindividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion

Bei 230 Patienten der andrologischen Ambulanz wurde die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ein zweites Mal gemessen. Tabelle 2 zeigt, daß sich insgesamt in 44.7% eine Reproduzierbarkeit des Resultates der ersten Messung ergibt. Es ergeben sich jedoch Unterschiede in der Reproduzierbarkeit in Bezug auf die normale bzw. pathologische Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. War die Δ AR bei der ersten

Messung $\geq 7.5\%$, dann lag sie bei der zweiten Messung in 77.8% auch $\geq 7.5\%$. Betrug die ΔAR bei der ersten Messung jedoch $< 7.5\%$, so war sie bei der zweiten Messung nur in 29.7% auch $< 7.5\%$.

Tabelle 2

Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei 230 Patienten der andrologischen Ambulanz

	2. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	2. Messung $\Delta AR < 7.5\%$
1. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	56 24.3%	16 7%
1. Messung $\Delta AR < 7.5\%$	111 48.3%	47 20.4%

Die 230 in die Auswertung eingeschlossenen Patienten wurden in 3 Gruppen subklassifiziert, welche entweder einen Samenwegsinfekt hatten, eine andrologische medikamentöse Therapie erhielten oder keine der beiden obengenannten Merkmale aufwiesen. Die andrologische medikamentöse Therapie war sehr heterogen; jeweils nur sehr kleine Patientenpopulationen erhielten die gleiche Therapie, weshalb eine Auswertung der einzelnen Gruppen (Daten nicht gezeigt) nicht sinnvoll war. Von den 230 Patienten, bei denen die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion zweimal gemessen wurde, erhielten 158 eine Therapie und/oder es bestand ein Samenwegsinfekt. Die übrigen 72 hatten keine Therapie und keinen Samenwegsinfekt. Die intraindividuellen Schwankungen unterschieden sich in diesen beiden Gruppen jedoch nicht wesentlich. Bei den 158 Patienten mit Therapie und/oder Samenwegsinfekt war das Ergebnis in 43.1% reproduzierbar (Tabelle 3). Bei den 72 Patienten ohne Therapie und ohne Samenwegsinfekt betrug die Reproduzierbarkeit 48.6% (Tabelle 4).

Tabelle 3

Intraindividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei 158 Patienten mit Therapie und/oder Samenwegsinfekt

	2. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	2. Messung $\Delta AR < 7.5\%$
1. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	36 22.8%	12 7.6%
1. Messung $\Delta AR < 7.5\%$	78 49.3%	32 20.3%

Tabelle 4

Intraindividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei 72 Patienten ohne Therapie und ohne Samenwegsinfekt

	2. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	2. Messung $\Delta AR < 7.5\%$
1. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	20 27.8%	4 5.6%
1. Messung $\Delta AR < 7.5\%$	33 45.8%	15 20.8%

Bei insgesamt 43 Patienten wurde die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion dreimal gemessen. In der ersten Messung hatten 60.5% (26 von 43) der Patienten eine pathologische Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Tabelle 5 und 6).

Von den 26 Patienten, bei denen in der ersten Messung die $\Delta AR < 7.5\%$ war, hatten 84.6% (22 von 26) auch in der zweiten Messung die $\Delta AR < 7.5\%$. In der Drittmessung hatten

68.2% (15 von 22) der Patienten eine $\Delta AR < 7.5\%$, bei denen in der Erst- und Zweitmessung die ΔAR ebenfalls $< 7.5\%$ war (Tabelle 5).

Von den 17 Patienten, die in der ersten Messung die $\Delta AR \geq 7.5\%$ hatten, betrug sie auch in der zweiten Messung in 52.9% (9 von 17) $\geq 7.5\%$. Bei diesen Patienten, bei denen die $\Delta AR \geq 7.5\%$ in der ersten und zweiten Messung war, lag die ΔAR in 88,9% (8 von 9) auch in der dritten Messung $\geq 7.5\%$ (Tabelle 6).

Tabelle 5

Reproduzierbarkeit der pathologisch verminderten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei dreimaliger Messung

1. Messung ΔAR	2. Messung ΔAR	3. Messung ΔAR	Fallzahl (n)
$< 7.5\%$	$< 7.5\%$	$< 7.5\%$	15
$< 7.5\%$	$< 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	7
$< 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	$< 7.5\%$	1
$< 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	3

Tabelle 6

Reproduzierbarkeit der normalen Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei dreimaliger Messung

1. Messung ΔAR	2. Messung ΔAR	3. Messung ΔAR	Fallzahl (n)
$\geq 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	8
$\geq 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	$< 7.5\%$	1
$\geq 7.5\%$	$< 7.5\%$	$\geq 7.5\%$	8
$\geq 7.5\%$	$< 7.5\%$	$< 7.5\%$	0

Die Ergebnisse der verschiedenen Messungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion sind nur schwach miteinander korreliert (Tabelle 7).

Tabelle 7

Korrelation der verschiedenen Ergebnisse der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (r, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

	2. Messung ΔAR	3. Messung ΔAR
1. Messung ΔAR	r = 0.239 n = 274 p < 0.0001	r = 0.617 n = 43 p < 0.0001
2. Messung ΔAR		r = 0.358 n = 43 p = 0.019

3.2.1 Intraindividuelle Schwankungen der Δ AR in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitraum

Es ergeben sich Unterschiede in der Reproduzierbarkeit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion, wenn man den Zeitraum zwischen den Messungen berücksichtigt. Die Tabellen 8 und 9 zeigen, daß die Reproduzierbarkeit von Δ AR-Werten $\geq 7.5\%$ innerhalb eines Zeitraums von 3 Monaten niedriger liegt als in einem Zeitraum von mehr als 3 Monaten. Die Reproduzierbarkeit pathologischer Δ AR-Werte verhielt sich gegensätzlich. Liegen die Untersuchungen innerhalb von 3 Monaten, ist die Reproduzierbarkeit von pathologischen Δ AR-Werten größer, als bei einem Untersuchungsintervall von mehr als 3 Monaten.

Tabelle 8

Reproduzierbarkeit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei einem Untersuchungszeitraum < 3 Monaten

Untersuchungszeitraum < 3 Monate	2. Messung Δ AR $\geq 7.5\%$	2. Messung Δ AR $< 7.5\%$
1. Messung Δ AR $\geq 7.5\%$	14 12.1%	4 3.4%
1. Messung Δ AR $< 7.5\%$	63 54.3%	35 30%

Tabelle 9

Reproduzierbarkeit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei einem Untersuchungszeitraum > 3 Monaten

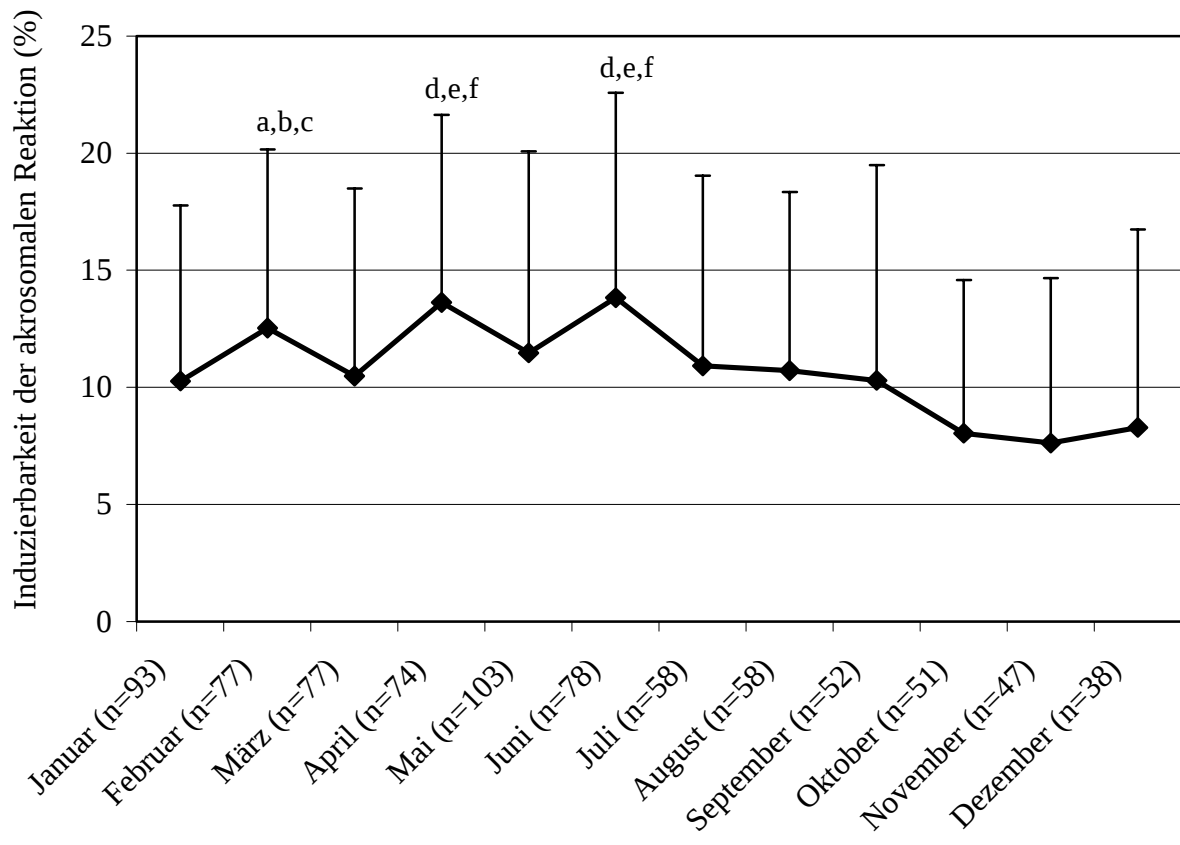
Untersuchungszeitraum > 3 Monate	2. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	2. Messung $\Delta AR < 7.5\%$
1. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$	43 38.1%	11 9.7%
1. Messung $\Delta AR < 7.5\%$	47 41.6%	12 10.6%

3.3 Jahreszeitliche Schwankungen

806 Messungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion wurden in Bezug auf ihre Beeinflussung durch jahreszeitliche Schwankungen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die höchsten Werte der ΔAR im Sommer und die niedrigsten Werte in den Wintermonaten lagen (Abbildung 3 und 4). Es ergab sich im χ^2 -Test ein signifikanter Unterschied in den Ejakulaten mit pathologisch erniedrigter Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in den Monaten April-September und Oktober-März ($p=0.0007$; Odds Ratio: 0.6069).

Abbildung 3

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) in Abhängigkeit von der Jahreszeit



Statistischer Test: Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparisons Test

^ap < 0.05 verglichen mit Oktober

^bp < 0.01 verglichen mit November

^cp < 0.05 verglichen mit Dezember

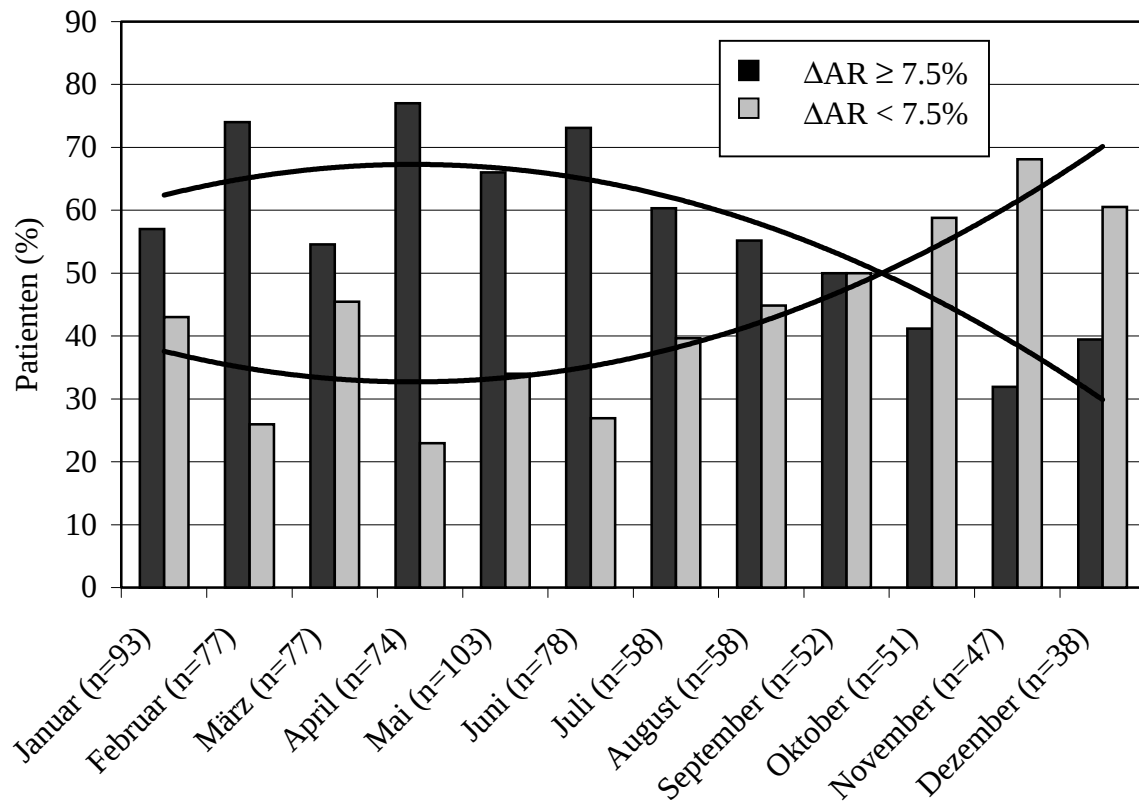
^dp < 0.01 verglichen mit Oktober

^ep < 0.001 verglichen mit November

^fp < 0.01 verglichen mit Dezember

Abbildung 4

Normale ($\geq 7.5\%$) und erniedrigte ($< 7.5\%$) Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Abhängigkeit von der Jahreszeit (polynomische Trendlinie)



3.4 Schwankungen der Ergebnisse in Abhängigkeit vom Untersucher des Ejakulates

489 erstmalige Messungen und 274 Zweitmessungen der Induzierbarkeit der AR wurden von fünf verschiedenen Untersuchern durchgeführt. Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion wurde dazu eingeteilt in normale ($\geq 7.5\%$) und erniedrigte ($< 7.5\%$) Induzierbarkeit. In den Abbildungen 5 und 6 sind diese Werte zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Messung aufgetragen. Wie aus den Abbildungen zu entnehmen entfiel die überwiegende Anzahl der Bestimmungen auf den zweiten Untersucher, sowohl bei der ersten, wie auch bei der zweiten Messung.

Abbildung 5

Messung der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch verschiedene Untersucher zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung (n=489)

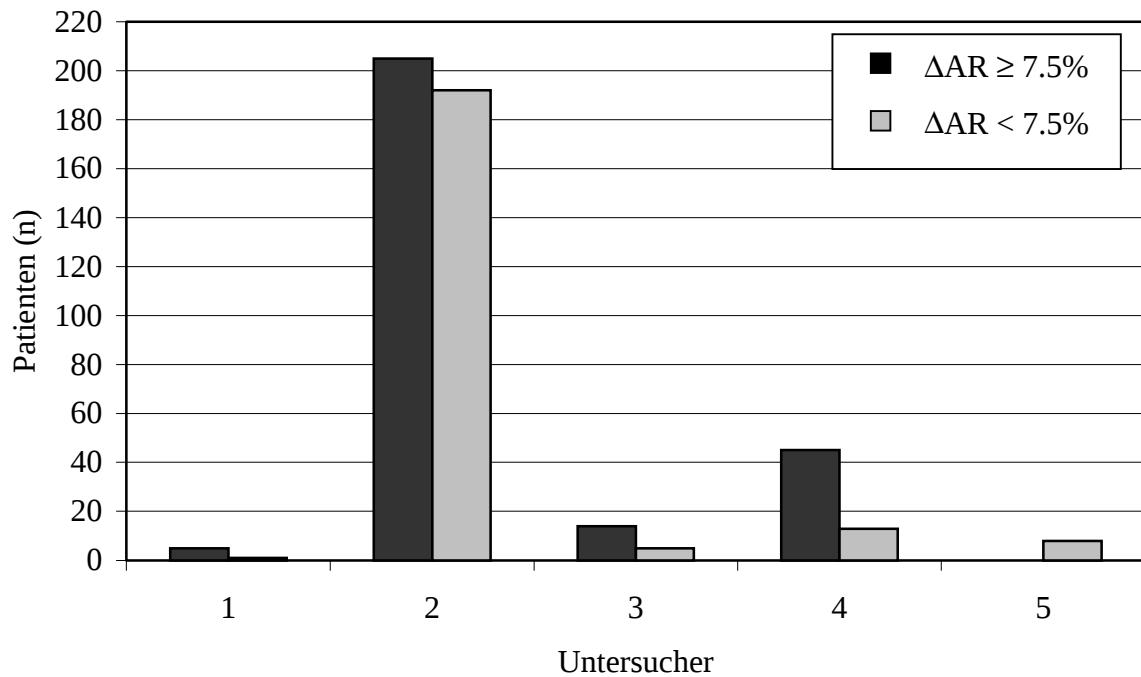
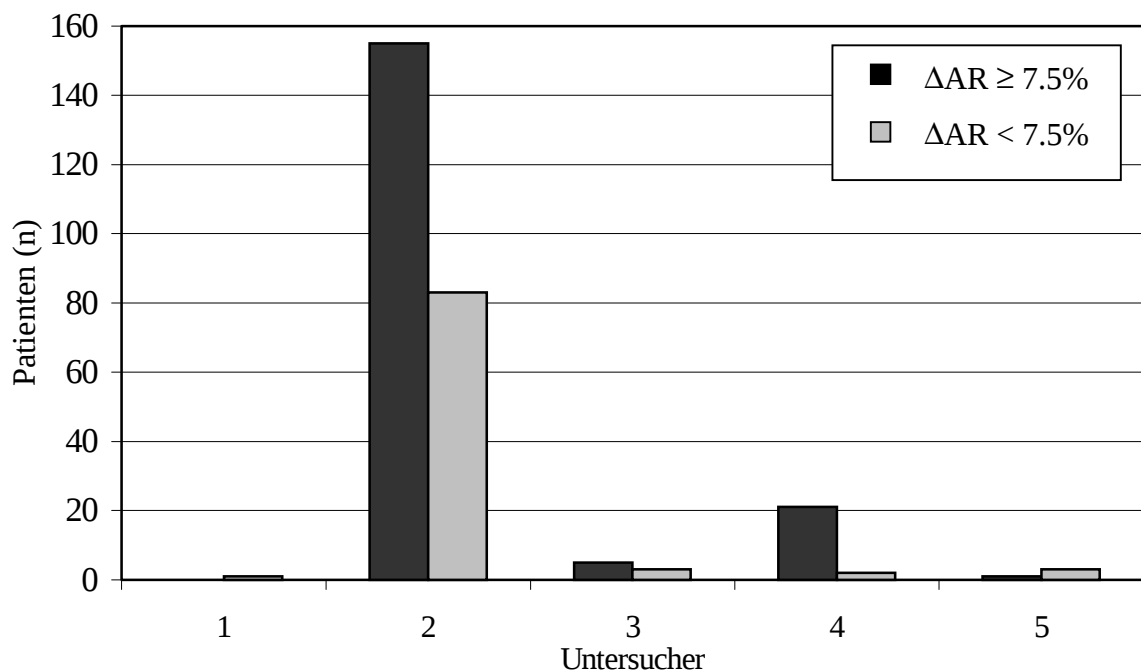


Abbildung 6

Messung der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch verschiedene Untersucher zum Zeitpunkt der zweiten Untersuchung (n=274)



3.5 Einflußfaktoren auf die akrosomale Reaktion

3.5.1 Ejakulatparameter

Bei Patienten der andrologischen Ambulanz sind verschiedene Ejakulatparameter erhoben und dann in Bezug auf ihre Korrelation mit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion hin untersucht worden. Nach den damals geltenden WHO-Richtlinien (1993) waren die Normalwerte der Standardsamenparameter wie folgt definiert:

- Spermatozoenkonzentration (normal: $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$)
- Progressivmotilität (WHOa, normal: $\geq 25\%$)
- Morphologie (normal: $\geq 30\%$ normal geformte Spermatozoen)
 - Akrosomale Störungen (Normalwerte nicht verfügbar)
 - Überstreckungen des Spermatozookopfes (Normalwerte nicht verfügbar)
- Anzahl peroxidase-positiver Zellen (normal: $< 1 \times 10^6/\text{ml}$)

Für weitere in dieser Untersuchung berücksichtigte Parameter sind folgende Grenzwerte verwendet worden:

- Granulozytenelastase (normal: $< 250 \text{ ng/ml}$; (Wolff und Anderson, 1988a))
- α -Glukosidase (normal: $> 20 \text{ mU/Ejakulat}$; (WHO, 1993))
- Qualitative Beurteilung der Chromatinkondensation durch Anilinblaufärbung (normal: 75% der Spermatozoen sind ungefärbt; (Dadoune et al., 1988))

3.5.1.1 Spermatozoenkonzentration

Bei 489 Patienten wurde die Spermatozoenkonzentration untersucht; von diesen hatten 319 eine normale ($\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$) und 170 eine pathologische ($< 20 \times 10^6/\text{ml}$) Konzentration (Tabelle 10).

In den Patientengruppen mit normaler und pathologischer Konzentration zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ($p < 0.05$; t-Test für unverbundene Stichproben (p im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Gruppe)), aber der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigte keine Korrelation zwischen ΔAR und Spermatozoenkonzentration ($r = -0.061$; $n = 489$; $p = 0.18$; Abbildung 7).

Tabelle 10

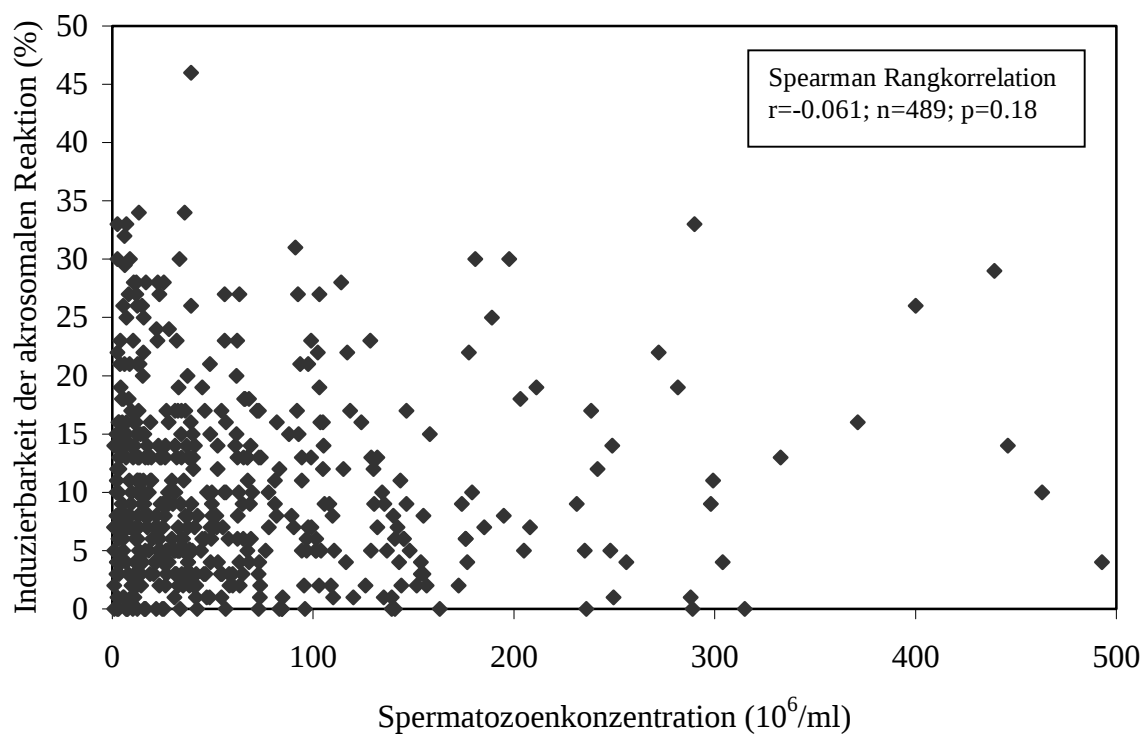
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Bezug zur Spermatozoenkonzentration
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Spermatozoen- konzentration	Fallzahl (n)	Δ AR (%)
$\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$	319	$9.8 \pm 7.8^*$
$< 20 \times 10^6/\text{ml}$	170	$11.3 \pm 8.2^*$

*t-test für unverbundene Stichproben, $p < 0.05$ im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Gruppe

Abbildung 7

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der Spermatozoenkonzentration



3.5.1.2 Progressivmotilität (WHO a)

Von 482 untersuchten Patienten zeigten 217 eine normale und 265 eine eingeschränkte Progressivmotilität (Tabelle 11). Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion unterschied sich nicht signifikant zwischen der Gruppe mit normaler oder eingeschränkter WHOa-Motilität. Es war keine Korrelation zwischen der Δ AR und der Progressivmotilität ersichtlich ($r=-0.006$; $n=482$; $p=0.894$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman; Abbildung 8).

Tabelle 11

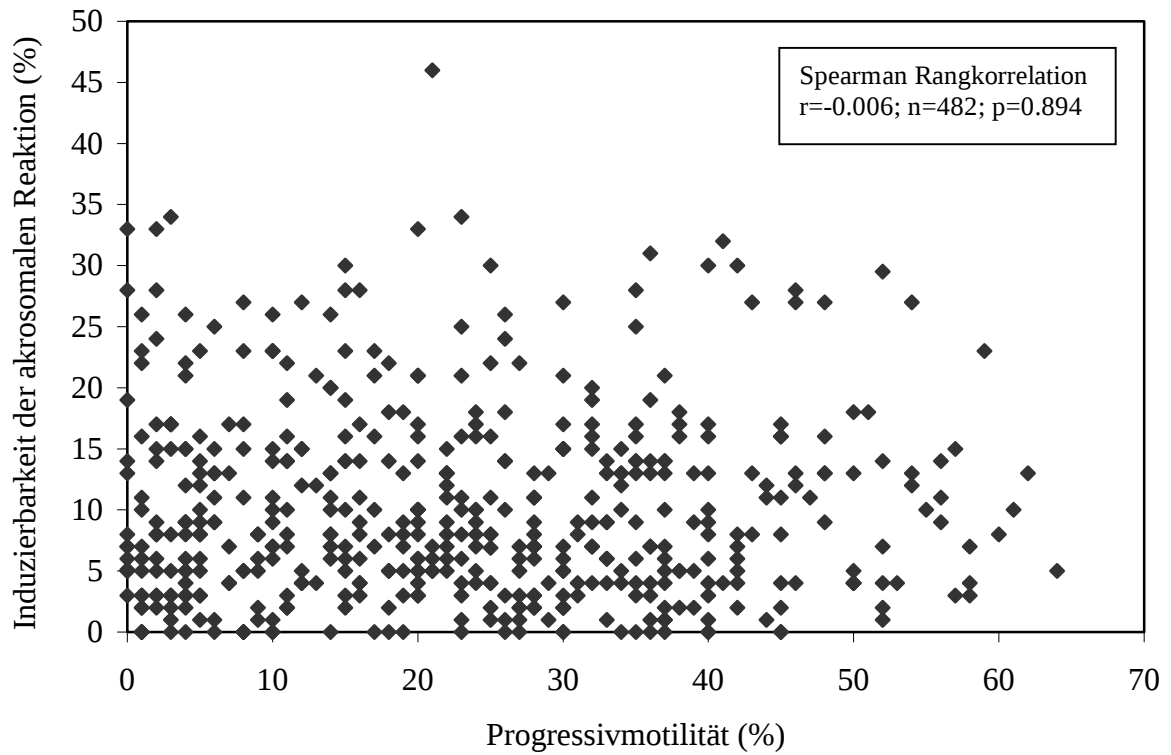
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Bezug zur Progressivmotilität (WHOa) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Progressivmotilität WHO a	Fallzahl (n)	Δ AR (%)
$\geq 25\%$	217	10.3 ± 8.2
$< 25\%$	265	10.3 ± 7.8

t-test für unverbundene Stichproben

Abbildung 8

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der Progressivmotilität (WHOa)



3.5.1.3 Morphologie (Normal, Akrosomale Störungen, Überstreckungen)

In den Gruppen mit normaler Morphologie, akrosomalen Störungen oder Überstreckungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Tabelle 12). Es war keine Korrelation zwischen ΔAR und normaler Morphologie ($r=-0.002$; $n=475$; $p=0.963$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman), akrosomalen Störungen ($r=-0.07$; $n=454$; $p=0.136$) oder Überstreckungen ($r=0.125$; $n=450$; $p=0.791$) ersichtlich (Abbildungen 9-11).

Tabelle 12

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Bezug zur normalen Morphologie, akrosomalen Störungen und Überstreckungen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Normale Morphologie	Fallzahl (n)	ΔAR (%)
$\geq 30\%$	111	11.1 ± 8.7
$< 30\%$	364	10.0 ± 7.7
Akrosomale Störungen		
$\geq 50\%$	70	10.4 ± 7.3
$< 50\%$	384	10.0 ± 8.0
Überstreckungen		
$\geq 50\%$	146	10.4 ± 7.8
$< 50\%$	304	9.8 ± 7.8

t-test für unverbundene Stichproben

Abbildung 9

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der AR und normaler Morphologie

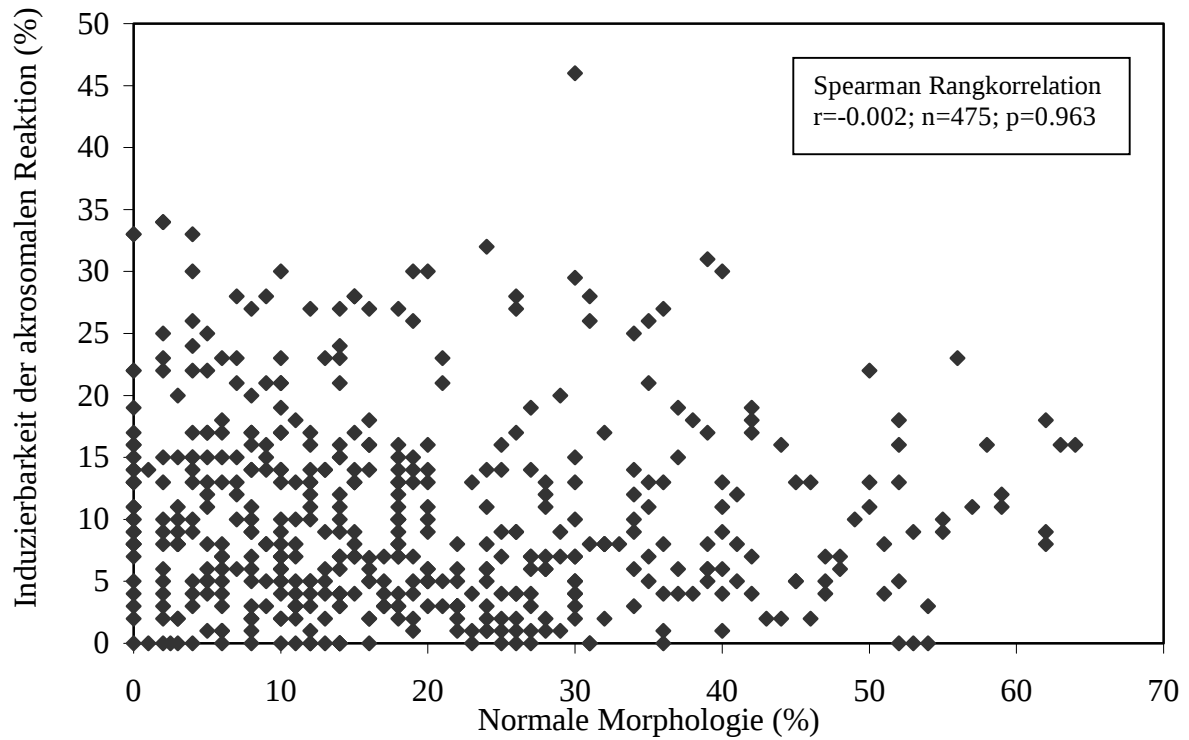


Abbildung 10

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der AR und akrosomalen Störungen

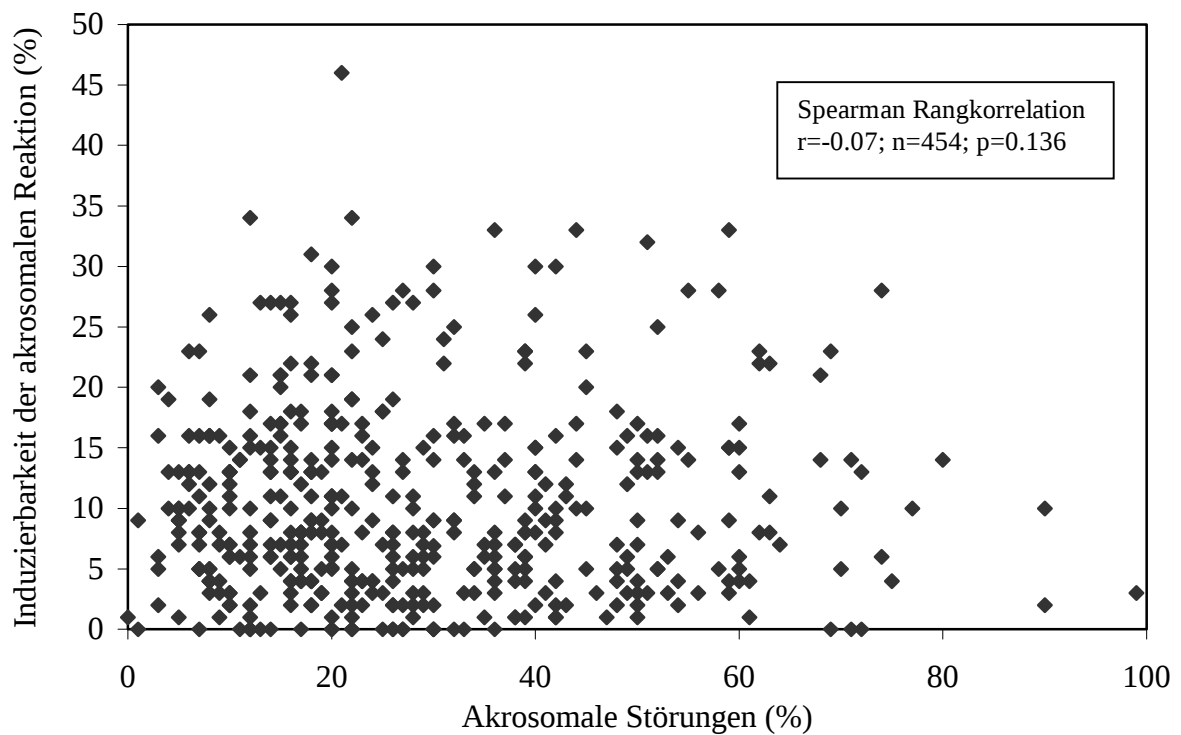
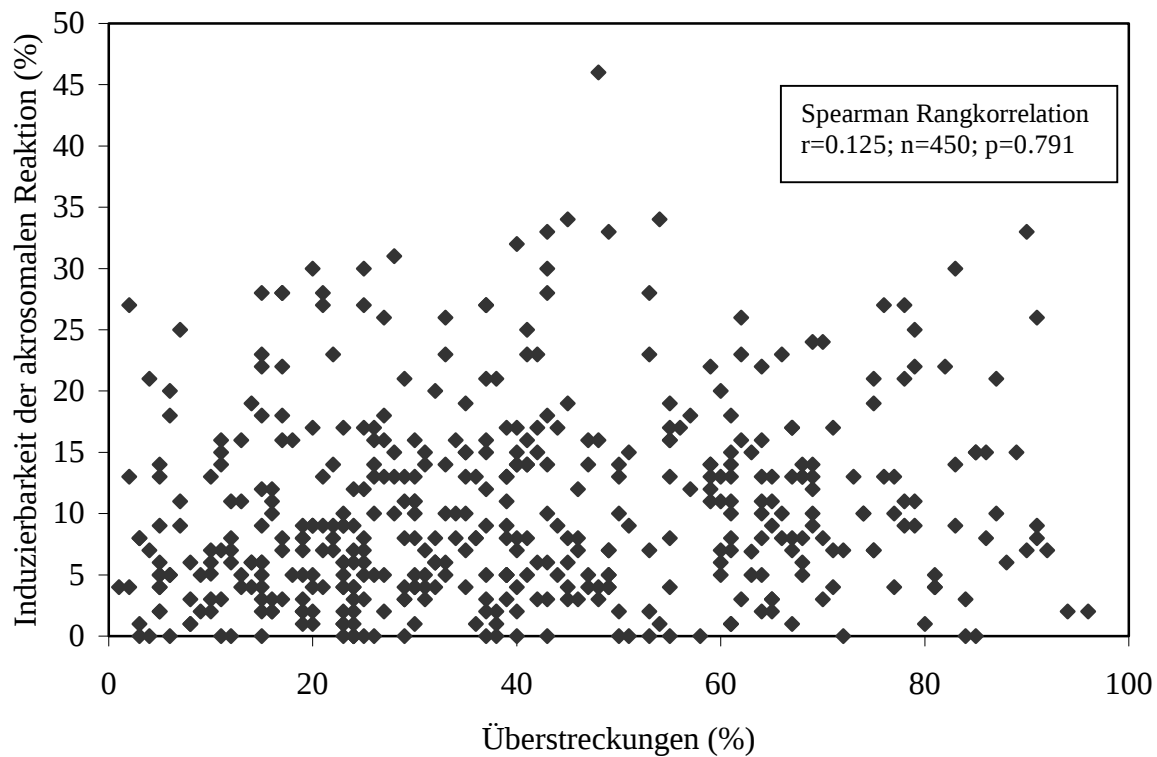


Abbildung 11

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und Überstreckungen



3.5.1.4 Anzahl peroxidase-positiver Zellen

Von 162 Patienten, bei denen die Anzahl peroxidase-positiver Zellen untersucht wurde, zeigten 48 pathologisch erhöhte und 114 normale Werte (Tabelle 13). Die Δ AR-Werte waren in den beiden Gruppen mit erhöhter und normaler Zellzahl nicht signifikant unterschiedlich. Im Spearman Rangkorrelationskoeffizienten war aber eine schwach positive Korrelation zwischen Δ AR-Werten und peroxidase-positiven Zellen erkennbar ($r=0.207$; $n=162$; $p=0.008$; Abbildung 12).

Tabelle 13

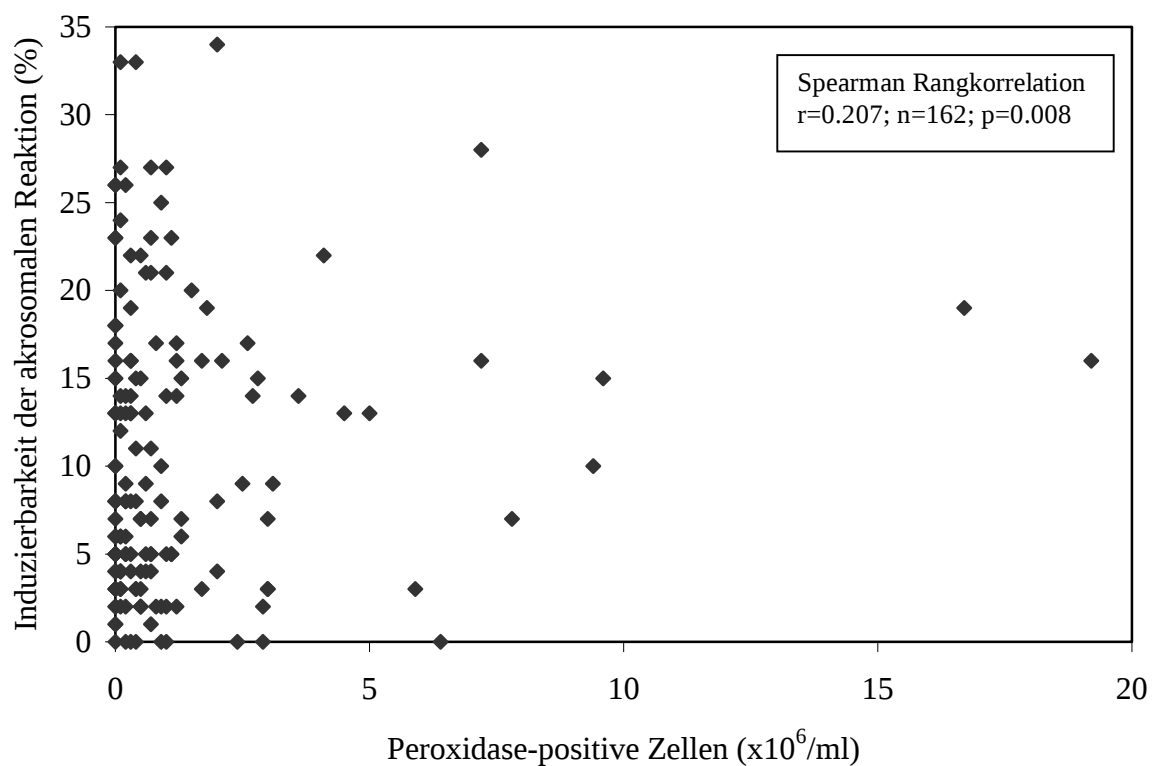
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Bezug auf die peroxidase-positiven Zellen
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Peroxidase-positive Zellen	Fallzahl (n)	Δ AR (%)
$\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$	48	9.5 ± 6.8
$< 1 \times 10^6/\text{ml}$	114	8.2 ± 7.4

t-test für unverbundene Stichproben

Abbildung 12

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und peroxidase-positiven Zellen



3.5.1.5 Granulozytenelastase

Die Messung der Granulozytenelastase wurde bei 270 Patienten durchgeführt. 180 Patienten hatten normale, 90 Patienten erhöhte Granulozytenelastase-Werte (Tabelle 14). Es ergab sich in den beiden Patientengruppen kein signifikanter Unterschied der Δ AR und keine Korrelation zwischen Δ AR und Granulozytenelastase ($r=-0.222$; $n=270$; $p=0.716$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman; Abbildung 13).

Tabelle 14

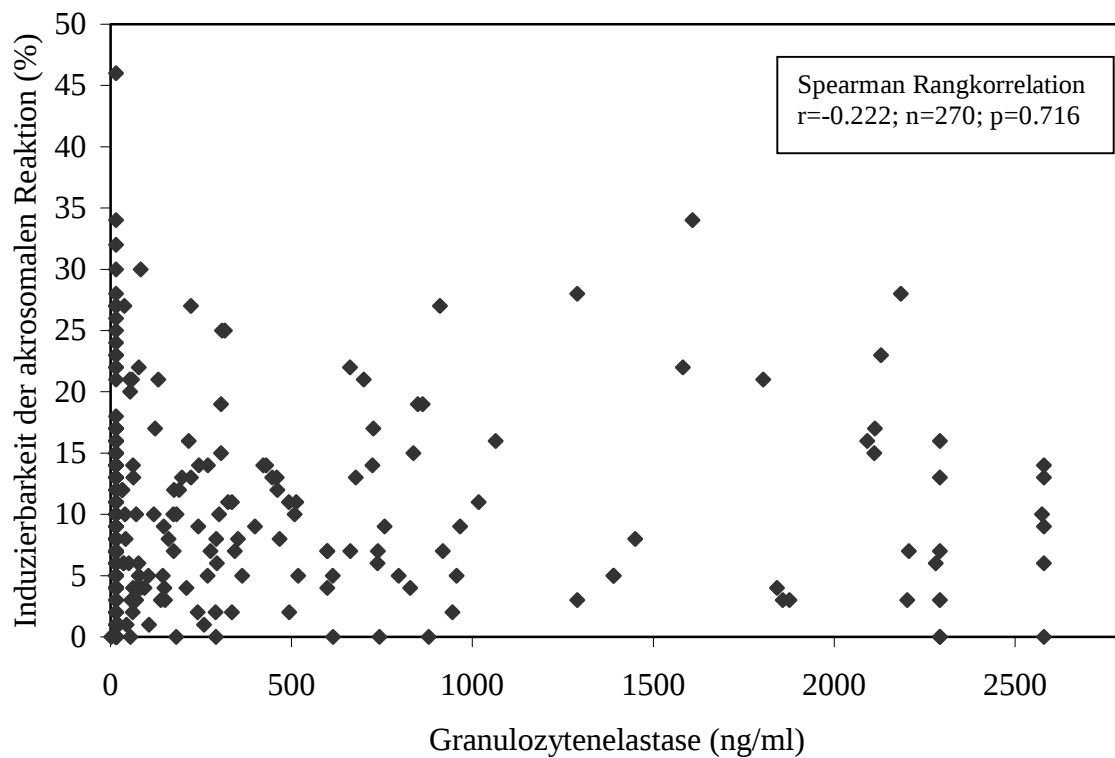
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Bezug zur Granulozytenelastase (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

Granulozytenelastase	Fallzahl (n)	Δ AR (%)
≥ 250 ng/ml	90	9.3 ± 7.3
< 250 ng/ml	180	10.0 ± 8.0

t-test für unverbundene Stichproben

Abbildung 13

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der Granulozytenelastase



3.5.1.6 α -Glukosidase

Die Auswertung der Messungen der α -Glukosidase zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede der Δ AR in der Patientengruppe mit normalen Werten und der Gruppe mit erniedrigten Werten (Tabelle 15) und ergab keine Korrelation zwischen Δ AR und α -Glukosidase ($r=-0.47$; $n=158$; $p=0.553$, Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman; Abbildung 14).

Tabelle 15

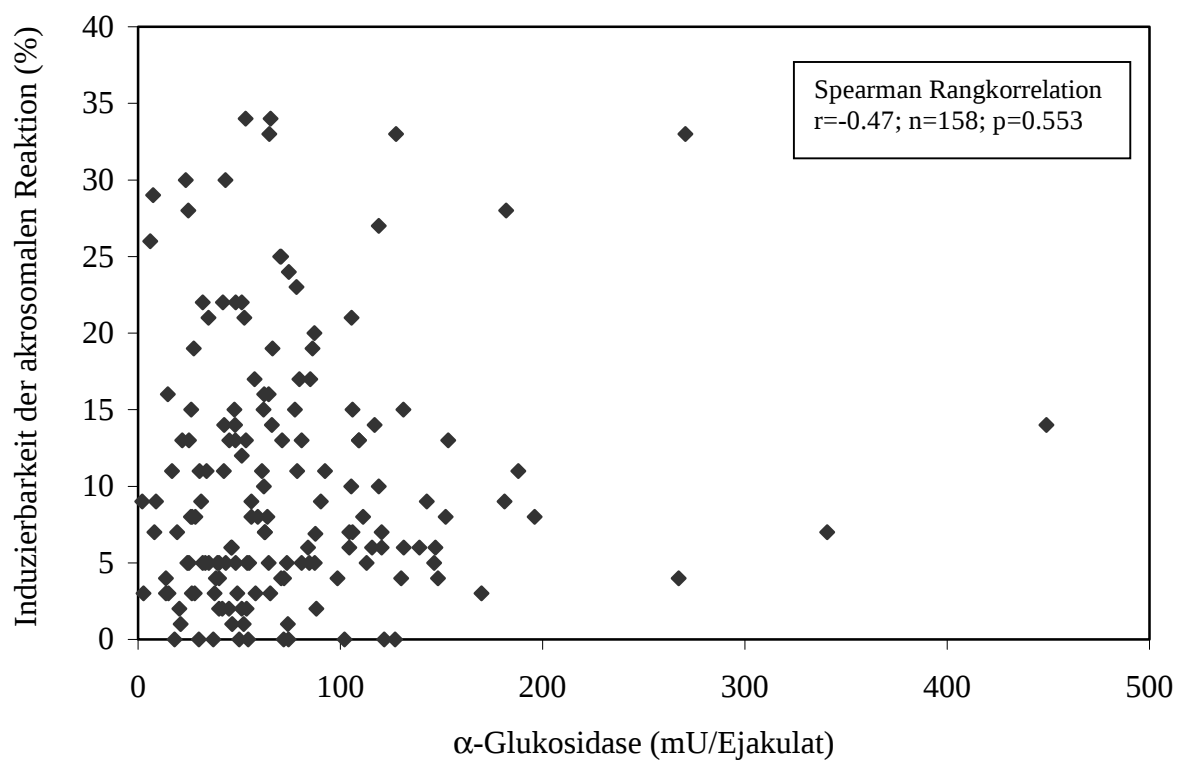
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der α -Glukosidase (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

α -Glukosidase	Fallzahl (n)	Δ AR (%)
≥ 20 mU/Ejakulat	145	9.5 ± 8.1
< 20 mU/Ejakulat	13	13.8 ± 13.2

t-test für unverbundene Stichproben

Abbildung 14

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der α -Glukosidase

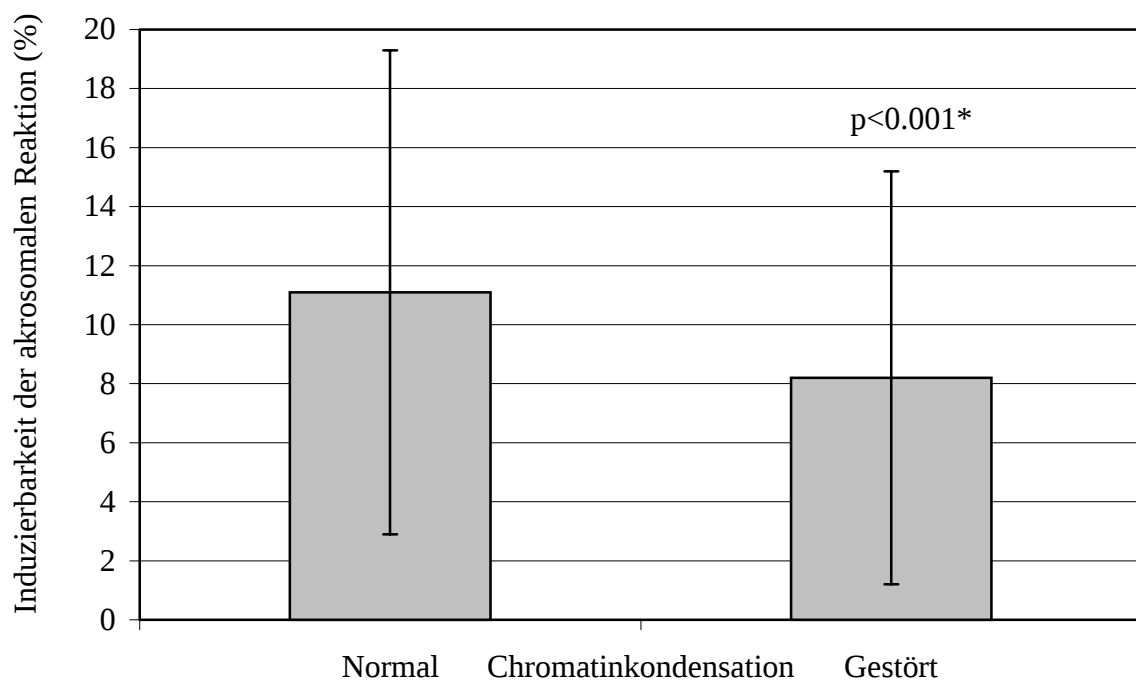


3.5.1.7 Chromatinkondensation

Bei 387 Patienten wurde die Chromatinkondensation untersucht. Sie war bei 258 Patienten normal und bei 129 gestört. In den beiden Gruppen mit normaler und gestörter Chromatinkondensation zeigte sich eine signifikant unterschiedliche ΔAR ($p < 0.001$; t-Test für unverbundene Stichproben (p im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Gruppe)). Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion war bei Patienten mit einer gestörten Chromatinkondensation vermindert (Abbildung 15).

Abbildung 15

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und Chromatinkondensation (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)



*t-Test für unverbundene Stichproben, $p < 0.001$ im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Gruppe

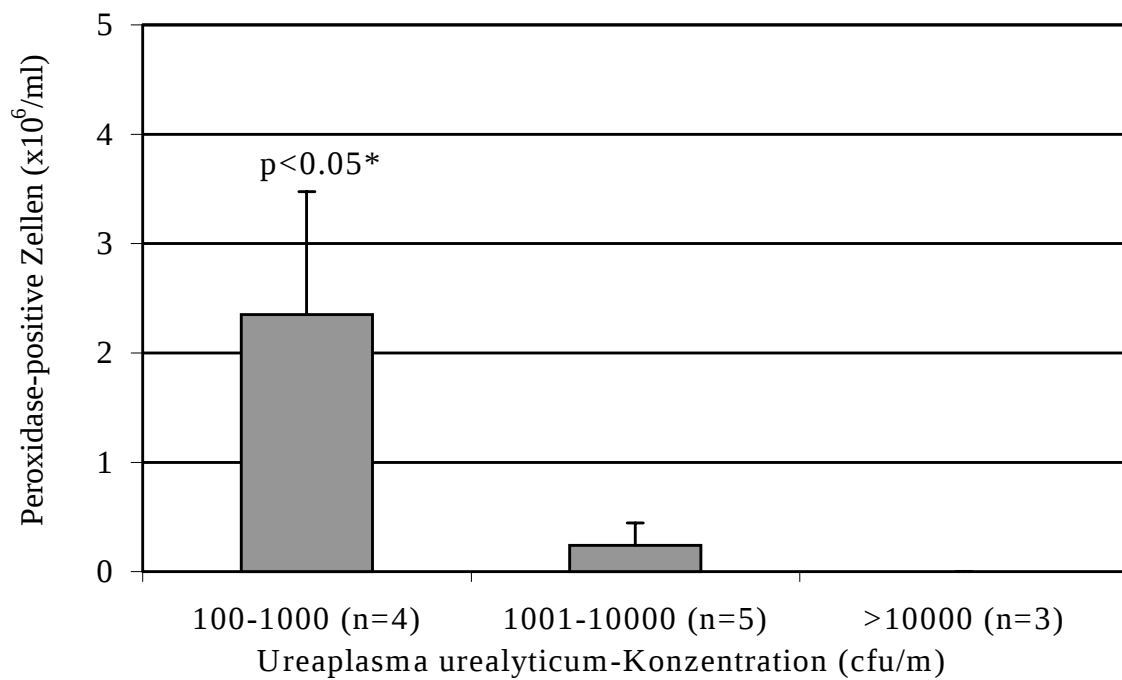
3.5.2 Bakterielle Samenwegsinfektion

3.5.2.1 Einfluß einer Infektion mit *Ureaplasma urealyticum*

Eine bakterielle Kultur des Seminalplasmas wurde bei 489 Patienten durchgeführt, bei denen auch die spontane akrosomale Reaktion und die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion untersucht wurde. Bei 52 Patienten gelang der Nachweis von *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma (100 bis 80000 colony forming units pro ml (cfu/ml)). Die Werte der spontanen akrosomalen Reaktion und der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion sind in der Patientengruppe mit *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma (n=52) und in einer Kontrollgruppe ohne bakterielle Samenwegsinfektion (n=72) verglichen worden (Tabelle 16). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der spontanen akrosomalen Reaktion und der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in beiden Patientengruppen. Männer mit einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion zeigten eher eine Tendenz zu erhöhter Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion korrelierte nicht mit der Zahl der Ureaplasmen im Seminalplasma ($r=-0.081$; n=52; $p=0.57$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman; Abbildung 16). Bei 12 Patienten mit *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma wurde die Anzahl peroxidase-positiver Zellen gemessen. Bei einer niedrigeren Konzentration von *Ureaplasma urealyticum* von 100-1000 cfu/ml zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl peroxidase-positiver Zellen im Vergleich mit Konzentrationen von *Ureaplasma urealyticum* >1000 cfu/ml ($p>0.05$; t-Test für unverbundene Stichproben; Abbildung 17). Bei 28 Patienten mit *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma wurde die Granulozytenelastase gemessen, wobei sich bei den unterschiedlichen Keimzahlen kein Unterschied in der Höhe der Granulozytenelastase zeigte (Abbildung 18). Bei 33 Patienten mit einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion wurden peroxidase-positiv Zellen und/oder die Granulozytenelastase als Entzündungsparameter gemessen. In den beiden Gruppen mit erhöhten und normalen Entzündungsparametern zeigte sich keine signifikant unterschiedliche ΔAR ($p=0.616$; t-Test für unverbundene Stichproben; Abbildung 19).

Abbildung 17

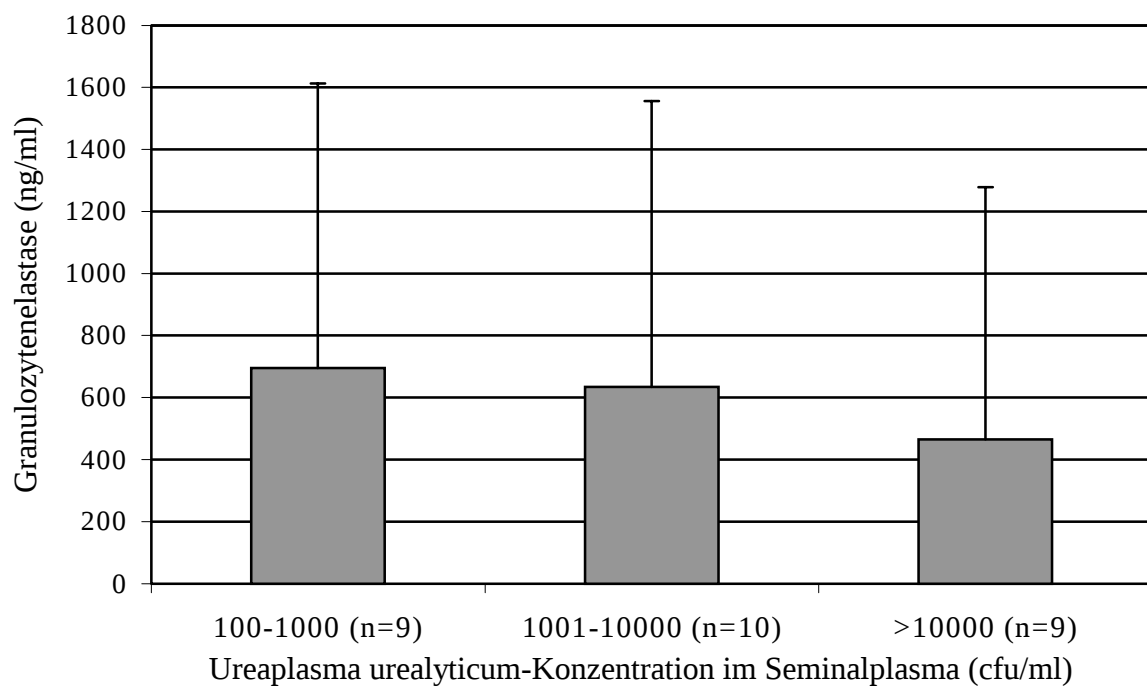
Peroxidase-positive Zellen und Ureaplasma urealyticum-Konzentration im Seminalplasma



*t-Test für unverbundene Stichproben, $p < 0.05$ im Vergleich mit den Gruppen mit höherer Konzentration

Abbildung 18

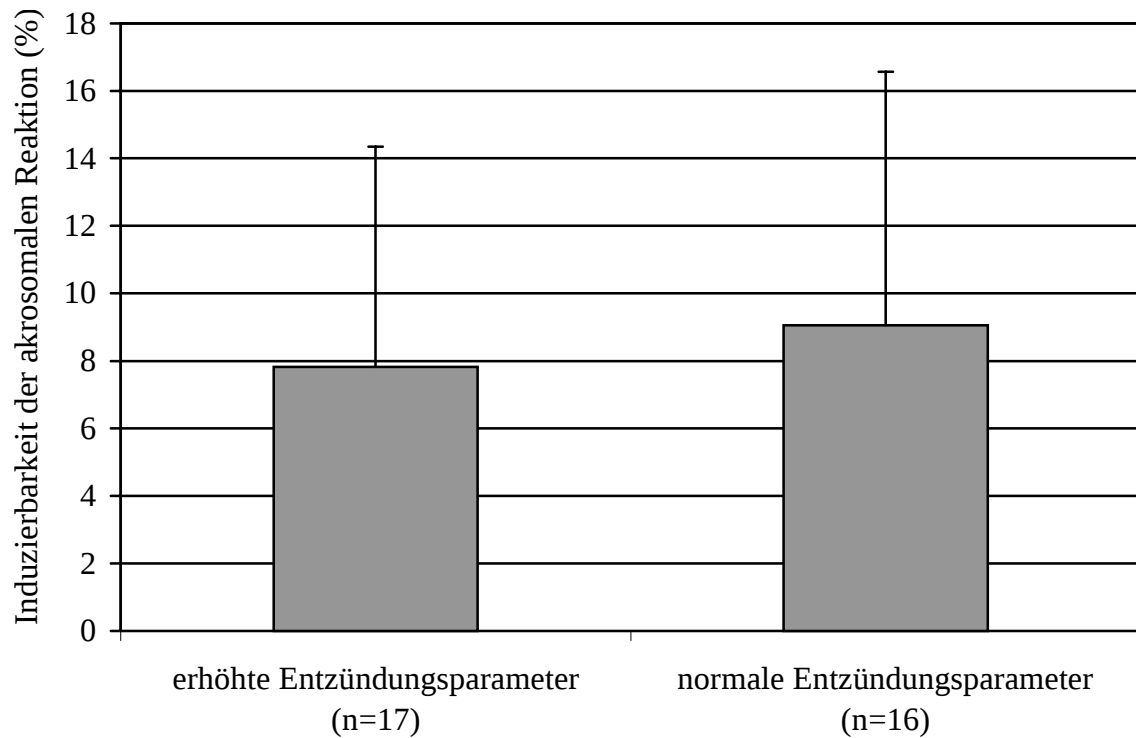
Granulozytenelastase und Ureaplasma urealyticum-Konzentration im Seminalplasma



t-Test für unverbundene Stichproben

Abbildung 19

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei Patienten mit Ureaplasma urealyticum-Konzentration im Seminalplasma und erhöhten und normalen Entzündungsparametern (peroxidase-positive Zellen und/oder Granulozytenelastase)



t-Test für unverbundene Stichproben

3.5.2.2 Einfluß einer E.coli-Infektion

Bei 31 von 489 Patienten wurde E.coli im Seminalplasma nachgewiesen (500 bis 100000 colony forming units pro ml (cfu/ml)). In Tabelle 17 sind die Daten der spontanen akrosomalen Reaktion und der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion von Patienten mit E.coli im Seminalplasma den entsprechenden Werten von Patienten ohne bakterielle Samenwegsinfektion gegenübergestellt worden. Bei Patienten mit E.coli im Seminalplasma lagen die Werte für die spontane akrosomale Reaktion signifikant höher als in der Gruppe ohne Infektion. In der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion unterschieden sich die Gruppen allerdings nicht signifikant. Die Anzahl von E.coli im Seminalplasma korrelierte nicht mit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ($r = -0.081$; $n = 31$; $p = 0.664$; Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman; Abbildung 20).

Bei 12 Patienten mit E.coli im Seminalplasma wurde die Anzahl peroxidase-positiver Zellen gemessen (Abbildung 21). In den Gruppen mit unterschiedlicher Konzentration zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei 23 Patienten mit E.coli im Seminalplasma wurde die Granulozytenelastase gemessen, wobei die Patienten mit einer E.coli-Konzentration im Seminalplasma >10000 cfu/ml eine signifikant höhere Granulozytenelastase zeigten im Vergleich mit den Gruppen mit niedrigeren Konzentrationen ($p < 0.05$; t-Test für unverbundene Stichproben; Abbildung 22). Bei 26 Patienten mit einer E.coli-Infektion wurden peroxidase-positiv Zellen und/oder die Granulozytenelastase als Entzündungsparameter gemessen. Patienten mit einer E.coli-Infektion und erhöhten Entzündungsparametern zeigten keine signifikant höhere Δ AR und spontane akrosomale Reaktion als die Patienten mit normalen Entzündungsparametern ($p = 0.3309$, bzw. $p = 0.165$; t-Test für unverbundene Stichproben; Abbildung 23 und 24).

Tabelle 17

Spontane akrosomale Reaktion und Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei Patienten mit E.coli im Seminalplasma und ohne bakterielle Infektion (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Median, Spannweite)

Gruppe	Spontane AR	Δ AR (%)	Δ AR $\geq 7.5\%$	Δ AR $< 7.5\%$
E.coli (n=31)	20.2 $\pm$ 16.6* (15; 1-72)	8.9 $\pm$ 8.5 (7; 0-30)	48.4%	51.6%
Ohne bakterielle Infektion (n=72)	12.8 $\pm$ 13.6 (8; 0-70)	8.7 $\pm$ 8.0 (6; 0-34)	33.3%	66.7%

*Mann-Whitney Test, $p < 0.01$ im Vergleich mit dem Wert der korrespondierenden Gruppe ohne bakterielle Samenwegsinfektion

Abbildung 20

Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und E.coli-Konzentration im Ejakulat

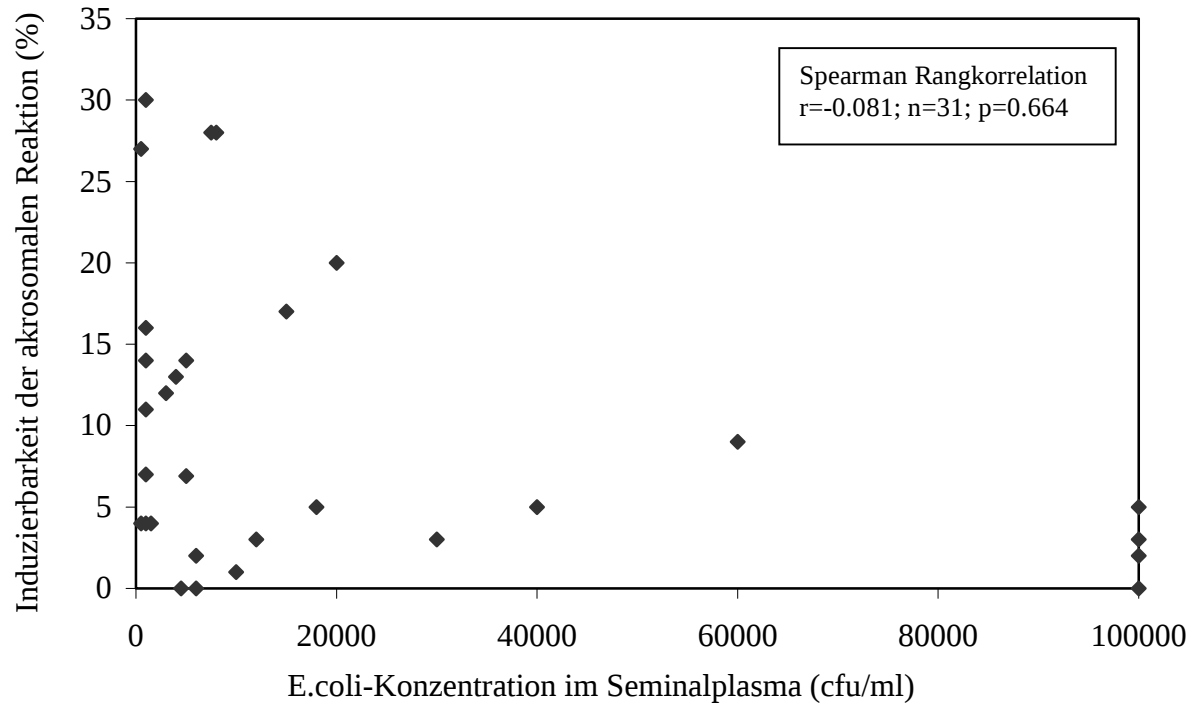
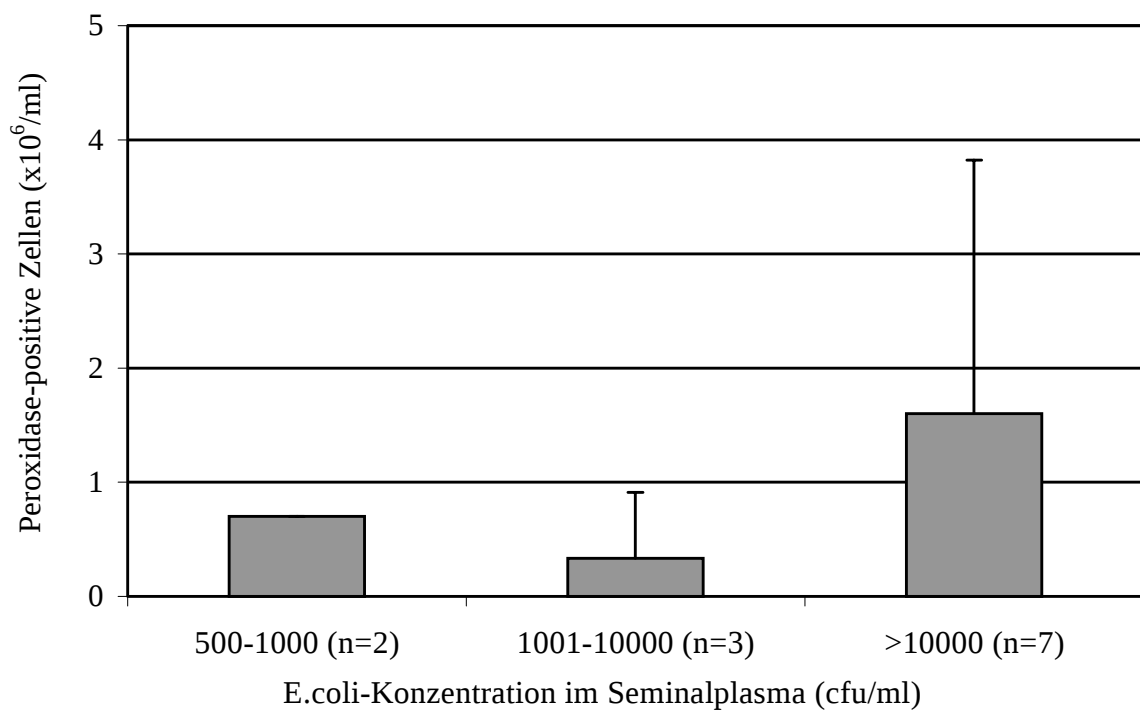


Abbildung 21

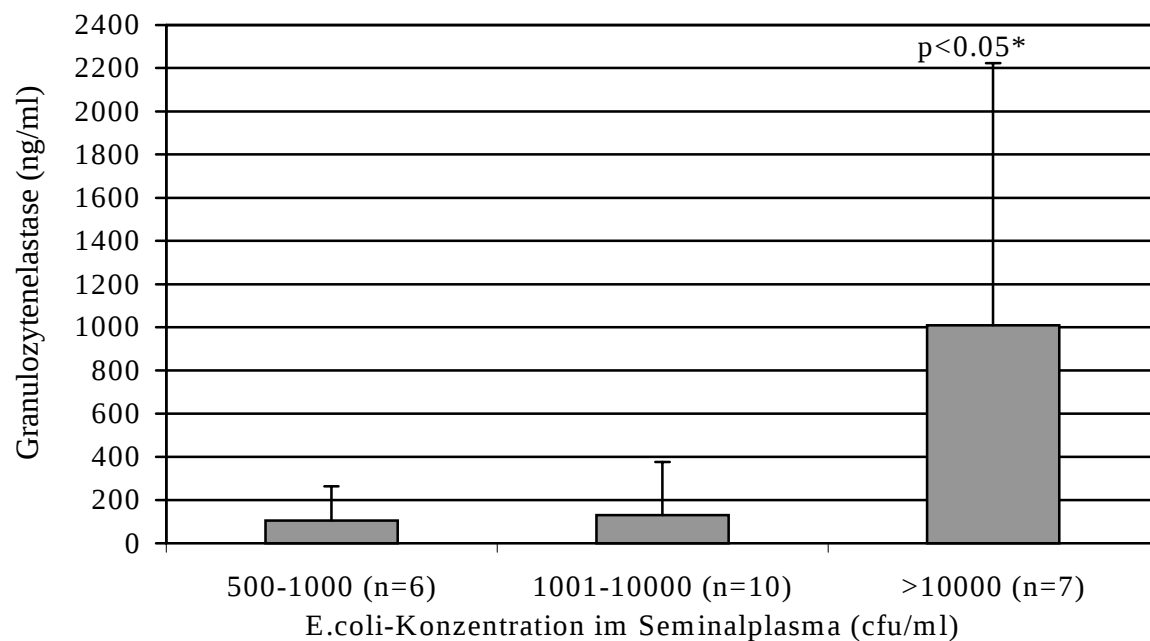
Peroxidase-positive Zellen und E.coli-Konzentration im Seminalplasma



t-Test für unverbundene Stichproben

Abbildung 22

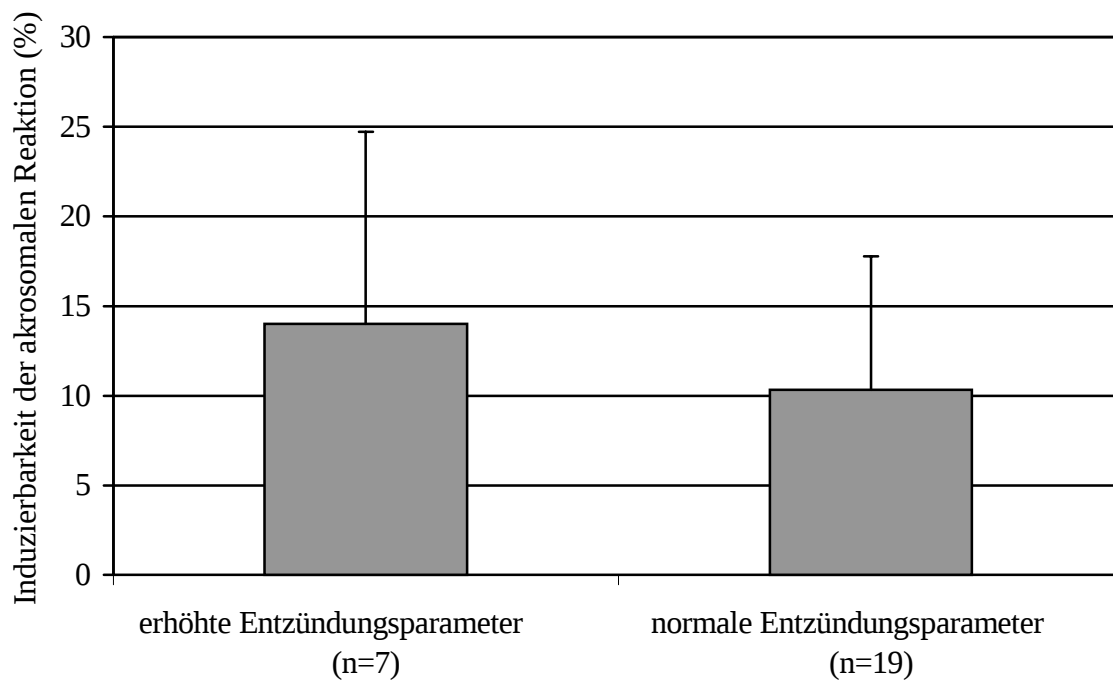
Granulozytenelastase und E.coli-Konzentration im Seminalplasma



*t-Test für unverbundene Stichproben, $p < 0.05$ im Vergleich mit den Gruppen mit niedrigerer Konzentration

Abbildung 23

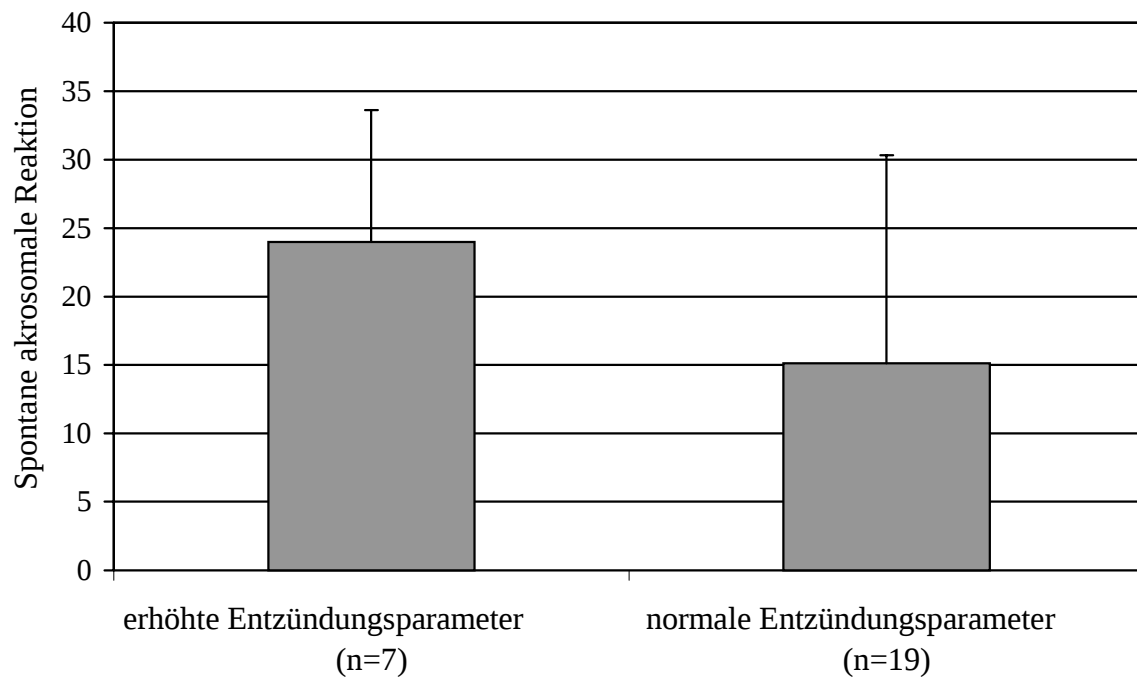
Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei Patienten mit E.coli-Konzentration im Seminalplasma mit erhöhten und normalen Entzündungsparametern (peroxidase-positive Zellen und/oder Granulozytenelastase)



t-Test für unverbundene Stichproben

Abbildung 24

Spontane akrosomale Reaktion bei Patienten mit E.coli-Konzentration im Seminalplasma mit erhöhten und normalen Entzündungsparametern (peroxidase-positive Zellen und/oder Granulozytenelastase)



t-Test für unverbundene Stichproben

3.5.2.3 Einfluß einer antibakteriellen Therapie bei einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion

Der Einfluß einer antibakteriellen Therapie wurde nur bei Patienten mit einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion untersucht, da die Fallzahl der Patienten mit einer *E.coli*-Infektion und Bestimmung der akrosomalen Reaktion vor und nach Therapie zu gering war. Bei 27 der 52 Patienten mit *Ureaplasma urealyticum* im Seminalplasma wurde eine antibiotische Therapie durchgeführt und die Werte der spontanen und induzierten akrosomalen Reaktion vor und nach der antibiotischen Behandlung bestimmt. Von den 27 Patienten mit einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion zeigten 7 Patienten eine $\Delta AR \geq 7.5\%$ und 20 Patienten eine $\Delta AR < 7.5\%$ (Tabelle 18). Bei 3 der 7 Patienten, bei denen die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion vor der Antibiose bei $\geq 7.5\%$ lag, war sie nach antibiotischer Therapie erniedrigt. Von den 20 Patienten, bei denen die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion vor der antibiotischen Therapie erniedrigt war, zeigten 13 Patienten nach der Antibiose eine normale Induzierbarkeit und 7 Patienten weiterhin eine erniedrigte Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Bei 2 der 7 Patienten, die weiterhin eine erniedrigte ΔAR zeigten und nur bei einem der 13 Patienten, die nach der Antibiose normale Werte der ΔAR zeigten, ließ sich auch nach der antibiotischen Therapie noch *Ureaplasma urealyticum* nachweisen. Es zeigten sich also bei insgesamt 17 von 20 Patienten, die vor der antibiotischen Therapie eine erniedrigte ΔAR hatten, nach der Antibiose keine Ureaplasmen mehr im Seminalplasma. In den Seminalplasmen dieser 17 Patienten betrug die Konzentration von *Ureaplasma urealyticum* vor der antibiotischen Therapie 500 bis 25000 (Median: 4000) colony forming units pro ml (cfu/ml). Nach der antibiotischen Behandlung lagen die Werte für die induzierte AR und die ΔAR statistisch signifikant höher als vor der Antibiose (Tabelle 19).

Tabelle 18

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei Patienten mit *Ureaplasma urealyticum* im Ejakulat vor und nach antibiotischer Therapie

	2. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$ Nach Antibiose	2. Messung $\Delta AR < 7.5\%$ Nach Antibiose
1. Messung $\Delta AR \geq 7.5\%$ Vor Antibiose	4 (14.8%)	3 (11.1%)
1. Messung $\Delta AR < 7.5\%$ Vor Antibiose	13 (48.1.0%)	7 (25.9%)

Tabelle 19

Einfluß einer antibiotischen Therapie auf die spontane AR, die induzierte AR und die ΔAR bei Patienten mit *Ureaplasma urealyticum* im Ejakulat und erniedrigter ΔAR (n=17)

	Spontane AR (%)	Induzierte AR (%)	ΔAR (%)
Vor Antibiose	9.1 $\pm$ 5.7 (10; 1-16)	12.8 $\pm$ 5.7 (15, 4-21)	3.8 $\pm$ 2.1 (4; 0-7)
Nach Antibiose	17.9 $\pm$ 15.3 (10; 4-51)	30.1 $\pm$ 16.5* (23; 8-63)	12.1 $\pm$ 7.7** (12; 1-27)

t-Test für verbundene Stichproben nach logarithmischer Umwandlung der Prozentwerte
 *p<0.01; p**<0.05 im Vergleich zur korrespondierenden Gruppe vor antibiotischer Therapie

4 DISKUSSION

4.1 Prävalenz und Reproduzierbarkeit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion

Die Prävalenz einer erniedrigten Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ($< 7.5\%$) betrug bei Patienten der andrologischen Sprechstunde des Zentrums für Dermatologie und Andrologie 31%. Die Ejakulate stammten von Männern, die in einer Ehe oder Partnerschaft mit mindestens zweijährigem Kinderwunsch lebten. Männer mit einer gestörten Fertilität waren in dieser Untersuchung sicher stärker repräsentiert. Tesarik berichtete in der ESHRE Andrology Special Interest Group (1996), daß nach seiner Kenntnis ungefähr 5% der infertilen Patienten eine gestörte akrosomale Reaktion haben. Er spekulierte, daß die akrosomale Reaktion sich bei der einen Hälfte der Patienten nicht durch Ionophor induzieren läßt und die andere Hälfte zu hohe Raten an spontan akrosomal reagierten Spermatozoen zeigt. Studien von Calvo et al. (1989) zeigten bei 6 von 15 infertilen Männern eine pathologische akrosomale Reaktion, während alle untersuchten 12 fertilen Patienten eine normale akrosomale Reaktion aufwiesen. Auch in späteren Studien von Calvo et al. (1994) wurde die Prävalenz einer reduzierten akrosomalen Reaktion durch Follikularflüssigkeit an Ejakulaten von 58 fertilen Patienten und 232 infertilen Patienten untersucht. Nur 2% der fertilen Männer zeigten eine erniedrigte akrosomale Reaktion ($< 5\%$), während sie sich bei 60% der infertilen Spender nachweisen ließ.

Man kann somit davon ausgehen, daß die Prävalenz einer erniedrigten akrosomalen Reaktion höher als die von Tesarik geschätzten 5% ist.

Die unterschiedliche Prävalenz einer erniedrigten akrosomalen Reaktion kann bei den einzelnen Arbeitsgruppen an der Benutzung verschiedener Stimulanzen liegen. In den eigenen Untersuchungen wurde die Kälteinduktion angewendet, Calvo et al. (1994) verwendeten Follikularflüssigkeit und Cummins et al. (1991) Ionophor.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit die intraindividuellen Schwankungen der akrosomalen Reaktion durch Kälteinduktion geprüft. In der Literatur sind bisher vorwiegend Aussagen über die intraindividuellen Schwankungen der Standardsamenparameter beschrieben worden.

So untersuchten Knuth et al. (1988) die intraindividuellen Schwankungen von Spermatozoenkonzentration, Gesamtspermatozoenzahl, Motilität und Morphologie und zeigten bei der Anzahl und Konzentration der Spermatozoen die höchsten intraindividuellen Fluktuationen. Ebenso wies die Analyse von Ejakulaten von sicher fertilen Männern große intraindividuelle Schwankungen auf, besonders bei der Anzahl und Konzentration der Spermatozoen und der Motilität (Cooper et al., 1991). In den eigenen Untersuchungen wurden nur die intraindividuellen Schwankungen der akrosomalen Reaktion genauer untersucht. Bei zweimaligem Messen fand sich eine Reproduzierbarkeit einer pathologischen Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ($\Delta AR < 7.5$) in 29.7% und eine Reproduzierbarkeit der normalen $\Delta AR (\geq 7.5\%)$ in 77.8%. Die Reproduzierbarkeit des Parameters „Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion“ hing davon ab, ob die ΔAR normal oder reduziert war. Eine pathologische Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ließ sich nicht so gut reproduzieren wie eine normale ΔAR . Die deutlichen intraindividuellen Schwankungen machen bei jedem Patienten mindestens zwei Untersuchungen der akrosomalen Reaktion notwendig. Auch Troup et al. (1994) zeigten intra- und interassay-Variationskoeffizienten von 10.8% und 18.8% bei der Messung der akrosomalen Reaktion durch ARIC (acrosome reaction to ionophore challenge). Die wöchentliche Untersuchung der Ejakulate von drei Patienten für zehn Wochen ließ Schwankungen in der akrosomalen Reaktion zwischen 16.5-60.0%, 0.5-28.5% und 8.5-47.0% erkennen. Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion schien nicht von der Dauer der sexuellen Abstinenz abzuhängen.

Als mögliche Ursache für die schlechtere Reproduzierbarkeit der pathologischen ΔAR , bzw. für die Tendenz zur Verbesserung der akrosomalen Reaktion bei einem Patienten müssen verschiedene Faktoren diskutiert werden. Zum einen könnten akute oder chronische Krankheiten die akrosomale Reaktion beeinflussen; das eigene Patientengut bot hier aber zu geringe Fallzahlen, um eventuell vorhandene Zusammenhänge darzulegen.

Auch eine medikamentöse Therapie könnte Einfluß haben. Hier fand sich kein Zusammenhang, aber die Fallzahlen waren ebenfalls sehr gering. Die Beziehung zwischen antibiotischer Therapie und akrosomaler Reaktion wird unter 4.4 diskutiert. Weiterhin könnten die Ejakulatparameter, eine Samenwegsinfektion oder auch jahreszeitliche Schwankungen die Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion beeinflussen; diese Punkte werden unter 4.2, 4.3 und 4.4 diskutiert. Die Schwankungen der Δ AR durch methodische Fehler, wie z.B. wechselnde Auswertkriterien durch unterschiedliche Untersucher sind unwahrscheinlich, da die zweimalige Bestimmung der Δ AR in 87% vom gleichen Untersucher durchgeführt wurde.

Wie in Tabelle 8 und 9 gezeigt, sollte geprüft werden, ob eine erniedrigte Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion auf Störungen der Spermatogenese oder der Spermatozoenreifung zurückzuführen sei, indem der Abstand der Untersuchungen mitberücksichtigt wurde. Wesentliche, klinisch relevante Unterschiede fanden sich hierbei allerdings nicht.

4.2 Jahreszeitliche Schwankungen der akrosomalen Reaktion

Die meisten Säugetiere tragen und gebären nur während bestimmter Jahreszeiten. Nur wenige Säugetierarten können sich während des ganzen Jahres paaren. Dazu gehören unter anderem einige Primaten und der Mensch (Campbell und Turek, 1981; Dunbar, 1990). Saisonale Schwankungen der Fertilitätsraten, wie sie aus dem übrigen Tierreich bekannt sind, finden sich auch beim Menschen. In warmen Klimaten wird eine maximale Konzeptionsrate in den Wintermonaten beobachtet, wogegen in den nördlichen Regionen die Konzeptionsraten in den Sommermonaten am höchsten sind (Übersicht bei Rojanski et al., 1992). Während bei verschiedenen Säugetieren ein saisonaler Effekt durch die Photoperiode auf die Hormonproduktion und somit die Ovulation gezeigt wurde, ist die Erklärung beim Menschen weniger klar. In den heißen Erdregionen sind die Geburtsraten im Frühjahr erniedrigt. Diskutiert wird eine temperaturbedingte Abnahme der Samenqualität in den heißen Sommermonaten. Lichtschwankungen, welche die Hypophysenvorderlappen-Ovar Achse beeinflussen, sind in den südlichen Breitengraden

weniger ausgeprägt. In den nördlichen Breitengraden sind solche Schwankungen der Sonneneinstrahlungen deutlicher ausgeprägt; die Konzeptionsraten scheinen in den meisten Ländern im Sommer erhöht zu sein. In Deutschland zeigten die Maxima der Geburtsraten jedoch einen säkulären Trend vom Frühjahr in der ersten Hälfte des Jahrhunderts zum Spätsommer mit Maximum Juli bis September in der zweiten Hälfte des Jahrhunderts, d.h. zu maximalen Konzeptionsraten in den Wintermonaten (Lerchl et al., 1993).

Ein Zusammenhang zwischen der Jahreszeit und der Samenqualität ist schon mehrfach beschrieben worden (Mortimer et al., 1983; Saint-Pol et al., 1989). So fanden Tjoa et al. (1982) nach Untersuchung von 4435 Ejakulatproben hohe Spermatozoenkonzentrationen im Winter und niedrigere im Sommer. Auch Levine et al. (1990) fanden ähnliche Ergebnisse. Die Spermatozoenkonzentration und Motilität waren in den Sommermonaten signifikant erniedrigt. Menge und Beitner (1989), sowie Ombelet et al. (1996) dagegen konnten diese jahreszeitlichen Schwankungen an Spermatozoen von 95 Patienten nicht nachweisen.

Eine Beziehung zwischen der akrosomalen Reaktion und der Jahreszeit ist bisher nicht geprüft worden. Die vorliegenden Untersuchungen demonstrieren die niedrigsten Werte für die Δ AR im Oktober bis Dezember und die höchsten Werte von Februar bis Juni. In den Monaten von September bis Dezember hatten sogar 50% oder weniger eine normale Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Da die Untersuchungen von Lerchl et al. (1993) jedoch zeigen, daß in Deutschland die höchsten Geburtenraten in den Monaten Juli bis September vorkommen und somit die höchsten Konzeptionsraten in den Wintermonaten liegen, bedeutet dies, daß die hier gezeigten jahreszeitlichen Schwankungen der induzierbaren akrosomalen Reaktion offenbar keine biologische Relevanz haben.

Zusammenfassend bleiben die Gründe für die Verschiebung der maximalen Konzeptionsraten von den Sommer- zu den Wintermonaten weitgehend unklar. Insgesamt dürfte der moderne Mensch sowohl am Arbeitsplatz, als auch zu Hause, durch

zunehmende Klimatisation und künstliche Beleuchtung, Faktoren wie Temperatur und Lichtintensität weniger unterworfen sein als früher. Womöglich sind deshalb die saisonalen Schwankungen der Konzeptionsraten zunehmend durch psychosoziale Faktoren, wie zum Beispiel Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs erklärt (Ehrenkranz, 1983; Abas und Murphy, 1987; Jacobsen et al., 1987).

4.3 Einfluß der Ejakulatparameter auf die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion

4.3.1 Spermatozoenkonzentration

Anhand der eigenen Daten zeigte sich zwar eine statistisch signifikant unterschiedliche ΔAR nach Kälteexposition in den Patientengruppen mit normaler und pathologischer Spermatozoenkonzentration. Eine signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern besteht aber nicht.

Bei infertilen Patienten mit Polyzoospermie ($> 250 \times 10^6/\text{ml}$) scheint die Akrosinaktivität erniedrigt zu sein. Außerdem wurden bei dieser Gruppe Störungen der akrosomalen Reaktion beschrieben (Töpfer-Petersen et al., 1987; Schill et al., 1988).

Die Beobachtung, daß Patienten mit Polyzoospermie eine gestörte akrosomale Reaktion aufweisen, könnte möglicherweise durch in vitro Beobachtungen von Calvo et al. (1989) erklärt werden. Diese Gruppe zeigte, daß die durch Follikularfüssigkeit induzierte akrosomale Reaktion mit zunehmender Konzentration der in vitro verwendeten Spermatozoen abnimmt.

Hingegen fanden Calvo et al. (1994) in einer Studie bei 58 fertilen und 232 infertilen Patienten eine signifikante Korrelation zwischen der akrosomalen Reaktion und der Spermatozoenkonzentration (Spearman Rangkorrelationskoeffizient, $r=0.524$, $p<0.001$). Auch Fuse et al. (1993) zeigten bei 76 infertilen Patienten eine signifikante Korrelation zwischen spontaner akrosomaler Reaktion und Spermatozoenkonzentration.

Es ist zudem auch gezeigt worden, daß Patienten mit einer idiopathischen Oligozoospermie eine erniedrigte induzierte akrosomale Reaktion durch Ionophor haben (Aitken et al., 1984; Reyes et al., 1984).

Es sollte beachtet werden, daß von den einzelnen Arbeitsgruppen zum Teil unterschiedliche Stimulanzen verwendet wurden. Parinaud et al. (1995) prüften, inwieweit eine Korrelation zwischen den Standardsamenparametern und der Induktion der akrosomalen Reaktion durch verschiedene Stimulanzen bestand. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Spermatozoenkonzentration und der induzierten akrosomalen Reaktion durch Ionophor, während die anderen Stimulanzen (Progesteron, menschliche Follikularflüssigkeit, cAMP und ein Phorbol ester (TPA)) keine Korrelation erkennen ließen.

Daraus läßt sich folgern, daß eine Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der Spermatozoenkonzentration von dem eingesetzten Stimulus abhängig ist. Offensichtlich besteht bei Kältestimulation keine Korrelation zwischen der Spermatozoenkonzentration und der ΔAR .

4.3.2 Motilität

Bei den Patienten mit normaler und erniedrigter Progressivmotilität zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der ΔAR nach Kälteexposition.

Frühere Untersuchungen an Patienten mit einer Asthenozoospermie und fertilen Männern zeigten ebenfalls keine signifikanten Differenzen in Bezug auf die akrosomale Reaktion (Schill et al., 1988). Auch Brandelli et al. (1995) konnten keine Korrelation zwischen der Progressivmotilität und der akrosomalen Reaktion nachweisen.

Im Gegensatz dazu fanden Parinaud et al. (1996) in 130 Samenproben eine negative Korrelation zwischen der spontanen akrosomalen Reaktion und der Progressivmotilität (Spearman Rangkorrelationskoeffizient, $r = -0.499$, $p < 0.0001$). Patienten mit einer

Asthenozoospermie zeigten eine reduzierte Induktion der akrosomalen Reaktion durch Ionophor (Pilikian et al., 1992). Es konnte eine positive Korrelation zwischen Motilität und akrosomaler Reaktion nach Induktion durch Follikularflüssigkeit, spontaner akrosomaler Reaktion und akrosomaler Reaktion nach Induktion durch Ionophor gezeigt werden (Fuse et al., 1993; Calvo et al., 1994; Aitken et al., 1994a). Parinaud et al. (1995) zeigten eine Korrelation zwischen Motilität und Induktion der akrosomalen Reaktion durch Ionophor, Progesteron und Phorbol ester, während Induktion durch menschliche Follikularflüssigkeit und cAMP keine Korrelation zeigte.

Eine Erklärung für mögliche Einflüsse der akrosomalen Reaktion auf die Spermatozoenmotilität könnte sein, daß der gleichzeitig eintretende Kalziuminflux in die Zelle negative Auswirkungen auf die Beweglichkeit hat (Fraser, 1987; Byrd et al., 1989).

Die Abhängigkeit der Korrelation zwischen der Motilität und der Δ AR vom eingesetzten Stimulus könnte erklären, warum die Kälteinduktion in den vorliegenden Experimenten in keinem Bezug zur Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion stand.

4.3.3 Morphologie

Eine signifikante Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Kälteexposition und morphologischen Störungen der Spermatozoen konnte in dem eigenen Patientengut nicht nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich zur Korrelation zwischen Morphologie und Δ AR unterschiedliche Angaben. Heywinkel et al. (1993) fanden, daß Spermatozoen, welche in der Papanicolaou-Färbung nur kleine oder nicht darstellbare Akrosomen haben, unfähig sind, die akrosomale Reaktion zu durchlaufen. Im Gegensatz dazu hatten elongierte Spermatozoen ohne akrosomale Defekte eine normale Rate akrosomaler Reaktionen. Parinaud et al. (1996) prüften die Korrelation zwischen spontaner akrosomaler Reaktion und verschiedenen Störungen der Morphologie. Sie konnten eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der spontanen akrosomalen Reaktion und den Störungen des Schwanzbereichs der Spermatozoen nachweisen, aber nur eine vergleichsweise schwach

positive Korrelation zwischen der spontanen akrosomalen Reaktion und morphologischen Kopfstörungen. Fukuda et al. (1989) wiesen eine deutliche Beziehung zwischen der Morphologie und der Induktion der akrosomalen Reaktion durch menschliche Follikularflüssigkeit nach. Bei morphologisch normalen Spermatozoen fand sich ein signifikant höherer Prozentsatz akrosomal reagierter Spermatozoen. Auch bei der Induktion durch Progesteron waren nur Spermatozoen mit normaler Morphologie fähig zur akrosomalen Reaktion (Contreras et al., 1999). In einer Studie an 14 Patienten mit Teratozoospermie (<14% morphologisch normale Spermatozoen) konnten signifikant niedrigere Prozentsätze spontan akrosomal reagierter und durch Progesteron induzierter akrosomal reagierter Spermatozoen nachgewiesen werden (Oehninger et al., 1994). Calvo et al. (1994) bestätigten diese Aussage an Ejakulaten von infertilen Patienten. Es zeigte sich auch hier eine signifikant positive Korrelation der Induktion der akrosomalen Reaktion durch menschliche Follikularflüssigkeit und der Morphologie (Spearman Rangkorrelationskoeffizient, $r=0.509$, $p < 0.001$).

Spermatozoen von zehn Männern mit gesicherter Fertilität wurden in vier verschiedene morphologische Gruppen eingeteilt und, im Hinblick auf ihre Fähigkeit die akrosomale Reaktion zu durchlaufen, analysiert. Nach Induktion der akrosomalen Reaktion durch Follikularflüssigkeit zeigte sich in allen vier Gruppen eine annähernd gleiche Zahl akrosomal reagierter Spermatozoen (Pampiglione et al., 1993). Patienten mit einer Teratozoospermie zeigten praktisch die gleiche Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen wie fertile Männer (Schill et al., 1988). Und auch Brandelli et al. (1995) fanden keine Beziehung zwischen Morphologie und der Induktion der akrosomalen Reaktion.

Die z. T. voneinander abweichenden Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen können eventuell auf die verschiedenen, bei den Experimenten verwendeten Stimulanzen zurückzuführen sein. Parinaud et al. (1995) demonstrierten eine signifikante Korrelation zwischen ΔAR und Morphologie nach Induktion mit Ionophor, Progesteron und Phorbol ester, aber nicht mit cAMP.

Zusammenfassend konnte in den eigenen Untersuchungen keine Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Exposition gegenüber Niedrigtemperatur und der Morphologie der Spermatozoen festgestellt werden.

Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, daß eine stark abnorme Morphologie der Spermatozoenköpfe die Differenzierung in akrosomal reagierte und akrosomal intakte Spermatozoen möglicherweise erschwert hat. Dadurch könnten Spermatozoen mit morphologischen Kopfstörungen bei der Auswertung der akrosomalen Reaktion nach Triple Stain unterrepräsentiert sein.

4.3.4 Entzündungsparameter

Die Diagnose chronisch-entzündlicher Prozesse des männlichen Genitaltraktes bereitet vielfach Schwierigkeiten, weil diese Infektionen nicht selten asymptomatisch verlaufen und pathogene Mikroorganismen nicht immer nachgewiesen werden können. Einen indirekten Hinweis auf eine Genitalinfektion gibt die Bestimmung von Leukozyten im Ejakulat (Comhaire et al., 1980). Nach WHO (1993) wird hierzu die Zahl peroxidase-positiver Zellen bestimmt. Der Nachweis von Granulozyten sezernierter Proteasen kann ebenfalls Ausdruck einer Genitalinfektion sein (Schiessler et al., 1984; Jochum et al., 1986). Die azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten, welche den größten Anteil der im Ejakulat gefundenen Leukozyten bilden, enthalten Elastase (El-Demiry et al., 1986; Wolff und Anderson, 1988b). Es wurde gezeigt, daß die Quantifikation der Granulozytenelastase im Seminalplasma einen sensitiven und spezifischen Parameter für eine asymptomatische männliche Genitalinfektion darstellt, welcher nach antibiotischer Therapie dementsprechend abnimmt (Reinhardt et al., 1997).

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich keine unterschiedliche Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in den beiden Gruppen mit normaler und erhöhter Anzahl peroxidase-positiver Zellen. Allerdings gab es eine schwach positive Korrelation zwischen der Δ AR und den peroxidase-positiven Zellen. Auch in den Gruppen mit normaler und

erhöhter Granulozytenelastase ließ sich keine unterschiedliche Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion nachweisen.

Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Studien überein, welche keine Assoziation zwischen der Leukozytenkonzentration oder deren Sekretionsprodukten und der induzierbaren akrosomalen Reaktion fanden (Aitken et al., 1994b; Fedder und Ellermann-Eriksen, 1995). Neuere Untersuchungen konnten dagegen eine positive Korrelation zwischen einer Leukozytospemie und der akrosomalen Reaktion zeigen (Kaleli et al., 2000).

Es ist auch bekannt, daß radikale Sauerstoffspezies (ROS), die aus Leukozyten freigesetzt werden, die Hyperaktivierung und Kapazitation von Spermatozoen induzieren können (De Lamirande et al., 1993; Griveau et al., 1994; Oehninger et al., 1995). Es ließ sich eine negative signifikante Korrelation zwischen der induzierten bzw. induzierbaren akrosomalen Reaktion und den radikalen Sauerstoffspezies nachweisen (Ichikawa et al., 1999).

4.3.5 α -Glukosidase

Im Seminalplasma lassen sich zwei Isoformen der α -Glukosidase nachweisen, eine quantitativ überwiegend neutrale Form aus dem Nebenhoden und eine saure Form aus der Prostata. Die neutrale α -Glukosidase hat eine höhere Spezifität und Sensitivität für die Funktion des Nebenhodens als die Nebenhodenmarker L-Carnitin und Glycerophosphocholin. Bei Patienten mit Azoospermie deutet eine Erniedrigung der α -Glukosidase auf eine Obstruktion der ableitenden Samenwege hin und hat deshalb in Kombination mit Hormonbestimmungen große diagnostische Bedeutung (Guerin et al., 1986).

Auf dem Weg durch den Nebenhoden machen Spermatozoen verschiedene Reifungsprozesse durch. Demonstriert worden ist bisher eine positive Korrelation der α -Glukosidase mit den zwei Standardsamenparametern Motilität und Spermatozoenkonzentration (Cooper et al., 1988). Untersuchungen an Operationspräparaten nach Orchidektomie haben ergeben, daß die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Kälteexposition vom Caput bis zur Cauda des Nebenhodens zunimmt

(Haidl et al., 1994). Es wäre denkbar, daß diese Reifungsprozesse der Spermatozoen bei gestörter Funktion des Nebenhodens eingeschränkt sind. Deshalb wurde die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit der α -Glukosidase korreliert. Nur 8% der Patienten, bei denen die α -Glukosidase gemessen wurde, zeigten einen pathologisch erniedrigten Wert. Es ließ sich kein Unterschied in der Δ AR zwischen Patienten mit normaler und pathologisch erniedrigter α -Glukosidase nachweisen.

4.3.6 Chromatinkondensation

Während der Spermiogenese kommt es zum Austausch von lysinreichen Histonen durch arginin- und cysteinreiche Protamine. Sie ermöglichen eine Kondensation des Chromatins, verhindern eine weitere Transkription und stabilisieren das Chromatin gleichzeitig gegenüber äußeren Einflüssen. Die Persistenz der lysinreichen Histone kann mit Anilinblau nachgewiesen werden, wobei sich die chromatingestörten Spermatozoen blau färben (Terquem und Dadoune, 1983).

Eine gestörte Chromatinkondensation ist mit einer reduzierten akrosomalen Morphologie korreliert. So ist bei morphologisch normalen Spermatozoen ein deutlich höherer Prozentsatz an ungefärbten Köpfen nachweisbar (etwa 80%), als bei den abnormal geformten Spermatozoen (etwa 50%) (Dadoune et al., 1988). Die Prozentzahl reifer, d.h. chromatinkondensierter Spermatozoenköpfe ist signifikant mit der Fertilität korreliert (Silvestroni et al., 1976; Foresta et al., 1989; Auger et al., 1990; Foresta et al., 1992). Die Chromatinkondensation kann nicht nur in morphologisch abnormen, sondern auch in morphologisch normalen Spermatozoenköpfen infertiler Männer gestört sein und ist somit ein unabhängiger Parameter für die Beurteilung der männlichen Fertilität (Hofmann und Hilscher, 1991).

Deshalb wurde die Korrelation einer gestörten Chromatinkondensation mit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in der vorliegenden Arbeit untersucht. Patienten mit einer gestörten Chromatinkondensation zeigten eine verminderte Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die eingeschränkte

akrosomale Reaktion durch eine Reifungsstörung der Spermatozoen bedingt zu sein scheint.

4.4 Korrelation der bakteriellen Samenwegsinfektion mit der akrosomalen Reaktion

Bakterielle Infektionen können die männliche Fertilität über verschiedene Pathomechanismen beeinflussen. Anerkannt ist der Einfluß akuter Infektionen wie Prostatitiden und Epididymitiden. Hingegen ist der Einfluß chronischer asymptomatischer Infektionen umstritten (Cintron et al., 1981; Sherins und Howards, 1986; Megory et al., 1987). Eine Beziehung zwischen asymptomatischer Bakteriospermie und männlicher Infertilität wurde von einigen Untersuchern beschrieben (Grossgebauer und Kaden, 1982; Busolo et al., 1984a). In infertilen Patientengruppen waren Männer, deren Sperma mit Mikroorganismen kontaminiert war, signifikant häufiger repräsentiert, als in fertilen Patientengruppen (Rehewy et al., 1979; Toth und Lesser, 1981; Eggert-Kruse et al., 1992; Xu et al., 1997). Gleichzeitig sollen antimikrobielle Effekte des Seminalplasmas bei infertilen Patienten geringer sein als bei fertilen bzw. gesunden Männern (Rehewy et al., 1979). Swenson et al. (1980) zeigten durch Untersuchungen zur asymptomatischen Bakteriospermie bei über 100 Ejakulaten infertiler Männer, daß ein Zusammenhang zwischen Infertilität und Anwesenheit von Mikroorganismen im Sperma entweder nur durch gewisse Mikroorganismen oder durch eine sehr große Anzahl der Organismen erklärt werden.

Die Effekte einer symptomatischen oder asymptomatischen Samenwegsinfektion auf die Qualität des Spermas werden in der Literatur ebenfalls kontrovers beschrieben (Übersichten bei Purvis und Christiansen, 1993, 1995).

4.4.1 Einfluß von E.coli

E.coli ist der wichtigste pathogene Keim bei Prostatitis und Epididymitis (Giamarellou et al., 1984; Weidner et al., 1991). Er wird aber auch in Ejakulaten infertiler Männer ohne

Leukozytospemie oder klinische Zeichen einer Infektion mit einer Prävalenz zwischen 1,7% und 11% gefunden (Rehewy et al., 1979; Toth und Lesser, 1981; Naessens et al., 1986; Eggert-Kruse et al., 1992; Merino et al., 1995). Untersuchungen von 109 Samenproben von fertilen und infertilen Männern zeigten, daß E.coli bei 5% der infertilen Männer isoliert werden konnte, jedoch nicht bei den fertilen Männern (Rehewy et al., 1979).

Eine negative Auswirkung von E.coli auf die Motilität von Spermatozoen wurde von einigen Autoren beschrieben (Schirren und Zander, 1966; Teague et al., 1971; Auroux et al., 1991; Diemer et al., 1996). Gründe hierfür könnten Agglutination oder Ausscheidung eines von den Bakterien produzierten Immobilisationsfaktors sein, welcher zur Immobilisation der Spermatozoen führt (Teague et al., 1971; Paulson und Polakoski, 1977; Monga und Roberts, 1994). Eine signifikante Abnahme der Spermatozoenmotilität wurde bei einer Konzentration von 10^4 - 10^6 E.coli/ml gezeigt (Auroux et al., 1991; Monga und Roberts, 1994). Diemer et al. (1996) nehmen an, daß ein deutlich hemmender Effekt auf die Motilität bei einem Verhältnis von 1:1 (Spermatozoen/ E.coli) eintritt. Dieses Verhältnis zeigt sich in vivo aber kaum, Bakterienkonzentrationen überschreiten weder bei asymptomatischen, noch bei symptomatischen Infektionen selten Werte von 10^3 - 10^5 Mikroorganismen/ml (Comhaire et al., 1980). In vitro ist der Einfluß von Bakterien auf die quantitative und qualitative Motilität von Spermatozoen demnach stark von der Bakterienkonzentration abhängig. Erst bei Konzentrationen von 2×10^5 E.coli/ml oder mehr fanden Hano et al. (1986) eine verminderte Motilität. Der Motilitätsverlust war zudem mit der Inkubationszeit positiv korreliert.

Über den Einfluß einer Infektion mit E.coli auf die akrosomale Reaktion ist in der Literatur bisher wenig bekannt.

Bei Patienten der andrologischen Sprechstunde fanden sich signifikant höhere Werte für die spontane akrosomale Reaktion bei Patienten mit E.coli im Ejakulat im Gegensatz zu Patienten ohne bakterielle Samenwegsinfektion. Hingegen fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Die Kontrollgruppe ohne bakterielle Infektion wies sogar häufiger eine pathologische

Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion auf als Patienten mit E.coli im Ejakulat. Nach Unterteilung der Patienten mit einer E.coli-Infektion in zwei Gruppen mit normalen und erhöhten Entzündungsparametern zeigte die Gruppe mit erhöhten Entzündungsparametern keine signifikant höhere spontane akrosomale Reaktion im Vergleich mit der Gruppe mit normalen Entzündungsparametern. Auch in der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion unterschieden sich diese beiden Gruppen nicht. Damit sind auch mögliche indirekte Effekte einer Infektion mit E.coli durch eine gleichzeitig induzierte Entzündungsreaktion und die möglicherweise durch reaktive Sauerstoffspezies aus Leukozyten bedingten Auswirkungen auf die Spermatozoen ausgeschlossen.

Die Anzahl der E. coli im Seminalplasma korrelierte auch nicht mit der Δ AR. Bei den Patienten waren Bakterienkonzentrationen zwischen 500 und 100000 cfu pro ml Ejakulat nachweisbar; in diesen Konzentrationen spielt eine E.coli-Infektion des Ejakulates anscheinend keine Rolle im Hinblick auf die Beeinflussung der induzierbaren akrosomalen Reaktion.

Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen fanden Wolff et al. (1993) keine Korrelation zwischen der spontanen akrosomalen Reaktion und E.coli im Ejakulat. Auch in anderen Untersuchungen wurde dies bestätigt; allerdings war die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion in Spermatozoenproben mit E.coli signifikant niedriger als in Kontrollproben (El-Mulla et al., 1996). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von El-Mulla et al. (1996) wurden im Rahmen der vorgelegten Doktorarbeit keine in-vitro-Untersuchungen durchgeführt. Protektive Effekte des Seminalplasmas auf die Spermatozoen können eine Erklärung dafür sein, warum in-vivo keine Auswirkungen von E.coli auf die verschiedenen Parameter der akrosomalen Reaktion zu beobachten waren.

Eine mögliche Ursache des Einflusses von E.coli auf die akrosomale Reaktion könnte die Bindung der Bakterien an Mannose und Mannose-bindende Rezeptoren auf der Spermatozoenoberfläche sein (Bartoov et al., 1991; Wolff et al., 1993; Monga und Roberts, 1994). Dies kann einerseits zur Agglutination führen, andererseits ist die Expression von Mannose und Mannose-bindenden Rezeptoren auf der Spermatozoenoberfläche assoziiert mit der Kapazitation und der akrosomalen Reaktion (Benoff et al., 1993). Diskutiert worden ist weiterhin, daß Bakterien an das äquatoriale

Fibronectinband binden können, welches wahrscheinlich an der Spermatozoen-Oocyten Bindung beteiligt ist (Glander et al., 1991).

Inwieweit eine E.coli-Infektion die Schwangerschaftsrate beeinflussen kann, ist Gegenstand von Diskussionen. Patienten mit einer E.coli-Infektion im Seminalplasma induzierten nach einer erfolgreichen antibiotischen Behandlung eine höhere Schwangerschaftsrate (60%) im IVF-Programm im Vergleich zu Patienten, die während der IVF-Behandlung positive E.coli Kulturen im Sperma zeigten (Shalika et al., 1996). Auch im heterologen Hamster-Ovum-Penetrationstest kann die Penetrationsrate nach bakterieller Kontamination des Ejakulates mit E.coli auf 0% absinken (Hano et al., 1986). Allerdings zeigten bakteriell kontaminierte Ejakulate, die mit der „swim-up“-Technik aufbereitet worden waren, im Hamster-Ovum-Penetrationstest keinen Unterschied mehr zu nicht kontaminierten Ejakulaten.

4.4.2 Einfluß von Ureaplasmen

Ureaplasmen sind häufige Erreger von Urogenitalinfektionen, besonders der nichtgonorrhöischen Urethritis und chronischen Prostatitis (Styler und Shapiro, 1985; Weidner et al., 1985). Die Angaben über die Prävalenz von Ureaplasmen im Seminalplasma bei Männern variieren stark. Ureaplasma urealyticum finden sich bei 9.8% bis 44.8% infertiler Patienten (Cintron et al., 1981; Busolo et al., 1984b; Naessens et al., 1986; Balmelli et al., 1994; Shalika et al., 1996; Xu et al., 1997). Bei fertilen Männern treten sie mit einer Häufigkeit von 9.1% bis 27% auf (Shalhoub et al., 1986; Xu et al., 1997). In den eigenen Untersuchungen fanden sich Ureaplasma urealyticum im Seminalplasma von 10.6% der andrologischen Patienten.

Der Einfluß einer Samenwegsinfektion mit Ureaplasma urealyticum auf die Ejakulatqualität und männliche Fertilität wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Übersichten bei Styler und Shapiro, 1985). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Standardsamenparameter in Ejakulaten mit oder ohne Nachweis von Ureaplasmen (Cintron et al., 1981; Hill et al., 1987; Lumpkin et al., 1987). Ebenso konnte

keine Korrelation zwischen der Motilität und einer Ureaplasmen-Infektion in-vitro nachgewiesen werden (Busolo et al., 1984a; Shalhoub et al., 1986; Talkington et al., 1991). Im Gegensatz dazu demonstrierten andere Untersucher eine Beziehung zwischen einer *Mycoplasma hominis*- bzw. Ureaplasmen-Infektion und der Motilität oder der Spermatozoenzahl (Swenson et al., 1979; Naessens et al., 1986; Rose und Scott, 1994). Weiterhin wurde auch über eine Korrelation zwischen Spermatozoenmorphologie und einer Infektion mit Mykoplasmen berichtet (Rose und Scott, 1994).

Es zeigte sich keine signifikante Abnahme der Fertilisationsrate nach einer In-vitro-Fertilisation bei Paaren mit Ureaplasmen-Infektionen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Infektion (Hill et al., 1987; Montagut et al., 1991; Kanakas et al., 1999). Allerdings wurde eine erniedrigte Implantationsrate bei Paaren gefunden, bei denen die Männer eine Ureaplasmen-Infektion hatten. Als Erklärung wurde eine leichte Endometritis bei den Frauen angenommen (Montagut et al., 1991). Bei der heterologen Insemination findet sich bezüglich der Konzeptionsrate keine signifikante Differenz zwischen mykoplasmenkontaminiertem und mykoplasmenfreiem Seminalplasma (Lumpkin et al., 1987).

In den eigenen Untersuchungen wurde im Patientengut der andrologischen Sprechstunde der Einfluß einer Infektion mit *Ureaplasma urealyticum* auf die akrosomale Reaktion beurteilt. Es fanden sich keine Unterschiede bezüglich der spontanen akrosomalen Reaktion und der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion zwischen Patienten mit einer Ureaplasmen-Infektion und einer Kontrollgruppe. Nach Unterteilung der Patienten mit einer *Ureaplasma urealyticum*-Infektion in zwei Gruppen mit normalen und erhöhten Entzündungsparametern zeigte die Gruppe mit erhöhten Entzündungsparametern keine signifikant geringere Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion als die Gruppe mit normalen Entzündungsparametern.

Rose und Scott (1994) inkubierten Spermatozoen mit Ureaplasmen und zeigten in ihren Untersuchungen eine erniedrigte akrosomale Reaktion nach Induktion durch Ionophor. Diese Diskrepanz zwischen den in vitro Daten von Rose und Scott (1994) und unseren Beobachtungen könnten durch unterschiedliche Ureaplasmenkonzentrationen erklärbar

sein. Rose und Scott (1994) inkubierten 4×10^6 Spermatozoen mit 2.5×10^5 Mykoplasmen in einem Volumen von 1.5 ml über Nacht. Dies entspricht einer Mykoplasmenkonzentration von ca. $1.5 \times 10^5/\text{ml}$, was weit über den in vivo gemessenen Konzentrationen liegt. Bei unseren Patienten fanden wir eine durchschnittliche Ureaplasmenkonzentration von 9960 cfu/ml mit einem Maximalwert von 80000 cfu/ml.

Es werden verschiedene Ursachen eines Einflusses der Ureaplasmen auf die Spermatozoen diskutiert. Zum einen binden Ureaplasmen an die Spermatozoenoberfläche, insbesondere im Schwanzbereich. Zum anderen kommen Ureaplasmen in den geschwollenen Mittelteilen der Spermatozoen vor (Busolo et al., 1984b; Sánchez et al., 1989). Mittels Transmissionselektronenmikroskopie können Ureaplasmen in oder auf dem Kopfbereich der Spermatozoen nachgewiesen werden (Grossgebauer und Hennig, 1984). Swenson und O'Leary (1980) fanden nach Inkubation von Ejakulatproben mit *U. urealyticum* mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Ureaplasmen, die an die Köpfe und Flagellen der Spermatozoen gebunden waren. Die Bindung von Ureaplasmen an die Spermatozoen scheint die Motilität der Spermatozoen und damit die Fertilität physikalisch zu beeinträchtigen.

Gezeigt wurde auch, daß von Mykoplasmen produzierte reaktive Sauerstoffspezies, z. B. Peroxide, die Hyperaktivierung und Kapazitation von Spermatozoen unphysiologisch induzieren können (Cole et al., 1968; De Lamirande et al., 1993; Griveau et al., 1994; Oehninger et al., 1995).

Eine weitere Erklärung für schädigende Einflüsse dieser Bakterien könnte sein, daß Spermatozoen Ureaplasmen durch den Zervikalmukus und den Uterus transportieren und damit Infektionen des oberen weiblichen Genitaltraktes begünstigen, wodurch die Fertilität der Partnerin beeinträchtigt wird (Swenson und O'Leary, 1980).

4.4.3 Einfluß einer antibiotischen Therapie

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Untersuchung handelt, war eine weitergehende Untersuchung des Einflusses einer antibiotischen Therapie nur bei Patienten mit einer Ureaplasma urealyticum-Infektion möglich, da die Fallzahl der

Patienten mit einer E.coli-Infektion zu gering war. Die spontane und die induzierte akrosomale Reaktion und deren Induzierbarkeit wurde bei 27 Patienten der andrologischen Sprechstunde mit einer Ureaplasma urealyticum-Infektion vor und nach einer antibiotischen Therapie gemessen. Es ergab sich bei den Patienten, die vor antibiotischer Behandlung eine erniedrigte akrosomale Reaktion zeigten, eine signifikante Zunahme der induzierten akrosomalen Reaktion und deren Induzierbarkeit nach antibiotischer Therapie. Es muß hier bemerkt werden, daß es bei nichtinfizierten Männern ebenfalls zu einer Zunahme der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion kam. Wenn diese in der ersten Messung eine erniedrigte Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion zeigten, dann war die Induzierbarkeit in 70.3% bei der zweiten Messung normal. Es besteht somit eine Tendenz zur Verbesserung der Δ AR bei der Zweitmessung. Eine Ursache für die Verbesserung der Werte könnte aber auch die antibiotische Behandlung der U. urealyticum-Infektion sein. Die Wirkung einer antibiotischen Therapie auf die verschiedenen Standardsamenparameter wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben. Nach Untersuchungen von Sánchez et al. (1990) zeigten Patienten mit Ureaplasmen im Ejakulat nach einer Doxycyclin- bzw. Erythromycintherapie eine signifikante Verbesserung der Spermatozoenmorphologie. Daraus wurde geschlossen, daß Ureaplasmen wesentliche Veränderungen der Spermatozoenmorphologie hervorrufen können und beim Nachweis einer Teratozoospermie eine antibiotische Therapie erwogen werden sollte. Auch die Motilität wird durch eine antibiotische Therapie positiv beeinflusst (Swenson et al., 1979; Toth und Lesser, 1982; Busolo et al., 1984a). Patienten mit einer Asthenozoospermie und Ureaplasmen im Ejakulat zeigten nach einer Therapie mit Doxycyclin eine Verbesserung der Motilität (Aparicio et al., 1980).

Ob eine erfolgreiche Therapie von Ureaplasmen im Ejakulat zu einer erhöhten Schwangerschaftsrate führt, wird in der Literatur aber kontrovers diskutiert. 60% der Frauen, bei deren Männern nach einer Doxycyclin-Therapie keine Ureaplasmen mehr im Ejakulat nachweisbar waren, wurden schwanger. Dagegen erreichten nur 5% der Frauen, deren Männer nach einer Doxycyclin-Therapie immer noch Ureaplasmen im Ejakulat hatten, eine Schwangerschaft (Toth et al., 1983). Auch andere Autoren bestätigen eine erhöhte Anzahl an Schwangerschaften nach erfolgreicher antibiotischer Therapie (Shalika

et al., 1996). Dagegen konnten Harrison et al. (1975) bei 120 Paaren mit Ureaplasmen im vaginalen und zervikalen Abstrich und im Seminalplasma keine verbesserten Konzeptionsraten nach einer Doxycyclin-Therapie nachweisen.

Zusammengefaßt bleibt der Wert einer antibiotischen Therapie einer Ureaplasmeninfektion für die Spermatozoenfunktion und Fertilität umstritten. Im Hinblick auf die Möglichkeit einer eventuellen Infektion des weiblichen Genitaltraktes sollte die antibiotische Therapie dieser Infektionen trotzdem erfolgen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Akrosom ist eine während der Spermiogenese aus dem Golgi-Apparat entstehende Struktur, die von Membranen begrenzt wird, lysosomale Enzyme enthält und die vorderen Zweidrittel des Spermatozoonkopfes bedeckt. Die Befruchtung von Eizellen durch Spermatozoen ist ein hochkomplexer biologischer Vorgang, in dessen Verlauf die Spermatozoen die akrosomale Reaktion durchlaufen. Hierbei werden im Akrosom enthaltene Enzyme freigesetzt, welche für das Durchdringen der Zona pellucida notwendig sind. Die Fähigkeit der Spermatozoen, akrosomal zu reagieren, kann in vitro gemessen werden und korreliert mit den Fertilisierungsraten nach IVF. Unter physiologischen Bedingungen wird die akrosomale Reaktion durch den Kontakt mit der Zona pellucida ausgelöst.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Δ AR) nach Exposition gegenüber niedrigen Temperaturen bei 489 Patienten der andrologischen Ambulanz des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der JLU Giessen. Bei 31% der Patienten zeigte sich eine pathologisch verminderte Δ AR. Bei einer späteren zweiten Messung finden sich jedoch erhebliche intraindividuelle Schwankungen, wobei eine pathologisch erniedrigte Δ AR in nur 29.7%, und eine normale Δ AR in 77.8% der Fälle reproduzierbar war. Es ließ sich auch eine signifikante jahreszeitliche Schwankung der Δ AR nachweisen. Diese Resultate zeigen, daß die Messung der Δ AR, wie andere Standardsamenparameter auch, erst nach mindestens zweimaliger Bestimmung aussagekräftig ist.

In dieser Arbeit wurde zudem der Einfluß der Standardsamenparameter auf die Δ AR untersucht. Die Spermatozoenkonzentration, die Progressivmotilität und die Morphologie zeigten keine Korrelation mit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion. Es ließ sich auch kein Unterschied in der Δ AR zwischen Patienten mit normaler und pathologisch erniedrigter α -Glukosidase (Nebenhodenmarker) nachweisen. Eine pathologisch reduzierte Δ AR wurde in Proben mit einer pathologischen Chromatinkondensation gefunden.

Weiterhin wurde der Einfluß von Entzündungsfaktoren auf die Δ AR untersucht. Es liess sich eine schwach positive Korrelation zwischen der Δ AR und den peroxidase-positiven Zellen nachweisen. Da sich in vitro Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen bakterieller Infektion und Induzierbarkeit der AR zeigten, wurden gezielt Ejakulate mit Nachweis von Ureaplasmen und E.coli untersucht. Eine Korrelation von Samenwegsinfektionen mit Ureaplasmen oder E.coli und der Δ AR konnte nicht festgestellt werden. Eine antibiotische Therapie verbesserte aber bei Patienten mit Ureaplasmeninfektion die Δ AR signifikant, so daß bei dieser Patientengruppe dennoch eine Verminderung der Δ AR durch Ureaplasmen nicht ausgeschlossen werden kann. Einschränkend muss aber auf die hohe intraindividuelle Variabilität des Parameters „AR“ hingewiesen werden.

Zusammenfassend handelt es sich bei der kälteinduzierten Δ AR um einen Spermatozoenfunktionsparameter mit hoher intraindividuellem Variabilität und jahreszeitlicher Schwankung, welcher durch Spermatozoenreifungsstörungen und durch urogenitale Infektionen negativ beeinflusst werden kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abas, M. und Murphy, D. (1987). Seasonal affective disorders: the miseries of long dark nights? *Br Med J* 295, 1504-1505.

Aitken, R. J., Ross, A., Hargreave, T., Richardson, D., Best, F. (1984). Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A 23187. *J Androl* 5, 321-329.

Aitken, R. J. (1990). Evaluation of human sperm function. *Br Med Bull* 46, 654-674.

Aitken, R. J., Buckingham, D., Harkiss, D. (1994a). Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assays of the acrosome reaction and sperm-oocyte fusion. *Hum Reprod* 9, 1867-1874.

Aitken, R. J., West, K., Buckingham, D. (1994b). Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 15, 343-352.

Allison, A. C. und Hartree, E. F. (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil* 21, 501-515.

Aparicio, N. J. I., Muchnik, G., Levalle, O., Tropea, L., Guitelman, A., Grinstein, S. (1980). The effect of a treatment with doxycycline on sperm of asthenozoospermic patients with T-mycoplasma genital infection. *Andrologia* 12, 521-524.

Auger, J., Mesbah, M., Huber, C., Dadoune, J. P. (1990). Aniline blue Stain 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.

Auroux, M. R., Lacques, L., Mathieu, D. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study with *Escherichia coli*. *Int J Androl* 14, 264-270.

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

Avrech, O., Fisch, B., Shalgi, R. (1997). Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilizing capacity in vitro. *Andrologia* 29, 97-101.

Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating spermatozoa. *J Androl* 12, 323-330.

Balmelli, T., Stamm, J., Dolina-Giudici, M., Prduzzi, R., Piffaretti-Yanez, A., Balerna, M. (1994). *Bacteroides ureolyticus* in men consulting for infertility. *Andrologia* 26, 35-38.

Banerjee, M. und Chowdhury, M. (1995). Induction of capacitation in human spermatozoa in vitro by an endometrial sialic acid-binding protein. *Hum Reprod* 10, 3147-3153.

- 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.
- Bartoov, B., Ozbonfil, D., Maayan, M. C., Ohad, E., Nitzan, Y. (1991). Virulence characteristics of male genital tract *Escherichia coli* isolated from semen of suspected infertile men. *Andrologia* 23, 387-394.
- Bedford, J. M., Moore, H. D. M., Franklin, L. E. (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoa in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 119, 119-126.
- Benoff, S., Hurley, I., Cooper, G. W., Mandel, F. S., Rosenfeld, D. L., Hershlag, A. (1993). Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod* 8, 2441-2454.
- Bielfeld, P., Graf, M., Jeyendran, R. S., Zaneveld, L. J. D. (1992). No change in acrosome reaction of human spermatozoa during storage in cervical mucus. *Andrologia* 24, 83-86.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R., Alexander, N. (1990). Progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium in human sperm. *J Biol Chem* 265, 1376-1380.
- Bleil, J. D. und 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.
- Bolanos, J. R. und Katz, D. F. (1983). Human sperm penetration of zona-free hamster eggs after storage of the semen for 48 hours at 2°C to 5°C. *Fertil Steril* 39, 536-541.
- Bongso, A., Ho, J., Fong, C. Y., Ng, S. C., Ratnam, S. (1993). Human sperm function after coculture with human fallopian tubal epithelial cell monolayers: in vitro model for studying cell interactions in early human conception. *Arch Androl* 31, 183-190.
- Boué, F., Blais, J., Sullivan, R. (1996). Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* 54, 1009-1017.
- Brandelli, A., Miranda, P. V., Anón-Vazquez, M., Marín-Briggiler, C. I., Sanjurjo, C., Gonzalez-Echeverría, F., Blaquier, J. A., Tezón, 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.
- Brewis, I. A., Clayton, R., Barratt, C. L. R., Hornby, D. P. J., Moore, H. D. M. (1996). Recombinant human zona pellucida glykoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2, 583-589.

- Busolo, F., Zanchetta, R., Lanzone, E., Cusinato, R. (1984a). Microbial flora in semen of asymptomatic infertile men. *Andrologia* 16, 169-175.
- Busolo, F., Zanchetta, R., Bertolini, G. (1984b). Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 42, 412-417.
- Byrd, W. und Wolf, D. P. (1986). Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol Reprod* 34, 859-869.
- Byrd, W., Tsu, J., Wolf, D. P. (1989). Kinetics of spontaneous and induced acrosomal loss in human sperm incubated under capacitating and noncapacitating conditions. *Gamete Res* 22, 109-122.
- Calvo, L., Vantman, D., Banks, S. M., Tezon, J., Koukoulis, G. N., Dennison, L., Sherins, R., J. (1989). Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 52, 1048-1054.
- Calvo, L., Dennison-Lagos, L., Banks, S. M., Sherins, R., J. (1994). Characterization and frequency distribution of sperm acrosome reaction among normal and infertile men. *Hum Reprod* 9, 1875-1879.
- Campbell, S. C. und Turek, F. W. (1981). Cyclic function of the mammalian ovary. *Handbook of Behavioural Neurobiology. Biological Rhythm.* Aschoff, J. New York, Plenum Press. 4, 532.
- Chan, S. Y. W., Li, S. Q., Wang, C. (1987). TEST-egg yolk buffer storage increases the capacity of human sperm to penetrate hamster eggs in vitro. *Int J Androl* 10, 517-524.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature* 168, 697-698.
- Cintron, R. D., Wortham, J. W. E., Acosta, A. (1981). The association of semen factors with the recovery of *Ureaplasma urealyticum*. *Fertil Steril* 36, 648-652.
- Coddington, C., Fulgham, D. L., Alexander, N. J., Johnson, D. J., Herr, J. C. R., Hodgen, G. D. (1990). Sperm bound to zona pellucida in hemizonal assay demonstrate acrosome reaction when stained with T-6 antibodies. *Fertil Steril* 54, 504-508.
- Cole, B. C., Ward, J. R., Martin, C. H. (1968). Hemolysin and peroxide activity of *Mycoplasma* species. *J Bacteriol* 95, 2022-2030.
- Comhaire, F., Verschraegen, G., Vermeulen, L. (1980). Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *Int J Androl* 3, 32-45.
- Contreras, H. R., Roa, J., Ramirez, M. A. (1999). Effect of progesterone on acrosome reaction, hypoosmotic swelling test, and DNA stability in human spermatozoa. *Arch Androl* 42, 97-104.

- Cooper, T. G., Yeung, C. H., Nashan, D., Nieschlag, E. (1988). Epididymal markers in human infertility. *J Androl* 9, 91-101.
- Cooper, T. G., Jockenhövel, F., Nieschlag, E. (1991). Variations in semen parameters from fathers. *Hum Reprod* 6, 859-866.
- Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W., Hanson, F. W. (1988). Induction of acrosome reactions by human zona pellucida. *Biol Reprod* 38, 235-244.
- Cross, N. L. (1996). Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone; cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 54, 128-145.
- 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 seminal parameters. *J Androl* 12, 98-103.
- Dadoune, J. P., Mayaux, M. J., Guihard-Moscato, M. L. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 20, 211-217.
- De Jonge, C. J., Rawlins, R. G., Zaneveld, L. J. D. (1988). Induction of the human sperm acrosome reaction by human oocytes. *Fertil Steril* 50, 949-953.
- De Jonge, C. J., Han, H. L., Lawrie, H., Mack, S. R., Zaneveld, L. J. D. (1991a). Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 258, 113-125.
- De Jonge, C. J., Han, H. L., Mack, S. R., Zaneveld, L. J. D. (1991b). Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J Androl* 12, 62-70.
- De Lamirande, E., Eiley, D., Gagnon, C. (1993). Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl* 16, 258-266.
- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H. W., Schiefer, H. G., Rován, E., Mayer, F. (1996). Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl* 19, 271-277.
- Drisdell, R. C., Mack, S. R., Anderson, R. A., Zaneveld, L. J. D. (1995). Purification and partial characterization of acrosome reaction inhibiting glycoprotein from human seminal plasma. *Biol Reprod* 53, 201-208.
- Dunbar, R. I. M. (1990). Environmental and social determinants of fecundity in primates. *Fertility and Resources*. Landers, J. und Reynolds, V. Cambridge, Cambridge University Press, 5-17.

- Eddy, E. M. und O'Brien, D. A. (1994). The Spermatozoon. The Physiology of Reproduction. Knobil, E. und Neill, J. D. New York, Raven Press. 1, 47-52.
- Eggert-Kruse, W., Pohl, S., Näher, H., Tilgen, W., Runnebaum, B. (1992). Microbial colonization and sperm-mucus interactions: results in 1000 infertile couples. *Hum Reprod* 7, 612-620.
- Ehrenkranz, J. R. (1983). Seasonal breeding in humans: birth records of the Labrador Eskimo. *Fertil Steril* 40, 485-489.
- El-Demiry, M. I. M., Hargreave, T. B., Busuttill, A., James, K., Chisholm, G. D. (1986). Identifying leucocytes and leucocyte subpopulations in semen using monoclonal antibody probes. *Urology* 28, 492-496.
- El-Mulla, K. F., Köhn, F. M., Dandal, M., El Beheiry, A. H., Schiefer, H. G., Weidner, W., Schill, W. B. (1996). In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Arch Androl* 37, 73-78.
- ESHRE, A. S. I. G. (1996). Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. *Hum Reprod* 11, 1463-1479.
- Fedder, J. und Ellermann-Eriksen, S. (1995). Effect of cytokines on sperm motility and ionophore-stimulated acrosome reaction. *Arch Androl* 35, 173-185.
- Fénichel, P. (1995). Acrosomal function and sperm fertilizing ability. Human sperm acrosome reaction. Fénichel, P. und Parinaud, J. Montrouge, John Libbey Eurotext. *Colloque Inserm Vol. 236*, 315-325.
- Florman, H. M. und Storey, B. T. (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev Biol* 91, 121-130.
- Foresta, C., DeCarlo, E., Mioni, R., Zorzi, M. (1989). Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects. *Andrologia* 21, 384-390.
- Foresta, C., Zorzi, M., Rossato, M., Varotto, A. (1992). Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 15, 330-337.
- Fraser, L. R. (1987). Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod fertil* 81, 77-89.
- Fukuda, M., Morales, P., Overstreet, J. W. (1989). Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 24, 59-65.
- Fuse, H., Okumura, M., Sakamoto, M., Kazama, T., Katayama, T. (1993). Acrosome-reacted sperm in infertile and fertile men using the triple-stain technique. *Arch Androl* 30, 41-45.

- Fusi, F. M., Viganò, P., Daverio, R., Busacca, M., Vignali, M. (1994). Effects of coculture with human endometrial cells on the function of spermatozoa from subfertile men. *Fertil Steril* 61, 160-167.
- Giamarellou, H., Tympanidis, K., Bitos, N. A., Leonidas, E., Daikos, G. K. (1984). Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 16, 417-422.
- Glander, H. J., Herrmann, K., Haustein, U. F. (1991). Mögliche Störungen der Spermium-Oozyten-Interaktion durch Mikroorganismen. *Fertilität* 7, 66-68.
- 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.
- Griveau, J. F., Renard, P., Le Lannou, D. (1994). An in-vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17, 300-307.
- Grossgebauer, K. und Kaden, R. (1982). Microbiological analysis of semen from infertile men. *Arch Androl* 5, 6-10.
- Grossgebauer, K. und Hennig, A. (1984). Ureaplasma-infected human sperm in infertile men. *Arch Androl* 12, 35-41.
- Guerin, J.-F., Ali, H. B., Rollet, J., Souchier, C., Czyba, J.-C. (1986). α -Glukosidase as a Specific Epididymal Enzyme Marker. *J Androl* 7, 156-162.
- Haidl, G., Badura, B., Schill, W. B. (1994). Function of human epididymal spermatozoa. *J Androl* 15, 23-27.
- Han, H. L., Mack, S. R., De Jonge, C., Zaneveld, L. J. D. (1990). Inhibition of the human sperm acrosome reaction by a high molecular weight factor from human seminal plasma. *Fertil Steril* 54, 1177-1179.
- Hano, R., Zenzes, M. T., Belkien, L., Freund, I., Nieschlag, E. (1986). Schutz menschlicher Spermien vor Bakterien durch die "swim up" Präparation. *Fertilität* 2, 77-80.
- Harrison, R. F., De Louvois, J., Blades, M., Hurley, R. (1975). Doxycycline treatment and human infertility. *Lancet* 1, 605-607.
- Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Schill, W. B., Gips, H. (1992). Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion in der andrologischen Diagnostik und ihre prognostische Bedeutung für die IVF. *Fertilität* 8, 27-30.
- Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Gips, H., Schill, W. B. (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 8, 2128-2132.
- Heywinkel, E., Freundl, G., Hofmann, N. (1993). Acrosome reaction of spermatozoa with different morphology. *Andrologia* 25, 137-139.

- Hill, A. C., Tucker, M. J., Whittingham, D. G., Craft, I. (1987). Mycoplasmas and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 47, 652-655.
- Hofmann, N. und Hilscher, B. (1991). Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 6, 979-982.
- Holstein, A. F. und Roosen-Runge, E. C. (1981). Atlas of human spermatogenesis. Berlin, Grosse Verlag, 98-109.
- Hoshi, K., Sugano, T., Endo, C., Yoshimatsu, N., Yanagida, K., Sato, A. (1993). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. *Fertil Steril* 60, 149-153.
- Ichikawa, T., Oeda, T., Ohmori, H., Schill, W. B. (1999). Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *Int J Androl* 22, 37-42.
- Jacobsen, F., Wehr, R., Sack, D., Rosenthal, N. (1987). Seasonal affective disorders, a review of the syndrome and its public health implications. *Am J Public Health* 77, 57-59.
- Jamil, K. und White, I. G. (1981). Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch Androl* 7, 283-292.
- Jochum, M., Pabst, W., Schill, W. B. (1986). Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent genital tract inflammation. *Andrologia* 18, 413-419.
- Kaleli, S., Ocer, F., Irez, T., Budak, E., Aksu, M. F. (2000). Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 89, 185-191.
- Kanakas, N., Mantzavinos, T., Boufidou, F., Koumentakou, I., Creatsas, G. (1999). Ureaplasma urealyticum in semen: is there any effect on in vitro fertilization outcome? *Fertil Steril* 71, 523-527.
- 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.
- 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.
- Kopf, G. S., Lewis, C. A., Vacquier, V., D. (1983). Methylxanthines stimulate calcium transport and inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterases in abalone sperm. *Dev Biol* 99, 15-120.

Kopf, G. S. und Gerton, G. L. (1991). The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. *Elements of Mammalian Fertilization*. Wassarman, P. M. Boca Raton, Florida, CRC Press. 1, 153-203.

Lange, R., Schneider, K., Bockel, B., Michelmann, H. W. (1992). Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion und des Spermatozoenreifegrades im Ejakulat. *Fertilität* 8, 107-113.

Lerchl, A., Simoni, M., Nieschlag, E. (1993). Changes in seasonality of birth rates in Germany from 1951 to 1990. *Naturwissenschaften* 80, 516-518.

Levine, J. R., Mathew, R. M., Chenault, B. C., Brown, M. H., Hurtt, M. E., Bently, K. S. (1990). Differences in the quality of semen in outdoor workers during summer and winter. *N Engl J Med* 323, 12-16.

Liu, D. Y. und Baker, H. W. G. (1990). Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 5, 298-303.

Liu, D. Y. und Baker, H. W. G. (1992a). 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. und Baker, H. W. G. (1992b). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 58, 465-483.

Liu, D. Y. und Baker, H. W. G. (1994). Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 9, 1694-1700.

Liu, D. Y. und Baker, H. W. G. (1996). A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 11, 551-557.

Lumpkin, M. M., Smith, T. F., Coulam, C. B., O'Brien, P. C. (1987). Ureaplasma urealyticum in semen for artificial insemination: its effect on conception and semen parameters. *Int J Fertil* 32, 122-130.

Megory, E., Zuckerman, H., Shoham, Z., Lunenfeld, B. (1987). Infections and male fertility. *Obstet Gynecol Surv* 42, 283-290.

Meizel, S. (1995). Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone. Human sperm acrosome reaction. Fénel, P. und Parinaud, J. Montrouge, John Libbey Eurotext. *Colloque Inserm Vol. 236*, 151-164.

Menge, A. C. und Beitner, O. (1989). Interrelationship among semen, characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* 51, 486-492.

- Merino, G., Carranza-Lira, S., Murrieta, S., Rodriguez, L., Cuevas, E., Moran, C. (1995). Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. *Arch Androl* 35, 43-47.
- Minami, S., Yamano, S., Ishikawa, H., Aono, T. (1995). Increase of intracellular free $[Ca^{2+}]$ in single human motile spermatozoa treated with human follicular fluid. *Arch Androl* 34, 115-123.
- Monga, M. und Roberts, J. A. (1994). Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. *J Androl* 15, 151-156.
- Montagut, J. M., Leprêtre, S., Degoy, J., Rousseau, M. (1991). Ureaplasma in semen and IVF. *Hum Reprod* 6, 727-729.
- Mori, K., Daitoh, T., Kamada, M., Maeda, N., Maegawa, M., Hirano, K., Irahara, M., Aono, T. (1993). Blocking of human fertilization by carbohydrates. *Hum Reprod* 8, 1729-1732.
- Mortimer, D., Templeton, A., Lenton, E. A., Coleman, R. A. (1983). Animal patterns of human sperm production and semen quality. *Arch Androl* 10, 1-5.
- Naessens, A., Foulon, W., Debrucker, P., Devroey, P., Lauwers, S. (1986). Recovery of microorganisms in semen and relationship to semen evaluation. *Fertil Steril* 45, 101-105.
- Nagae, T., Yanagimachi, R., Srivastava, P. N., Yanagimachi, H. (1986). Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 45, 701-707.
- Naito, N., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. (1992). Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. *Hum Reprod* 7, 281-285.
- Oehninger, S., Blackmore, P., Morshedi, M., Sueldo, C., Acosta, A. A., Alexander, N. J. (1994). Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil Steril* 61, 349-354.
- Oehninger, S., Blackmore, P., Mahony, M., Hodgen, G. (1995). Effects of hydrogen peroxid on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 12, 41-47.
- Ombelet, W., Maes, M., Vandeput, H., Cox, A., Janssen, M., Pollet, H., Le R Fourie, F., Steeno, O., Bosmans, E. (1996). Chronobiological fluctuations in semen parameters with a constant abstinence period. *Arch Androl* 37, 91-96.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 828-833.
- Pampiglione, J. S., Tan, S. L., Campbell, S. (1993). Acrosome reactivity in spermatozoa of different morphology in response to stimulation with follicular fluid. *Hum Reprod* 8, 412-415.

Parinaud, J., Vieitez, G., Moutaffian, H., Richoilley, 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.

Parinaud, J., Vieitez, G., Moutaffian, H., Richoilley, G., Milhet, P. (1996). Relationships between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa. *Hum Reprod* 11, 1240-1243.

Paulson, J. D. und Polakoski, K. L. (1977). Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Escherichia coli* filtrates. *Fertil Steril* 28, 182-185.

Perry, R. L., Barratt, C. L. R., Warren, M. A., Cooke, I. D. (1996). Comparative study of the effect of human cervical mucus and a cervical mucus substitute, Healonid, on capacitation and the acrosome reaction of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 11, 1055-1062.

Peterson, R. N., Russel, L., Bundman, D., Freund, M. (1978). Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing to acrosome reaction. *Biol Reprod* 19, 459.

Pilikian, S., Guerin, J. F., Adeleine, P., Ecochard, R., Czyba, J. C. (1992). Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in asthenozoospermic infertile semen. *Hum Reprod* 7, 991-993.

Plachot, M., Mandelbaum, J., Junca, A. M. (1984). Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42, 418-423.

Purvis, K. und Christiansen, E. (1993). Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl* 16, 1-13.

Purvis, K. und Christiansen, E. (1995). The impact of infection on sperm quality. *J Brit Fert Soc* 1, 31-41.

Rehewy, M. S. E., Hafez, E. S. E., Thomas, A., Brown, W. J. (1979). Aerobic and anaerobic bacterial flora in semen from fertile and infertile groups of men. *Arch Androl* 2, 263-268.

Reinhardt, A., Haidl, G., Schill, W. B. (1997). Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. *Andrologia* 29, 187-192.

Reyes, A., Martinez, R., Luna, M., Chavarria, M. E., Merino, G. (1984). Quantitative evaluation of the human spermatozoal motility and acrosome reaction in infertile oligozoospermic and fertile euspermic men. *Arch Androl* 12, 187-194.

Rojanski, N., Brzezinski, A., Schenker, J. G. (1992). Seasonality in human reproduction: an update. *Hum Reprod* 7, 735-745.

- Rose, B. I. und Scott, B. (1994). Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubations with mycoplasmas. *Fertil Steril* 61, 341-348.
- Russell, L., Peterson, R. N., Freund, M. (1979). Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 32, 87-92.
- Saint-Pol, P., Beuscard, R., Leroy-Martin, B., Hermand, E., Jablonski, W. (1989). Circannual rhythms of sperm parameters of fertile men. *Fertil Steril* 51, 1030-1033.
- Saling, P. M. (1989). Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxford Review of Reproductive Biology*. Milligan, S. R. Oxford, Oxford University Press. 2, 339-388.
- Sánchez, R., Villagran, E., Concha, M., Cornejo, R. (1989). Ultrastructural analysis of the attachment sites of *Escherichia coli* to the human spermatozoon after in-vitro migration through estrogenic cervical mucus. *Int J Fertil* 34, 363-367.
- Sánchez, R., Hein, R., Concha, M., Vigil, P., Schill, W. B. (1990). Mollicutes in male infertility: is antibiotic therapy indicated? *Andrologia* 22, 355-360.
- Sánchez, R. und Schill, W. B. (1991a). Influence of incubation time/temperature on acrosome reaction/sperm penetration assay. *Arch Androl* 27, 35-42.
- Sánchez, R. und Schill, W. B. (1991b). Induction of the acrosome reaction in sperm by exposure to low temperature increases their rate of fusion with zona-free hamster oocytes. *Int J Androl* 14, 423-431.
- Schiessler, H., Jochum, M., Friesen, A., Schill, W. B., Hofstetter, A. (1984). Granulozytenelastase im Ejakulat als Entzündungsparameter bei Adnex-Affektionen. *Fortschritte der Fertilitätsforschung*. Schirren, C. und Semm, K. Berlin, Grosse Verlag. 12, 157-163.
- Schill, W. B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E. (1988). The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum Reprod* 3, 139-145.
- Schirren, C. und Zander, H. A. (1966). Genitalinfektionen des Mannes und ihre Auswirkungen auf die Spermatozoenmotilität. *Med Welt* 45, 45-47.
- Shalhoub, D., Abdel-Latif, A., Fredericks, C. M., Mathur, S., Rust, P. F. (1986). Physiological integrity of human sperm in the presence of *Ureaplasma urealyticum*. *Arch Androl* 16, 75-80.
- Shalika, S., Dugan, K., Smith, R. D., Padilla, S. L. (1996). The effect of positive semen bacterial and *Ureaplasma* cultures on in-vitro fertilization success. *Hum Reprod* 11, 2789-2792.

Sherins, R. J. und Howards, S. S. (1986). Male infertility. Campbell's Urology. Walsh, P. C., Gittes, R. F., Perlmutter, A. D., Stamey, T. A. London, Saunders, 672-673.

Silvestroni, L., Frajese, G., Fabrizio, M. (1976). Histones instead of protamines in terminal germ cells of infertile oligospermic men. *Fertil Steril* 27, 1428-1437.

Smith, M., Peterson, R. N., Russel, L. D. (1983). Penetration of zona free hamster eggs by boar sperm treated with the ionophore A23187 and inhibition of penetration by antiplasma membrane antibodies. *J Exp Zool* 225, 157-160.

Stock, C. E. und Fraser, L. R. (1987). The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod* 2, 109-119.

Stock, C. E., Bares, R., Lindsay, K. S., Edmonds, D. K., Fraser, L. R. (1989). Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J Reprod Fertil* 86, 723-730.

Styler, M. und Shapiro, S. S. (1985). Mollicutes (mycoplasma) in infertility. *Fertil Steril* 44, 1-12.

Swenson, C. E., Toth, A., O'Leary, W. M. (1979). *Ureaplasma urealyticum* and human infertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* 31, 660-665.

Swenson, C. E., Toth, A., Toth, L., Wolfgruber, L., O'Leary, W. M. (1980). Asymptomatic bacteriospermia in infertile men. *Andrologia* 12, 7-11.

Swenson, C. E. und O'Leary, W. M. (1980). Examination of human semen infected with *Ureaplasma urealyticum* by fluorescence microscopy. *Arch Androl* 5, 373-377.

Talbot, P., Summers, R. G., Hylander, B. L., Keough, E. M., Franklin, L. E. (1976). The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A 23187. *J Exp Zool* 198, 383-392.

Talbot, P. und Chacon, R. S. (1980). A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human spermatozoa. *Gamete Res* 3, 211-216.

Talbot, P. und Chacon, R. S. (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J Exp Zool* 215, 201-208.

Talkington, D. F., Davis, J. K., Canupp, K. C., Garrett, B. K., Waites, K. B., Huster, G. A., Cassell, G. H. (1991). The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration in vitro. *Fertil Steril* 55, 170-176.

Teague, N. S., Boyarsky, S., Glenn, J. F. (1971). Interference of human spermatozoa motility by *Echerichia coli*. *Fertil Steril* 22, 281-285.

- Terquem, A. und Dadoune, J. P. (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. The sperm cell. André, J. The Hague, Martinus Nijhoff Publishers, 249-252.
- Tesarik, J., Pilka, L., Drahorad, J., Cechova, D., Veselsky, L. (1988). The role of cumulus cellsecreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. *Hum Reprod* 3, 129-132.
- Tesarik, J. (1989). Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoa. *Hum Reprod* 4, 957-961.
- Tesarik, J. und Mendoza, C. (1992). Defective function of a nongenomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly in infertile patients. *Fertil Steril* 58, 793-797.
- Thomas, P. und Meizel, S. (1988). An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by follicular fluid. *Gamete Res* 20, 397- 411.
- Thomas, T. S., Wilson, W. L., Reynolds, A. B., Oliphant, G. (1986). Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor. *Biol Reprod* 35, 691-703.
- Tjoa, W. B., Smolensky, M. H., Hsi, B. P., Steinberger, E., Smith, K. D. (1982). Circannual rhythm in human sperm count revealed by serially independent sampling. *Fertil Steril* 38, 454-459.
- Töpfer-Petersen, E., Heissler, E., Schill, W. B. (1985). The kinetics of acrosome reaction - an additional sperm parameter? *Andrologia* 17, 224-227.
- Töpfer-Petersen, E., Völcker, C., Heissler, E., Schill, W. B. (1987). Absence of acrosome reaction in polyzoospermia. *Andrologia* 19, 225-228.
- Töpfer-Petersen, E., Ensslin, M., Waberski, D. (1996). Kapazitation. *Fertilität* 12, 183-189.
- Toth, A. und Lesser, M. L. (1981). Asymptomatic bacteriospermia in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 36, 88-91.
- Toth, A. und Lesser, M. L. (1982). Ureaplasma urealyticum and infertility: the effect of different antibiotic regimes on the semen quality. *J Urol* 128, 705-707.
- Toth, A., Lesser, M. L., Brooks, C., Labriola, D. (1983). Subsequent pregnancies among 161 couples treated for T-mycoplasma genital-tract infection. *N Engl J Med* 308, 505-507.
- 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.

Van Duin, M., Polman, J. E. M., De Breet, I. T. M., Van Ginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J., Aitken, R. J. (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 51, 607-617.

Van Kooij, R. J., Balerna, M., Roatti, A., Campana, A. (1986). Oocyte penetration and acrosome reactions of human spermatozoa: Correlations with other seminal parameters. *Andrologia* 18, 503-508.

Weidner, W., Krause, W., Schiefer, H. G., Brunner, H., Friedrich, H. J. (1985). Ureaplasma infections of the male urogenital tract, in particular prostatitis, and semen quality. *Urol Int* 40, 5-9.

Weidner, W., Jantos, C., Schiefer, H. G., Haidl, G., Friedrich, H. J. (1991). Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26, 173-183.

WHO (1993). Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer-Verlag.

Wolff, H. und Anderson, D. J. (1988a). Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia. *Fertil Steril* 50, 129-132.

Wolff, H. G. und Anderson, D. J. (1988b). Immunohistologic characterization and quantitation of leucocyte subpopulation in human semen. *Fertil Steril* 49, 497-504.

Wolff, H., Panhans, A., Stolz, W., Meurer, M. (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E.coli*. *Fertil Steril* 60, 154-158.

Xu, C., Sun, G. F., Zhu, Y. F., Wang, Y. F. (1997). The correlation of ureaplasma urealyticum with infertility. *Andrologia* 29, 219-226.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. The physiology of reproduction. Knobil, E. und Neill, J. D. New York, Raven Press. 1, 189-316.

Yao, Y., Ho, P., Yeung, W. S. (2000). Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 73, 680-686.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. F.-M. Köhn, für das Überlassen des Themas und die Möglichkeit, auf einen reichhaltigen Fundus sorgfältig dokumentierter Fälle zurückgreifen zu dürfen. Seine immerwährende Bereitschaft zur Diskussion und nachhaltige Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation haben wesentlich zu deren Gelingen beigetragen. Das mir von ihm entgegengebrachte Vertrauen weiß ich ganz besonders zu schätzen.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill meinen Dank aussprechen für das großzügige Überlassen der Arbeitsmaterialien im Zentrum für Dermatologie und Andrologie. Auch Herrn W. Pabst möchte ich in diesem Sinne danken; er ermöglichte die statistische Analyse im Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Mein spezieller Dank gilt allen, die mich in dieser Zeit unterstützt haben; insbesondere meinen Eltern Jutta und Willi Erdmann, die mich in meinem Berufswunsch und meinen Zielen immer bestärkten, meinem Lebenspartner Jörg Nonhoff und meinen Geschwistern Birgit, Thomas und Astrid Erdmann.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. T.M. Kündig für seine reichhaltige Unterstützung in meinem wissenschaftlichen Weiterkommen danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Iris Erdmann
Geburtsdatum	25. Juli 1969
Geburtsort	Diepholz
Familienstand	Lebensgemeinschaft mit Herrn Jörg Nonhoff, gemeinsamer Sohn, geb. 29.10.2001
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnanschrift	Bötzowstrasse 8, 10407 Berlin
Eltern	Jutta Erdmann, geb. Gnuschke, *05.10.39 Prof. Dr. Willi Erdmann, *31.07.37

Schulische Ausbildung

August 1975 – Mai 1988	Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium
Mai 1988	Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

Juni 1988 - September 1991	Ausbildung zur Physiotherapeutin in Oldenburg Abschluß: Staatlich anerkannte Physiotherapeutin
November 1991 - März 1992	Mitarbeit in Physiotherapiepraxis in Oldenburg

Universitäre Ausbildung

April 1992 - Mai 1998	Studium der Humanmedizin an der Justus- Liebig-Universität Gießen
Mai 1998	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluss: Ärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit

Dezember 1998 - November 2000	Ärztin im Praktikum an der Dermatologischen Klinik, Universitätsspital Zürich
Januar 2001	Erteilung der Approbation als Ärztin
Dezember 1998 – Oktober 2001	Als wissenschaftliche Assistentin tätig auf dem Gebiet der experimentellen Immunologie und Dermatologie unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. T.M. Kündig.
Seit Oktober 2001	Erziehungszeit