

MASTZELLEN UND GESTÖRTE MÄNNLICHE FERTILITÄT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von Max Wassilij Langer
aus Köln

2007

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. G. Haidl
2. Gutachter: Professor Dr. med. D. Klingmüller

Tag der Mündlichen Prüfung: 21. November 2007

Aus der Klinik und Poliklinik
für Dermatologie des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: **Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. Thomas Bieber**

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis	S. 5
1. Abkürzungsverzeichnis	S. 9
2. Einleitung	S. 11
2.1 Allgemeines	S. 11
2.2 Lokalisation und Funktion von Mastzellen	S. 12
2.3 Bedeutung von Mastzellen im Hoden in Bezug auf die männliche Infertilität	S. 13
2.4 Bedeutung der Leukozytospemie in Bezug auf die männliche Infertilität	S. 15
2.5 Zielsetzung der Arbeit	S. 15
3. Material und Methoden	S. 16
3.1 Patienten	S. 16
3.2 Spermiogrammbefund	S. 16
3.3 Quantifizierung der Mastzellen im Durchflusszytometer	S. 18
3.3.1 Funktionsweise des Durchflusszytometers	S. 20
3.4 Quantifizierung von Peroxidase	S. 23
3.5 Quantifizierung der Granulozytenelastase	S. 24
3.6 Spermiantikörper (MAR-Test)	S. 25

3.7 Statistische Testverfahren	S. 26
4. Ergebnisse	S. 26
4.1 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern der Patientengruppe des Gesamtkollektivs	S. 28
4.1.1 Mastzellen und Spermienzahl	S. 28
4.1.2 Mastzellen und Morphologie	S. 29
4.1.3 Mastzellen und Elastase	S. 30
4.1.4 Mastzellen und Peroxidase	S. 31
4.1.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)	S. 32
4.1.6 Mastzellen und Motilität (schnell)	S. 33
4.1.7 Mastzellen und Eosin (vitale)	S. 34
4.1.8 Mastzellen und MAR (IgA)	S. 35
4.1.9 Mastzellen und MAR (IgG)	S. 36
4.2 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern der Patientengruppe mit Normozoospermie	S. 37
4.2.1 Mastzellen und Anzahl der Spermien	S. 37
4.2.2 Mastzellen und Morphologie	S. 38

4.2.3 Mastzellen und Elastase	S. 39
4.2.4 Mastzellen und Peroxidase	S. 40
4.2.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)	S. 41
4.2.6 Mastzellen und Motilität (schnell)	S. 42
4.2.7 Mastzellen und Eosin (vitale)	S. 43
4.2.8 Mastzellen und MAR (IgA)	S. 44
4.2.9 Mastzellen und MAR (IgG)	S. 45
4.3 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern der Patientengruppe mit Oligozoospermie	S. 46
4.3.1 Mastzellen und Spermienzahl	S. 46
4.3.2 Mastzellen und Morphologie	S. 47
4.3.3 Mastzellen und Elastase	S. 48
4.3.4 Mastzellen und Peroxidase	S. 49
4.3.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)	S. 50
4.3.6 Mastzellen und Motilität (schnell)	S. 51
4.3.7 Mastzellen und Eosin (vitale)	S. 52
4.3.8 Mastzellen und MAR (IgA)	S. 53

4.3.9 Mastzellen und MAR (IgG)	S. 54
5. Diskussion	S. 55
6. Zusammenfassung	S. 59
7. Literaturverzeichnis	S. 60
8. Danksagung	S. 63
9. Lebenslauf	S. 64

1. Abkürzungsverzeichnis

Azoospermie: fehlender Nachweis von Spermatozoen im Ejakulat

C: Chymase

COX-2: Cyclooxygenase-2

die: dies (Tag)

Elastase: Enzym Granulozytenelastase

FACS: Fluorescence Activated cell sorter

FSC: Vorwärtsstreulicht

IgA: Immunglobulin A

IgG: Immunglobulin G

IMAC: Immuno Activation

µl: Mikroliter

mg/dl: Milligramm pro Deziliter

Mio: eine Million

Mio/ml: Million pro Milliliter

Max: Maximalwert

Min:	Minimalwert
min:	Minute
MTC:	Mastzellen mit Tryptase und Chymase
Normozoospermie:	normales Ejakulat nach Richtlinien der WHO
n:	Anzahl der Personen
ng/ml:	Nanogramm pro Milliliter
OAT:	Oligo-Asteno-Terato-Zoospermie-Syndrom
Oligozoospermie:	Erniedrigte Spermatozoendichte (< 20 Mio/ml)
r:	Korrelationskoeffizient
PR:	Schwangerschaftsrate
ROS:	Reaktive-Sauerstoff-Spezies
SSC:	Seitwärtsstreulicht
T:	Tryptase
TNF-alpha:	Tumornekrosefaktor-alpha
U/min:	Umdrehungen pro Minute
WHO:	Weltgesundheitsorganisation

2. Einleitung

2.1 Allgemeines

In der Bundesrepublik Deutschland sind ungefähr 1.000.000 Ehepaare im fortpflanzungsfähigen Alter ungewollt kinderlos (Schirren und Schill, 1990). Zu etwa 30% ist die Ursache der ungewollten Kinderlosigkeit auf den Mann zurückzuführen, zu etwa weiteren 30% liegt sie bei der Frau und zu etwa 40% liegt die Ursache bei beiden Partnern (Haidl und Schill, 1990, 1993).

Somit kommt der ungewollten Kinderlosigkeit, die ihre Ursache in der männlichen Unfruchtbarkeit findet eine nicht unerhebliche Bedeutung zu. Es wird diskutiert, ob deren Inzidenz in Zukunft noch weiter ansteigt (Auger et al., 1995; Carlsen et al., 1992). Worin die Ursachen der männlichen Unfruchtbarkeit zu sehen sind, ist in vielen Fällen noch nicht geklärt, auch wenn genetische Faktoren bei einigen Patienten, die unter Oligozoospermie oder Azoospermie leiden, ursächlich sind (Chandley, 1995). Die Entwicklung von Techniken zur Diagnosestellung und Therapie der männlichen Infertilität gestaltet sich aufgrund der vorgenannten Wissenslücke als sehr problematisch.

Die männliche Unfruchtbarkeit basiert in der Mehrzahl der Fälle nicht nur auf einer Komponente, sondern ist meist die Folge von verschiedenen schädigenden Einflüssen, welche sich addieren und letztendlich zur Unfruchtbarkeit führen.

Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten leiden unter einer primären Infertilität und haben somit bisher noch keine Kinder zeugen können, im Gegensatz zu Patienten mit sekundärer Infertilität, welche zwar schon Kinder gezeugt haben, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt infertil geworden sind.

2.2 Lokalisation und Funktion von Mastzellen

Mastzellen kommen in fast allen Organen des menschlichen Körpers vor (Metcalf et al., 1999). Sie sind vor allem im Bindegewebe von Haut, Lunge, Verdauungstrakt und ebenso in den Geschlechtsorganen des Mannes (im interstitiellen Bindegewebe des Hodens, in der Lamina propria der Tubuli seminiferi und im Nebenhoden), sowie den Geschlechtsorganen der Frau lokalisiert (Behrendt et al., 1981).

Abhängig vom Aktivierungszustand fällt der Phänotyp der Mastzellen unterschiedlich aus. So verlieren aktivierte degranulierte Mastzellen auch ihre typische Morphologie. Ebenso mitbestimmend für die Morphologie ist das die Mastzellen umgebende Gewebe. Menschliche Mastzellen werden nach ihren Hauptprodukten, den Proteasen Chymase (C) und Tryptase (T), grob untergliedert. MTC besitzen beide Proteasentypen und MT besitzen lediglich Tryptase. Somit liegt Tryptase in allen menschlichen Mastzellen in nicht unerheblichen Mengen vor (bis zu 10 pg/Zelle) (Metcalf et al., 1999).

Neben den Proteasen Chymase und Tryptase enthalten Mastzellen in ihrem nichtaktivierten Speicherzustand weitere Granula wie Histamin, TNF-alpha und andere Signalmoleküle.

Durch eine IgE-vermittelte oder auch IgE-unabhängige Aktivierung der Mastzellen können diese Granula entleert und die Mastzellprodukte freigesetzt werden (Benoist et al., 2002). Die derartig aktivierten Mastzellen sezernieren zusätzlich Chemokine, Zytokine und Prostaglandine (Benoist et al., 2002; Krishnaswamy et al., 2001; Metcalf et al., 1997).

Als Effektorzellen allergischer Reaktionen übernehmen Mastzellen wichtige Funktionen. Des Weiteren sind sie massgeblich beteiligt bei fibrotischen- und chronisch-entzündlichen Prozessen. Es mehrten sich weiterhin in den letzten Jahren Hinweise auf eine Beteiligung der Mastzellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Welle, 1997).

Besonders bei der Entstehung von fibrotischen Prozessen ist offenbar Tryptase massgeblich beteiligt. So wirkt Tryptase chemotaktisch und mitotisch auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Gruber, 2003).

2.3 Bedeutung von Mastzellen im Hoden in Bezug auf die männliche Infertilität

Sowohl im Hoden als auch im Nebenhoden liegen Mastzellen von der Geburt bis ins Erwachsenenalter als Bestandteile des Bindegewebes vor (Nistal et al., 1984).

Im Wachstum sind Schwankungen in Bezug auf die Anzahl der Mastzellen im Interstitium, in der Tunica albuginea als auch im Bindegewebe des Nebenhodens zu beobachten. So steigt sie im Säuglingsalter leicht an, nimmt im Laufe der Kindheit ab, um dann in der Pubertät erneut anzusteigen. Im Erwachsenenalter nimmt die Anzahl der Mastzellen im testikulären und epididymidalen Bindegewebe kontinuierlich wieder ab (Nistal et al., 1984). Die Anwesenheit von Mastzellen scheint demzufolge physiologischer Natur zu sein und wird erst in erhöhter Anzahl pathologisch.

So schrieben A. Mayerhofer et al., dass im Hoden von Männern mit Spermatogenesestörungen deutlich vermehrt Mastzellen vorkommen, von denen viele aktiviert und degranuliert sind und somit zu erwarten sei, dass Produkte der Mastzellen freigesetzt werden. Ihre Untersuchungen in menschlichen Zellkulturen zeigten, dass Tryptase, das Hauptprodukt der Mastzellen, die Bildung von COX-2 und von Prostaglandinen stimuliert. Bestimmte Prostaglandine (J2/15dJ2) stimulieren dann über den PPARgamma-Rezeptor das Fibroblastenwachstum als Voraussetzung der Fibrose. Als weitere Ergebnisse fanden A. Mayerhofer et al. heraus, dass bei Spermatogenesedefekten, Mastzellvermehrung und deren Aktivierung mit der Expression von COX-2 in interstitiellen Zellen einhergehen. Bei Hoden mit normaler Spermatogenese (und nur wenigen Mastzellen) war COX-2 dagegen nicht nachweisbar.

Rezeptoren für Tryptase sind auf interstitiellen relevanten Prostaglandinrezeptoren auf peritubulären Zellen nachweisbar. Somit ist es möglich, dass Mastzelltryptase COX-2 und Prostaglandinbildung im infertilen Hoden anregt. Dies führt letztlich zur Fibrose in der Tubuluswand (Mayerhofer et al., 2004).

In einer 1981 durchgeführten Studie wurden Hodenbiopsien von 15 fertilen Probanden genommen und mit Biopsien von 70 Patienten mit nicht näher charakterisierter idiopathischer Infertilität verglichen. Es wurde nachgewiesen, dass bei den erkrankten Patienten eine erhöhte Anzahl von Mastzellen im interstitiellen Bindegewebe der Tubuli seminiferi vorlag (Maseki et al., 1981).

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2000 bestätigt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen männlicher Infertilität und dem erhöhten Auftreten von Mastzellen im Bindegewebe und der Lamina propria der Tubuli seminiferi besteht. Hierbei wurden Hodenbiopsien von 12 Patienten mit obstruktiver Azoospermie, sieben Patienten mit idiopathischer Azoospermie, von 30 Patienten mit Varikozele und Oligozoospermie und von acht gesunden, fertilen Männern genommen. Eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Mastzellen wurde nachgewiesen (Yamanaka et al., 2000).

Studien, welche unter Gabe von Mastzellblockern durchgeführt wurden, erhärten die Vermutung, dass Mastzellen und ihre Produkte eine wichtige Rolle im Rahmen der männlichen Infertilität spielen. In den nachfolgend vorgestellten Studien verbesserte sich die Ejakulatqualität nach Einsatz von Mastzellblockern.

Unter Gabe des Mastzellblockers Ketotifen zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung der Spermatozoenkonzentration und -motilität in der Behandlung von Astheno- und Oligozoospermien. Unter dreimonatiger Gabe von Ketotifen 2 x 1 mg/die wurden Patienten (n=17) mit einer idiopathischen normogonadotropen Oligozoospermie (Spermatozoenkonzentration $< 20 \times 10^6$ /ml) behandelt (Schill et al., 1986).

Durch Medikation mit dem Mastzellblocker Tranilast (n=17; Spermatozoenkonzentration $< 10 \times 10^6$ /ml; 300 mg/die) konnte in einer Studie von Hibi et al. eine signifikante Erhöhung der Gesamtspermatozoenzahl erreicht werden (Hibi et al., 2001).

Yamamoto führte 1995 eine placebo-kontrollierte, randomisierte Studie zum Einsatz des Mastzellblockers Rizaben durch. Hierbei bekamen Männer (n=50) mit idiopathischer Infertilität (Spermatozoenkonzentration $< 5 \times 10^6$ /ml; normale Spermatozoenmorphologie $> 60\%$; Spermatozoenmotilität $> 10\%$) Rizaben 300 mg/die über 12 Wochen. In der Verumgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Spermatozoenkonzentration, Spermatozoenmotilität und der Anzahl der motilen Spermatozoen. Im Vergleich zur Schwangerschaftsrate (PR) der Placebogruppe (PR=0%) betrug diese in der Verumgruppe 28% (Yamamoto et al., 1995).

2.4 Bedeutung der Leukozytospemie in Bezug auf die männliche Infertilität

Die Bedeutung einer erhöhten Leukozytenkonzentration im Ejakulat als Ursache einer männlichen Infertilität wird kontrovers diskutiert (Aitken und Baker, 1995). Diverse Untersuchungen haben ergeben, dass erhöhte Leukozytenzahlen im Ejakulat typisch sind für das Vorliegen einer urogenitalen Infektion (Caldamone et al., 1980; Weidner et al., 1991; Krieger et al., 1996). Nach WHO liegt eine Leukozytospemie bei einer Leukozytenzahl von mehr als 1×10^6 peroxidase-positiver Leukozyten/ml im Ejakulat vor.

Erhöhte Leukozytenzahlen sind in der Vergangenheit immer wieder mit anderen pathologischen Ejakulatparametern in Beziehung gebracht worden (Gonzales et al., 1989; Korte-bani, 1992). So zeigten verschiedene Studien, dass erhöhte Leukozytenkonzentrationen vor allem mit einer Verminderung der Spermienmotilität und -konzentration assoziiert sind (Wolff et al., 1990; Omu et al., 1999). Die Mechanismen, welche auf die Spermatozoen einwirken, sind jedoch zurzeit noch ungenügend erforscht. Einerseits scheinen die Leukozyten selbst eine tragende Rolle zu spielen (Wolff et al., 1990), andererseits wird diskutiert, inwiefern sich auch die Sekretionsprodukte der Leukozyten, wie Lymphokine, Monokine und die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die mit einer Störung der Spermatozoen-Oozyten-Fusion einhergeht, negativ auf die Fertilität auswirken (Aitken et al., 1995).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung von Mastzellen im Ejakulat von Männern mit primärer Infertilität zu untersuchen. Da bislang Mastzellen nur im Ausstrich beurteilt werden konnten, wurde für diese Arbeit das Durchflusszytometer gewählt, um eine hohe Spezifität und Sensitivität zu erreichen. Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang von Mastzellen mit weiteren Parametern untersucht werden. Die auf Korrelation untersuchten Parameter sind Spermienzahl, Morphologie, Elastase, Peroxidase, Motilität (gesamt), Motilität (schnell), Eosin (vitale), MAR (IgA) und MAR (IgG). Um auch verschiedene Formen der Infertilität zu berücksichtigen, wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe besteht aus der Gesamtheit der Patienten, die zweite Gruppe rekrutiert sich aus Männern, bei denen eine Normozoospermie vorliegt, und die dritte Gruppe bezieht sich auf Patienten mit Oligozoospermie. Alle untersuchten Probanden sind Patienten der Abteilung für Andrologie der Universitätsklinik Bonn, welche unter Infertilität leiden.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Untersucht wurden Ejakulate von 22 bis 55-jährigen (Mittelwert: 37) Patienten, welche die Fertilitätssprechstunde der Andrologischen Abteilung der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn aufgrund unerfüllten Kinderwunsches konsultierten.

Es wurden insgesamt 100 Proben (n=100) untersucht.

Diese Proben wurden eingeteilt in drei Gruppen. Die erste Gruppe besteht aus dem Gesamtkollektiv der untersuchten Patienten (n=100), die zweite Gruppe besteht aus Patienten mit Normozoospermie (normales Ejakulat gemäß den Richtlinien der WHO; n=52) und die dritte Gruppe aus Patienten mit Oligozoospermie (Spermatozoenzahl < 20 Mio/ml; n=48).

3.2 Spermiogrammbefund

Gemäß den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation wurde routinemäßig ein standardisierter Spermiogrammbefund erstellt (Allam et al., 2006).

Die Gewinnung des Ejakulates erfolgte durch Masturbation nach einer Karenzzeit von 2 bis 7 Tagen. Anschließend wurde die Bestimmung der Menge des Ejakulates, der Farbe, des pH-Wertes und der Konsistenz im physikalischen Befund vorgenommen.

Die Anzahl der Spermatozoen pro Milliliter wurde aus dem Nativpräparat und der Anteil toter Spermien mit Hilfe der Eosin-Vitalfärbung (tote Spermien mit geschädigter Plasmamembran nehmen selektiv bestimmte Farbstoffe, z.B. Eosin, auf) ermittelt.

Für alle Patienten wurde im Labor ein zytogrammgefärbtes Ausstrichpräparat nach der im Labor üblichen Shorr-Färbung für morphologische Spermienausstriche angefertigt:

(1)	absolute Fixierung	(Fa. Merck Darmstadt)	10 Min.
(2)	70% Äthanol Fixierung		1 Min.
(3)	Hämalaun nach Mayer	(Fa. Merck Darmstadt)	10 Min. 30 Sek.
(4)	fließendes Wasser		3 Min.
(5)	70% Äthanol		ca. 10 Sek.
(6)	95% Äthanol		ca. 10 Sek.
(7)	Shorr'sche Farblösung	(Fa. Merck Darmstadt)	1 Min.
(8)	2 mal 95% Äthanol		je 10 Sek.
(9)	3 mal absolut Äthanol		je 5 Min.
(10)	2 mal Xylol		je 5 Min.

Die Differenzierung morphologisch normaler und pathologischer Spermatozoen erfolgte durch Untersuchung im Lichtmikroskop. Hierbei wurde gemäß des Düsseldorfer Klassifikationsschemas der Spermatozoenmorphologie (Hofmann und Haider, 1985) mit einem Olympus-Mikroskop (Objektiv 100x, Okular 10x) unter 1000facher Ölimmersion mikroskopiert.

Um die gefärbten Ausstrichpräparate morphologisch zu beurteilen, werden 100 Spermien bezüglich Normalität und pathologischen Veränderungen beurteilt. Es werden gleichzeitig die pathologischen Spermien nach Veränderungen des Kopfes (überstreckt, akrosomgestört), des Mittelteils (Zytoplasmarestes), und des Schwanzes (atypisch gefärbt, Strukturdefekte, abgeknickt, rudimentär) differenziert. Die Quantifizierung von Leukozyten und Makrophagen wurde ebenfalls mit diesem Mikroskop durchgeführt.

Um die Motilität der Spermatozoen zu bestimmen, wird ein Nativpräparat erstellt.

Hierbei wird ein Tropfen (10 µl) Ejakulat auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Nachfolgend werden mittels Zählgerät die Spermien mit Motilität und die Spermien ohne Bewegung ausgezählt. Die Motilität wird für die hier vorliegende Arbeit unterteilt in die Gesamtzahl der motilen Spermien und die Zahl der schnell motilen Spermien.

Die Bestimmung der Spermienzahl wird vorgenommen, indem in einem Reagenzglaschen 950 μl 10%ige NaCl-Lösung und 50 μl Ejakulat pipettiert werden. Anschliessend werden 10 μl der vor- genannten Verdünnung in die Neubauer Zählkammer pipettiert und die Spermien ausgezählt.

3.3 Quantifizierung der Mastzellen im Durchflusszytometer

Um die Mastzellen genau zu quantifizieren, wurden sie mit dem Antikörpermarker CD 117 (Fa. Becton Dickinson) markiert. CD 117 ist ein monoklonales anti-humanes Reagenz der Maus zur Identifizierung von Zellen, welche CD 117 exprimieren. Es bindet an die Rezeptoren für den Stammzellenfaktor (SCF) und erkennt selektiv NIH-3T3-Zellen, die mit humanem c-Kit transfiziert wurden – dem Gen, das SCF-R kodiert. CD 117 blockiert nicht das Epitop, das den Stammzellenfaktor (SCF) bindet. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechender Isotyp verwendet (Fa. Becton Dickinson).

Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben (jeweils 500 μl) nach folgendem Schema vorbereitet:

1. 500 μl Ejakulat wurden mit FACS-Puffer (Fa. Becton Dickinson) gewaschen und zentrifugiert (5 min. bei 1300 U/min. (Zentrifuge Fa. Kendro).
2. Nach Abschütten, Zugabe von 10 μl CD 117 Marker bzw. Isotyp (Fa. Becton Dickinson).
3. Kühlung der Probe für 15 min. im Kühlschrank.
4. Erneutes Waschen der Probe mit FACS-Puffer (Fa. Becton Dickinson).
5. Abschütten und weiteres Zentrifugieren (5 min. bei 1300 U/min. (Zentrifuge Fa. Kendro).
6. Abwerfen des Überschusses und Messen im Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson).

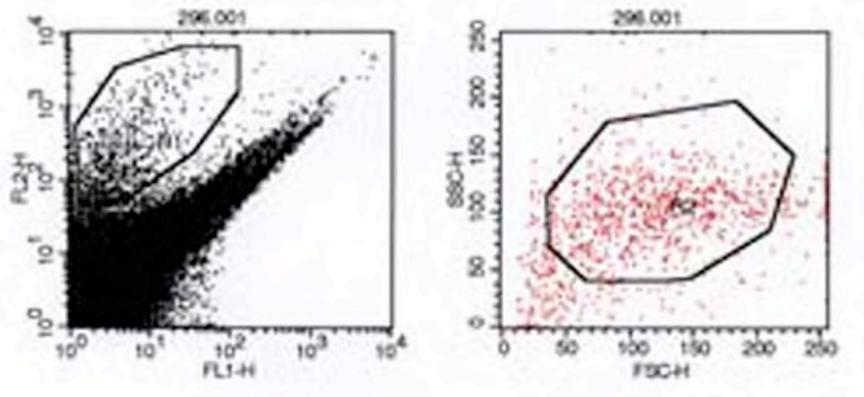


Abb. 1: Spermiogrammbefund mit Mastzellen in R1 und R2
 (R1 = CD 117 positive Zellen; R2 = physikalische Region
 der Leukozyten)
 (FL1-H, FL2-H = spezifische Fluoreszenz;
 SSC-H = Seitwärtsstreulicht, FSC-H Vorwärtsstreulicht)

Isotypfärbungen zur Negativkontrolle wurden wie folgt vorbereitet:

1. 500 µl Ejakulat wurden mit FACS-Puffer (Fa. Becton Dickinson) gewaschen und zentrifugiert (5 min. bei 1300 U/min. (Zentrifuge Fa. Kendro), sowie mit 10 µl eines entsprechenden PE-konjugierten Isotyps (FA Becton Dickinson) gefärbt.
2. Kühlung der Probe für 15 min. im Kühlschrank.
3. Erneutes Waschen der Probe mit FACS-Puffer (Fa. Becton Dickinson).
4. Abschütten und Zentrifugieren (5 min. bei 1300 U/min. (Zentrifuge Fa. Kendro)).
5. Abwerfen und Messen im Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson).

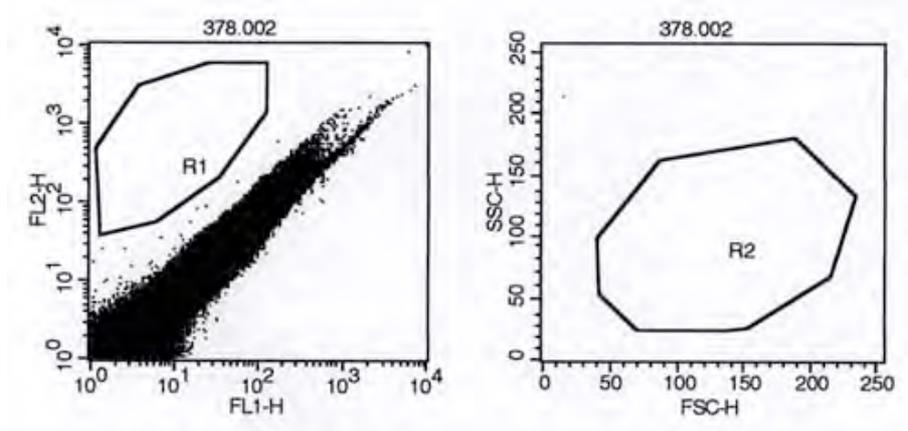


Abb. 2: Spermiogrammbeurteilung einer negativ-Isotypkontrolle ohne Mastzellen in R1 und R2

3.3.1 Funktionsweise des Durchflusszytometers

Im Durchflusszytometer werden suspendierte Einzelzellen durch einen Lichtstrahl (Laser) geführt. In Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung senden die Zellen charakteristische Lichtsignale aus, welche mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden können. Hierbei quantifiziert die Durchflusszytometrie im Vergleich zur Mikroskopie simultan mehrere optische Eigenschaften (Parameter) kompletter Zellen mit hoher Durchsatzrate.

Die zu messenden Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit (hier FACS-Puffer der Fa. Becton Dickinson), welche eine laminare Strömung erzeugt (Hüllstrom), eingemessen. Die Querschnittsverringering in der Messküvette bedingt, dass sowohl der laminare Proben- als auch der Hüllstrom beschleunigt und dadurch verjüngt werden. Dieser Prozess wird auch hydrodynamische Fokussierung genannt. Die beiden Strömungen vermischen sich hierbei nicht. Der daraus resultierende Effekt liegt in einer Abstandsvergrößerung zwischen direkt aufeinander folgenden Zellen, welche somit jeweils einzeln den Laserstrahl passieren können und so auch als einzelne Zellen gemessen werden können.

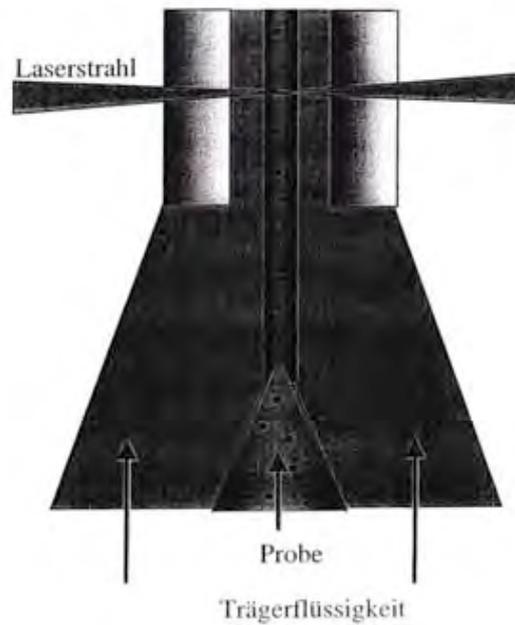


Abb. 3: Funktionsweise des Durchflusszytometers

Die relative Größe der Zellen wird im Vorwärtsstreulicht (FSC) gemessen. Hierbei entsteht eine Lichtbeugung proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße), gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes. Im Seitwärtsstreulicht (SSC) wird die relative Granularität oder ihre interne Komplexität gemessen, wobei hier die Lichtbrechung und Reflexion proportional zur Zellkomplexität oder -granularität in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird.

Beispiel für FSC/SSC: Lysiertes Vollblut

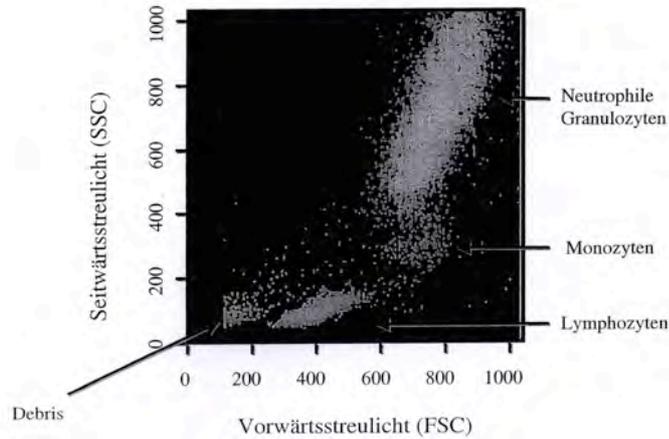


Abb. 4: Charakteristische Verteilung von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie (Aus FACSScan User manual, BDBiosciences)

Des Weiteren wird im Durchflusszytometer die der jeweiligen Zellen spezifische Fluoreszenz (FL1, FL2, FL3, FL4) und die jeweils entsprechende Fluoreszenzintensität gemessen. Die Fluoreszenzen werden in Abhängigkeit vom verwendeten Gerätetyp (hier 3-4 Fluoreszenzen (1-2 Laser): BD FACSCalibur™) sowie der Probenvorbereitung gemessen. Die Wellenlänge ist hierbei vom entsprechenden Fluorochrom abhängig. Wie auch beim schon vorgestellten Seitwärtsstreulicht werden auch die Fluoreszenzen in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen.

Das entstehende Fluoreszenzlicht entsteht, indem das Fluorochrom die Energie des Laserlichtes absorbiert und nachfolgend die Energie wieder freigibt und zwar entweder in Form von Schwingungsenergie und Wärme oder in Form von Emission eines Photons mit einer grösseren Wellenlänge (= geringere Energie). Die bei diesem Vorgang entstehende Wellenlängendifferenz zwischen Absorption und Emission wird Stoke's Shift genannt.

Die Messgeschwindigkeit beträgt hierbei maximal 4000 Zellen pro Sekunde (BD FACSScan™).

Wie entsteht Fluoreszenzlicht ?

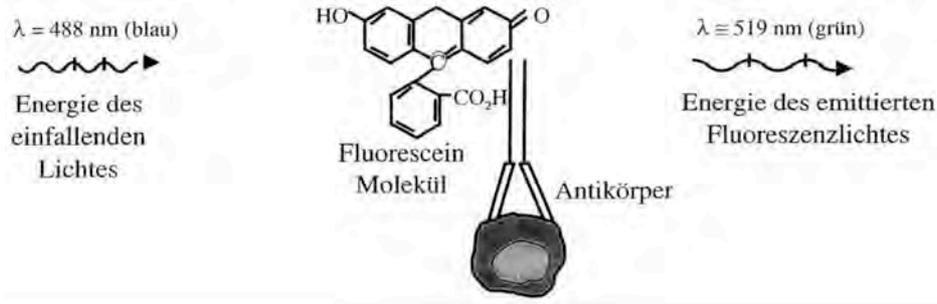


Abb. 5: Entstehung von Fluoreszenzlicht

3.4 Quantifizierung der Peroxidase

Messdurchführung:

Es wird zunächst eine „stock solution“ hergestellt, indem 50 ml Wasser, 50 ml Ethanol (96%) und 125 mg Benzidine (Fa. Sigma) gemischt und nachfolgend zu je 4 ml aliquotiert werden.

Vor der eigentlichen Färbung ist die Arbeitslösung durch Mischung von 4 ml „stock solution“ und 5 μl H_2O_2 (30%) herzustellen.

Zur nachfolgenden Färbung werden 20 μl Ejakulat und 20 μl Arbeitslösung gemischt und fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 160 μl Medium können die peroxidasepositiven Zellen in der Neubauer Zählkammer ausgezählt werden. Aufgrund des Verdünnungsfaktors von 1:10 erhält man nach Division durch 10 die Anzahl der Zellen in Mio/ml.

3.5 Quantifizierung mit Granulozytenelastase

Prinzip:

Leukozyten, wie z.B. polymorphkernige Granulozyten, sowie Makrophagen enthalten in ihren zahlreichen Lysosomen eine Enzymausstattung mit großer hydrolytischer oder proteolytischer Aktivität (Dingle, 1977). Durch den hohen Gehalt an Elastase in den Granula der Entzündungszellen, wird diesem Enzym eine besonders große Bedeutung zugeschrieben. Durch Messen der Elastasemenge lässt sich eine zuverlässige Aussage über die Menge und den jeweiligen Aktivitätszustand der Leukozyten im Ejakulat treffen (Reinhardt et. al., 1994).

Um die Granulozytenelastase im Seminalplasma zu quantifizieren, wurde der IMAC (Immuno Activation) PMN Elastase Test (Firma Merck, Darmstadt) benutzt.

Antikörperfragmente (Fab) gegen humane PMN Elastase werden kovalent an Meerrettichperoxidase gebunden, wobei Antikörperkonjugate entstehen. Diese Antikörperkonjugate und die in der Probe enthaltene PMN Elastase bilden in einer Immunreaktion Aggregate. In den Antikörperkonjugaten, welche nicht aggregiert entstehen, wird die Peroxidase durch hohe H_2O_2 -Konzentrationen inhibiert.

In den Antikörperkonjugaten welche aggregiert entstehen, katalysiert die Peroxidase die nachfolgend aufgeführte Reaktion:



Bei der oben dargestellten Reaktion ist die Menge des gebildeten Chinoniminfarbstoffes der Peroxidaseaktivität und damit der Konzentration an PMN Elastase direkt proportional. Die Menge des Farbstoffes wurde unter Zuhilfenahme des Photometers bei 405 nm gemessen und mittels des Computerprogramms elias-med-Technik[®] in ng/ml umgerechnet.

Messdurchführung:

100 µl des durch zentrifugieren (625 g) gewonnenen Seminalplasmas, werden mit 200 µl Probenverdünnungsmedium im Verhältnis 1:3 verdünnt. Es werden jeweils 25 µl der verdünnten Proben, der zum Test gehörenden Eichstandards und die Kontrollproben mit 100 µl Antikörperkonjugat vermischt. 250 µl Farbreagenz (1 Teil Substratlg. A + 1 Teil Diluent) werden nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C jeweils zu den Proben, Eichstandards und Kontrollen hinzugegeben. Nach erneuter 10 minütiger Inkubation bei 37°C werden die ablaufenden Reaktionen jeweils mit 1000 µl Stoppreagenz angehalten. Zur Messung im Photometer werden nachfolgend 200 µl auf eine Mikrotiterplatte gegeben.

Hersteller: Alle Reagenzien wurden von der Fa. Merk, Darmstadt bezogen.

3.6 Spermienantikörper (MAR-Test)

Prinzip: (MAR) P

Zum Nachweis von Spermienantikörpern (IgG und IgA) im Ejakulat wurde der direkte Sperm-Mar Test (Fa. Glück, Hamburg) verwendet. Er basiert auf dem Prinzip der Antigen/Antikörper-Reaktion, wobei unbehandeltes Ejakulat mit IgG- bzw. IgA-Antikörpern beschichteten Latexpartikeln vermischt wird. Dieser Mischung wird beim MAR-Test (IgG) zusätzlich ein Antiserum gegen menschliches IgG beigegeben. Diejenigen Spermatozoen, welche nicht mit Antikörpern behaftet sind, schweben frei zwischen den Latexpartikeln. Die Latexpartikel haften in Gruppen aneinander und beweisen somit den korrekten Ansatz des Testes. Sind auf Spermien Antikörper vorhanden, so haften diese an den beweglichen Spermien und führen zu einer Agglutination.

Testdurchführung:

MAR-Test (IgA)

Es werden 10 µl frisches Ejakulat sowie 10 µl IgA-beschichtete Latexpartikel auf den Objektträger gegeben und vermischt. Nach Abdeckung mit dem Deckgläschen wird die Nasspräparation unter dem Mikroskop (Hellfeld- oder Phasenkontrast) betrachtet.

MAR-Test (IgG)

Jeweils 10 µl frisches Ejakulat, 10 µl IgG-beschichtete Latexpartikel sowie 10 µl Antiserum werden auf einen Objektträger gegeben. Zuerst werden Ejakulat und die IgG-beschichteten Partikel gemischt und danach mittels eines Deckgläschens das Antiserum beigemischt. Nach Abdeckung mit dem Deckgläschen wird die Nasspräparation unter dem Mikroskop (Hellfeld- oder Phasenkontrast) betrachtet.

3.7 Statistische Testverfahren

Die ermittelten Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik, Dokumentation und Datenverarbeitung der Universität Bonn ausgewertet. Hierbei kam zur Prüfung der Daten auf Signifikanz das Statistikprogramm SPSS 11.0 zur Anwendung. Eine signifikante Korrelation liegt bei $p = < 0,05$ (nach Pearson) vor.

Die Auflistung der Daten und deren graphische Auswertung erfolgte mittels des Programms Microsoft Excel 2004 für Mac, Version 11.0.

4. Ergebnisse

Es werden nachfolgend die Zusammenhänge der untersuchten Patientengruppen und den weiteren Parametern dargestellt.

Die Gruppen unterteilen sich in das Gesamtkollektiv ($n = 100$), sowie dessen Unterteilung in Patienten mit Normozoospermie ($n = 52$) und Oligozoospermie ($n = 48$).

Die weiteren untersuchten Parameter, welche in Bezug auf die oben genannten Gruppen gesetzt und auf Korrelation untersucht wurden, sind:

1. Mastzellen und Spermienanzahl
2. Mastzellen und Morphologie
3. Mastzellen und Elastase
4. Mastzellen und Peroxidase
5. Mastzellen und Motilität (gesamt)
6. Mastzellen und Motilität (schnell)
7. Mastzellen und Eosin (vitale)
8. Mastzellen und MAR (IgA)
9. Mastzellen und MAR (IgG)

4.1 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs (n = 100).

4.1.1 Mastzellen und Spermienzahl

Um zu untersuchen, ob der Nachweis von Mastzellen im Ejakulat Einfluss auf die Spermienzahl haben könnte, wurde eine Korrelation zwischen Mastzellzahl und Spermienzahl berechnet ($r = 0,1$; $n = 100$).

Zwischen der Anzahl der Mastzellen im Ejakulat und der Anzahl an Spermien der einzelnen Probanden konnte jedoch statistisch gesehen kein Zusammenhang nachgewiesen werden. ($p = 0,28$).

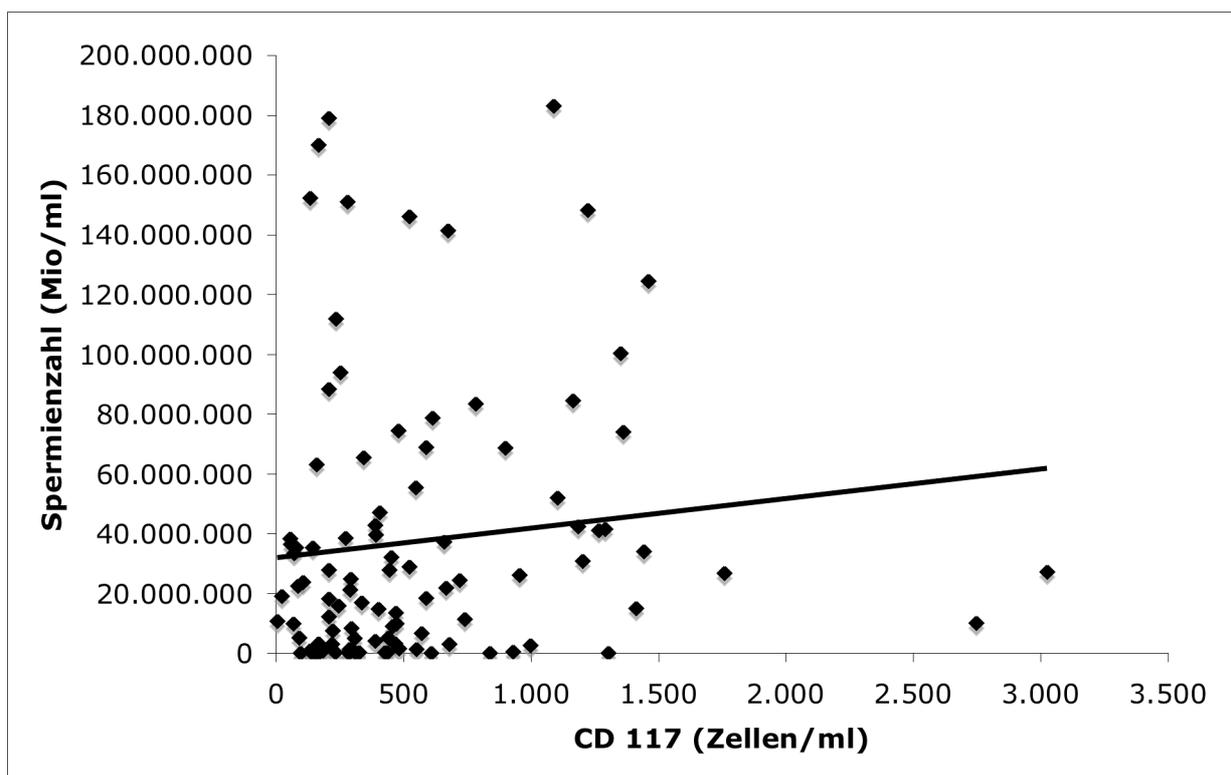


Abb. 6: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und der Spermienzahl in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs (n = 100).

4.1.2 Mastzellen und Morphologie

Des Weiteren wurde untersucht, ob Mastzellen einen Einfluss auf die Spermienmorphologie haben könnten.

Es konnte jedoch keine Korrelation ($r = 0,1$; $n = 80$) festgestellt werden zwischen der Anzahl der Mastzellen im Zusammenhang mit der Morphologie der Spermien ($p = 0,47$).

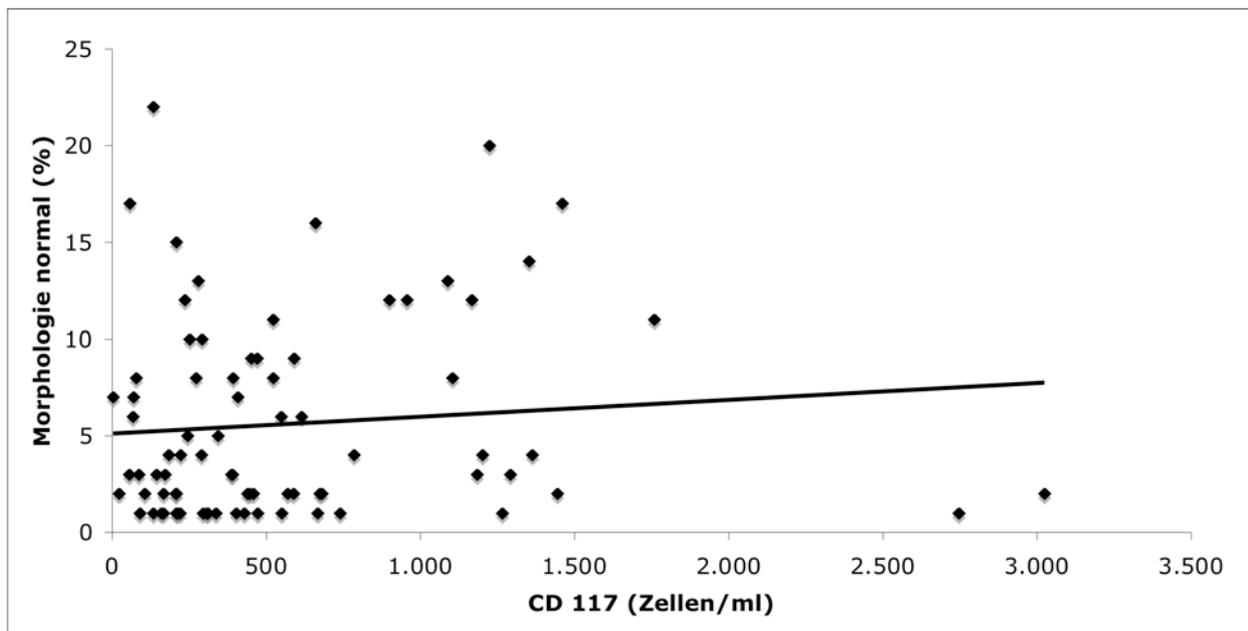


Abb. 7: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und der Normalmorphologie in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 80$).

4.1.3 Mastzellen und Elastase

Als Marker für eine Erhöhung von neutrophilen Granulozyten als Hinweis auf eine Entzündung im Nebenhoden (Allam et al., 2006) wurde die Elastase mit dem Nachweis von Mastzellen korreliert ($r = 0,2$; $n = 55$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und Menge an Elastase im Ejakulat konnte statistisch kein Zusammenhang festgestellt werden ($p = 0,45$).

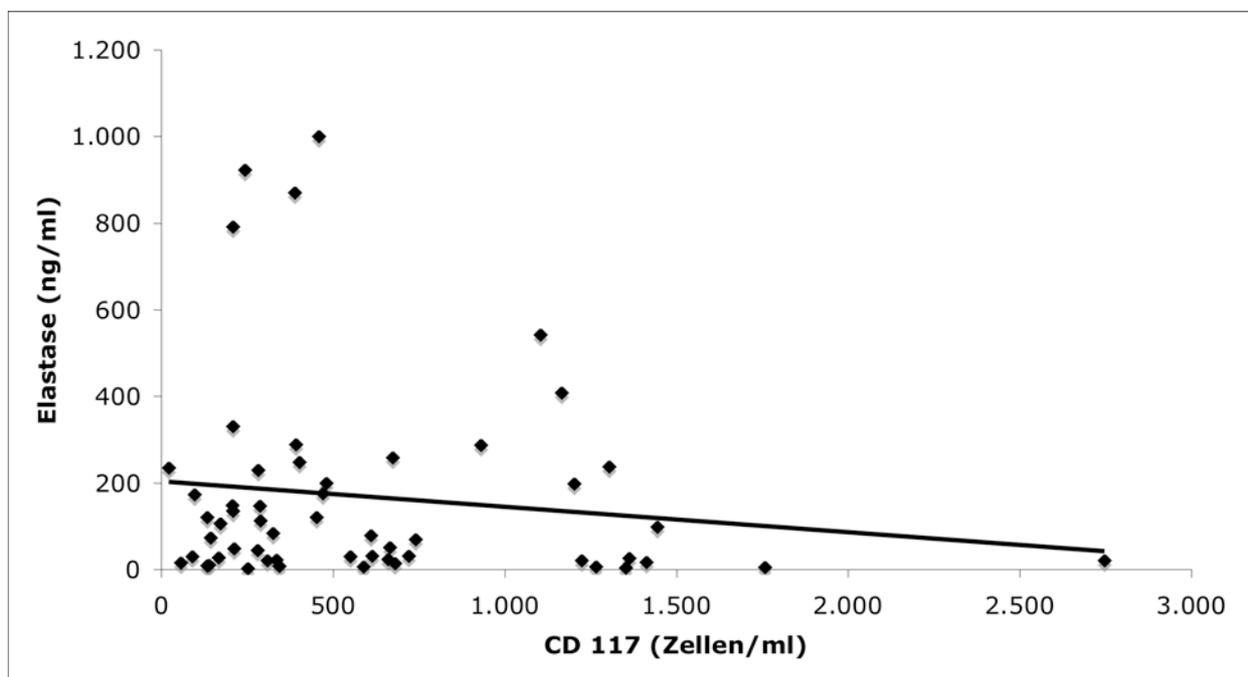


Abb. 8: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Elastase in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 55$).

4.1.4 Mastzellen und Peroxidase

Ebenfalls als Nachweis für eine Entzündung dient die Peroxidase (Allam et al., 2006), die mit der Anzahl von Mastzellen korreliert wurde ($r = -0,1$; $n = 24$).

Zwischen der Anzahl der Mastzellen und der Menge an gemessener Elastase lässt sich kein statistischer Zusammenhang feststellen ($p = 0,54$).

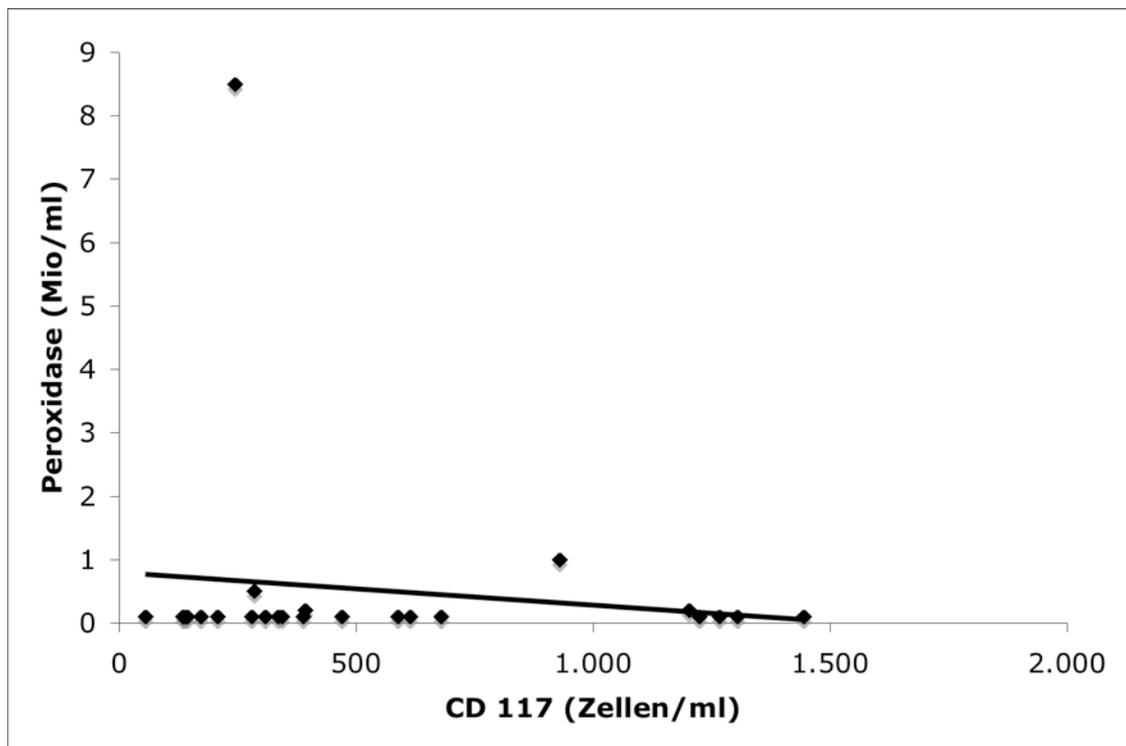


Abb. 9: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Peroxidase in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 24$).

4.1.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)

Bei einem Großteil der Männer mit primärer Infertilität findet sich eine gestörte Motilität (Allam et al., 2006). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Mastzellen und Motilität zu untersuchen, wurde diese mit dem Nachweis von Mastzellen korreliert ($r = -0,1$; $n = 85$).

Zwischen der Anzahl der Mastzellen im Ejakulat und der Anzahl der gesamten motilen Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang zeigen ($p = 0,75$).

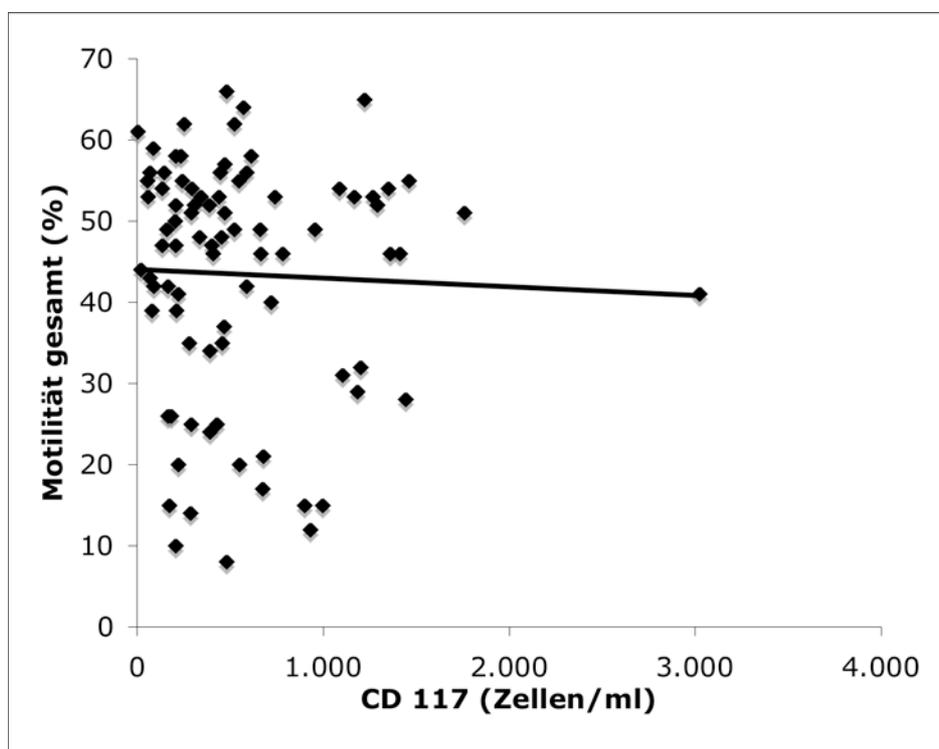


Abb. 10: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Gesamtmotilität in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 85$).

4.1.6 Mastzellen und Motilität (schnell)

Zudem wurde der Zusammenhang zwischen Mastzellen und progressiv-motilen Spermien untersucht ($r = -0,01$; $n = 72$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und der Anzahl der schnell motilen Spermien lässt sich kein statistischer Nachweis erbringen ($p = 0,55$).

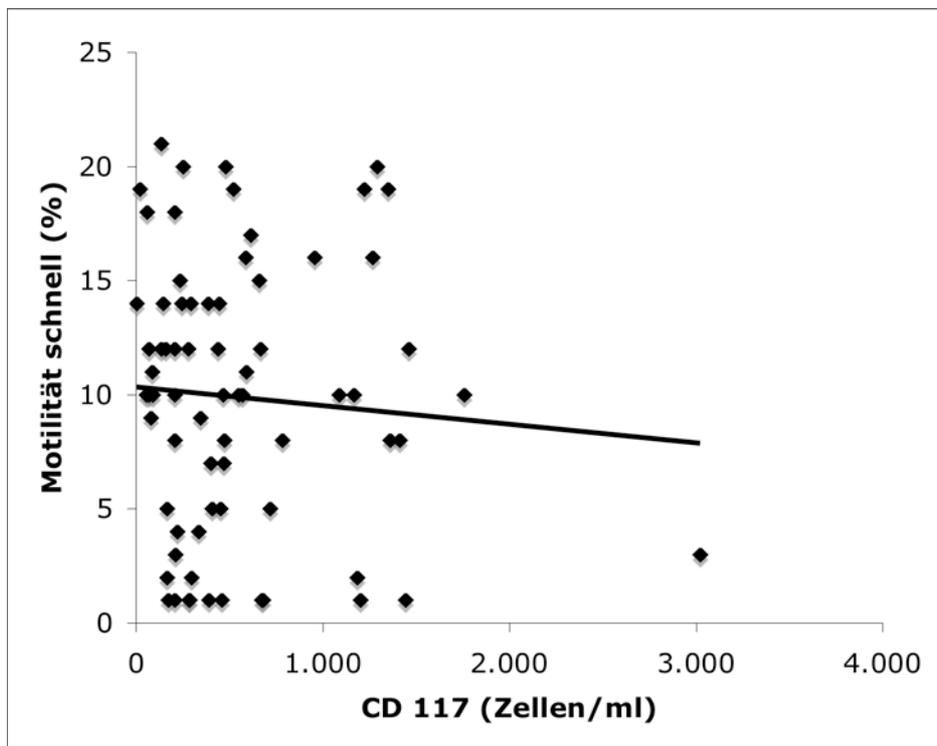


Abb. 11: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und schnell-motilen Spermien (WHO-a) in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 72$).

4.1.7 Mastzellen und Eosin (vitale)

Um zu untersuchen, ob Mastzellen auf die Vitalität Einfluss nehmen könnten, wurde eine Korrelation zwischen Mastzellen und Spermiovitalität berechnet ($r = -0,1$; $n = 81$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und Anzahl der in der Eosin-Vitalfärbung toten Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang zeigen ($p = 0,93$).

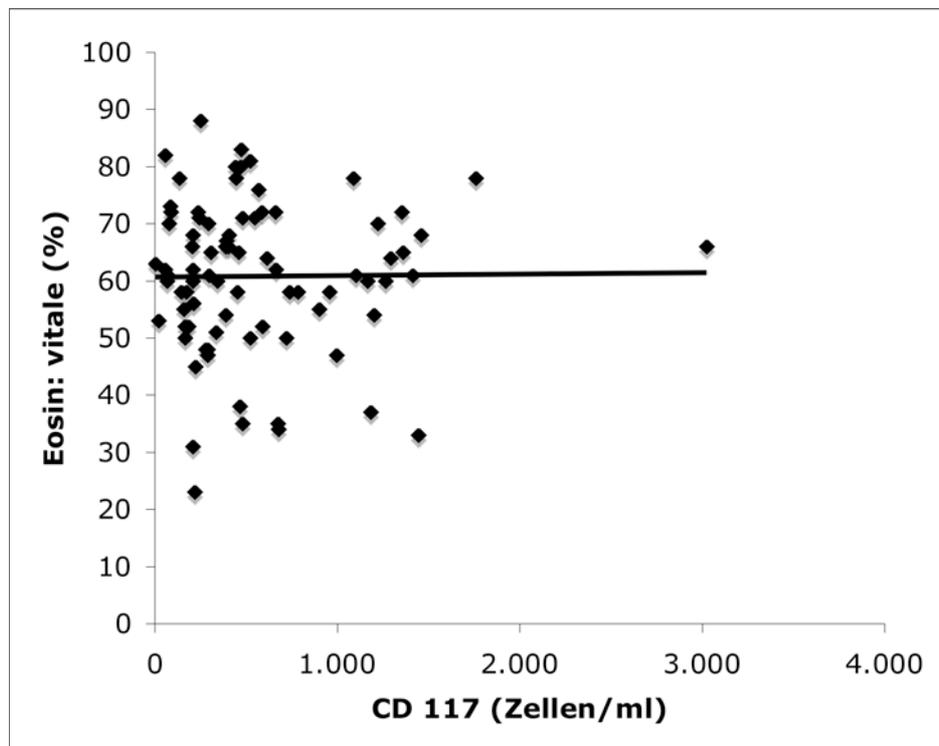


Abb. 12: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Vitalität (Eosin) in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 81$).

4.1.8 Mastzellen und MAR (Immunglobulinklasse A)

Auf Spermien gebundene Antikörper können auf eine immunologische Störung bei Männern mit primärer Infertilität hinweisen (Allam et al., 2006), so dass wir eine Korrelation zwischen Mastzellen und Antikörpern auf Spermien der Immunglobulinklasse A (IgA) untersuchten ($r = 0,5$; $n = 23$).

Eine Korrelation zwischen Mastzellen und der im MAR-Test gemessenen prozentualen Menge an IgA lässt sich in der statistischen Auswertung sowohl nach Pearson als auch nach Spearman signifikant nachweisen (Pearson = 0,03; Spearman = 0,04).

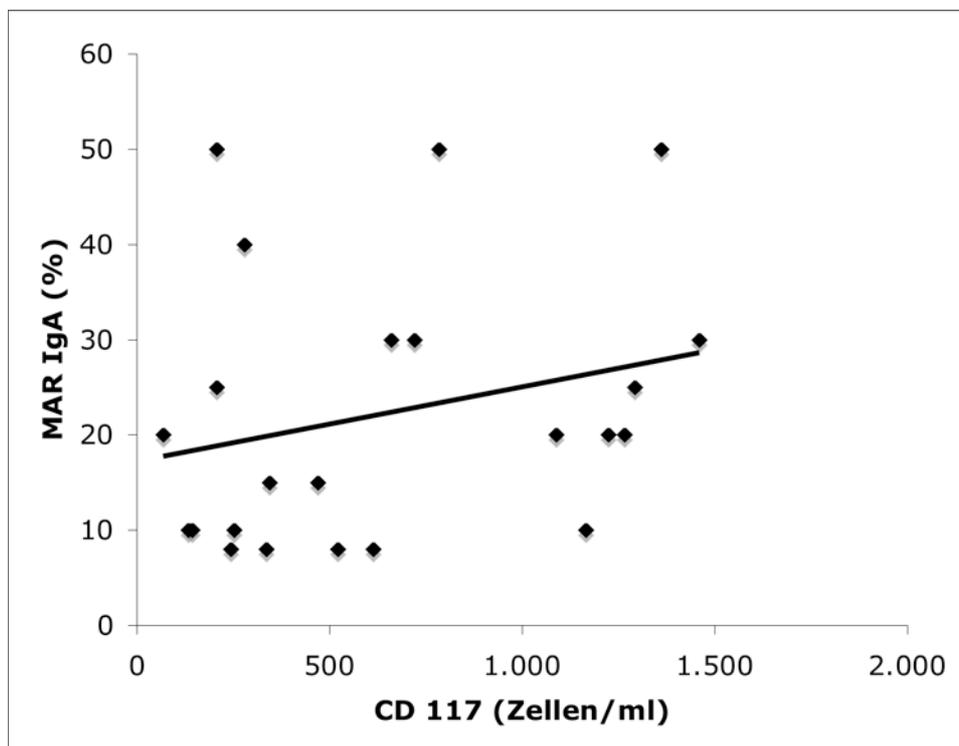


Abb. 13: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgA) in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 23$).

4.1.9 Mastzellen und MAR (Immunglobulin G)

Auf Spermien gebundene Antikörper können auf eine immunologische Störung bei Männern mit primärer Infertilität hinweisen (Allam et al., 2006), so dass wir eine Korrelation zwischen Mastzellen und Antikörpern auf Spermien der Immunglobulinklasse G (IgG) untersuchten ($r = 0,2$; $n = 24$).

Zwischen Anzahl an Mastzellen und der Menge an gemessenem IgG im MAR-Test lässt sich kein statistischer Zusammenhang feststellen ($p = 0,134$).

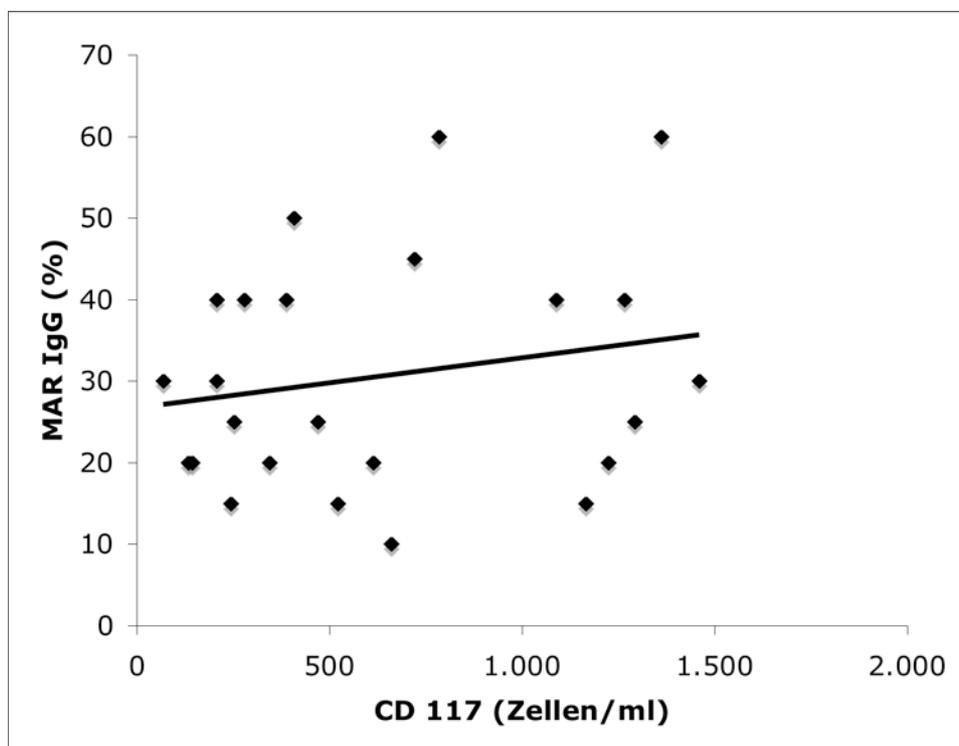


Abb. 14: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgG) in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 24$).

4.2 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern in der Patientengruppe mit Normozoospermie.

4.2.1 Mastzellen und Anzahl der Spermien

Des Weiteren wurde die Gruppe der infertilen Männern mit Normozoospermie untersucht und zunächst eine Korrelation zwischen Mastzellen und Spermienzahl berechnet ($r = -0,1$; $n = 52$).

Zwischen der Anzahl an gemessenen Mastzellen und der Menge an gemessenen Spermien lässt sich statistisch kein Zusammenhang zeigen ($p = 0,78$).

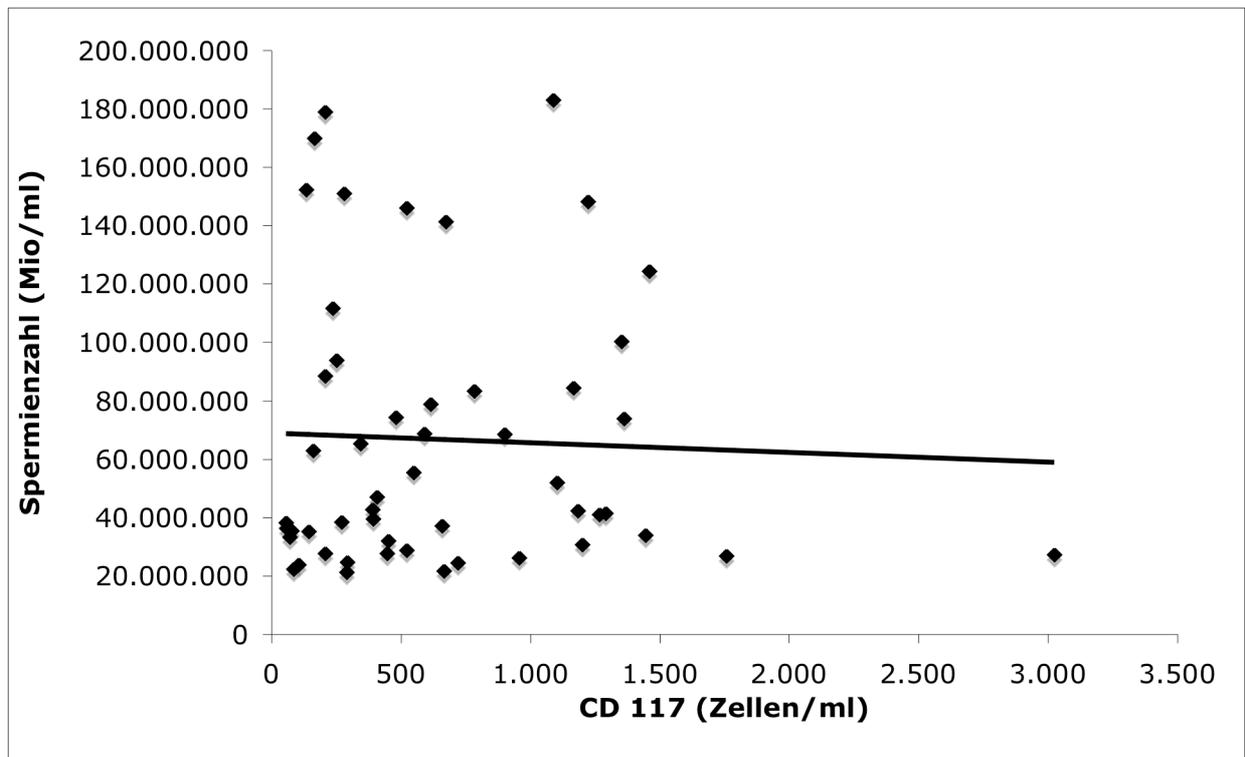


Abb. 15: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und der Spermienzahl in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 52$).

4.2.2 Mastzellen und Morphologie

Zudem wurde auch in dieser Gruppe die Korrelation zwischen Mastzellen und Morphologie berechnet ($r = -0,01$; $n = 49$).

Zwischen der Anzahl an gemessenen Mastzellen und der Anzahl an morphologisch normalen Spermien lässt sich statistisch kein Zusammenhang darstellen ($p = 0,98$).

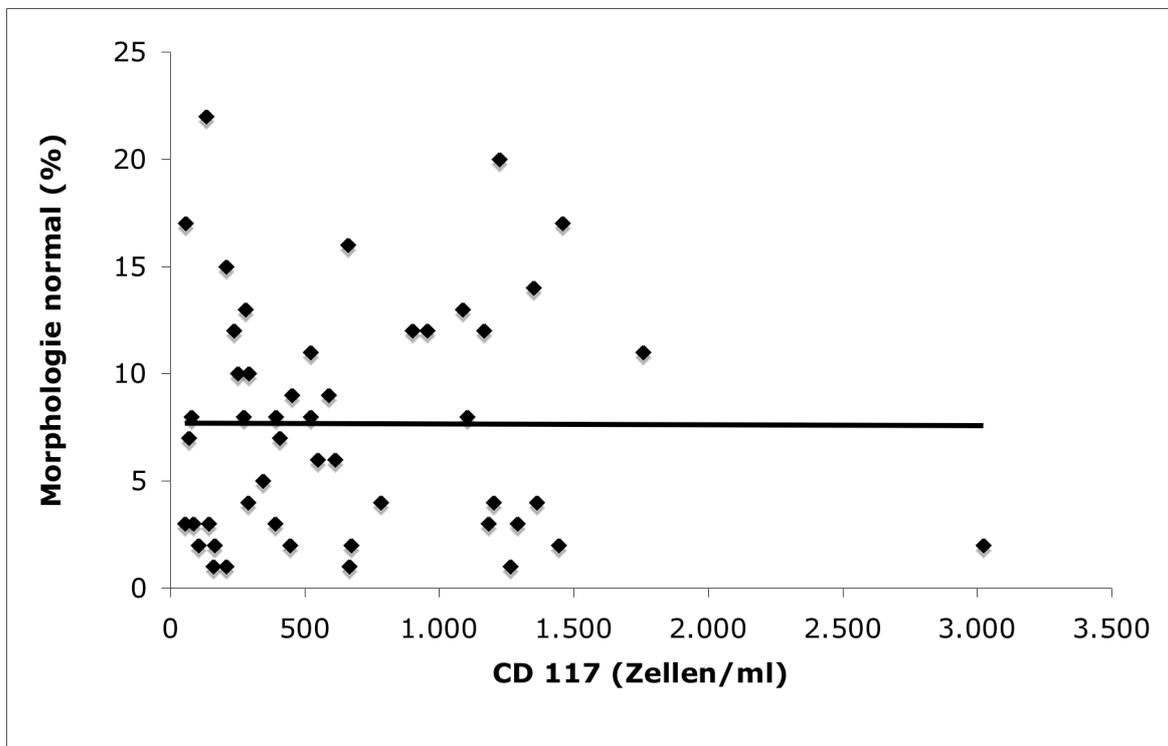


Abb. 16: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und der Normalmorphologie in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 49$).

4.2.3 Mastzellen und Elastase

Durch die Elastase kann Rückschluss auf die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten gezogen werden, die bei chronischen Nebenhodenentzündungen erhöht im Ejakulat nachweisbar sind (Allam et al., 2006). Um Rückschlüsse auf die Beteiligung von Mastzellen bei solchen chronischen Nebenhodenentzündungen schließen zu können, wurde eine Korrelation zwischen Mastzellen und Elastase berechnet ($r = -0,1$; $n = 26$).

Zwischen der Zahl der gemessenen Mastzellen und der Menge an gemessener Elastase lässt sich jedoch statistisch kein Zusammenhang zeigen ($p = 0,58$).

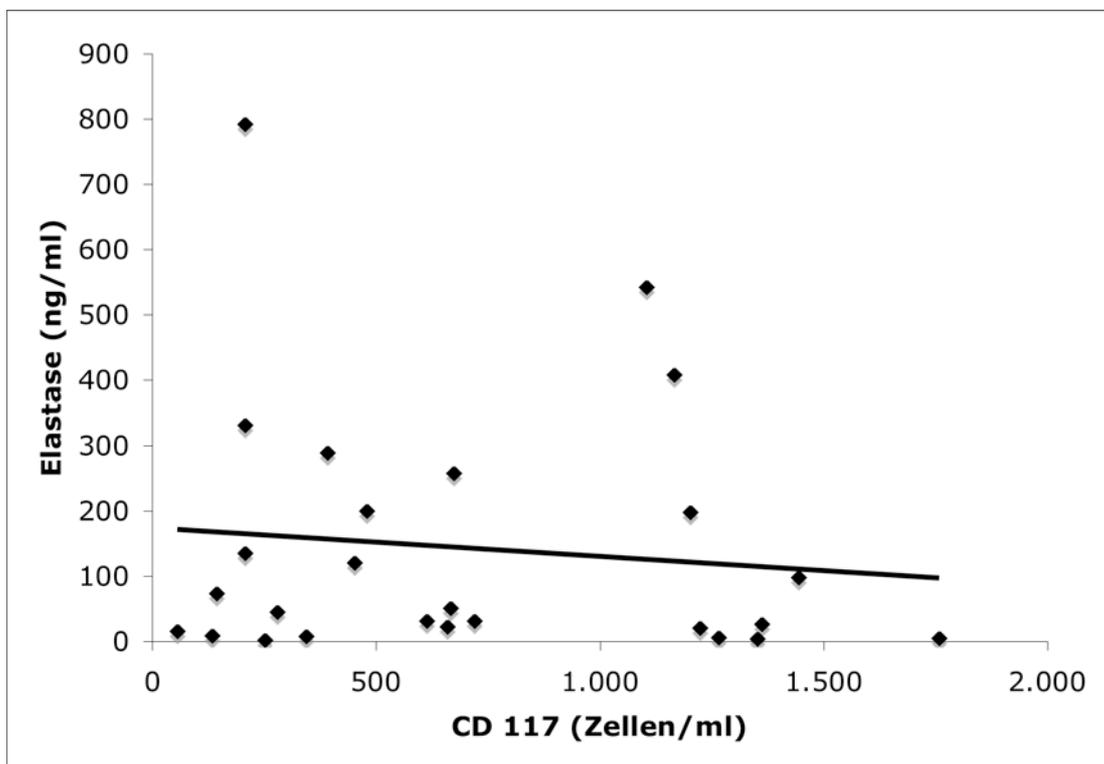


Abb. 17: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Elastase in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 26$).

4.2.4 Mastzellen und Peroxidase

Ebenso wie die Elastase kann eine erhöhte Peroxidase auf Entzündungen im Nebenhoden hindeuten (Allam et al., 2006), so dass auch hier eine Korrelation zwischen Mastzellen und Peroxidase berechnet wurde ($r = 0,2$; $n = 12$).

Zwischen der Anzahl der gemessenen Mastzellen und der Menge an gemessener Peroxidase lässt sich statistisch kein Zusammenhang aufführen ($p = 0,6$).

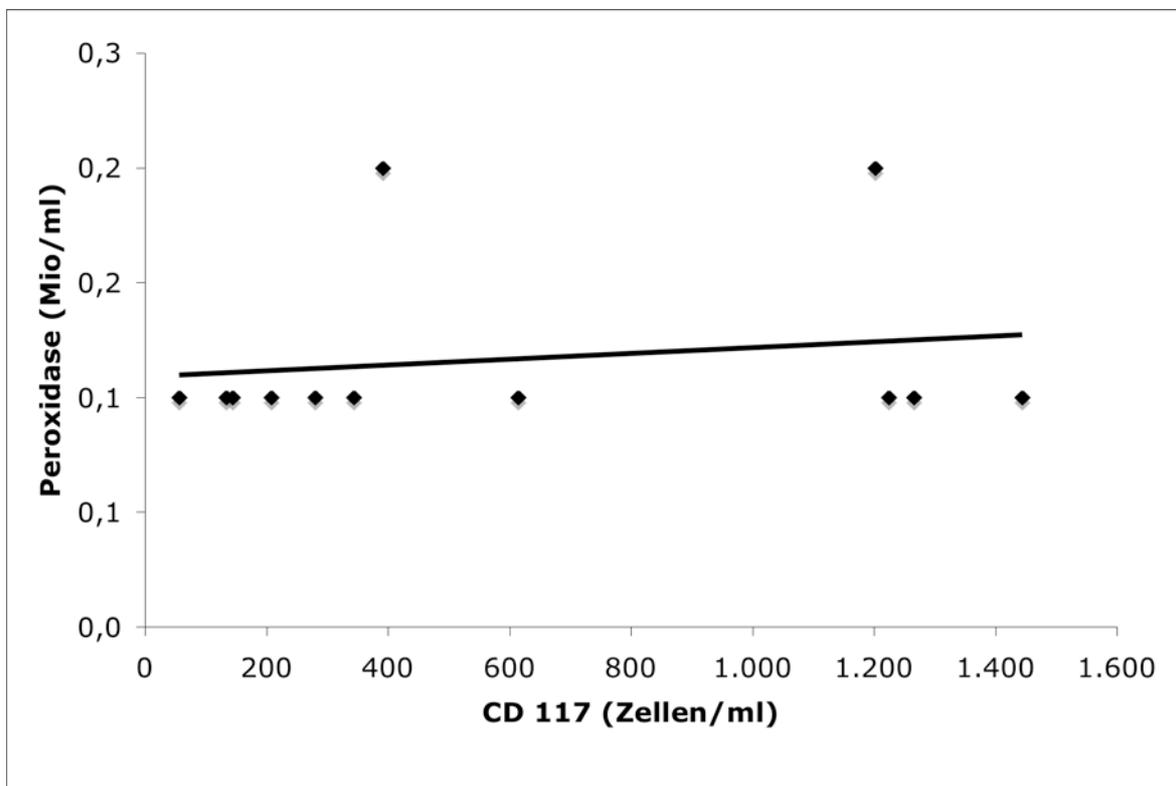


Abb. 18: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Peroxidase in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 12$).

4.2.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)

Um zu untersuchen, ob der Nachweis von Mastzellen im Ejakulat Einfluss auf die Motilität haben könnte, wurde eine Korrelation zwischen Mastzellzahl und Motilität berechnet ($r = -0,1$; $n = 50$). Zwischen der Anzahl an gemessenen Mastzellen und der Gesamtzahl der motilen Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang darstellen ($p = 0,55$).

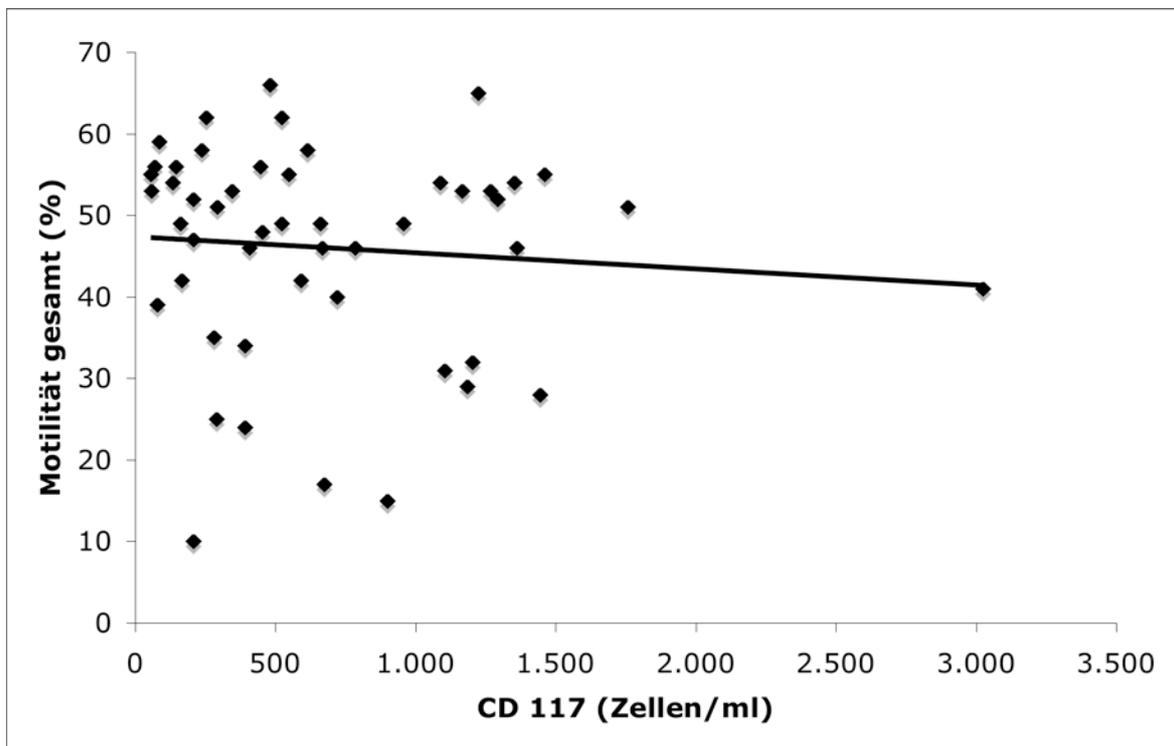


Abb. 19: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Gesamtmotilität in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 50$).

4.2.6 Mastzellen und Motilität (schnell)

Zudem wurden Mastzellen mit progressiv-motilen Spermien korreliert ($r = -0,2$; $n = 45$).

Zwischen der Anzahl an gemessenen Mastzellen und der Anzahl der schnell motilen Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang aufzeigen ($p = 0,21$).

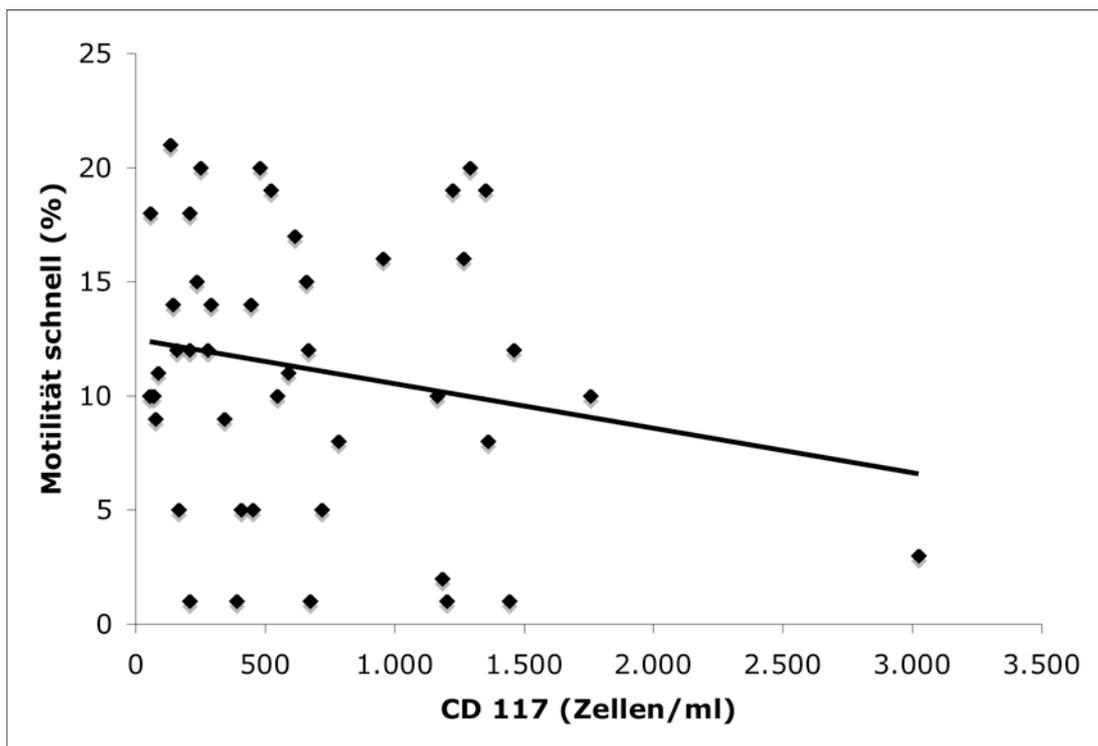


Abb. 20: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und schnell-motilen Spermien (WHO-a) in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 45$).

4.2.7 Mastzellen und Eosin (vitale)

Auch in der Gruppe der infertilen Männer mit Normozoospermie wurde eine Korrelation zwischen Mastzellen und Spermiovitalität berechnet ($r = -0,01$; $n = 50$).

Zwischen der Anzahl der Mastzellen und der Anzahl an in der Eosin-Vitalfärbung tot dargestellten Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang aufführen ($p = 0,77$).

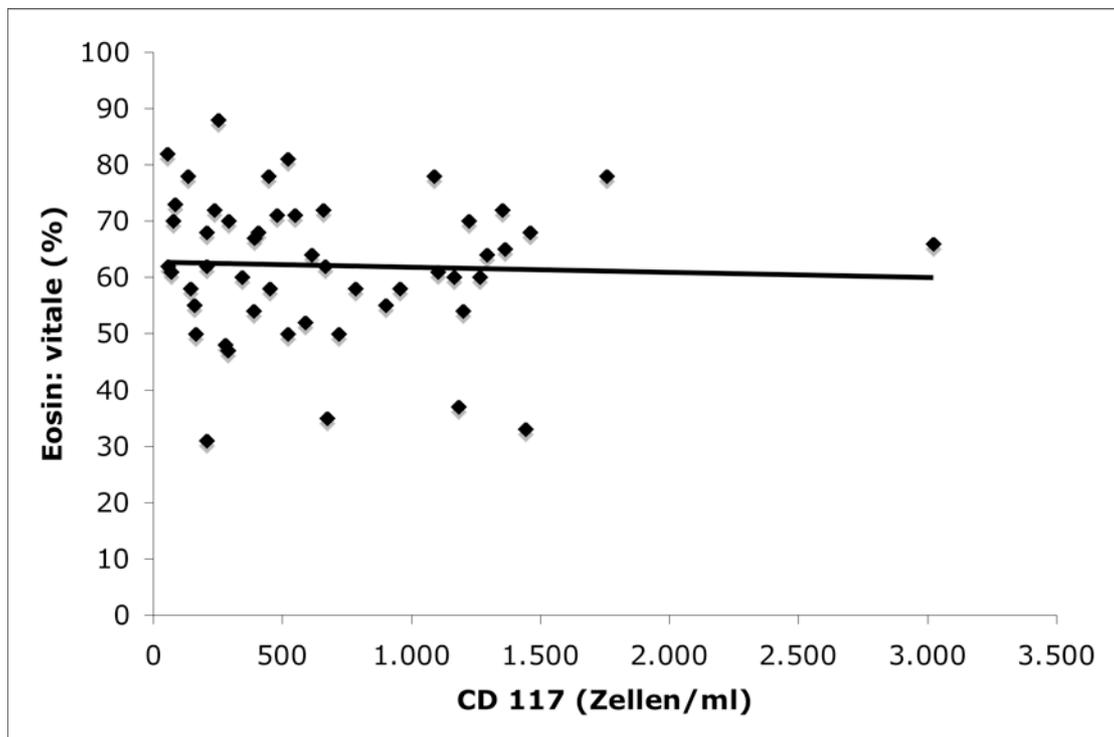


Abb. 21: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Vitalität (Eosin) in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 50$).

4.2.8 Mastzellen und MAR (IgA)

In der Gruppe der infertilen Männer mit Normozoospermie wurde zudem die Korrelation zwischen Mastzellen und Immunglobulin A berechnet ($r = 0,5$; $n = 19$).

Zwischen der Zahl der Mastzellen und der prozentualen Menge an im MAR-Test gemessenen IgA lässt sich in der statistischen Auswertung ein signifikanter Zusammenhang zeigen (Pearson = 0,05; Spearman = 0,04).

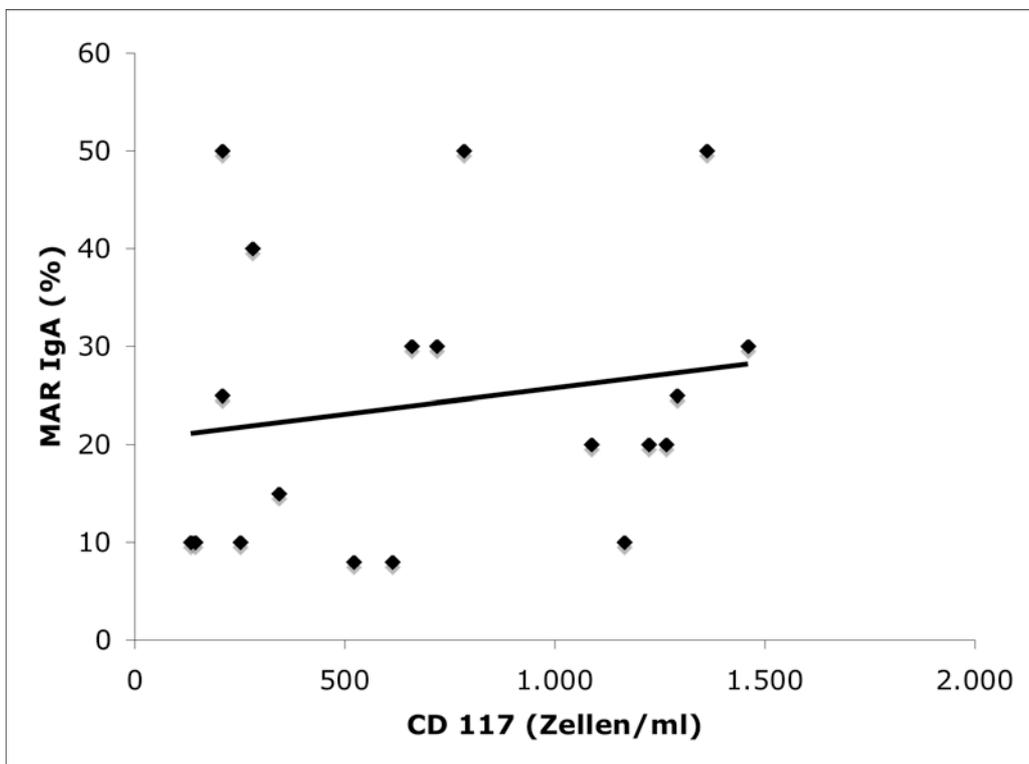


Abb. 22: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgA) in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 19$).

4.2.9 Mastzellen und MAR (IgG)

In der Gruppe der infertilen Männer mit Normozoospermie wurde weiterhin die Korrelation zwischen Mastzellen und Immunglobulin G berechnet ($r = 0,2$; $n = 20$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und der prozentualen Menge an im MAR-Test gemessenen IgG lässt sich statistisch kein Zusammenhang aufführen ($p = 0,42$).

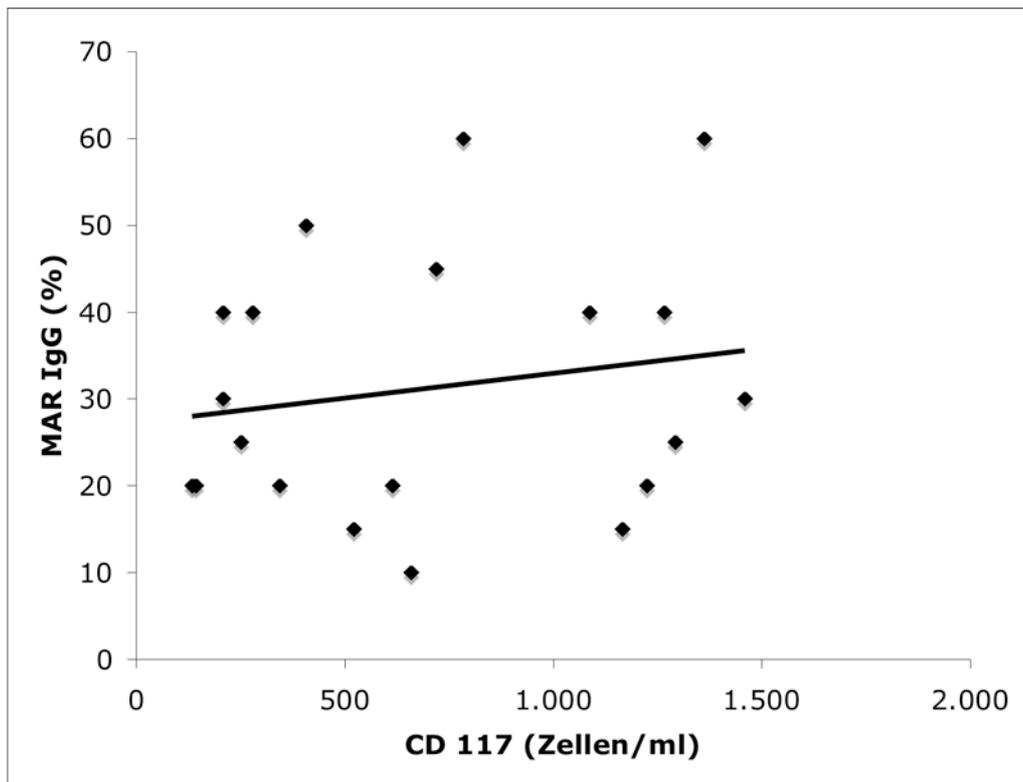


Abb. 23: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgG) in der Patientengruppe mit Normozoospermie ($n = 20$).

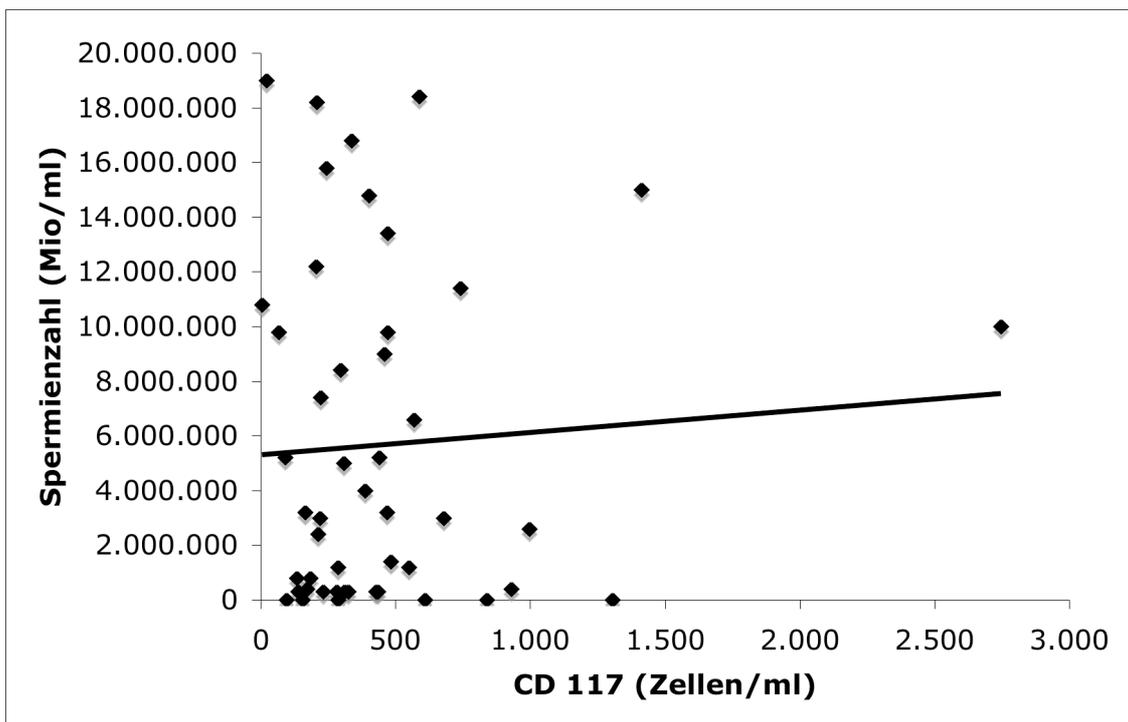
4.3 Zusammenhänge zwischen Mastzellen im Ejakulat und weiteren untersuchten Parametern im Patientengut mit Oligozoospermie.

Nach Analyse des Gesamtpatientengutes wurde die Subgruppe von Patienten mit primärer Infertilität und nachgewiesener Oligozoospermie gesondert untersucht.

4.3.1 Mastzellen und Spermienzahl

Zunächst wurde in dieser Gruppe ein Zusammenhang zwischen Mastzellen und Spermienzahl untersucht ($r = 0,1$; $n = 48$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und der gemessenen Menge an Spermien lässt sich statistisch kein Zusammenhang darstellen ($p = 0,67$).



4.3.3 Mastzellen und Elastase

Da häufig bei infertilen Männern mit Oligozoospermie eine chronische Entzündung des Nebenhodens vorliegt (Allam et al., 2006) wurde ein Zusammenhang zwischen Elastase und Mastzellen untersucht ($r = -0,12$; $n = 29$).

Zwischen der Zahl der gemessenen Mastzellen und der Menge an gemessener Elastase lässt sich statistisch kein Zusammenhang darstellen ($p = 0,5$).

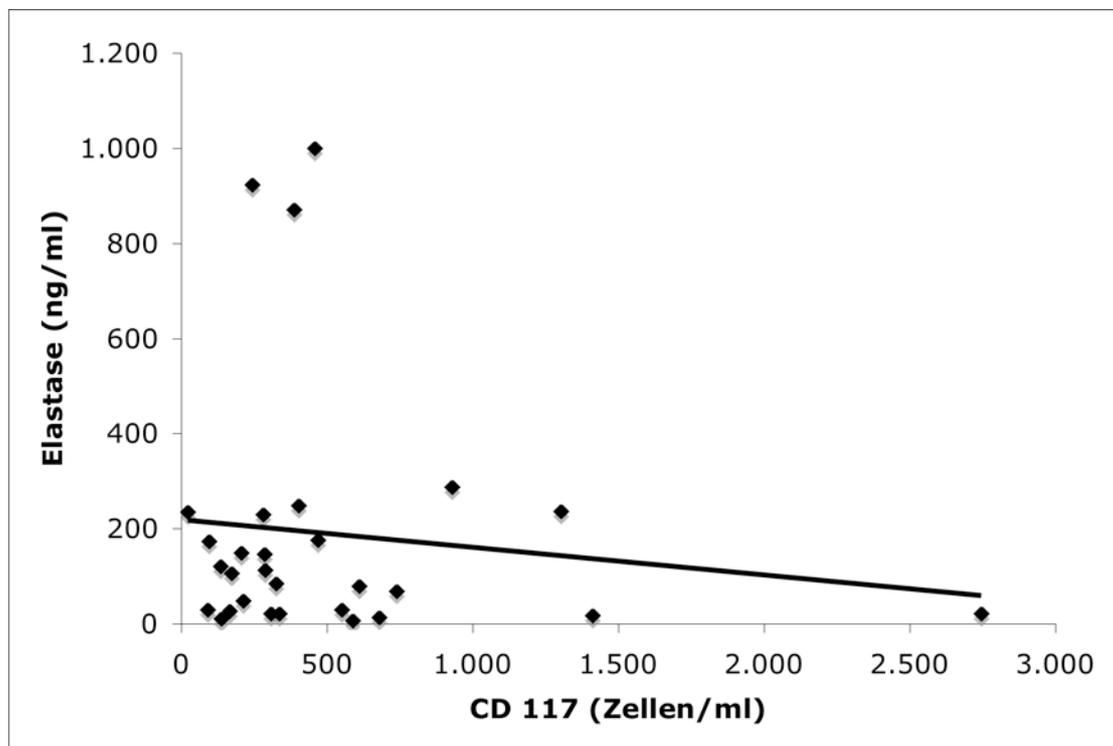


Abb. 26: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Elastase in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 29$).

4.3.4 Mastzellen und Peroxidase

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Mastzellen und Peroxidase untersucht ($r = -0,34$; $n = 13$), die ebenfalls bei Entzündungen im Nebenhoden erhöht nachweisbar ist (Al-lam et al., 2006).

Zwischen den gemessenen Mastzellen und der Menge an gemessener Peroxidase lässt sich statistisch kein Zusammenhang erkennen ($p = 0,42$).

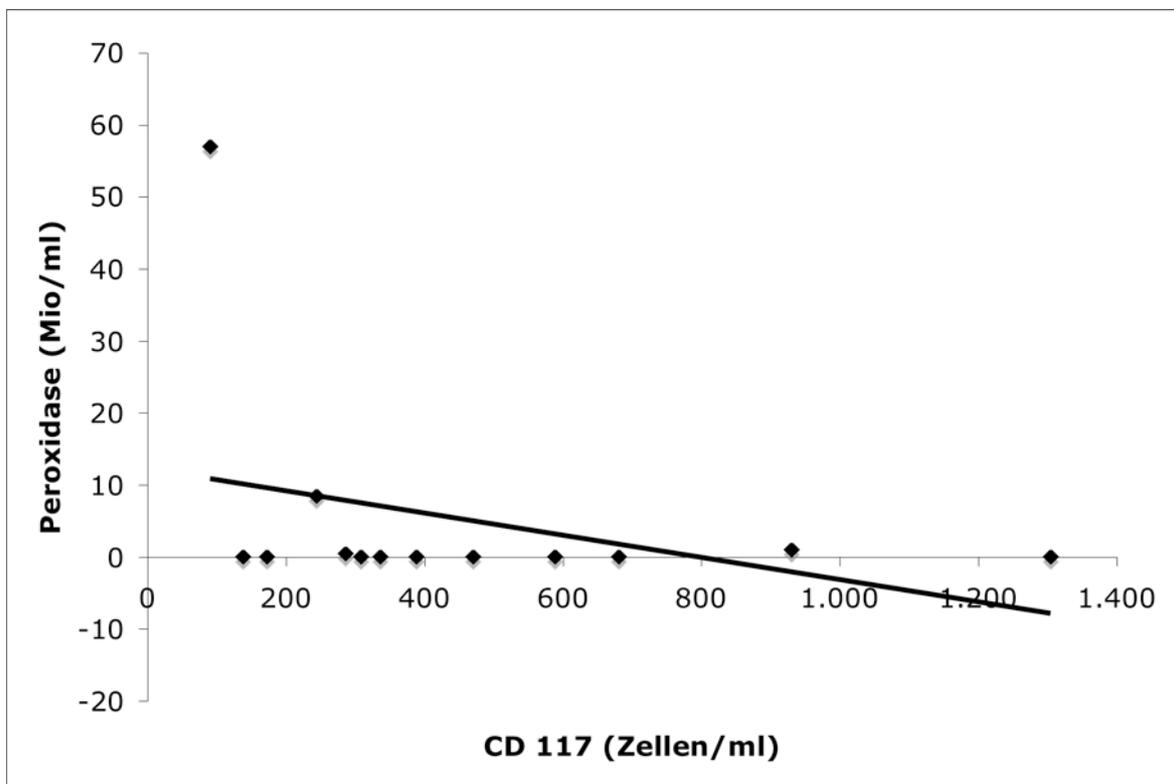


Abb. 27: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Peroxidase in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 13$).

4.3.5 Mastzellen und Motilität (gesamt)

Um zu untersuchen, ob Mastzellen in dieser Gruppe einen Einfluss auf die Motilität haben könnten, wurde auch hier eine Korrelation berechnet ($r = -0,17$; $n = 35$).

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und der Gesamtzahl an gemessen motilen Spermien lässt sich statistisch kein Zusammenhang darstellen ($p = 0,17$).

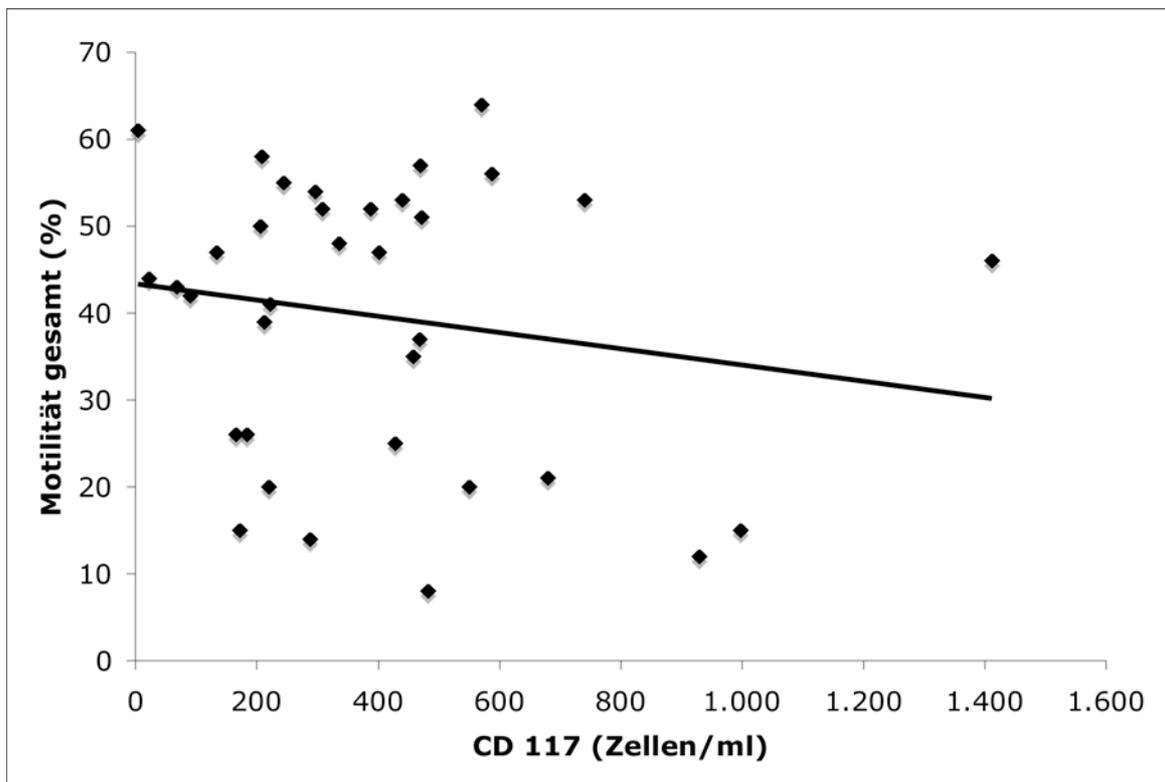


Abb. 28: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Gesamtmotilität in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 35$).

4.3.6 Mastzellen und Motilität (schnell)

Zusätzlich wurden Mastzellen mit progressiv-motilen Spermien korreliert ($r = -0,2$; $n = 27$). Zwischen der Zahl der gemessenen Mastzellen und der Anzahl an schnell motilen Spermien lässt sich statistisch kein Zusammenhang aufführen ($p = 0,57$).

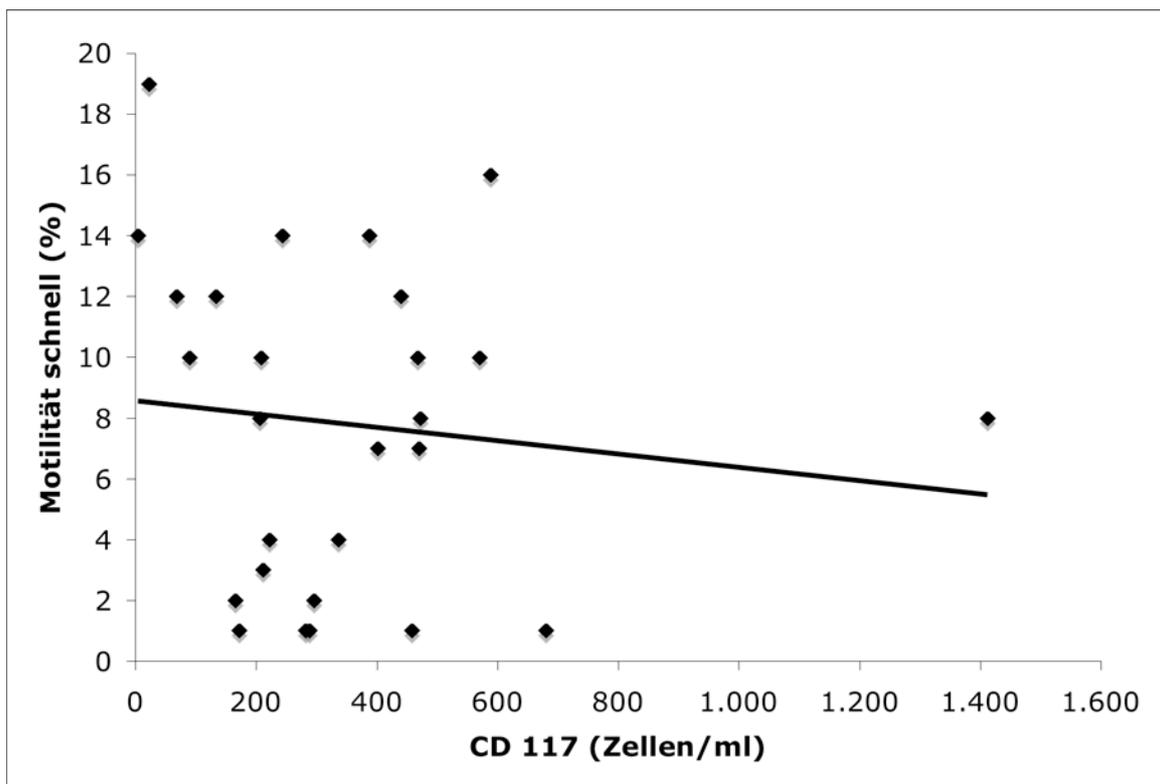


Abb. 29: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und schnell-motilen Spermien (WHO-a) in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 27$).

4.3.7 Mastzellen und Eosin (vitale)

Ebenso wurde der Zusammenhang zwischen Spermienvitalität und Mastzellen untersucht ($r = 0,01$; $n = 31$).

Zwischen der Anzahl der Mastzellen und der Anzahl an in der Eosin-Vitalfärbung tot dargestellten Spermien lässt sich kein statistischer Zusammenhang darstellen ($p = 0,89$).

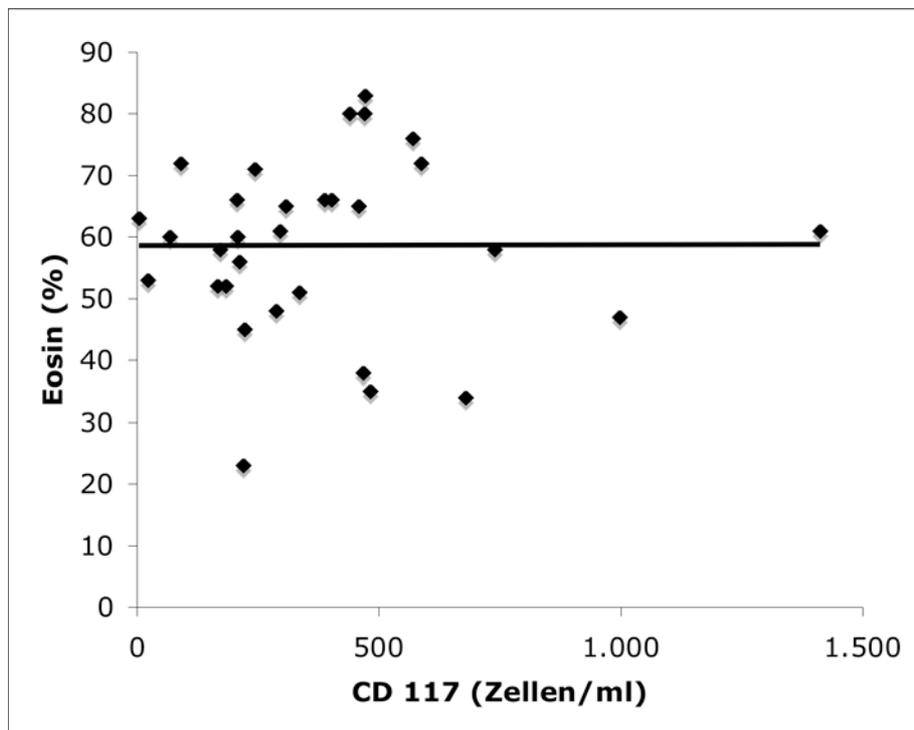


Abb. 30: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und Vitalität (Eosin) in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 31$).

4.3.8 Mastzellen und MAR (IgA)

Um einen Zusammenhang zwischen immunologischen Störungen durch Nachweis von an Spermien gebundene Immunglobuline und Mastzellen zu untersuchen, wurde auch eine Korrelation berechnet ($r = -0,4$; $n = 4$).

Zwischen der Zahl der Mastzellen und der prozentualen Menge an im MAR-Test gemessenen IgA lässt sich statistisch kein Zusammenhang zeigen, wobei hierbei eine Analyse nicht möglich gewesen ist, da nicht genügend Daten vorhanden waren. Somit lässt sich eine Aussage nach Pearson oder Spearman nicht erstellen.

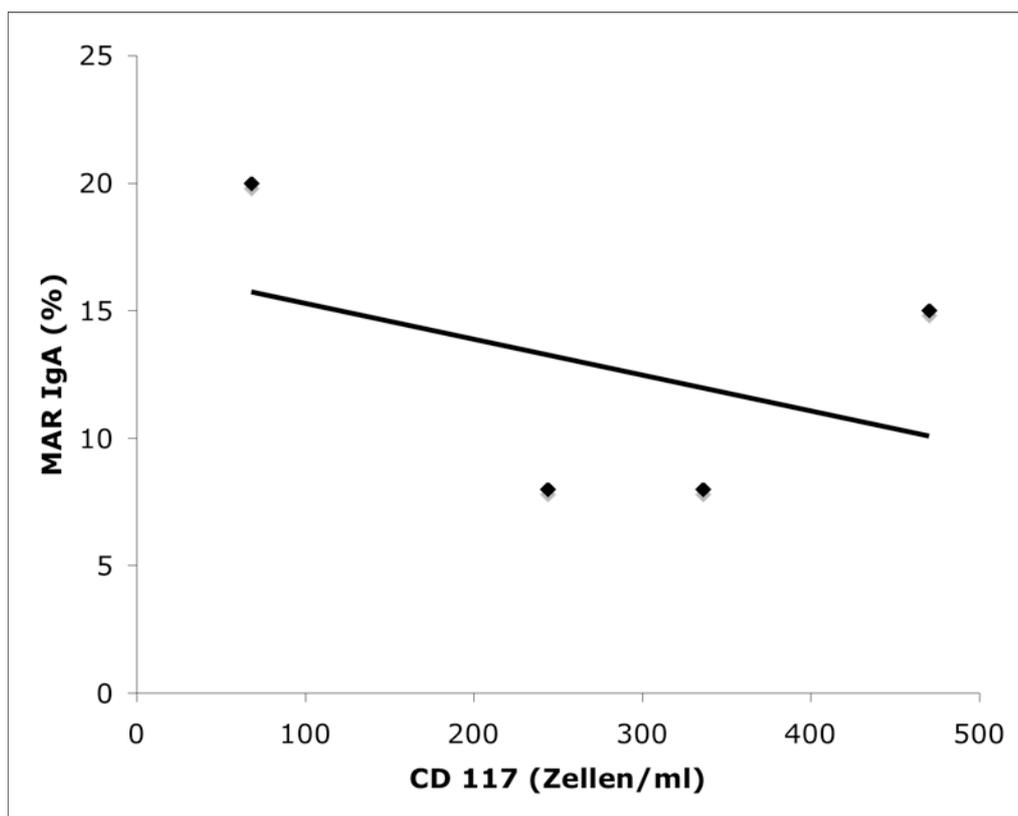


Abb. 31: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgA) in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 4$).

4.3.9 Mastzellen und MAR (IgG)

Zwischen der Anzahl an Mastzellen und der prozentualen Menge an im MAR-Test gemessenen IgG lässt sich statistisch kein Zusammenhang aufführen ($r = 0,1$; $n = 4$), da hier nicht genügend Daten vorhanden gewesen sind, um eine Aussage in Bezug auf Signifikanz zu erstellen.

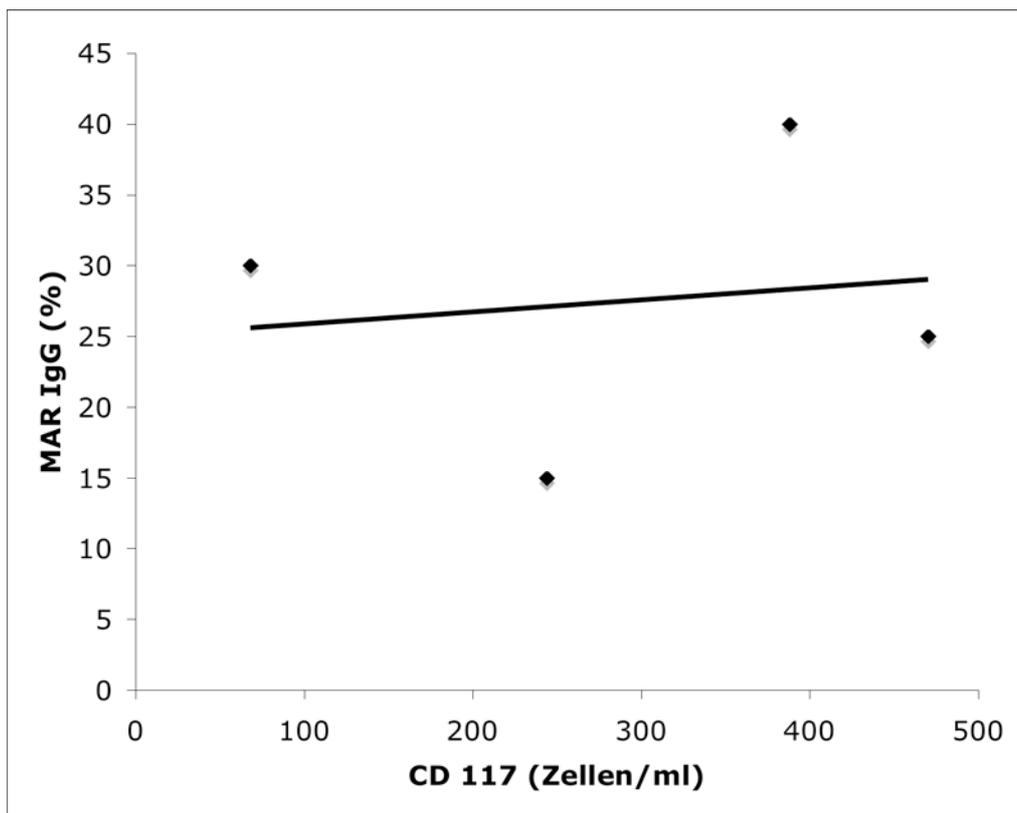


Abb. 32: Darstellung der Korrelation zwischen Mastzellen und MAR (IgG) in der Patientengruppe mit Oligozoospermie ($n = 4$).

5. Diskussion

Die Ätiologie und Pathogenese der männlichen Infertilität ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend untersucht, und die bisher durchgeführten Studien lassen verschiedene Zusammenhänge erkennen. So scheinen unter anderem pathologisch erhöhte Leukozytenzahlen im Sperma ursächlich für Störungen der männlichen Infertilität zu sein (Weidner et al., 1991; Krieger et al., 1996).

Weiterhin werden auch pathologisch erhöhte Werte an Mastzellen und deren Produkte wie Trypsinase, welche wiederum COX-2 und Prostaglandine bilden, mit männlichen Fertilitätsstörungen in Verbindung gebracht (Mayerhofer et al., 2004).

Yamanaka et al. wiesen durch eine Untersuchung von Hodenbiopsien eines Patientengutes mit obstruktiver Azoospermie, idiopathischer Azoospermie und Patienten mit Varikozele und Oligozoospermie eine signifikante Erhöhung an Mastzellen im Bindegewebe und der Lamina propria der Tubuli seminiferi nach (Yamanaka et al., 2000).

Es scheint also inzwischen erwiesenermaßen ein Zusammenhang zu bestehen zwischen männlicher Infertilität und dem Auftreten von pathologisch erhöhten Mastzellzahlen im Hodengewebe.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals mittels Durchflusszytometrie an einem Patientenkollektiv von 100 Probanden ($n = 100$) mit primärer männlicher Infertilität der Nachweis von Mastzellen im Seminalplasma erbracht und diese mit weiteren Parametern auf Korrelation untersucht. Bislang wurde der Nachweis von Mastzellen nur im morphologischen Ausstrich in der Routinediagnostik bestimmt. Da dieser Methode eine geringe Sensitivität und Spezifität zugrunde liegt, war eine grundlegende Untersuchung über die Bedeutung von Mastzellen bei infertilen Männern nicht aussagekräftig. Mit der hohen Sensitivität und Spezifität der Durchflusszytometrie konnte erstmals eine genaue Untersuchung von Mastzellen im Ejakulat durchgeführt werden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Mastzellen im Ejakulat keinen Einfluss genommen haben auf die Spermienzahl, die Beweglichkeit, die Morphologie und die Vitalität der Spermien (jeweils $p = > 0,05$). Weiterhin ließ sich keine Korrelation erkennen im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen (hier Elastase und Peroxidase als Entzündungsparameter (jeweils $p = > 0,05$)).

Eine Korrelation der Mastzellen zeigte sich allerdings mit dem Nachweis von Immunglobulin A auf Spermien ($p = 0,03$), nicht jedoch bei Immunglobulin G ($p = > 0,05$).

Eine Überlegung bezüglich des Auftretens von Mastzellen im Ejakulat stellt sich bei der Frage nach der Entstehung eines Oligo-Asteno-Terato-Zoospermie-Syndroms (OAT) bezüglich der Herkunft der Mastzellen. Einerseits haben Yamanaka et al. herausgefunden, dass bei Hodenbiopsien von infertilen Männern erhöhte Mastzellzahlen vorlagen (Yamanaka et al., 2000) und weiterhin vermuten Mayerhofer et al., dass Mastzellen, bzw. deren Produkt Tryptase zu Fibrosierungen der Tubulismembran führen können (Mayerhofer et al., 2004), andererseits konnte in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass es keine Korrelation der Mastzellen zu der Anzahl der Spermien gibt. Sollte eine hohe Mastzellkonzentration im Hoden, wie z.B. durch eine Orchitis herbeigeführt, zu einem starken Fibrosierungsgrad der Tubuli seminiferi führen, so müsste folgernd die Anzahl der Spermien abnehmen. Da dies nicht der Fall ist, sollte die Überlegung angestellt werden, ob die Mastzellen nicht auch im Nebenhoden in pathologisch hoher Konzentration gebildet werden. Wo die Mastzellen in der hier vorliegenden Arbeit gebildet worden sind, ist nicht Teil der Untersuchung gewesen und bedarf in Zukunft weiterer Forschung. Bekannt ist lediglich, dass die Produktion von sekretorischem IgA hauptsächlich im Epididymis, im Rete testis sowie in den Ductuli efferentes erfolgt (Marshburn et al., 1994; Luckas et al., 1998). Somit könnte durch die Korrelation von erhöhten Mastzellzahlen und erhöhten IgA-Antikörperzahlen im Ejakulat ein Ansatz bestehen, in den vorgenannten Regionen nach einem Ursprung der Mastzellproduktion zu suchen.

Ein anderer Faktor, der für die Entstehung eines OAT verantwortlich zu sein scheint, ist die Anwesenheit von Leukozyten im Sperma von infertilen Patienten.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation von Mastzellen zu Entzündungsparametern hergeleitet werden. Zwar haben Omu et al. 1999 nachgewiesen, dass bei infertilen Patienten ein gehäuftes Auftreten von Leukozytospermie vorliegt, doch konnte in den hier durchgeführten Versuchen keine Korrelation aufgestellt werden (Omu et al., 1999).

Andere Publikationen hingegen beschreiben, dass Patienten mit erhöhten Leukozytenzahlen ähnliche Seminalparameter zeigen wie die Patienten, welche normale Leukozytenkonzentrationen und keine signifikante Häufung von Spermienantikörpern im Ejakulat aufweisen (Gonzales et al., 1992).

Der Nachweis einer signifikanten Korrelation von Mastzellen und Immunglobulin A im Gesamtkollektiv ($n = 23$) und dem Kollektiv der Patienten mit Normozoospermie ($n = 19$) lässt weitere Spekulationen zu.

Zunächst ist hier noch anzumerken, dass im Kollektiv der Patienten mit Oligozoospermie ($n = 4$) nicht genügend Daten vorliegen, um eine aussagekräftige Signifikanz zu erstellen. Es lässt sich jedoch vermuten, dass auch in dieser Patientengruppe eine Korrelation besteht, da das Gesamtkollektiv und die Gruppe der Normozoospermie-Patienten eine signifikante Korrelation aufweisen.

Unterstützend zu den hier getätigten Aussagen bzgl. einer Korrelation von Mastzellen und Immunglobulin A weisen andere in der Vergangenheit durchgeführte Studien auf einen Zusammenhang von IgA und Infertilität hin. Witkin et al. veröffentlichten schon 1982 eine Studie, in der sie durch den ELISA-Test bei infertilen Patienten 2,3-fach erhöhte IgA-Werte vorfanden (Witkin et al., 1982). Die Spermiegebundenen IgA-Antikörper fanden sich im Seminalplasma und der Prostataflüssigkeit, nicht jedoch im Serum und wurden nachweislich lokal im Genitaltrakt gebildet.

Hendry et al. weisen in einer Studie darauf hin, dass eine Korrelation besteht zwischen der Penetrationsfähigkeit des Zervikalmukus durch im MAR-Test IgA-positiv getesteter Spermien. Demnach konnten die IgA-positiven Spermien den Zervikalmukus nur ungenügend penetrieren im Gegensatz zu den IgA-negativen Spermien. Beide Patientengruppen wiesen IgG-Antikörper auf, die sich jedoch nicht auf das Ergebnis auswirkten und keine Korrelation aufwiesen (Hendry et al., 1982).

Clarke bestätigte die Angaben von Hendry et al., indem er mittels Immunobeadtest den Zusammenhang zwischen Spermienantikörpern des IgA-Typs und der Penetration des Zervikalmukus untersuchte. Auch hier zeigte sich eine signifikant geringere Penetration des Zervikalmukus bei IgA-positiven Spermien im Gegensatz zu IgA-negativen Spermien. Ebenfalls konnte bei Clarke diese Beobachtung in Gegenwart von Spermienantikörpern des Isotyps IgG nicht gemacht werden (Clarke, 1988).

Weitere im Zusammenhang mit erhöhten Spermienantikörpern in der Follikelflüssigkeit stehende Phänomene sind ein negativer Einfluss auf die Akrosomreaktion (Tasdemir et al., 1996), die Bindung an die Zona pellucida (Francavilla et al., 1997), sowie die Fusion mit der Oozyte (Wolfe et al., 1995).

Auch Meinertz und Hiort kamen zu dem Ergebnis, dass die tragende Rolle bzgl. der männlichen Infertilität in den Antikörpern der IgA-Gruppe zu finden sei (Meinertz und Hiort, 1986). Ebenfalls in dieser Studie waren IgG-Antikörper vorhanden, jedoch nicht in Zusammenhang zu bringen mit einer Fertilitätsstörung.

Durch die in der hier vorliegenden Studie festgestellte Korrelation von Mastzellen und IgA-Antikörpern wirft sich die Frage auf, in welcher Hinsicht die beiden Zellpopulationen einander bedingen. Drei Möglichkeiten stehen zur Diskussion. Entweder regen die Mastzellen die Entstehung von IgA-Antikörpern an, oder im umgekehrten Fall bedingen erhöhte IgA-Werte die Entstehung erhöhter Mastzellzahlen. Als dritter Punkt könnte die Möglichkeit bestehen, dass ein übergeordneter Faktor für die Entstehung von sowohl erhöhten Mastzellzahlen als auch erhöhten IgA-Werten verantwortlich ist. In der bisher veröffentlichten Literatur sind keine Studien zu dieser Korrelation bekannt. Insofern besteht hier erweiterter Forschungsbedarf.

Weiterhin ist zu überlegen, inwiefern bei infertilen Patienten erhöhte Mastzellpopulationen durch IgE-Antikörper entstehen. So könnte unter Umständen bei Patienten, welche in die Gruppe der Atopiker einzuordnen sind, ein möglicher Zusammenhang bestehen. Da bei diesen Patienten bekanntermaßen erhöhte IgE-Werte im Serum und dementsprechend auch erhöhte Mastzellaktivität vorliegen, wäre ein Ansatz hier, eine Beeinflussung bzgl. des Genitaltraktes zu untersuchen.

Beobachtungen aus dem eigenen Patientengut weisen daraufhin, dass immunologische Fertilitätsstörungen häufig bei Patienten mit Typ-I Allergien auftreten (unpubliziert). Auch zu dieser Theorie sind in der Fachliteratur bis heute keine Forschungsergebnisse veröffentlicht worden.

6. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mastzellen im Ejakulat von Männern mit Infertilität mittels Durchflusszytometrie nachweisbar sind. Es bleibt zu klären, ob Mastzellen im Ejakulat physiologisch auftreten können, oder ob es sich um ein pathologisches Phänomen handelt.

Verschiedene Studien bestätigen den Zusammenhang von Infertilität bei Männern und erhöhten Mastzellzahlen, wie auch von erhöhten IgA-Antikörpern im Zusammenhang mit Infertilität.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass auch eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Mastzellzahlen und IgA-Antikörpern besteht, und zwar sowohl in der Patientengruppe des Gesamtkollektivs ($n = 23$) als auch in der Gruppe der Patienten mit Normozoospermie ($n = 19$). Keine Korrelation konnte in der Gruppe der Patienten mit Oligozoospermie ($n = 4$) festgestellt werden, da die Gruppengröße zu klein für eine signifikante Aussage ist. Somit besteht hier ein erneuter Forschungsansatz für die Zukunft.

Nicht bekannt ist, wie die Korrelation in der Gruppe des Gesamtkollektivs und der Gruppe der Normozoospermiepatienten zustande kommt. Als Möglichkeiten kommen in Betracht, dass eine Erhöhung der Mastzellzahlen eine Erhöhung der IgA-Antikörper nach sich zieht oder der umgekehrte Fall ursächlich ist. Als weitere Möglichkeit wäre zu untersuchen, ob nicht ein dritter Parameter existiert, welcher in Korrelation zu Mastzellen und IgA-Antikörpern gleichermaßen steht.

Eine Zusammenführung der einzelnen Gruppen hat nicht stattgefunden, da aus der Gruppe des Gesamtkollektivs die Gruppen der Normozoospermie- und der Oligozoospermiepatienten hervorgeht.

Durch die Korrelation von Mastzellen mit IgA-Antikörpern lässt sich als zukünftiger Untersuchungsansatz auch die Möglichkeit eines immunologischen-pathologischen Prozesses diskutieren.

Eine Korrelation zu IgG-Antikörpern besteht nicht und auch in verschiedenen vorhergegangenen Studien ist bisher lediglich nachgewiesen worden, dass männliche Infertilität vorrangig mit IgA-Antikörpern in Verbindung gebracht wird.

Des Weiteren ist keine Korrelation der Mastzellen zu den anderen untersuchten Parametern wie Spermienzahl, Beweglichkeit, Morphologie oder Vitalität, sowie auch zu den Entzündungsparametern (Elastase, Peroxidase) festzustellen.

7. Literaturverzeichnis

- Auger J, Kunstmann JM, Cycglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New. Eng. J.* 1995; 5: 281-332
- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 81: 459-469
- Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritians?, *Hum Repod.* 1995; 10: 1736-1739
- Allam JP, Haidl G. Andrologische Diagnostik. *CME Dermatol.* 2006; 2: 40-47
- Allen RC. Biochemical excitation: Chemiluminescence and the study of biological oxygenation reactions. In: Adam W. and Cilento G. eds. *Chemical and biological generation of excited states.* London: Academic Press. 1982: 320-341
- Behrendt H, Hilscher B, Passia D, Hofmann N, Hilscher W. The occurrence of mast cells in the human testis. *Acta Anat* 1981; 111: 14
- Benoist C, Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 2002; 420: 875-878
- Caldamore AA, Emilson LBV, Al-Juburi A, Cockett ATK. Prostatitis: Prostatic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertil Steril* 1980; 34: 602-603
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaeck NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 1992; 13: 305-609
- Chandley AC. The genetic basis of male infertility. *Reprod. Med-Rev.* 1995; 4: 1-8
- Clarke GN. Immunglobulin class and regional specificity of antispermatozoal autoantibodies blocking cervical mucus penetration by human spermatozoa. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology* 1988; 16: 135-138
- Dingle JT. *A laboratory handbook.* Amsterdam-New York-Oxford. North-Holland Publikation Company. 1977
- Francavilla F, Romano R, Santucci R. Interference of antisperm antibodies with the induction of the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and ist relationship with the inhibition of ZP binding. *Fertility and Sterility* 1997; 67: 1128-1133
- Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Effect of isotypes of antisperm antibodies on semen quality. *International Journal of Andrology* 1992; 15: 220-228
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5: 147-153.
- Haidl G, Schill WB. *Moderne Diagnostik in der Andrologie.* Dt. Ärzteblatt 1993; 90: 54-66

- Hendry WF, Stedronska J, Lake RA. Mixed erythrocyte-spermatozoa antiglobulin reaction (MAR test) for IgA antisperm antibodies in subfertile males. *Fertil Steril* 1982; 37: 108-112
- Hibi H, Kato K, Mitsui K, Taki T, Yamada Y, Honda N, Fukatsu H. The treatment with tranilast, a mast cell blocker, for idiopathic oligozoospermia. *Arch Androl* 2001; 47: 107-111
- Hofmann N, Haider SG. Neue Ergebnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogeneseestörung. *Gynäkologe*. 1985; 18: 70-80
- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 2001; 6: D 1109-D 1127
- Luckas MJM, Buckett WM, Aird IA, Johnson PM, Lewis-Jones DI. Seminal plasma immunoglobulin concentration in autoimmune male subfertility. *Journal of Reproductive Immunology* 1998; 37: 171-180
- Marshburn PB, Kutteh WH. The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertility and Sterility* 1994; 61: 799-811
- Maseki Y, Miyake K, Mitsuya H, Kitamura H, Yamada K. Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1981; 36: 814-819
- Mayerhofer A, Meineke V, Weidinger S, Köhn FM, Frungieri MB. Hodenmastzellen und männliche Infertilität. *J. für Reproduktionsmed und Endokrinologie* 2004; 1: 6-8
- Meinertz H, Hiort T. Detection of autoimmunity to sperm: mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. *Fertil Steril* 1986; 46: 86-91
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiological Reviews* 1999; 77: 1033-1079
- Nistal M, Santamaria L, Paniagua R. Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat* 1984; 119: 115-160
- Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, Fatinikum MT, Fernandes S. Seminal immun response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 86: 195-202
- Reinhardt A, Haidl G, Schill WB. Significance of granulocytic elastase in andrological diagnosis. *Reprod. Dom. Anim.* 1994; 29 : 103
- Schill WB, Schneider J, Ring J. The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia. *Andrologia* 1986; 18: 570-573
- Schirren C, Schill WB. Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie und der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Fertilität und Sterilität für die Förderung der Andrologie in Deutschland. *Andrologia* 1990; 22: 377-385

Tasdemir I, Tasdemir M, Fukuda J. Sperm immobilization antibodies in infertile male sera decrease the acrosome reaction, a possible mechanism for immunologic infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1996; 13: 413-416

Weidner W, Jantos C. Krankheiten der Prostata. Prostatitisyndrom; in: *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*; Hrsg. v. Krause W, Rothauge CF. 2. Auflage; Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1991; 193-207

Welle M. Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast-cell specific proteases chymase and tryptase. *J. Leuc Biol* 1997; 61: 233-245

Witkin SS, Zelikovsky G, Bongiovanni AM, Good RA, Day NK. IgA antibody to spermatozoa in seminal and prostatic fluids of a subfertile man. *JAMA* 1982; 274: 1014-1015

Wolfe JP, DeAlmeida M, Ducot B, Rodriguez D, Jouannet P. High levels of sperm-associated antibodies impair human sperm oolemma interaction after subzonal insemination. *Fertility and Sterility* 1995; 63: 584-590

Yamamoto M, Hibi H, Miyake K. New treatment of idiopathic severe oligospermia with mast cell blockers: results of a single blind study. *Fertil Steril* 1995; 64: 1221-1223

Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono J. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. *Hum Reprod* 2000; 15: 1534-1547