

ANNEXIN V POSITIVE SPERMIEN IM EJAKULAT INFERTILER
MÄNNER UND DIE BEDEUTUNG DER FRÜHAPOPTOSE FÜR
INFLAMMATORISCHE PROZESSE IM SEMINALPLASMA

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

Florian Dominik Fronhoffs

aus Geldern

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Haidl
2. Gutachter: PD Dr. med. M. Montag

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.11.2009

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums
Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Th. Bieber

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	
1.1 Unerfüllter Kinderwunsch - Epidemiologie und Terminologie	9
1.2 Ursachen der männlichen Infertilität	9
1.3 Immunologie des Hodens und des männlichen Genitaltraktes	10
1.4 Entzündungen im männlichen Genitaltrakt	14
1.5 Apoptose und ihre Bedeutung für Spermien	18
2 Zielstellung der Arbeit	22
3 Material und Methoden	
3.1 Auswahl der Patienten	23
3.2 Annexin V – Färbung	24
3.3 Die Swim-up Methode	25
3.4 Durchflusszytometrische Messungen	25
3.5 Bestimmung der Spermienkonzentration	31
3.6 Analyse der Spermienmorphologie	32
3.7 Quantifizierung der Granulozytenelastase im Seminalplasma	34
3.8 Bestimmung der Leukozytenzahl	35
3.9 Statistische Auswertung der Rohdaten	36
4 Ergebnisse	
4.1 Anteil Annexin V positiver Spermien in allen A-Proben	37

4.2 Anteil Annexin V positiver Spermien in A- und B-Proben	39
4.3 Anteil Annexin V positiver Spermien vor und nach Swim-up	42
4.4 Korrelation der Elastasekonzentration mit Annexin V	47
4.5 Korrelation des Ejakulatvolumens mit Annexin V	49
4.6 Korrelation der Spermienkonzentration und -gesamtzahl mit Annexin V	51
4.7 Korrelation der Spermienkonzentration (B-Proben) mit Annexin V	54
4.8 Korrelation der normalen Morphologie mit Annexin V	55
4.9 Korrelation Morphologiedefekte mit Annexin V	56
4.9.1 Korrelation Akrosomstörung mit Annexin V	57
4.9.2 Korrelation Überstreckung der Köpfe mit Annexin V	58
4.9.3 Korrelation überstreckter + akrosomgestörter Köpfe mit Annexin V	59
4.9.4 Korrelation Mittelstückdefekte mit Annexin V	61
4.9.5 Korrelation Flagellumdefekte Typ IA mit Annexin V	62
4.9.6 Korrelation Flagellumdefekte Typ IB mit Annexin V	64
4.9.7 Korrelation Flagellumdefekte Typ II mit Annexin V	65
4.9.8 Korrelation Flagellumdefekte Typ III	67
5 Diskussion	69
6 Zusammenfassung	75
7 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte	76
8 Verzeichnis der Firmenadressen	78
9 Literatur	80

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin D
DISC	Death-inducing signaling complex
ESIS	European Studies of Infertility and Subfecundity
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas associated protein with death domain
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IMSI	intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
IFN	Interferon
µl	Mikroliter
LASER	Light amplification by stimulated emission of Radiation
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAGI	Male accessory gland infection
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat-buffered-saline
PI	Propidiumiodid
ROS	Reactive oxygene species
SSC	Sideward Scatter
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TTP	Time to pregnancy
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Unerfüllter Kinderwunsch – Epidemiologie und Terminologie

Momentan bleiben etwa 25% der Paare, die sich im reproduktionsfähigen Alter befinden, kinderlos. Bei etwas mehr als der Hälfte von ihnen ist dies geplant, jedoch leben ungefähr 12% der kinderlosen Paare ungewollt ohne eigenen Nachwuchs (Neulen und Neises, 2007).

In diesem Zusammenhang gilt es zunächst die mit diesem Phänomen verbundene Terminologie zu definieren.

Die Fertilität beschreibt die Zeugungsfähigkeit des Mannes und die Fähigkeit der Frau zur Konzeption und Einleitung einer Schwangerschaft. Infertilität liegt dann vor, wenn innerhalb von 12 Monaten bei regelmäßigem und ungeschütztem Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt. Die Fekundität (Fruchtbarkeit) bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, „mit der aus einem Menstruationszyklus ein lebendes Kind hervorgeht“ (Nieschlag, 2000).

Die Fekundität von Paaren variiert regional. Die 1990 gegründete Studiengruppe „European Studies of Infertility and Subfecundity“ (ESIS) befragte 1992 insgesamt 4035 Frauen aus Dänemark, Deutschland, Italien, Schweden und Frankreich wie lang die Zeitspanne („Time to pregnancy“ = TTP) zwischen ungeschütztem Verkehr und Eintritt der Schwangerschaft war (Juul et al., 1999). Die Teilnehmerinnen waren entweder schwanger oder hatten kurz vor der Befragung Kinder geboren. Von der Studienpopulation hatten 16% eine Wartezeit von mehr als einem Jahr, was als eingeschränkte Fekundität bewertet wurde. Die höchste Fekundität fand sich in Süditalien (TTP > 1 Jahr = 10%), die niedrigste in Ostdeutschland (TTP > 1 Jahr = 24%).

1.2 Ursachen der männlichen Infertilität

Die Ursachen für herabgesetzte Fekundität und Infertilität sind vielgestaltig. Eine Ende der 80er Jahre von Thonneau et al. (1991) an 1686 französischen Paaren durchgeführte Studie stellte eine Prävalenz von 14,1% für Infertilität fest. In einem Drittel der Fälle fanden sich die Ursachen ausschließlich bei der Frau, in einem Fünftel der Fälle beim Mann und in 39% der Fälle bei beiden Partnern. 8% der Fälle wurden als idiopathisch

klassifiziert. Laut WHO (1997) liegen die Ursachen für unerfüllten Kinderwunsch in 20 - 25% der Fälle beim Mann, in 30 - 40% der Fälle bei der Frau und in etwa 30% der Fälle gleichermaßen bei beiden Partnern. Bei 15% der Paare können keine spezifischen Faktoren gefunden werden, die eine Kinderlosigkeit erklären könnten.

Howards (1995) hingegen sieht in etwa 50% der Fälle den männlichen Partner beteiligt: In 30% der Fälle fanden sich ausschließlich beim Mann Fertilitätseinschränkungen, in 20% bei beiden Partnern.

Eine von Swan et al. (2000) durchgeführte Metanalyse zeigte, dass die durchschnittliche Spermienkonzentration im Ejakulat von Männern aus den USA, Europa und Australien zwischen 1934 und 1996 kontinuierlich abgenommen hat. In der Schweiz konnte in einer aktuellen Studie, an der bislang 300 Rekruten freiwillig teilnahmen, gezeigt werden, dass 25% der Probanden eine Spermiedichte unterhalb der WHO-Kriterien aufwiesen (Krausaz et al., 2006). Eine eindeutige Erklärung für die stetige Abnahme der Spermienzahlen gibt es bislang nicht. Vermutet wird der negative Einfluss von Umweltfaktoren und -giften. Daneben gibt es eine Vielzahl anderer Faktoren, die zu einer männlichen Infertilität führen können, von denen eine große Zahl der andrologischen Diagnostik zugänglich ist.

Fertilitätsstörungen sind entweder anlagebedingt oder erworben. Erworbenere Ursachen sind entzündlicher, immunologischer, physikalisch-thermischer, medikamentöser oder toxikologischer Natur (Schill, 2003). Die verschiedenen Ätiologien der männlichen Infertilität können ferner nach dem Ort der Störung eingeteilt werden: Prätestikulär (z.B. Hypogonadotroper Hypogonadismus; Erektile Dysfunktion), testikulär (z.B. Orchitis; Varikozele) und posttestikulär (z.B. Cystische Fibrose; Vasektomie) (De Kretser und Baker, 1999).

Im Folgenden soll nun der Fokus auf die männliche Infertilität inflammatorischer Genese gelegt werden.

1.3 Immunologie des Hodens und des männlichen Genitaltraktes

Im männlichen Körper nehmen die Hoden eine privilegierte Stellung innerhalb des Immunsystems ein. Ein Großteil des Reifungsprozesses der Keimzellen findet hinter der Blut-Hoden-Schranke statt.

Blut-Hoden-Schranke

Diese Barriere wird von den Sertoli-Zellen gebildet. Sie übernehmen die Funktion eines Stützgerüsts und repräsentieren 35 - 40% des Keimepithelvolumens. Sie sitzen der Basalmembran auf und reichen in das Lumen der Samenkanälchen vor (Weinbauer et al., 2000).

Die Sertoli-Zellen bilden untereinander im basolateralen Bereich „occluding tight junctions“ aus. Diese Kontaktzonen entsprechen morphologisch der Blut-Hoden-Schranke. Das Keimepithel wird so in zwei Abschnitte gegliedert: Einen basalen und einen adluminalen. Im basalen Bereich des Keimepithels, zwischen den Verschlussleisten (Zonulae occludentes) der Sertoli-Zellen und der Basalmembran, liegen die Spermatogonien und die Spermatozyten I (Präoptänstadium). Der adluminale Bereich enthält Spermatozyten I (Prophase I der Meiose), Spermatozyten II und die Spermatischen (Holstein, 1994).

Die Blut-Hoden-Schranke trägt zu einer physikalischen Isolierung der haploiden antigenen Keimzellen bei. Diese ist notwendig, um die meiotischen und postmeiotischen Keimzellen vor einer Autoimmunantwort zu schützen, da mit Beginn der Pubertät (und somit lange nach der Etablierung der immunologischen Selbsttoleranz) im Hoden eine Vielzahl an Neoantigenen auftritt. In diesem Zusammenhang wird häufig von einem „Immunprivileg“ des Hodens gesprochen (Fijak und Meinhardt, 2006).

Die Integrität der Blut-Hodenschranke kann durch Entzündung und/oder Infektion (Comhaire et al., 1999) oder Trauma (Slavis et al., 1990) vermindert sein. Dies ist verbunden mit einem Konzentrationsanstieg von TNF- α (Hedger und Meinhardt, 2003). Es konnte an Ratten gezeigt werden, dass größere Mengen TNF- α den Aufbau der Blut-Hoden-Schranke in vitro (Siu et al., 2003) und in vivo (Li et al., 2006) beeinträchtigen, vermutlich durch Verminderung der Expression von Occludin, einem wichtigen Bestandteil der tight-junctions zwischen den Sertoli-Zellen (Mankertz et al., 2000).

In den vergangenen Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass die Aufrechterhaltung des testikulären Immunprivilegs nicht allein auf der mechanischen Abgrenzung von Autoantigenen durch die Blut-Hoden-Schranke beruhen kann.

So liegen Spermatogonien und frühe Spermatozyten im basalen Bereich des Keimepithels und somit unterhalb der Blut-Hoden-Schranke. Ferner wird die Blut-Hoden-

Schranke ab dem Rete testis immer durchlässiger. Unter normalen Umständen kommt es an diesen Lokalisationen trotzdem zu keiner Immunantwort (Fijak und Meinhardt, 2006).

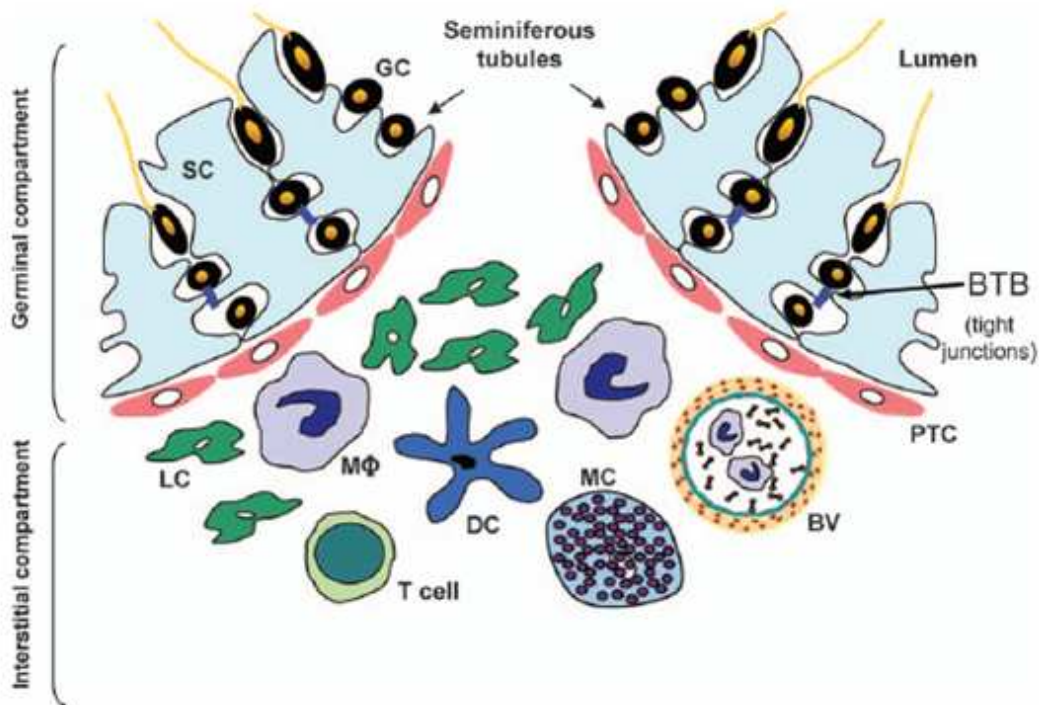


Abb.1.: Morphologie des Hodens (aus: Fijak und Meinhardt, 2006)

Die Abbildung zeigt, stark vereinfacht, die unterschiedlichen Zelltypen des testikulären Interstitiums und des Keimzellepithels.

BTB = Blood-testis barrier, BV = Blood vessel, DC = Dendritic cell, GC = Germ cell, LC = Leydig cell, MC = Mast cell, MΦ = Makrophage, PTC = Peritubular cells, SC = Sertoli cell

Testosteron ist offensichtlich ein wesentlicher Faktor bei der Supprimierung von Autoimmunreaktionen. In vitro konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von stimulierten menschlichen Monozyten und Makrophagen in Anwesenheit hoher Testosteronkonzentrationen mit einer verminderten Expression der proinflammatorischen Interleukine 1 und 6 und TNF- α einherging. Gleichzeitig war die Produktion des anti-inflammatorischen Interleukin 10 erhöht (Fijak und Meinhardt, 2006). Dass Androgenmangel eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von

Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematosus oder rheumatoider Arthritis spielen kann, darauf weisen diverse Berichte aus der Klinik hin (z.B. Bizzarro et al., 1987; Cutolo et al., 1991).

Leukozyten im männlichen Genitaltrakt

Makrophagen machen 25% der interstitiellen Zellen im adulten Hoden aus. Auf 10 - 50 Leydig-Zellen kommt ein Makrophage, der somit zu der zweitgrößten Zellpopulation im testikulären Interstitium gehört (Weinbauer et al., 2000). Makrophagen exprimieren MHC II Moleküle und können die proinflammatorischen Cytokine Interleukin 1 und TNF- α produzieren. Die Gewebsmakrophagen im Hoden produzieren aber deutlich geringere Mengen an entzündungsfördernden Substanzen als andere Histozyten. Vermutlich spielen dabei die zahlreichen cytoplasmatischen Zell-Zell-Kontakte der Gewebsmakrophagen mit den Leydig-Zellen eine wichtige Rolle (Hedger, 1997).

Es lassen sich nur wenige Lymphozyten im Hoden finden. Es handelt sich überwiegend um T-Zellen, insbesondere MHC I exprimierende und CD8 positive zytotoxische Zellen. CD4 positive T-Helfer-Zellen, die eine große Bedeutung für die Stimulation immunkompetenter Zellen haben, gibt es nur wenige. Das relative Überwiegen der CD8⁺ Zellen steht im Gegensatz zu den Mengenverhältnissen im Blut (hier CD4⁺ > CD8⁺) (Hedger, 1997).

Makrophagen und Lymphozyten werden zwar regelmäßig in den Epithelien von Ductus deferens, Samenleitern, Nebenhoden und den männlichen Adnexen gefunden, allerdings nicht im Keimepithel der Tubuli seminiferi. Stattdessen beschränkt sich ihre Anwesenheit auf das testikuläre Interstitium. Allerdings gibt es zwei Ausnahmen: Lymphozyten und Makrophagen können im Epithel der Tubuli seminiferi nahe dem Rete testis nachgewiesen werden, T-Zellen im Gewebe unterhalb der testikulären Kapsel. Beide Orte sind prädisponiert für den Beginn von Autoimmunreaktionen (Hedger, 1997). Nahe den subkapsulären Blutgefäßen lassen sich Mastzellen nachweisen, im Interstitium finden sich vereinzelt auch antigenpräsentierende dendritische Zellen (Fijak und Meinhardt, 2006). Obwohl Neutrophile Granulozyten sehr häufig auch bei gesunden Männern im Ejakulat nachweisbar sind, sind sie im Hoden selbst nur bei entzündlichen Prozessen zu finden (Hedger, 1997).

Bedeutung der Leukozyten für die andrologische Diagnostik

Eine Leukozytospemie bezeichnet eine abnorm hohe Konzentration weißer Blutkörperchen im Seminalplasma. Laut WHO liegt sie ab einer Leukozytenkonzentration von mehr als 10^6 /ml vor (WHO 1999).

Die Prävalenz der Leukozytospemie liegt, je nach Studie, zwischen 2% und 40%. Im Seminalplasma finden sich vor allem Neutrophile Granulozyten, aber auch B- und T-Zellen (Keck et al., 1998). Es ist noch immer umstritten, ob Leukozyten im Seminalplasma schädlich auf die Spermien wirken. Es existieren Arbeiten, in denen von negativen Effekten einer Leukozytospemie auf Spermienparameter berichtet wird (Aitken und Baker, 1995; Rajasekaran et al., 1995; Yanushpolsky et al., 1996). Ebenso gibt es aber Autoren, die diese Negativeffekte nicht beobachten konnten (Tomlinson et al., 1993; Kiessling et al., 1995; Zorn et al., 2000).

Beeinträchtigungen der Spermien lassen sich mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beim Untergang von Neutrophilen Granulozyten erklären. Diese enthalten in ihren Phagosomen das Enzym Peroxidase, das aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ROS synthetisieren kann. Diese schädigen die DNA und die an ungesättigten Fettsäuren reiche Zellmembran der Spermien (Comhaire et al., 1998; Rajasekaran et al., 1995).

Ein weiterer guter Entzündungsindikator, auch bei klinisch stummen Entzündungen, ist die Granulozytenelastase (Haidl et al., 2008; Henkel et al., 2007; Wolf et al., 1991; Zorn et al., 2000; Zorn et al., 2005). Sie kann proteolytische Schäden an den Spermatozoen verursachen, ihr Normalwert liegt bei < 250 ng/ml Seminalplasma. Konzentrationen zwischen 250 und 1000 ng/ml weisen auf eine mäßige, Werte über 1000 ng/ml auf eine massive Entzündung hin (Haidl, 2003).

1.4 Entzündungen im männlichen Genitaltrakt

Ein inflammatorisches Geschehen kann sich an zahlreichen Orten des männlichen Genitaltraktes ereignen und die Fertilität auf verschiedene Weise beeinträchtigen.

Krankheitserreger sind in der Lage, die Hoden und die ableitenden Samenwege entweder direkt zu schädigen oder aber eine Immunantwort auszulösen, die ihrerseits schädlich auf die männliche Zeugungsfähigkeit wirken kann. Auch

Autoimmunreaktionen, ohne Beteiligung mikrobieller Krankheitserreger, können zu schweren Defekten und Infertilität führen.

Topographische Einteilung

Eine erste grobe Differenzierung zwischen einer Orchitis und einer Entzündung der akzessorischen Drüsen („Male Accessory Gland Infection“ = MAGI) ist hilfreich.

Everaert et al. (2003) schätzen, dass 12% der männlichen Patienten mit anamnestischer Infertilität und auffälligen Spermioogrammen eine MAGI aufweisen.

Epididymitis

Aus einer Entzündung des Nebenhodens (Epididymitis) und einer hiermit verbundenen Funktionseinschränkung kann eine Beeinträchtigung der Spermienmotilität (Asthenozoospermie) resultieren. Die Alpha-Glukosidase ist hier ein guter Organmarker (Cooper et al., 1988). Die Aktivität dieses Enzyms ist im Falle einer Störung, etwa einer entzündungsbedingte Obstruktion mit Behinderung des Spermientransportes zwischen Nebenhoden und Ductus ejaculatorius, erniedrigt (Kret et al., 1995).

Die akute Epididymitis wird bei jungen Männern unter 35 Jahren am häufigsten durch sexuell übertragbare Infektionskrankheiten hervorgerufen. Haupterreger sind Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae. Bei Männern jenseits des 35. Lebensjahres wird die Nebenhodenentzündung am häufigsten durch Escherichia Coli ausgelöst (Berger et al., 1979; Krieger, 1984). Eine Infektion mit Chlamydien ist in der Regel nur mit einem geringen Gewebsschaden verbunden. Es findet sich eine periduktale und intraepitheliale Inflammation verbunden mit epithelialer Proliferation. Epididymitiden mit E. coli sind hingegen häufig destruktiv und mit der Ausbildung von Abszessen verbunden (Hori und Tsutsumi, 1995).

In seltenen Fällen kann eine Epididymitis (Erst-)Symptom einer Tuberkulose sein (Al-Ghazo et al., 2005; Kulchavenya und Khomayakov, 2006; Viswaroop et al., 2005).

Nicht-infektiöse Ätiologien sind selten. Beispielsweise kann die Einnahme von Amiodaron eine Nebenhodenentzündung auslösen (Sadek et al., 1993). Ferner können Vaskulitiden wie Polyarteriitis nodosa mit einer Epididymitis assoziiert sein (Hashiguchi et al., 2001).

Vesikulitis

Sie kommt entweder als Prostatavesikulitis oder als männliche Adnexitis vor und ist kein eigenständiges Krankheitsbild (Schill, 2003).

Die Glandulae vesiculosae (Samenblasen) schwellen bei einer Vesikulitis an und können dann aufgrund ihrer engen Lagebeziehung zum Rektum oftmals digital getastet werden. Die paarigen Glandulae vesiculosae sind daher ob ihrer Topographie einer transrektalen Sonographie gut zugänglich. Ihr fruktosehaltiges Sekret macht 50 - 80% der Gesamtmenge des Ejakulats aus (Holstein, 1994). Es ermöglicht die Koagulation des Seminalplasmas unmittelbar nach der Ejakulation und spielt offenbar eine wesentliche Rolle beim Schutz der Spermatozoen und des Embryos vor einer weiblichen Immunantwort (Gonzales, 2001).

Zwar wird die Fruktose oftmals als organspezifischer Funktionsparameter bestimmt, ihre Aussagekraft ist jedoch, was die Unterscheidung zwischen Entzündung und Nicht-Entzündung der Samenblasen betrifft, begrenzt. Höhere Aussagekraft hat in diesem Fall das Ejakulatvolumen, welches bei einer Infektion erniedrigt ist (Comhaire et al., 1989).

Orchitis

Aufgrund ihrer engen anatomischen Beziehung zueinander ist eine Entzündung des Hodens sehr häufig mit einer Epididymitis kombiniert (Luzzi und O'Brien, 2001).

Die Epididymo-Orchitis ist meist bakteriell bedingt und nimmt ihren Ausgang vom Nebenhoden.

Im Falle einer viralen Infektion, etwa mit Coxsackie B, zeigt sich eine isolierte Orchitis (Hungerhuber, 2004). Es handelt sich hierbei häufig um eine Begleitorchitis im Rahmen einer systemischen Virusinfektion. Für den Andrologen von großer Relevanz ist die Mumpserkrankung, die im Falle einer postpubertären Infektion bei ungefähr einem Viertel der Patienten mit einer Orchitis verbunden ist, in deren Folge es zu einer Hodenatrophie mit irreversibler kompletter Tubulussklerose kommen kann (Nieschlag et al., 2000).

Spezifische Infektionen, wie z.B. Tuberkulose, Brucellose oder Syphilis, können zu granulomatösen Orchitiden führen. Zudem können Traumata, Vaskulitiden und Tumoren eine Orchitis induzieren (Schill, 2003).

Eine Orchitis kann die Fertilität eines Mannes unterschiedlich stark einschränken. Leukozytenexsudate können Ursache einer Tubulussklerosierung oder Obstruktion des Rete testis sein. Im schlimmsten Fall resultiert die Hodenentzündung in einem Arrest der Spermatogenese und einer Atrophie der Testes (Hungerhuber, 2004).

Prostatitis

Bei etwa 16% aller Männer wird im Laufe ihres Lebens eine Prostatitis diagnostiziert (Bergman und Zeitlin, 2007). Es ist die häufigste urologische Diagnose bei Männern unter 50 Jahren (Hungerhuber et al., 2004).

Die amerikanischen National Institutes of Health (NIH) klassifizieren die Prostatitis in vier Gruppen (Krieger et al., 1999):

Category	Term	Explanation
I	Acute bacterial prostatitis	Acute bacterial infection
II	Chron. bacterial prostatitis	Chron. bacterial infection
III	Chron. abacterial prostatitis (chronic pelvic pain syndrome)	No evidence of pathogens
IIIA	Inflammatory chron. prostatitis	Evidence of leukocytes (prostate exprimate, exprimate urin, ejaculate)
IIIB	Noninflammatory chronic pelvic pain syndrome (Prostatodynia)	Neither pathogen nor leukocytes (prostate exprimate, exprimate urin, ejaculate)
IIIC	Asymptomatic prostatitis	No symptoms, but evidence of inflammation (e.g. in prostate biopsy specimen) Evidence of leukocytes (prostate exprimate, exprimate urin, ejaculate)

Tabelle 1: NIH-Klassifikation der Prostatitis (aus: Hungerhuber et al., 2004)

Das Ausmaß, in dem Prostatitiden die Fertilität von Männern beeinflussen, ist unklar. Es gilt als unwahrscheinlich, dass bei einer Infektion Bakterien die Spermien direkt schädigen, da die Kontaktzeit nur sehr kurz ist. Allerdings können sich Entzündungen der Prostata auf ihre Sekretionsprodukte auswirken (Everaert et al., 2003).

Markersubstanzen für die Prostatafunktion sind Citrat, saure Prostataphosphatase, Zink sowie das prostataspezifische Antigen (PSA) (Haidl, 2003). Mehrere Autoren berichten von einer erniedrigten Citrat-Konzentration bei Patienten mit einer entzündlich veränderten Prostata (Comhaire et al., 1989; Cooper et al., 1990; Wolff et al., 1991). Die

Serumkonzentrationen von PSA können während einer Prostatitis deutlich erhöht sein (Terrone et al., 2005).

In diversen Studien wird von einer Beeinträchtigung der Motilität und Morphologie der Spermien berichtet, insbesondere bei chronischen Prostatitiden (Christiansen et al., 1992; Leibz et al., 1994; Motrich et al., 2005). Allerdings sind auch einige Arbeiten erschienen, in denen der Einfluss einer Prostatitis auf die Spermienqualität als gering eingestuft wird (Li et al., 2004; Ludwig et al., 2003).

1.5 Apoptose und ihre Bedeutung für Spermien

Definition der Apoptose

Als Apoptose wird der durch die Zelle selbst eingeleitete programmierte Zelltod bezeichnet. Dabei schrumpft die Zelle und zieht sich zusammen, wobei kleine, membranumhüllte Fragmente entstehen. Diese „apoptotischen Körperchen“ werden von Makrophagen phagozytiert. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod, bei dem die Zellen anschwellen und platzen, kommt es bei der Apoptose zu keinem Zeitpunkt zu einem Kontakt zwischen intrazellulären Bestandteilen der apoptotischen Zellen mit dem Extrazellularraum. Eine entzündliche Reaktion des Immunsystems wird so vermieden (Lodish et al., 2001).

Allgemeiner Ablauf und Regulation der Apoptose

Es wird zwischen extrinsischer und intrinsischer Apoptose unterschieden. Intrinsische Stimuli, wie z.B. DNA-Schäden, führen zu einer Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Das Cytochrom c aktiviert das cytosolische Protein Apaf-1, und es formiert sich ein „Apoptosom“, welches die Initiatorcaspase 9 aktiviert. Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein in ihrem aktiven Zentrum, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartatresten spalten können. Die aktivierte Caspase 9 führt ihrerseits zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Diese lösen die Zerlegung der chromosomalen DNA durch Nukleasen aus (Yan und Shi, 2005).

Extrinsisch wird eine Apoptose durch „Todesfaktoren“ ausgelöst. Ein intensiv beforschter Vertreter dieser „Death factors“ ist der Fas-Ligand (FasL). FasL gehört zur

Tumornekrosefaktor- (TNF-) Familie und bindet an Fas, ein Zelloberflächenmolekül und Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie. Die Apoptose wird durch Bindung eines Trimers aus drei FasL-Molekülen an drei Fas-Rezeptoren induziert: An die intrazelluläre „Todesdomäne“ bindet ein Adaptermolekül namens FADD (**F**as **a**ssociated protein with **d**eath **d**omain), welches die Initiatorcaspase 8 rekrutiert. An der cytosolischen Seite der Zellmembran hat sich nun ein „Death-inducing signaling complex“ (DISC) formiert. Caspase 8 aktiviert die Caspasen 3 und 7 und hat somit eine gemeinsame Endstrecke mit der intrinsischen Apoptose. Außerdem spaltet Caspase 8 Bid, ein Protein der Bcl-2-Familie, dessen Spaltprodukt zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt und somit verstärkend auf die Apoptose wirkt (Nagata, 1999; Yan und Shi, 2005).

Tumorsuppressorproteine wie P53 sichern die Genomintegrität in geschädigten Zellen während der Replikation und Differenzierung, indem sie in den Übergang von der Ruhe- (G1-) zur Synthese- (S-) Phase eingreifen. P53 verursacht zunächst einen G1-Arrest und ermöglicht so den Versuch einer Reparatur der DNA (Lodish et al., 2001). Wenn der Schaden nicht behoben werden kann leitet P53 die Apoptose ein, u.a. dadurch, dass es die Expression von FAS hochreguliert und so die Menge an Cytochrom c im Zytoplasma ansteigen lässt. (Nagata, 1999). Ein Verlust oder Inaktivierung von P53 führt zur unkontrollierten Zellproliferation und liegt bei etwa der Hälfte aller malignen Neoplasien vor (Dansranjavin, 2000).

Eine zentrale Rolle bei der Apoptoseregulation spielen Proteine aus der bcl-2-Familie. Einige Repräsentanten dieser Gruppe, z.B. bcl-2 oder bcl-xL, wirken inhibitorisch, andere, wie etwa bax, bcl-xS und bak, begünstigen die Apoptose (Dansranjavin, 2000).

Apoptose und Immunabwehr

Die Apoptose ist ein wirkungsvoller Abwehrmechanismus bei der Bekämpfung intrazytoplasmatischer Pathogene, vor allem von Viren (Vaux und Korsmeyer, 1999). Sie ist maßgeblich an der Elimination von Zellen mit mangelhafter DNA-Integrität beteiligt und eine wichtige Komponente des Organismus bei der Prophylaxe von Neoplasien und Autoimmunerkrankungen (Dansranjavin, 2000; Nagata, 1999; Lodish et al., 2001).

Zytotoxische, CD8 positive T-Zellen sind fähig, mit ihren membrangebundenen Fas-Liganden in ihren Zielzellen die Apoptose zu initiieren. Diese Killerzellen erkennen Zellen, deren MHC-Klasse-I-Komplexe mit neuartigen und/oder körperfremden Peptiden beladen sind. MHC I - Moleküle (MHC = Major Histocompatibility Complex) sind Proteine, die auf der Oberfläche der meisten kernhaltigen Körperzellen zu finden und an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Der Vorteil dieser Form von Antigenpräsentation liegt darin, dass die Zielzelle eindeutig identifiziert werden kann und die Nachbarzellen verschont bleiben (Janeway et al., 2005).

Im Hoden präsentieren zwar Sertoli- und Leydig-Zellen MHC I - Komplexe an ihrer Oberfläche, jedoch fehlen diese Proteine bei den sich differenzierenden Keimzellen entweder ganz oder sind nur vereinzelt nachweisbar. Zellen der Spermatogenese können so der Erkennung durch CD8⁺ T- Zellen entgehen. Interessanterweise können hingegen an ejakulierten menschlichen Spermatozoen MHC I - Antigene nachgewiesen werden (Fijak und Meinhardt, 2006).

Aktivierete CD8⁺ T-Zellen leiten nicht nur Apoptosen ein, sondern können zusätzlich Interferon γ (IFN- γ) und TNF- α sezernieren. IFN- γ hemmt die virale Replikation und stimuliert die Produktion von MHC I - Molekülen. TNF- α aktiviert das Endothel, erhöht dessen Permeabilität und führt zu einem verstärkten Einstrom von Immunglobulinen, Komplement-Faktoren und Entzündungszellen. Es bewirkt Fieber und erhöht die Flüssigkeitsdrainage zu den Lymphknoten. Beide Cytokine aktivieren Makrophagen (Janeway et al., 2005).

Bedeutung der Apoptose für die Spermatogenese

Pro Sekunde entstehen im Menschen etwa 100.000 Zellen durch Mitose. Im gleichen Zeitraum stirbt eine ähnliche Anzahl an Zellen, 99,9% von ihnen durch Apoptose (Vaux und Korsmeyer, 1999).

Der programmierte Zelltod ist ein physiologischer Vorgang, der Bedeutung für Differenzierungsprozesse, Verteidigung gegenüber Pathogenen und Homöostase hat. Die Apoptose spielt auch eine wichtige Rolle bei der Spermatogenese. Wichtige Erkenntnisse konnten insbesondere mithilfe von genmanipulierten Mäusen gewonnen werden.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mäuse, denen das proapoptotische Bax fehlt, infertil sind (Vaux und Korsmeyer, 1999). Männchen, die zur Expression von p53 nicht in der Lage waren, zeigten eine verstärkte Proliferation von Spermatogonien, weniger apoptotische Spermatozyten und eine erhöhte Spermienproduktion. Bei Tieren, deren Spermatogonien Bcl-2 (fehl)exprimierten, konnte präpubertär eine Akkumulation von Spermatogonien und postpubertär ein Fehlen von Keimzellen in fast allen Tubuli seminiferi beobachtet werden (Sinha Hikim und Swerdloff, 1999).

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Apoptose im Hodengewebe. So konnten z.B. Pentikainen et al. 1999 demonstrieren, dass TNF- α in vitro die Apoptose von Keimzellen im menschlichen Hodengewebe inhibiert, indem es die Expression von FasL drosselt. Die meisten der beobachteten apoptotischen Zellen waren Spermatozyten und Spermatozyten, die selber meist keine Rezeptoren für TNF- α aufwiesen. Vermutlich wird der apoptotische Zelluntergang indirekt über die Sertoli-Zellen vermittelt, bei denen der TNF- α -Rezeptor TNFR-I nachweisbar ist.

Spermproben mit niedriger Spermiedichte und schlechter Morphologie zeigen eine erhöhte Expression von Fas und p53 (Sakkas et al., 2002).

Der Apoptosemarker Annexin V

Eine häufig verwendete Substanz zur Markierung apoptotischer Zellen ist Annexin V (van Engeland et al., 1998). Auch bei der Untersuchung der Spermienapoptose fand Annexin V bereits Verwendung (z.B. Allam et al., 2008; Aziz et al., 2007; Barroso et al., 2006; Said et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Das Protein Annexin V bindet calciumabhängig sehr selektiv an das Phospholipid Phosphatidylserin. Phosphatidylserin wird bereits sehr früh während der Apoptose einer Zelle von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert (Vermees et al., 1995). Vermutlich dient die Aufhebung der asymmetrischen Lokalisation von Phosphatidylserin und seine externe Präsentation Makrophagen und Fibroblasten als Signal zur Phagozytose der apoptotischen Zellen (Fadok et al., 2001).

2 Zielstellung der Arbeit

Entzündliche Prozesse in Hoden und Nebenhoden sind offenbar schädlich für Spermien. Das inflammatorische Milieu enthält Faktoren, die in Spermatozoen die Apoptose induzieren können. Beispiele für solche Induktoren sind freie Sauerstoffradikale (ROS) oder Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α).

Die Apoptose ist allerdings gleichzeitig unverzichtbarer Bestandteil der Entwicklungsbiologie und Ontogenese des Menschen. Auch schützt der programmierte Zelltod den Organismus vor ungehemmter Zellteilung potentieller Krebszellen und Energieverschwendung an beschädigte oder funktionsuntüchtige Zellen. Sie ist nicht ausschließlich ein pathologisches, sondern oftmals ein physiologisch notwendiges Ereignis.

Trotzdem sind unsere Kenntnisse über die Rolle der Apoptose für Prozesse in der Spermatogenese und ihre Bedeutung für reife Spermien noch lückenhaft. Eine der Hauptfragen dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Patienten mit erhöhten Entzündungsparametern im Ejakulat mit Hilfe der Annexin V - Färbemethode innerhalb des andrologischen Krankengutes detektiert und differenziert werden können. Dem Vergleich zwischen der Höhe der Granulozytenelastasekonzentration und dem prozentualen Anteil Annexin V positiver Spermien wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Ferner sollte allgemein das Phänomen „Apoptose im Sperma“ untersucht werden. Hierzu wurden Korrelationen zwischen dem Anteil Annexin V positiver Spermien und gängigen andrologischen Untersuchungsparametern wie Spermienkonzentration, Ejakulatvolumen und morphologischen Defekten vorgenommen.

Schließlich wurde untersucht, ob der Anteil Annexin V positiver Spermien in den Proben von Männern variiert, die innerhalb von 60 Minuten zweimal ejakulierten (A- und B-Probe).

Einige Proben wurden dem Swim-up Verfahren unterzogen, um zu überprüfen, ob nach Aufarbeitung im Überstand, der fast ausschließlich vitale progressiv-motile Spermien enthält, weiterhin Annexin V positive Spermatozoen zu finden sind.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Patienten

Wir untersuchten das Sperma von 31 infertilen Männern, die sich in der andrologischen Ambulanz der Universitätshautklinik Bonn zur Abklärung der Ursachen ihres unerfüllten Kinderwunsches vorstellten. Insgesamt wurden 59 Ejakulate untersucht. Dabei unterschieden wir zwischen A- und B-Proben. Für die B-Proben wurden die Männer gebeten, innerhalb von 60 Minuten ein zweites Mal zu ejakulieren (n = 24).

Die Patienten wurden vor Abgabe der Proben über Verwendung der Daten für wissenschaftliche Zwecke informiert. Die Studie wurde mit Erlaubnis der Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

Von allen A-Proben wurde ein standardisiertes Spermogramm erstellt. Dies geschah in Anlehnung an die WHO-Richtlinien (WHO, 1999). In 16 A-Proben wurde die Morphologie vor der Annexin V - Färbung zusätzlich gemäß den Kriterien der Düsseldorfer Klassifikation analysiert (Hofman und Haider, 1985). In den B-Proben wurde lediglich die Spermiedichte bestimmt.

Es wurden zwei Gruppen gebildet: Entzündungsgruppe (= E-Gruppe) und Vergleichsgruppe (= V-Gruppe). Zur E-Gruppe wurden Spermaproben gerechnet, in deren Seminalplasma eine Leukozytospemie und/oder eine erhöhte Elastasekonzentration (≥ 250 ng/ml) ermittelt wurde. Von jedem Patienten, der zwecks Diagnostik in der andrologischen Sprechstunde vorstellig wird, werden innerhalb eines Zeitraumes von maximal drei Wochen zwei Spermogramme erstellt. Spezialuntersuchungen wie die Bestimmung der Elastasekonzentration oder der Leukozytenmenge werden bei den meisten Patienten nur für das erste Spermogramm durchgeführt. Gleiches gilt für die differenzierte morphologische Beurteilung. Patienten wurden auch dann in die E-Gruppe aufgenommen, wenn die Bestimmung der erhöhten Elastase bereits zwei Wochen zurücklag. Fanden sich in den Proben keine erhöhten Entzündungsmarker, so wurden diese in die V-Gruppe aufgenommen.

Im Ejakulat von 11 Patienten fanden sich erhöhte Entzündungsparameter (E-Gruppe), die restlichen Spermaproben (n = 24) zeigten keinen Anhalt für ein inflammatorisches Geschehen (V-Gruppe).

Von 24 Patienten wurden jeweils eine A- und B-Probe abgegeben.

Es wurden 14 A- und korrespondierende B-Proben mit Swim-up aufgearbeitet, wobei jeweils vor und nach Swim-up eine Färbung mit Annexin V durchgeführt wurde. Auch die Probenpaare für den Swim-up wurden in Entzündungs- und Vergleichsgruppe unterteilt (E-Gruppe: n = 7 Paare; V-Gruppe: n = 7 Paare).

3.2 Annexin V- Färbung

Die Annexin V - Moleküle können mit dem Farbstoff Fluorescein Isothiocyanit (FITC) gekoppelt werden, so dass sie in der Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie Verwendung finden können.

Um avitale Zellen von apoptotischen zu unterscheiden, ist die zusätzliche Verwendung eines DNA-Farbstoffes wie 7-Aminoactinomycin D (7AAD) sinnvoll. Dieser ist nicht in der Lage, eine intakte Plasmamembran zu durchdringen. Eine Doppelfärbung mit Annexin V und 7AAD ist somit kennzeichnend für avitale Zellen. Vitale, apoptotische Zellen sind hingegen nur Annexin V positiv (van Engeland et al., 1998).

Durchführung der Annexin V- Färbung

Für die Annexin V - Färbung wurden Aliquots von Ejakulaten mit einer Spermiedichte von 2 Mio./ml verwendet.

Die Aliquots wurden in 15 ml-Zentrifugenröhrchen je zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, gevortext und für 5 Minuten mit 2000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Milliliter 1x-Binding-Buffer (BD Pharmingen) gelöst, der 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl und 2,5 mM CaCl₂ enthielt. Je 100 µl dieser Lösung wurden in zwei FACS-Röhrchen pipettiert (= Probe + Leerwert).

Der Probe wurden 5 µl 7AAD und 5 µl Annexin V-FITC hinzugefügt. Das Röhrchen mit dem Leerwert enthielt hingegen keine Markersubstanzen.

Unter Lichtabschluss inkubierten Probe und Leerwert für 15 Minuten. Um die Färbereaktion abzustoppen wurden 400 µl 1x-Binding-Buffer in Probe und Leerwert hinzupipettiert. Beide Röhrchen wurden für 5 Minuten mit 1200 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 - 500 µl 1x-Binding-Buffer resuspendiert. Die Lagerung bis zur zeitnahen weiteren Verwendung erfolgte bei 4 °C.

3.3 Die Swim-up - Methode

Mit dieser Methode können vitale, progressiv-bewegliche Spermien von unbeweglichen und toten Spermatozoen getrennt werden. Das Pellet des Ejakulates wird mit einem Kulturmedium überschichtet. Während der Inkubation im Brutschrank steigen die motilen Spermien aktiv, entgegen der Schwerkraft, in das Medium auf und können für weitere Diagnostik oder eine assistierte Reproduktion verwendet werden.

Das Resultat dieser Methode ist eine hochreine Spermien-Lösung, die frei von Seminalplasma und Leukozyten ist (De Geyter et al., 2000).

Durchführung des Swim-up

Die Probe wurde in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit PVP (MEDICULT) 1 : 1 verdünnt. PVP ist ein auf Earle's gepufferter Salzlösung basierendes Medium mit humanem Serumalbumin.

Die Probe wurde gevortext und für 10 Minuten mit 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Transferpipette abgenommen und verworfen.

Das Pellet wurde in 2 ml PVP resuspendiert und ein zweites Mal für 10 Minuten mit 2000 U/min zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes wurden, ohne das Pellet aufzuwirbeln, je nach Spermiedichte 200 - 1000 µl PVP vorsichtig ins Röhrchen pipettiert.

Die Probe inkubierte für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank in einer 8 - 10 % CO₂-Atmosphäre. In dieser Zeit schwammen die motilen Spermien vom Pellet in den Überstand. Nach der Inkubation wurde soviel PVP abpipettiert, wie vor dem Inkubieren hinzugegeben worden war. Das die motilen Spermien enthaltene Medium wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach Bestimmung der Spermienkonzentration lagerten die Proben bis zur zeitnah stattfindenden Annexin V - Färbung bei 4 °C.

3.4 Durchflusszytometrische Messungen

FACS: Funktionsprinzip

Die Abkürzung FACS steht für **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting. Im Deutschen wird dieses Verfahren auch als Durchflusszytometrie bezeichnet. Verwendet wurde das

Gerät FACScan von der Firma Becton & Dickinson. Die Analyse und Darstellung der Daten erfolgte mit der „CellQuest“ Software für Apple Macintosh Computer.

FACS ermöglicht die rasche Analyse einzelner Zellen im Hinblick auf ihre Größe, Granularität und Fluoreszenz. Die zu untersuchenden Zellen werden vor der Messung in Suspension gebracht. Mit einer Trägerflüssigkeit wird ein laminarer Hüllstrom erzeugt, welcher die suspendierten Zellen an einem Laserstrahl vorbeiführt. Aufgrund der Querschnittsverringering innerhalb der Messküvette werden Proben- und Hüllstrom beschleunigt. Dabei werden beide Ströme verjüngt, nicht aber miteinander vermischt. Dieses Phänomen wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

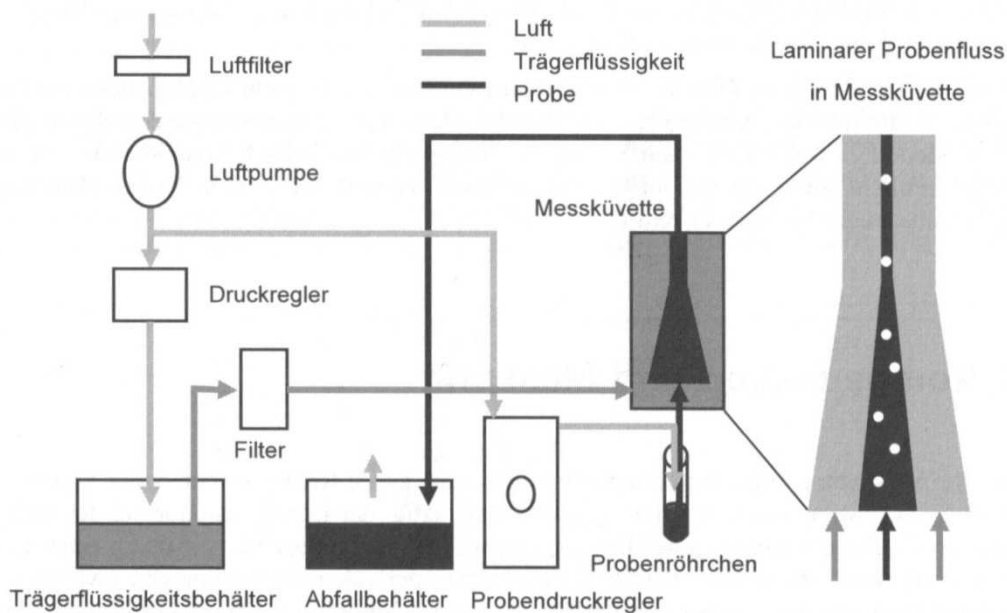


Abb.2: Flüssigkeitssystem, Luftsystem und Probenfluss eines Durchflusszytometers (aus: Luttmann et al., 2004)

Einzelne Zellen passieren den Messlaser. Dieser trifft mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm (blau) den Probenstrom. Die angeregten Zellen emittieren ihrerseits langwelligere (= energieärmere) Strahlung, die mit spezifischen Messzellen gemessen werden kann.

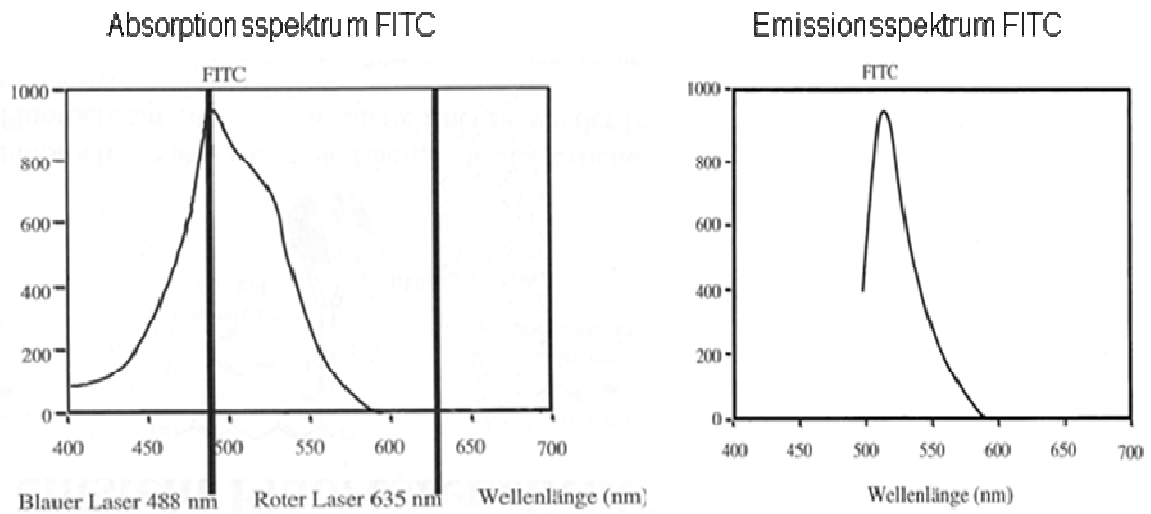


Abb. 3: Absorptions- und Emissionsspektrum von Fluorescein Isothiocyanit (FITC) (Modifiziert nach Luttmann et al., 2004)

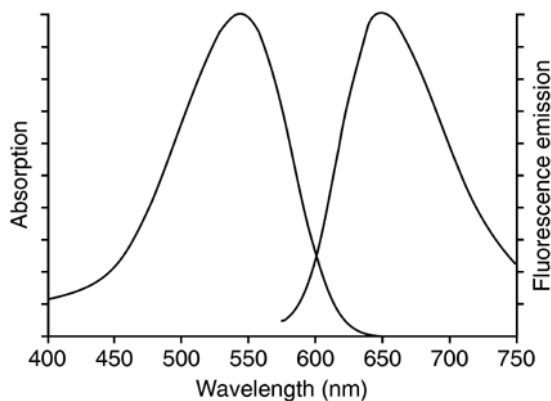


Abb. 4: Absorptions- und Emissionsspektren von 7-Amino-Actinomycin D (7AAD)

(aus: Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:7-AADSpektrum.png>.

Zugriffsdatum: 20.03.2009)

Unter Verwendung spezifischer Detektoren lassen sich Fluoreszenzeigenschaften, Größe (= Beugung der Lichtstrahls) und Granularität (= Brechung und Reflexion des Lichtstrahls) erfassen.

Jede Einzelmessung gilt als ein „Event“. Miteinander verklumpte Zellen werden ebenfalls als singuläres Ereignis gewertet.

Einige der physikalischen Eigenschaften der Zellen können unabhängig von einer Markierung mit Fluorchromen bestimmt werden. Messzelle 1 (Forward Scatter) ist dem Laserstrahl gegenüber angebracht. Sie misst das Ausmaß der Lichtbeugung. Diese ist proportional zur Zellgröße, so dass jede Zellspezies ein charakteristisches Vorwärtsstreulicht erzeugt, das im Forward Scatter (FSC) entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird.

Das Seitwärtsstreulicht hingegen wird in einem 90° - Winkel zum einfallenden Laserlicht in der Messzelle 2 oder Sideward Scatter (SSC) erfasst und ist proportional zur Zellgranularität.

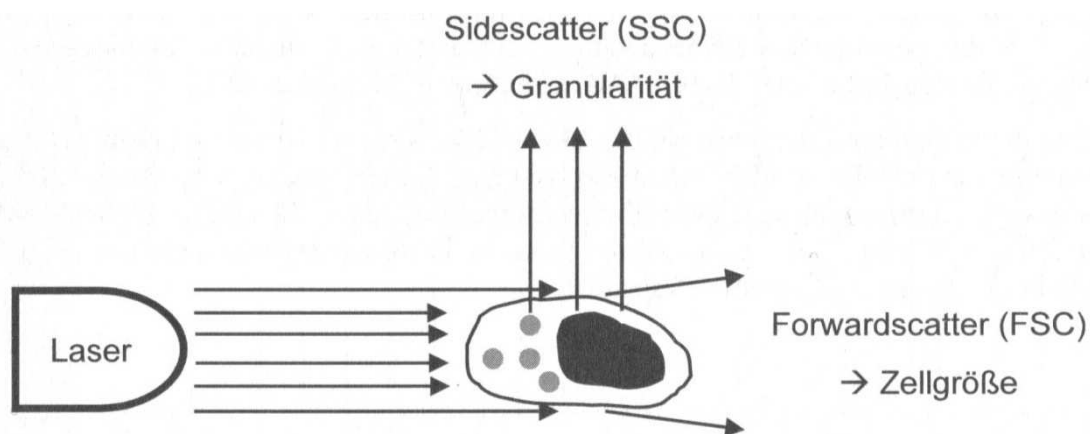


Abb. 5: Die Parameter FSC und SSC

(aus: Luttmann et al., 2004)

Mit weiteren Messzellen können spezifische, von einem aktivierten Fluoreszenzfarbstoff ausgehende Lichtmengen gemessen werden.

So misst der Bandpass-Filter 1 (FL1) Licht mit einer Wellenlänge zwischen 460 und 540 nm (Blau bis ins niederfrequente Grün). In diesem Bereich liegt die Fluoreszenz von FITC.

Bandpass-Filter 2 (FL2) detektiert Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 564 und 606 nm (Gelb bis niederfrequentes Orange).

Longpass-Filter 3 (FL3) schließlich misst Fluoreszenzen mit einer Wellenlänge von mehr als 670 nm (Rot).

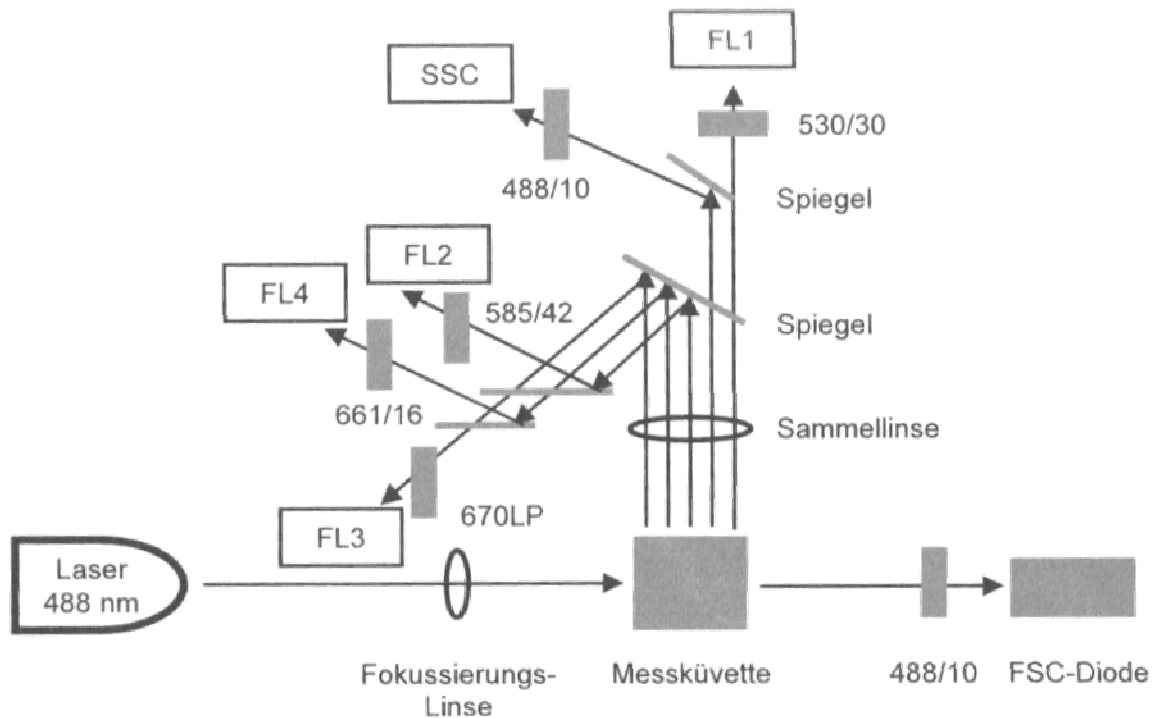


Abb. 6: Optisches System eines Durchflusszytometers

(aus: Luttmann et al., 2004)

Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen sind abhängig von ihrer natürlichen Autofluoreszenz, der Probenaufbereitung und ggf. verwendeten Fluorchromen (Luttmann et al., 2004; Güth, 2005; Leschner, 2006).

Messung der mit Annexin V und 7AAD markierter Spermien:

Threshold (Schwellenwert)

Die Einstellung des Schwellenwertes sollte verhindern, dass Debris (Zellschrott) Eingang in die Datenaufnahme findet. In den Messungen wurden Ereignisse unterhalb des Messkanals 51 im FSC in der Darstellung ignoriert.

Geräteeinstellung

Die jeweiligen Werte für die Spannungs-Verstärkereinstellungen sind von mehreren Faktoren abhängig, etwa den optischen Eigenschaften des benutzten Durchflusszytometers, Art der Zellen sowie der Probenvorbereitung.

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Spannungsverstärkung der verschiedenen Detektoren, die für die Messungen genutzt wurden. Ferner zeigt sie, ob dies im linearen oder logarithmischen Modus geschah.

Tabelle 2: Spannungs- und Verstärkereinstellungen

Parameter	Detektor	Spannung (in Volt)	Verstärkung um Faktor	Modus
P1	FSC	E00	3,32	Lin
P2	SSC	335	1,46	Lin
P3	FL1	572	1	Log
P4	FL2	508	1	Log
P5	FL3	628	1	Log

Kompensation

Sollen mehrere Fluoreszenzen simultan gemessen werden, so muss berücksichtigt werden, dass die emittierten Fluoreszenzen der verwendeten Fluorochrome sich spektral überlappen können. Dies muss bei der Auswertung berücksichtigt und gegebenenfalls kompensiert werden.

Für FITC wurde folgendermaßen kompensiert:

FL1 - 1,3 % FL2

Für 7AAD wurde folgende Kompensation vorgenommen:

FL3 - 49,0 % FL2.

Die Einstellungen wurden so vorgenommen, dass in der Dot-Plot-Darstellung die ungefärbte Spermienpopulation im linken unteren, die Annexin V positive Population im rechten unteren und die Annexin V UND 7AAD positive Population im rechten oberen Quadranten zur Darstellung kamen (Abb. 7).

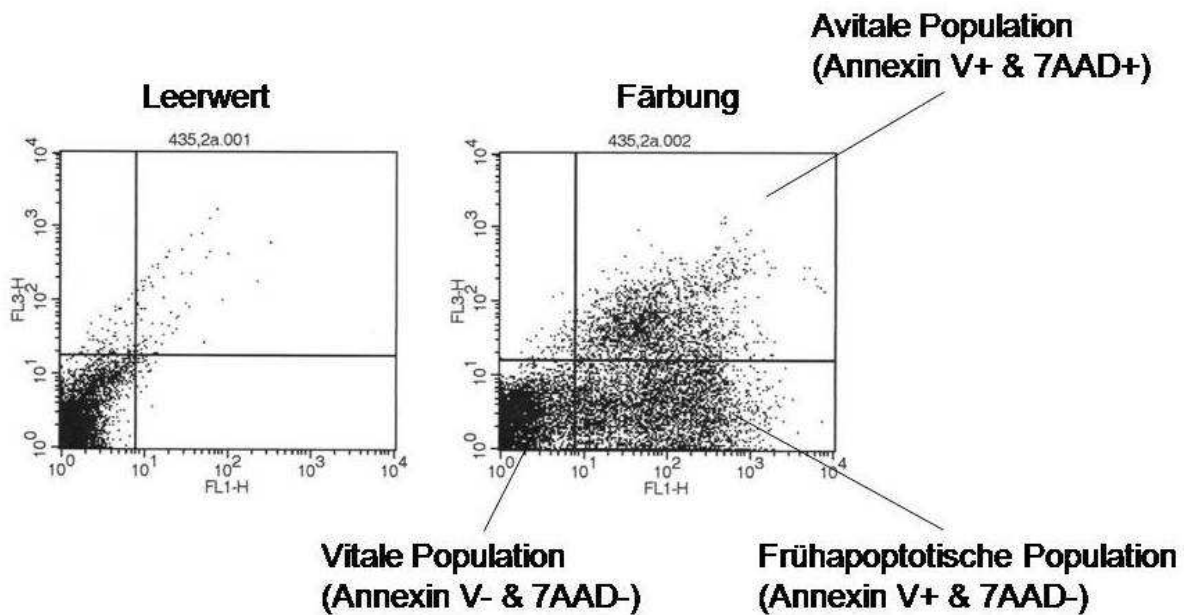


Abb. 7: Beispiel für eine durchflusszytometrische Messung

3.5 Bestimmung der Spermienkonzentration

Es wurden 50 µl Ejakulat in ein Reagenzglas mit 950 µl NaCl-Lösung (10 %) pipettiert, was einer Verdünnung von 1 : 20 entspricht. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Zählkammer mit dem Raster des Neubauer-Hämozytometers gegeben. Die Zählkammer wurde mit einem Deckplättchen abgedeckt und für 3 Minuten stehen gelassen, damit die Zellen sich am Boden der Zählkammer absetzen konnten. Mit einem Lichtmikroskop wurden 5 große Quadrate der Zählkammer durchgemustert. Gezählt wurden ausschließlich Spermien mit Flagellum. Das Auszählungsergebnis wurde durch den Umrechnungsfaktor 10 dividiert, so dass der Untersucher die Spermienkonzentration in Mio./ml erhielt.

3.6 Analyse der Spermienmorphologie

Für die Anfertigung von Ausstrichen wurden nur gründlich gesäuberte und mit 70 % Äthanol gespülte Objektträger verwendet. Vom frischen Nativejakulat wurden jeweils zwei Ausstriche angefertigt. Diese wurden luftgetrocknet und nach Shorr gefärbt. Die Beurteilung der Ausstrichpräparate fand unter Öl-Emulsion bei 1000 x Vergrößerung statt.

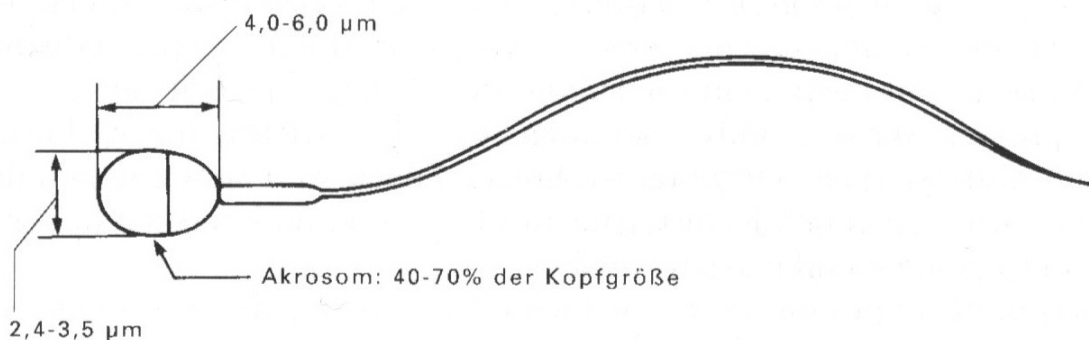


Abb. 8: Normal geformtes Spermium nach den sogenannten „strengen Kriterien“ (aus: Haidl, 2003)

Eine normale Spermatozoenmorphologie liegt, gemäß den „strengen Kriterien“ (Kruger et al., 1986), dann vor, wenn das Spermium folgende Eigenschaften besitzt:

1. Ovaler Kopf
2. Klar abgrenzbare akrosomale Kappe (40 - 70 % der Kopfgröße)
3. Keine Mittelstückdefekte
4. Keine Schwanzdefekte
5. Kein Zytoplasmarest größer als die Hälfte des Kopfes.

Gemäß der Düsseldorfer Klassifikation wurden des Weiteren folgende Morphologiedefekte berücksichtigt:

- Akrosomstörungen
- Überstreckung des Kopfes
- Akrosomstörung + Überstreckung des Kopfes = Ü/A-Formen
- Mittelstückdefekte
- Flagellumdefekte
 - o IA: atypisches Färbeverhalten (Flagellum blau statt rot: Vergesellschaftung mit Nebenhodenstörungen)
 - o IB: struktureller Defekt des Flagellums
 - o II: Unterbrechungen und Windung des Flagellums
 - o III: Rudimentäres Flagellum.

Es folgt das Protokoll der Shorr-Färbung:

1.: Fixierung: Äthanol (100 %)	10 Min
2.: Fixierung: Äthanol (70 %)	1 Min
3.: Färbung: Hämalau nach Mayer	10 Min 30 Sek
4.: Waschen: Fließendes Wasser	3 Min
5.: Entwässern: Äthanol (70 %)	10 Sek
6.: Entwässern: Äthanol (95 %)	10 Sek
7.: Färbung: Shorr'sche Farblösung	1 Min
8.: Entwässern: 2 x Äthanol (95 %)	je 10 Sek
9.: Entwässern: 3 x Äthanol (100 %)	je 5 Sek
10.: Klären: 2 x Xylol	je 5 Min
11.: Eindecken	

3.7 Quantifizierung der Granulozytenelastase im Seminalplasma

Die Konzentration der Elastase wurde mit einem homogenen Immunaktivierungsassay (IMAC) bestimmt. Verwendet wurde das PMNE-Kit der Fa. Merck (Darmstadt).

Eingesetzt wurden Antikörperkonjugate aus Antikörperfragmenten (Fab) gegen humane Granulozytenelastase (PMNE) mit kovalent gebundener Meerrettichperoxidase (POD). In einer Immunreaktion bilden diese Antikörperkonjugate mit in der Probe enthaltenen Proteinen der Granulozytenelastase Aggregate.

Die POD in nicht-aggregierten Antikörperkonjugaten wird mit hohen H_2O_2 -Konzentrationen inhibiert. Die POD-Aktivität in den dreidimensional vernetzten Aggregaten bleibt hingegen auch in der Gegenwart hoher H_2O_2 -Mengen erhalten. Erst durch die Zugabe von 4-Aminophenazon und Phenol katalysiert die in den Aggregaten enthaltene POD die sog. TRINDER-Reaktion:

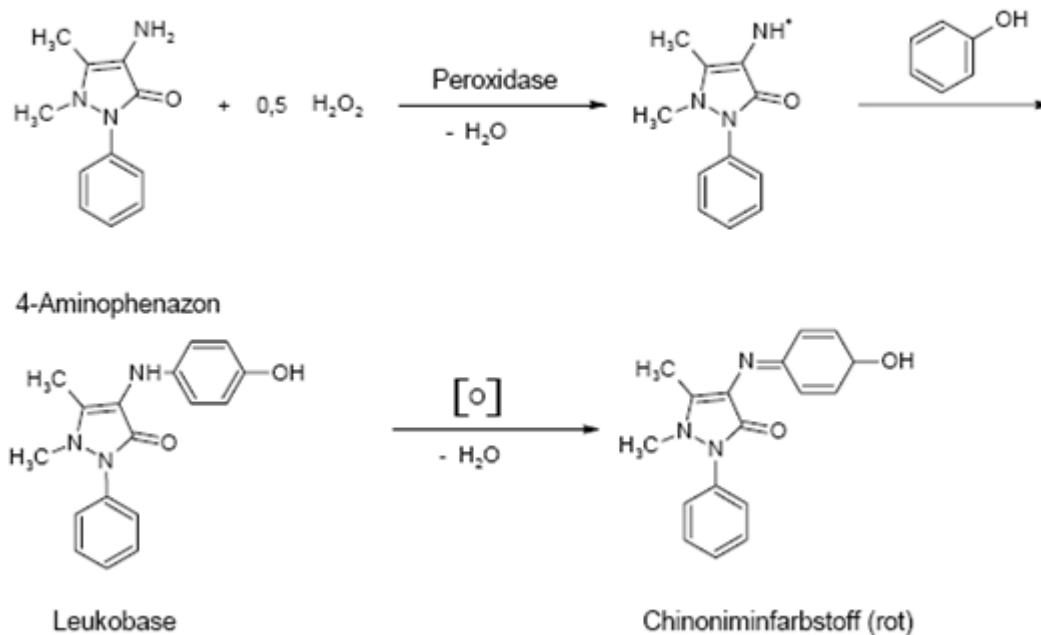


Abb. 9: TRINDER-Reaktion

(aus: Gröger, 2003)

Die Menge an gebildetem rotem Chinoniminfarbstoff ist direkt proportional zur Konzentration der Granulozytenelastase. Sie wird mit einem Photometer bei 405 nm gemessen.

Es folgt das Protokoll der PMNE-Quantifizierung:

- 1.: Zentrifugation der Spermaprobe bei 2000 U/min 10 Min.
- 2.: 100 µl Seminalplasma + 200 µl Probenverdünnungsmedium
- 3.: Je 25 µl von
 - a) verdünnter Probe
 - b) Eichstandard
 - c) Kontrollewerden mit 100 µl Antikörperkonjugat vermischt
- 4.: Inkubation bei 37 °C 10 Min.
- 5.: Zugabe von 250 µl Farbreagenz zu Probe, Eichstandard und Kontrolle
- 6.: Inkubation bei 37 °C 10 Min.
- 7.: Zugabe von Stoppreagenz zu Probe, Eichstandard und Kontrolle
- 8.: Gabe von je 200 µl auf eine Mikrotiterplatte
- 9.: Messung im Photometer

3.8 Bestimmung der Leukozytenzahl

Die Analyse der Leukozytenzahl fand nach Shorr-Färbung im Rahmen der morphologischen Beurteilung statt. Durch einen erfahrenen Untersucher wurden die Ergebnisse der Leukozytenbestimmung in fünf Kategorien eingeteilt:

1. Keine
2. Vereinzelt (+)
3. Vermehrt +
4. Deutlich erhöht ++
5. Massig +++

3.9 Statistische Auswertung der Rohdaten

Für die Korrelationen, Auflistung und grafische Aufarbeitung der Daten wurde Microsoft Office Excel 2007 für PC verwendet. Zur Beurteilung der Signifikanz wurden der Mann-Whitney-U- sowie der Pearson-Test verwendet. Wir verwendeten das Statistikprogramm SPSS 11.0. Signifikanz lag dann vor, wenn $p < 0,05$. Signifikante Daten wurden im Ergebnisteil gesondert gekennzeichnet (*) und/oder in der Beschreibung der entsprechenden Grafik erwähnt.

4 Ergebnisse

4.1 Anteil Annexin V positiver Spermien in allen A-Proben

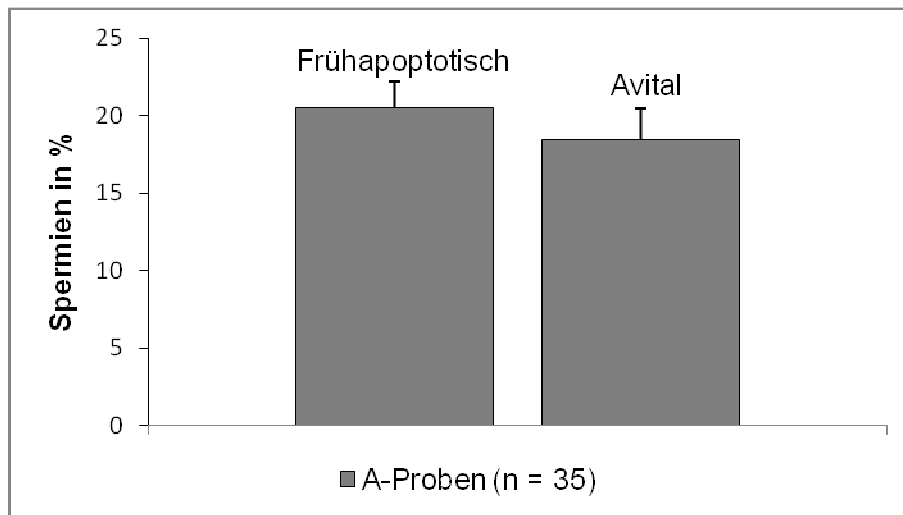
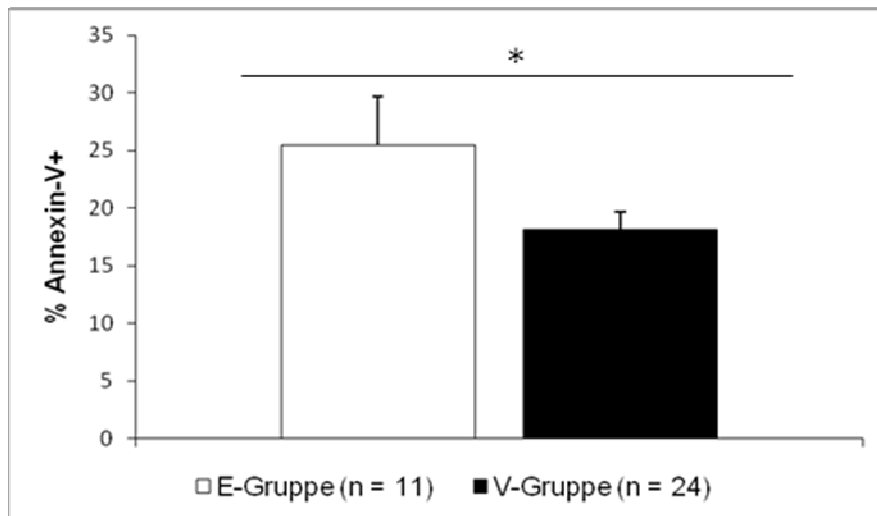


Abb. 10: Mittelwertige Anteile frühapoptotischer und avitaler Spermien aller A-Proben an der Gesamtspermienpopulation

Wie Abbildung 10 zeigt lag der mittlere Anteil an frühapoptotischen Spermien in allen A-Proben (n = 35) bei 20,47 % (SEM \pm 1,76). Der avitalen Population gehörten im Mittel 18,49 % (SEM \pm 1,96) aller Spermien an.

Es zeigte sich, dass innerhalb der E-Gruppe der Anteil frühapoptotischer Spermatozoen mit 25,52 % (SEM \pm 4,17) signifikant höher war als in der V-Gruppe mit 18,15 % (SEM \pm 1,56; $p < 0,05$). Vgl. hierzu mit Abbildung 11.



**Abb. 11: Anteil frühapoptotischer Spermien in E- und V-Gruppe (alle A-Proben),
* = $p < 0,05$**

Der Zahl avitaler Spermien war im Mittel in der E-Gruppe mit 21,28 % (SEM \pm 4,17) ebenfalls höher als in der V-Gruppe mit 17,21 % (SEM \pm 2,10). Vgl. hierzu mit Abbildung 12.

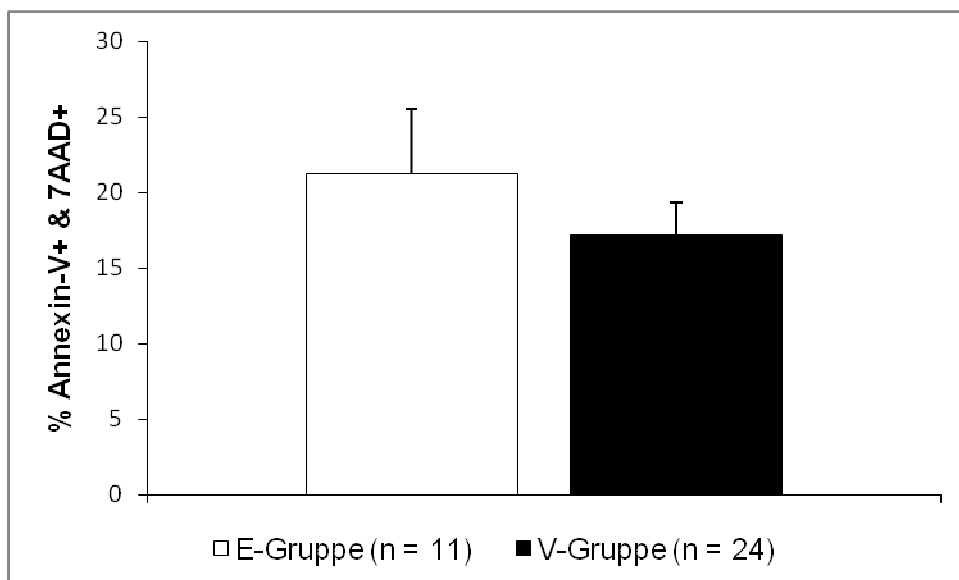


Abb. 12: Anteil avitaler Spermien in E- und V-Gruppe (alle A-Proben)

4.2 Anteil Annexin V positiver Spermien in A- und B-Proben

Es war unser Ziel zu untersuchen, wie hoch der Anteil Annexin V positiver Spermien im Ejakulat von Männern mit und ohne erhöhten inflammatorischen Entzündungsparametern im Seminalplasma ist. Ferner sollte geklärt werden, ob sich der Anteil frühapoptotischer Spermatozoen in den B-Proben im Vergleich zu ihren korrespondierenden A-Proben ändert. Es wurden 24 A- und B-Proben untersucht und die Mittelwerte für die frühapoptotischen (Annexin-V+ & 7AAD-) und avitalen (Annexin-V+ & 7AAD+) Spermien errechnet (Abb. 13):

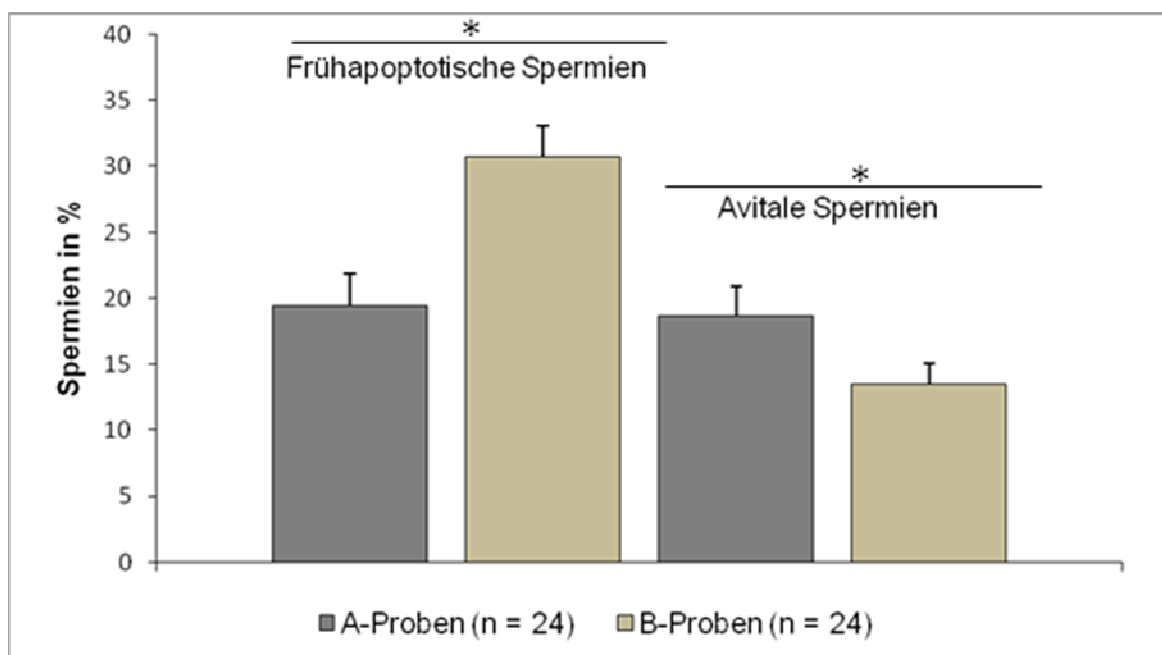


Abb. 13: Mittelwerte der frühapoptotischen und avitalen Spermien in A- und korrespondierenden B-Proben; * = $p < 0,05$

Der Anteil frühapoptotischer Spermien betrug im Mittel 19,46 % (SEM \pm 2,40) in den A- und 30,72 % (SEM \pm 2,33; $p < 0,05$) in den B-Proben. Des Weiteren lag der Mittelwert für die avitalen Spermien in den A-Proben bei 18,63 % (SEM \pm 2,34) und in den B-Proben bei 13,46 % (SEM \pm 1,61; $p < 0,05$).

Die 24 Probenpaare wurden in der Auswertung zusätzlich in E- und V-Gruppe unterteilt (n = 8 bzw. n = 16). Die Mittelwerte in A- und B-Proben der E-Gruppe zeigt Abbildung 14.

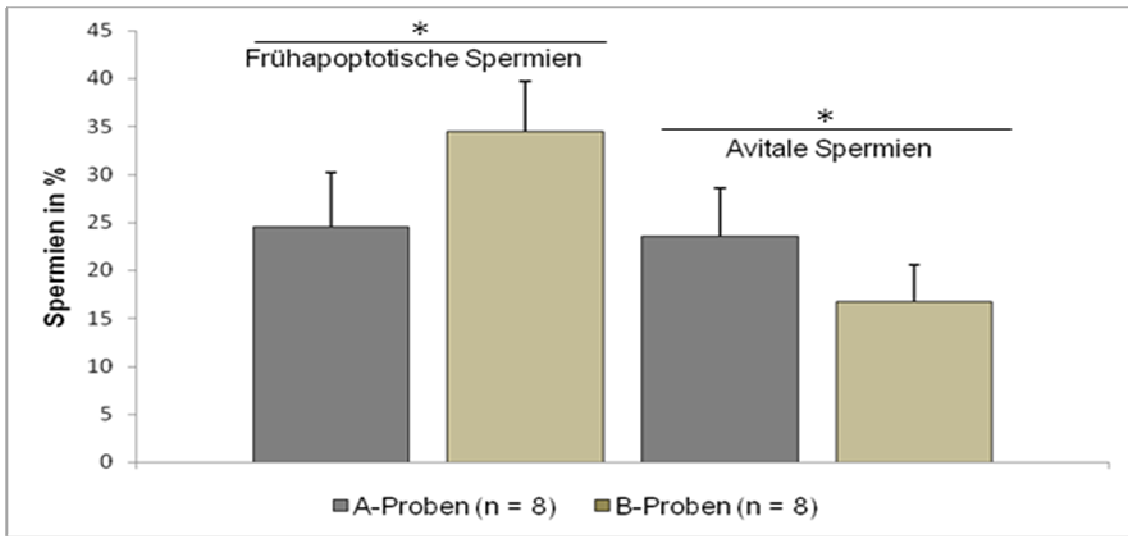


Abb. 14: Mittelwerte der frühapoptotischen und avitalen Spermien in A- und korrespondierenden B-Proben innerhalb der E-Gruppe; * = $p < 0,05$

In der E-Gruppe lag der Mittelwert für den prozentualen Anteil an frühapoptotischen Spermien in den A-Proben bei 24,59 % (SEM \pm 5,56) und in den B-Proben bei 34,48 % (SEM \pm 5,18; $p < 0,05$). Im Mittel waren 23,57 % (SEM \pm 5,01) der Spermien in den A- und 16,76 % (SEM \pm 3,80; $p < 0,05$) der Spermien in den B-Proben avital. Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte innerhalb der V-Gruppe:

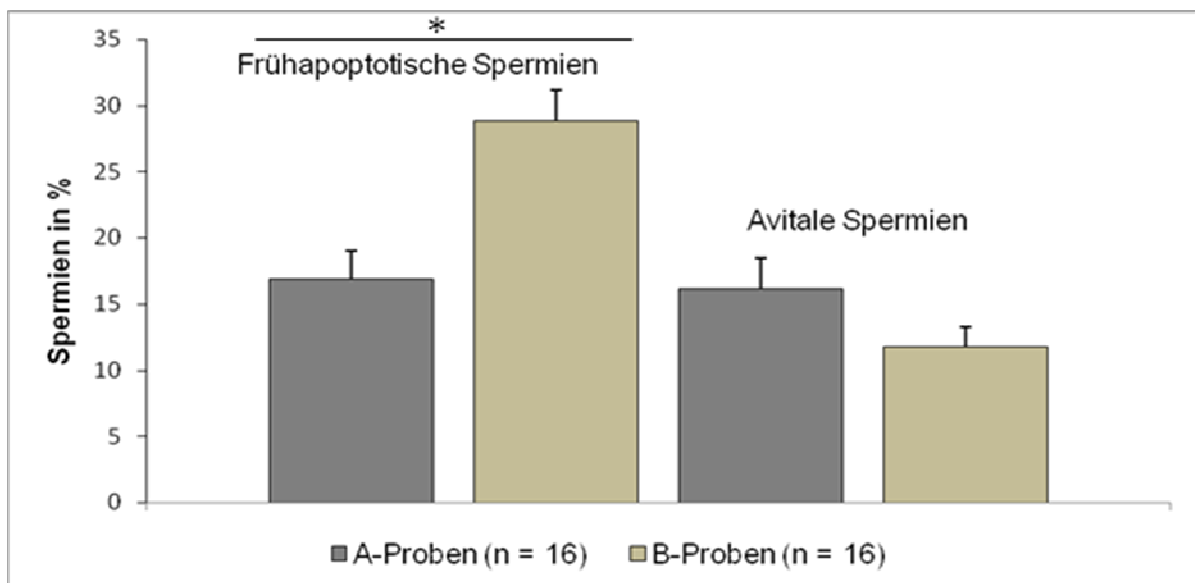


Abb. 15: Mittelwerte der frühapoptotischen und avitalen Spermien in A- und korrespondierenden B-Proben innerhalb der V-Gruppe; * = $p < 0,05$

Im Mittel waren innerhalb der V-Gruppe 16,90 % (SEM \pm 2,16) aller Spermien der A- und 28,83 % (SEM \pm 2,35; $p < 0,05$) aller Spermien der B-Proben frühapoptotisch. Ferner waren in den A-Proben 16,15 % (SEM \pm 2,35) und in den B-Proben 11,81 % (SEM \pm 1,43) der Spermien avital.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in beiden Gruppen sowohl in A- als auch B-Proben frühapoptotische Spermien nachweisbar waren. Der Anteil Annexin V positiver & 7AAD negativer Spermatozoen war im Mittel in den B-Proben deutlich höher als in den A-Proben. Innerhalb der E-Gruppe waren in beiden Proben mehr Spermien frühapoptotisch als in der V-Gruppe (Abb.16).

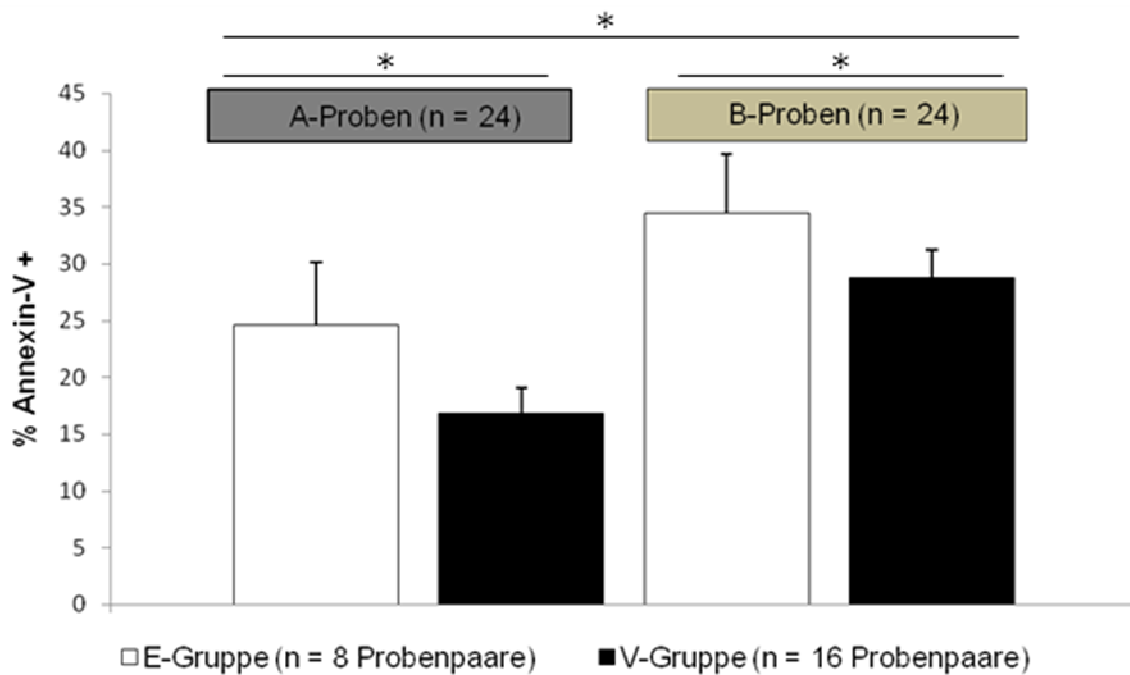


Abb. 16: Mittelwertige Anteile frühapoptotischer Spermien innerhalb von E- und V-Gruppe im Vergleich; * = $p < 0,05$

4.3 Anteil Annexin V positiver Spermien vor und nach Swim-up

Das Swim-up Verfahren ist eine effiziente Methode, um vitale progressiv-motile Spermien von avitalen oder inmotilen zu trennen. Wir führten mit 28 Proben (14 A- und korrespondierende B-Proben) vor und nach Swim-up Färbungen mit Annexin V durch und bestimmten durchflusszytometrisch den Anteil frühapoptotischer und avitaler Spermien an der Gesamtspermienpopulation. Es wurde auch hier zwischen einer Entzündungs- und eine Vergleichsgruppe (E- bzw. V-Gruppe) unterschieden. Beide Gruppen enthielten jeweils sieben Probenpaare.

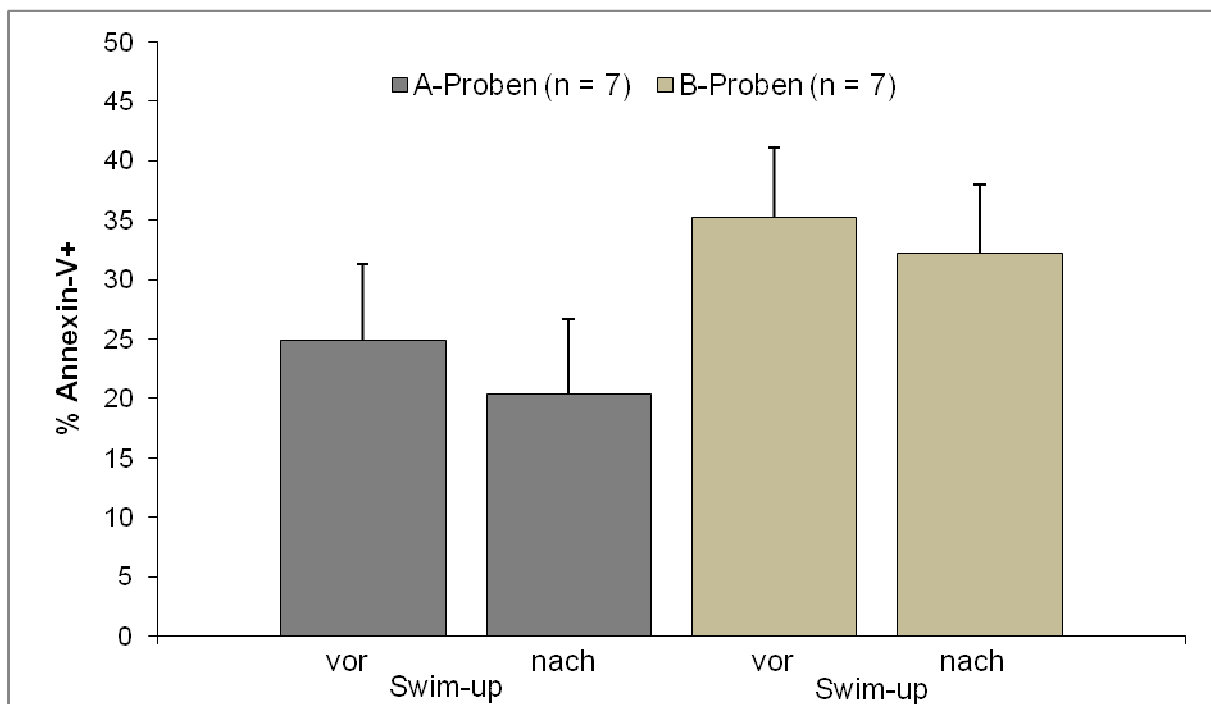


Abb. 17: Mittelwerte der frühapoptotischen Spermien in A- und B-Proben vor und nach Aufarbeitung mit Swim-up (E-Gruppe)

In der E-Gruppe waren vor Swim-up 24,89 % (SEM \pm 6,41) Spermien den A- und 35,20 % (SEM \pm 5,93) der B-Proben frühapoptotisch. Nach Swim-up waren in den A-Proben 20,39 % (SEM \pm 6,29) und in den B-Proben 32,27 % (SEM \pm 5,63) der Spermatozoen Annexin V positiv (Abb.17).

Abbildung 18 zeigt für die E-Gruppe den Anteil der avitalen Spermien in A- und B-Proben vor und nach Swim-up. In den A-Proben waren vor Swim-up 20,48 % (SEM \pm 4,55) und nach Swim-up 8,30 % (SEM \pm 1,85; $p < 0,05$) der Spermien avital. In den B-

Proben war dies bei 14,74 % (SEM \pm 3,72) bzw. 17,59 % (SEM \pm 3,49) der Spermien der Fall.

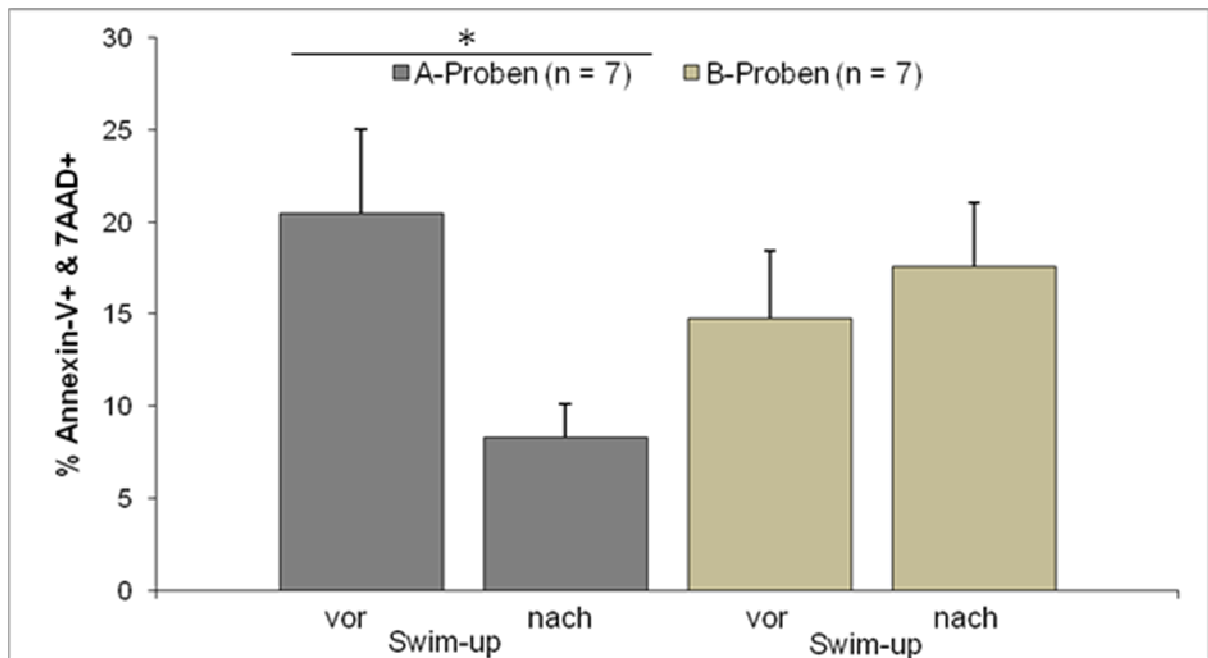


Abb. 18: Mittelwerte der avitalen Spermien in A- und B-Proben vor und nach Aufarbeitung mit Swim-up (E-Gruppe); * = p < 0,05

Innerhalb der V-Gruppe waren vor Swim-up 13,51 % (SEM \pm 3,52) der Spermien aus den A- und 30,06 % (SEM \pm 4,66; p < 0,05) der Spermatozoen aus den B-Proben frühapoptotisch (vgl. Abb.19).

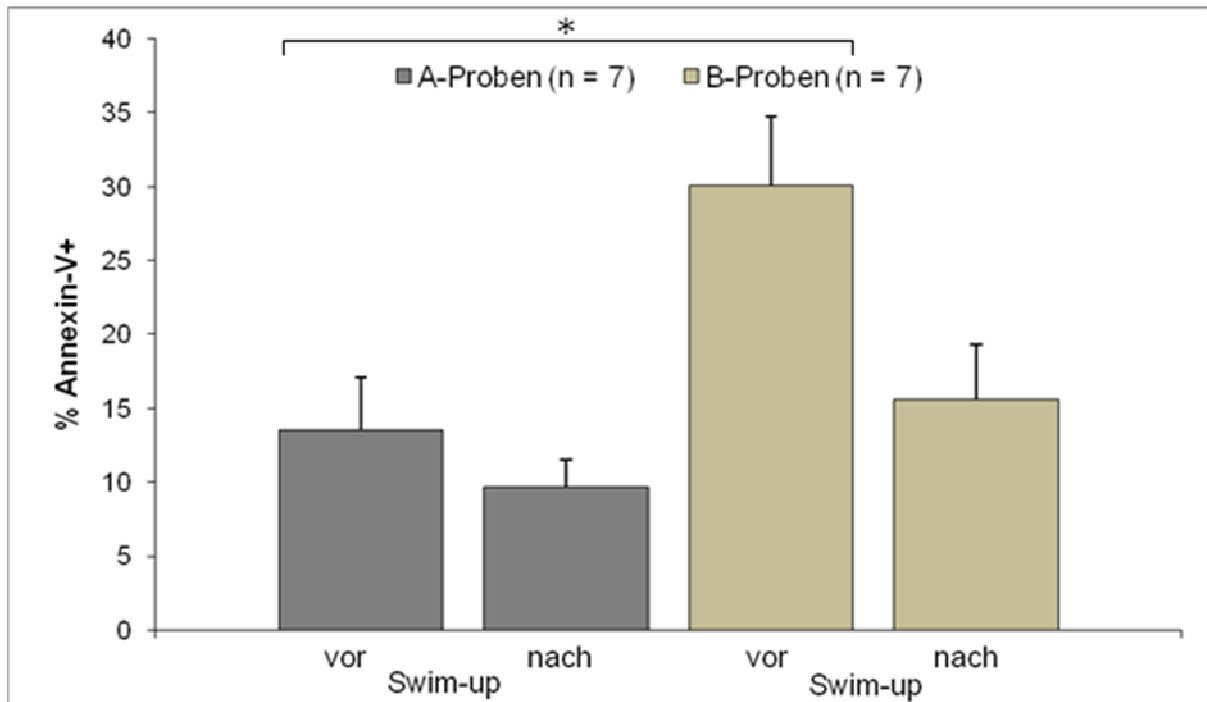


Abb. 19: Mittelwerte der frühapoptotischen Spermien in A- und B-Proben vor und nach Aufarbeitung mit Swim-up (V-Gruppe); * = $p < 0,05$

Der Abbildung 19 ist ferner zu entnehmen, dass sich nach Swim-up 9,67 % (SEM \pm 1,85) der Spermien in den A- und 15,53 % (SEM \pm 3,77) der Spermien in den B-Proben im Stadium der Frühapoptose befanden.

Wir bestimmten auch in der V-Gruppe den Anteil der avitalen Spermien an der Gesamtpopulation (vgl. Abb. 20). So waren vor Swim-up 14,60 % (SEM \pm 3,31) der Spermien in den A- und 10 % (SEM \pm 1,44) der Spermien in den B-Proben avital. Der Anteil avitaler Spermatozoen betrug nach Swim-up 12,17 % (SEM \pm 6,79) in den A- und 13,54 % (SEM \pm 3,49) in den B-Proben.

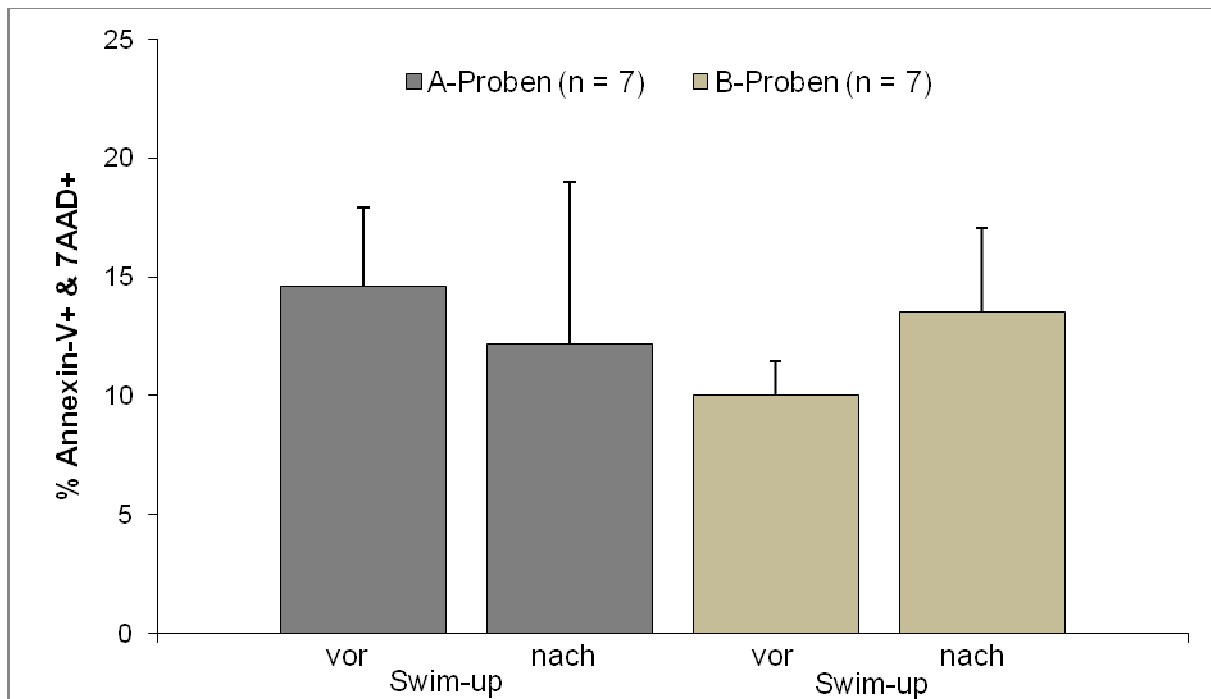


Abb. 20: Mittelwerte der avitalen Spermien in A- und B-Proben vor und nach Aufarbeitung mit Swim-up (V-Gruppe)

Die Abbildung 21 zeigt den mittleren Anteil frühapoptotischer Spermien in E- und V-Gruppe, vor und nach Swim-up, im Vergleich. Der Anteil Annexin-V positiver Spermien ist in den B-Proben sowohl vor als auch nach Swim-up Aufarbeitung höher als in den korrespondierenden A-Proben. Dies gilt für E- und V-Gruppe.

Der Anteil frühapoptotischer Spermien ist in der E-Gruppe sowohl vor und nach Swim-up als auch in A- und B-Proben im Mittel signifikant höher als in der V-Gruppe ($p < 0,05$).

In den untersuchten Proben waren nach Swim-up zwar weniger Annexin V positive Spermien vorhanden als vor der Aufarbeitung. Allerdings lag der Anteil frühapoptotischer Spermien nach Swim-up weiterhin im zweistelligen Prozentbereich.

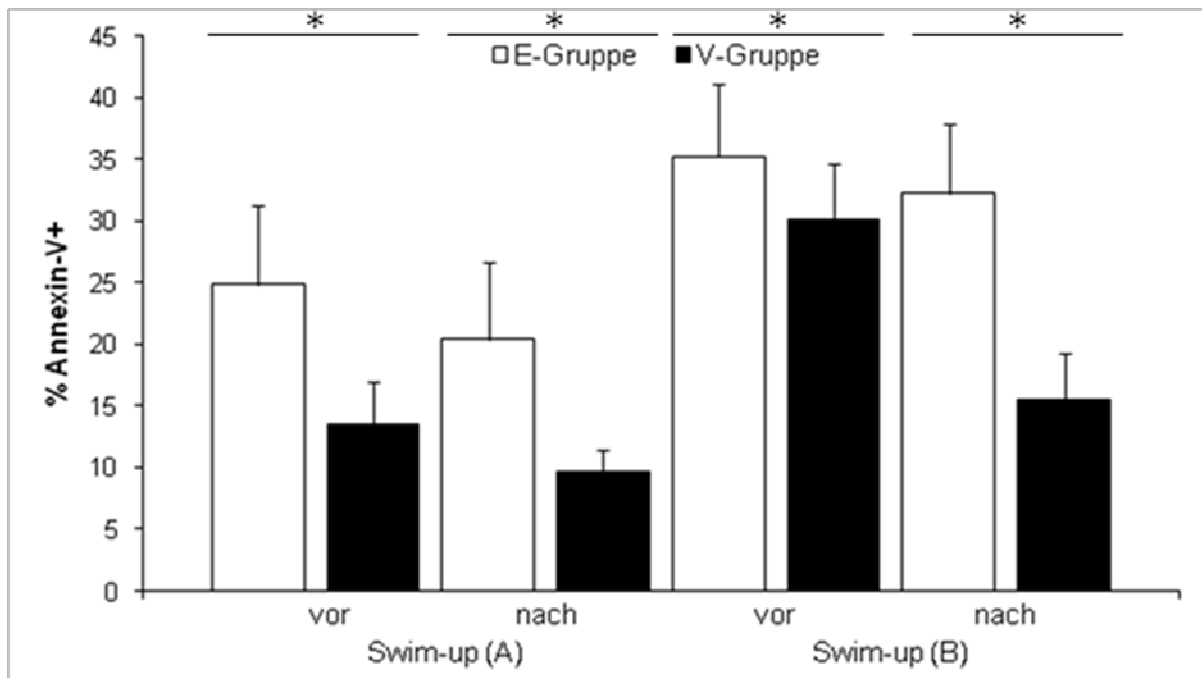


Abb. 21: Mittelwerte der frühapoptotischen Spermien in E- und V-Gruppe vor und nach Swim-up im Vergleich. Es wurden 14 A- und 14 B-Proben vor und nach Swim-up untersucht. E-Gruppe: n = 7 Probenpaare, V-Gruppe: n = 7 Probenpaare; * = p < 0,05

4.4 Korrelation der Elastasekonzentration mit Annexin V

Im Seminalplasma von 18 Ejakulaten wurde die Konzentration der Granulozytenelastase bestimmt und mit den prozentualen Anteilen frühapoptotischer und avitaler Spermien korreliert. Wir konnten eine signifikante positive Korrelation von frühapoptotischen Spermien mit Elastase feststellen ($r = 0,57$, $p < 0,05$). Zwischen dem Anteil avitaler Spermien und der Granulozytenelastase konnte kein signifikanter statistischer Zusammenhang festgestellt werden ($r = -0,25$). Die Korrelationen sind in den Abbildungen 22 (frühapoptotische Spermien) und 23 (avitale Spermien) grafisch als Punktdiagramme dargestellt.

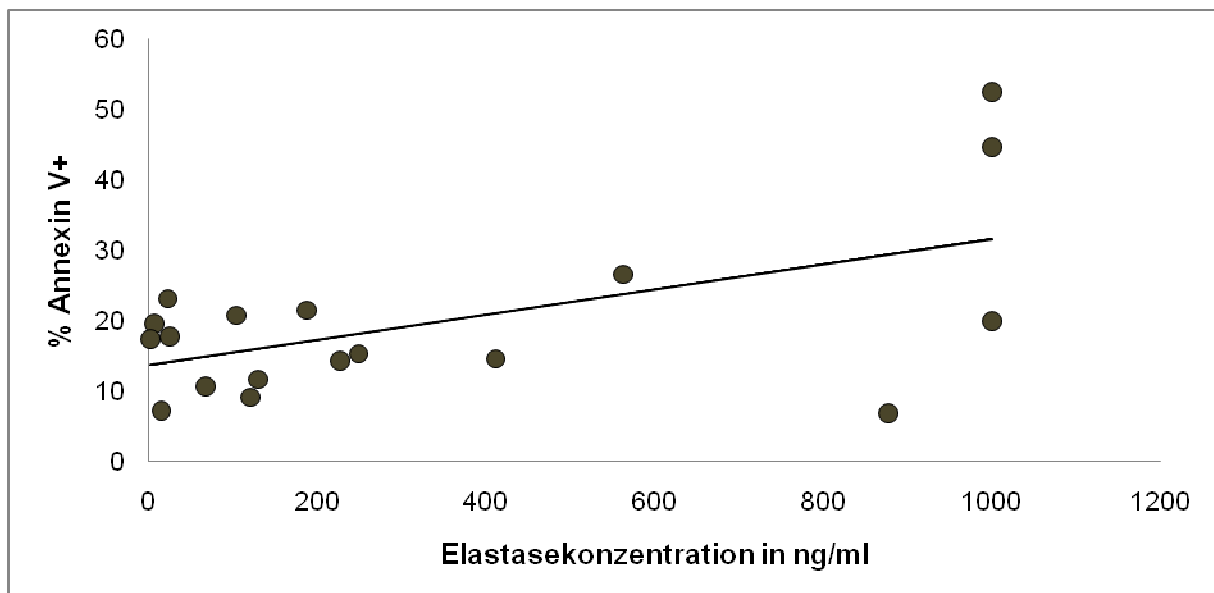


Abb. 22: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat und Elastasekonzentration im Seminalplasma ($r = 0,57$, $p < 0,05$; $n = 18$)

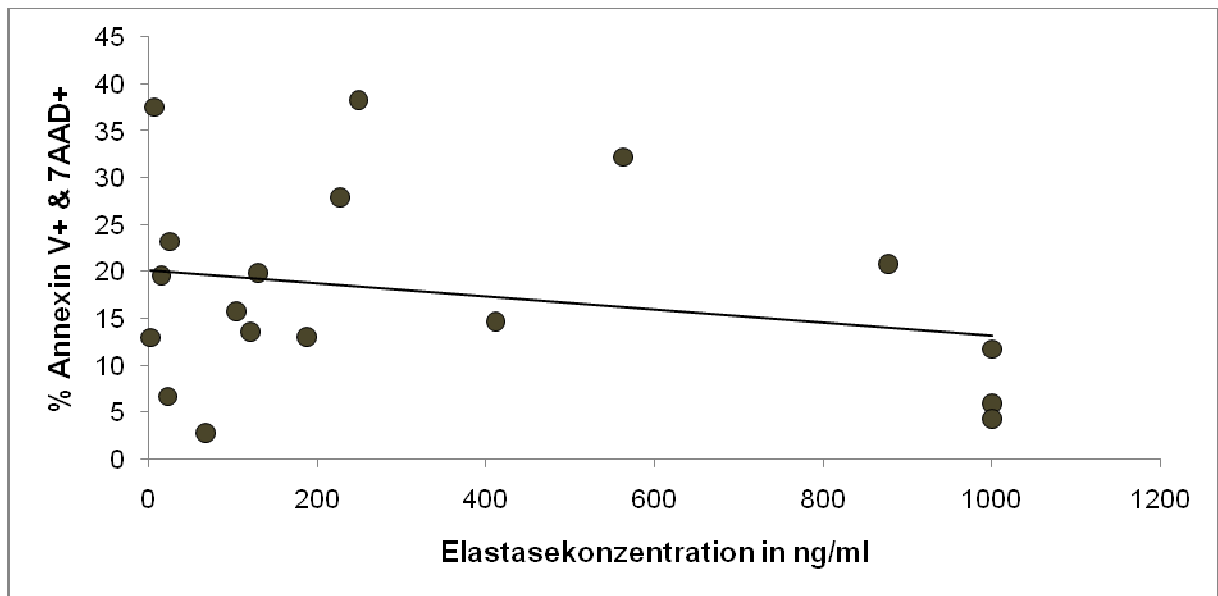


Abb. 23: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien im Ejakulat und Elastasekonzentration im Seminalplasma ($r = -0,25$; $n = 18$)

4.5 Korrelation des Ejakulatvolumens mit Annexin V

Untersucht wurden insgesamt 35 Proben (E-Gruppe: n = 11 und V-Gruppe: n = 24). Innerhalb der E-Gruppe bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen Frühapoptose und Ejakulatvolumen ($r = -0,50$, $p < 0,05$). In der V-Gruppe konnte keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden ($r = 0,11$). Vergleiche hierzu auch mit Abbildung 24.

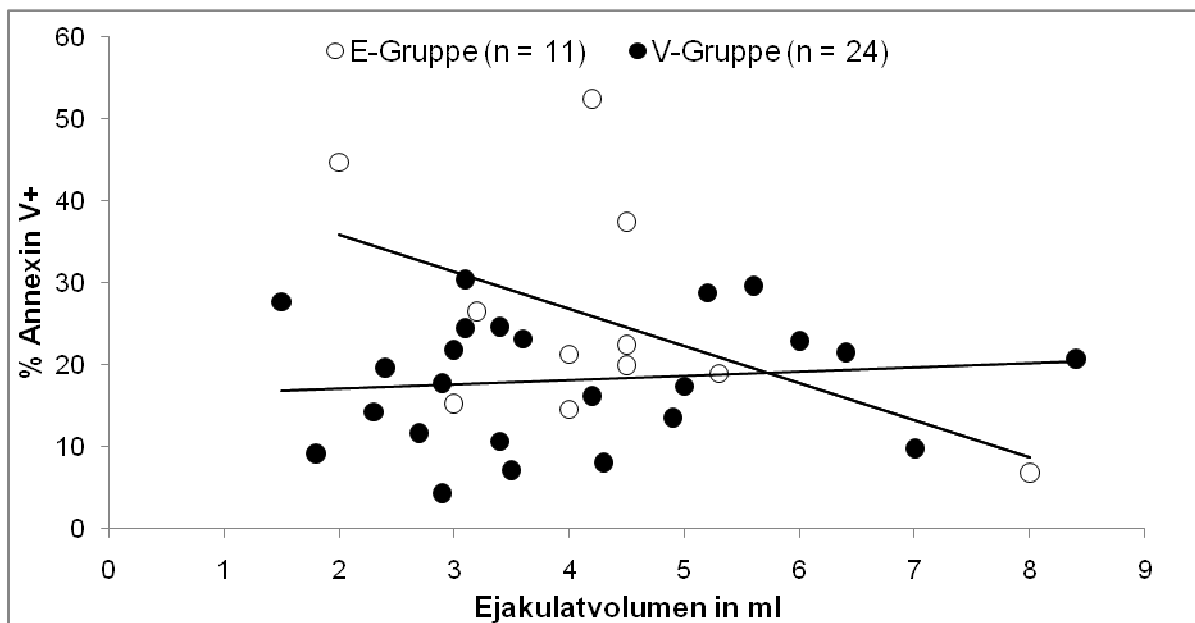


Abb. 24: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat und Ejakulatvolumen (E-Gruppe: $r = -0,50$, $p < 0,05$; V-Gruppe: $r = -0,25$)

Es bestand kein statistischer Zusammenhang zwischen Ejakulatvolumen und avitalen Spermien in der E-Gruppe ($r = 0,08$) und in der V-Gruppe ($r = -0,23$), wie Abbildung 25 demonstriert.

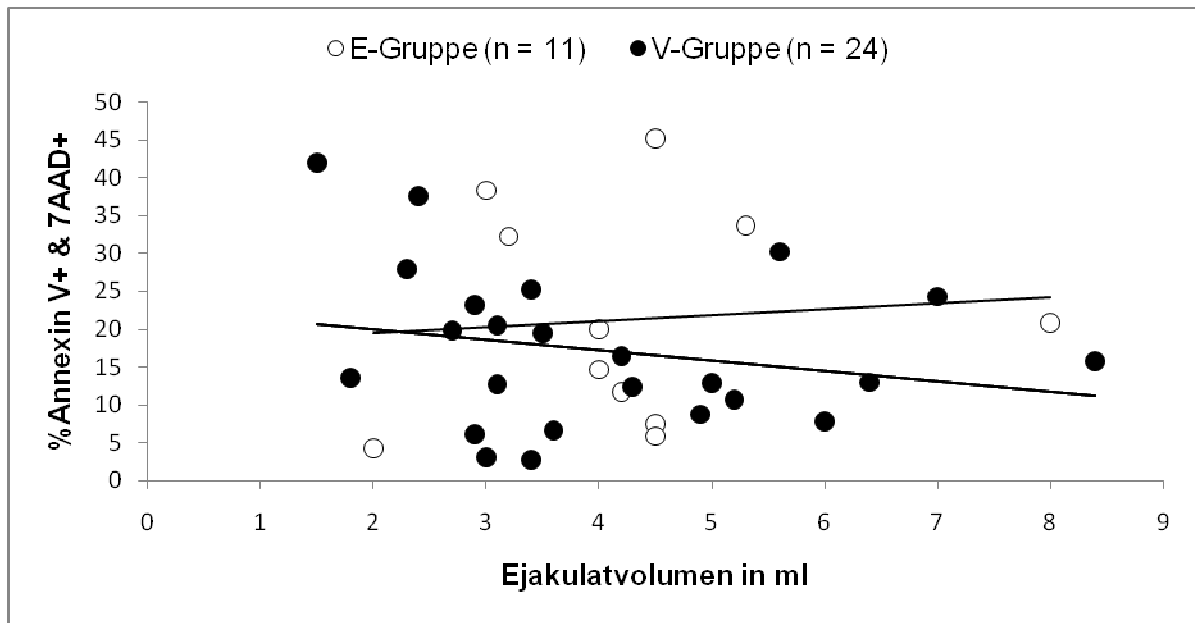


Abb. 25: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien im Ejakulat und Ejakulatvolumen (E-Gruppe: $r = 0,08$; V-Gruppe: $r = -0,23$)

4.6 Korrelation der Spermienkonzentration und -gesamtzahl mit Annexin V

Die Spermienkonzentration und -gesamtzahl wurde in insgesamt 35 Proben bestimmt (E-Gruppe: n = 11 und V-Gruppe: n = 24). Abbildung 26 zeigt die Korrelation der Frühapoptose mit der Spermienkonzentration:

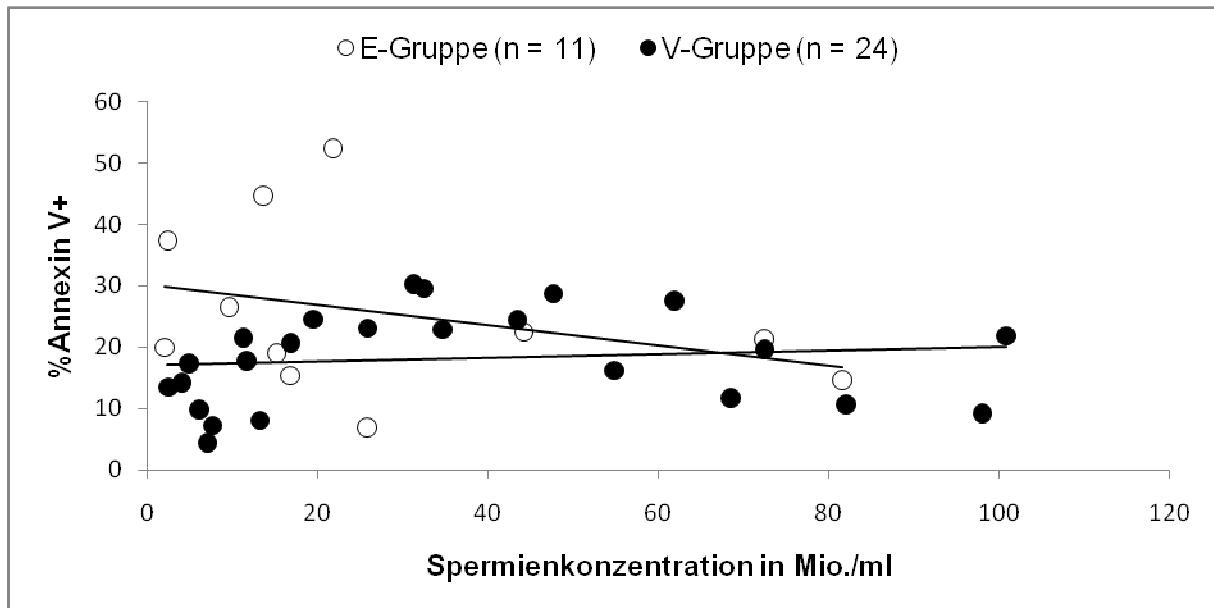


Abb. 26: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat und Spermienkonzentration (E-Gruppe: $r = -0,32$; V-Gruppe: $r = 0,12$)

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Spermienkonzentration und dem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat nachgewiesen werden (E-Gruppe: $r = -0,32$; V-Gruppe: $r = 0,12$). Ebenso wenig bestand eine statistisch signifikante Korrelation zwischen avitalen Spermien und Spermiedichte (E-Gruppe: $r = 0,13$; V-Gruppe: $r = -0,05$; vgl. Abbildung 27).

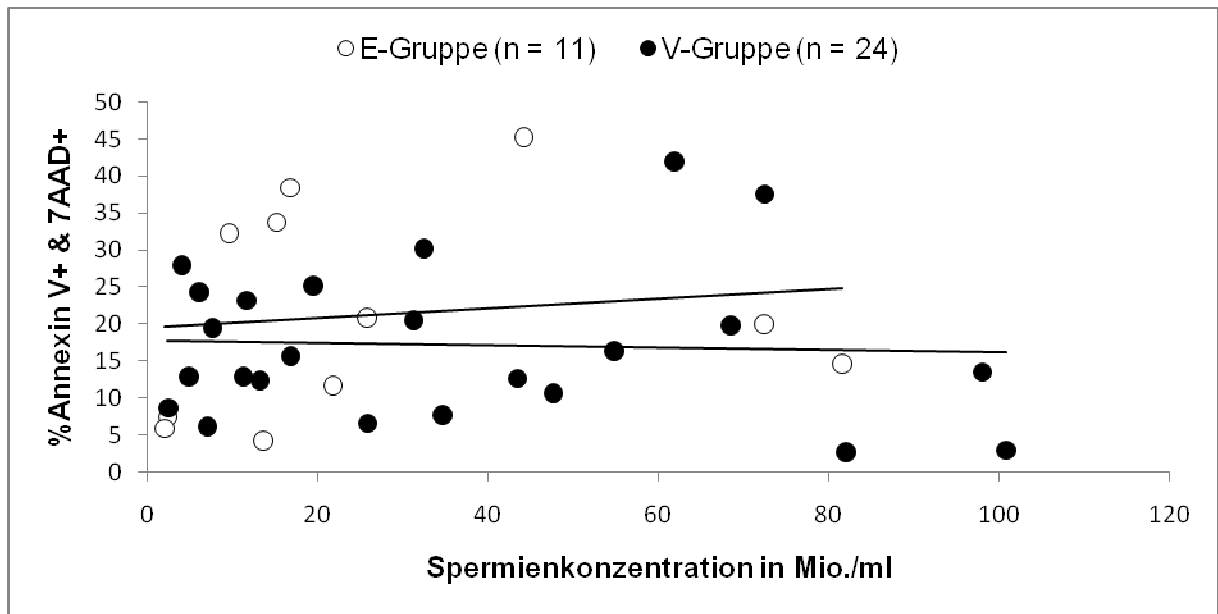


Abb. 27: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien im Ejakulat und und Ejakulatvolumen (E-Gruppe: $r = 0,13$; V-Gruppe: $r = -0,05$)

Wir bestimmten für alle 35 Proben die Spermiengesamtzahl, indem wir die Spermienkonzentration mit dem Ejakulatvolumen multiplizierten. Abbildung 28 zeigt die Korrelation der Spermiengesamtzahl mit dem Anteil an frühapoptotischen Spermien. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Spermienzahl und Frühapoptose festgestellt werden (E-Gruppe: $r = -0,45$; V-Gruppe: $r = 0,29$).

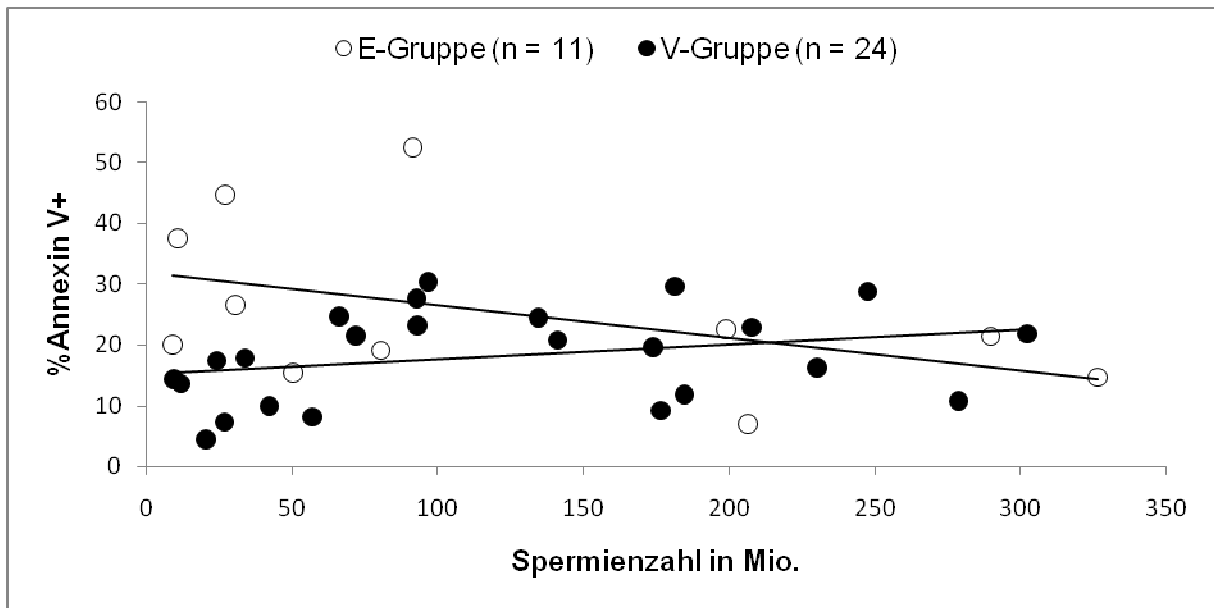


Abb. 28: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat und Spermiengesamtzahl (E-Gruppe: $r = -0,45$; V-Gruppe: $r = 0,29$)

Ebensowenig zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Spermienzahl und avitalen Spermien, wie Abbildung 29 zu entnehmen ist (E-Gruppe: $r = 0,16$; V-Gruppe: $r = -0,25$).

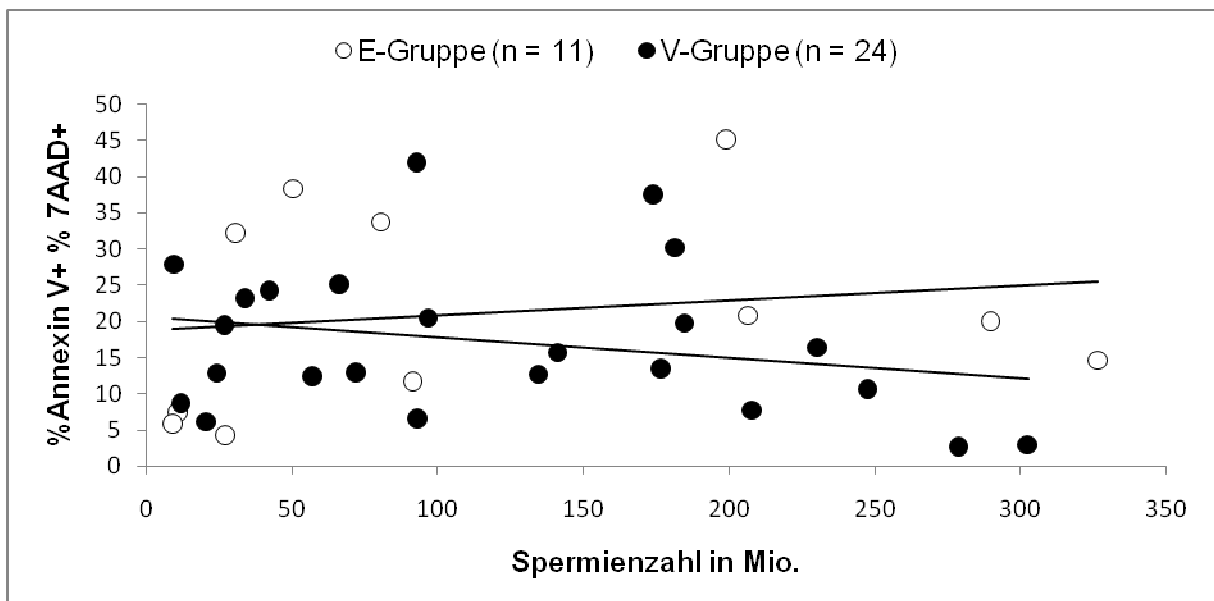


Abb. 29: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien im Ejakulat und Spermiengesamtzahl (E-Gruppe: $r = 0,16$; V-Gruppe: $r = -0,25$)

4.7 Korrelation der Spermienkonzentration (B-Proben) mit Annexin V

Wir bestimmten die Spermienkonzentrationen von 24 B-Proben und korrelierten sie mit der Rate an frühapoptotischen und avitalen Spermien. Wie Abbildungen 30 und 31 zeigen bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Spermienkonzentration und der Menge an frühapoptotischen bzw. avitalen Spermien in den B-Proben.

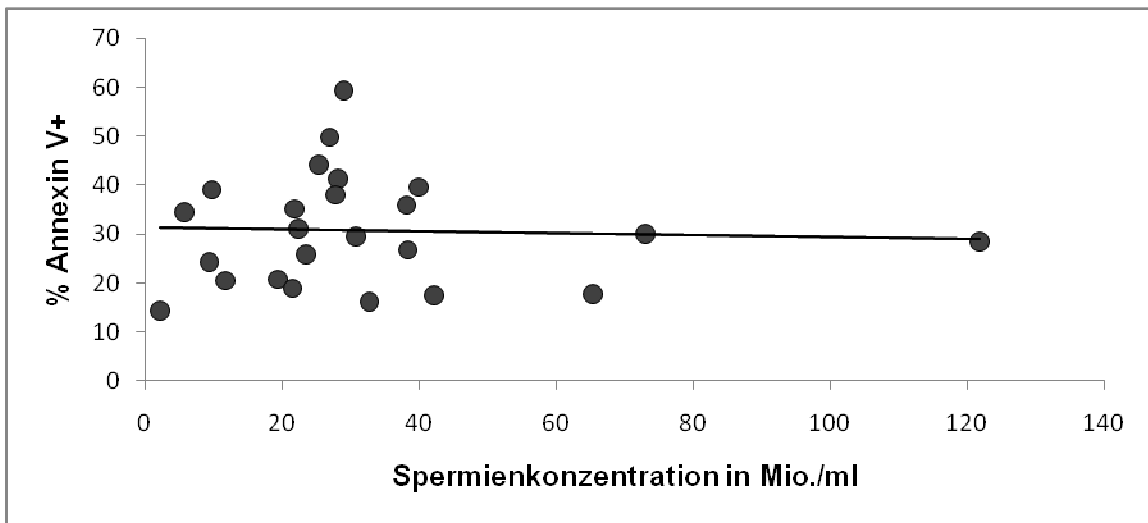


Abb. 30: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien im Ejakulat und Spermienkonzentration in B-Proben (n = 24, r = -0,04)

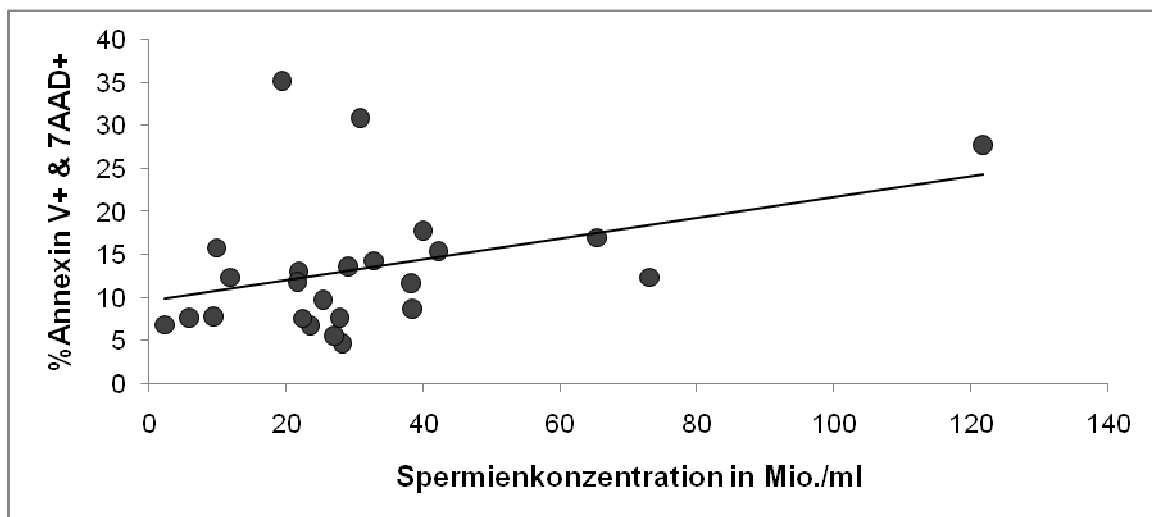


Abb. 31: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien im Ejakulat und Spermienkonzentration in B-Proben (n = 24, r = 0,39)

4.8 Korrelation der normalen Morphologie mit Annexin V

Wir bestimmten nach den „strengen Kriterien“ die Menge der Spermien mit normaler Morphologie im Verhältnis zur Spermiengesamtzahl und korreliertem sie mit der frühapoptotischen (Abbildung 32) und avitalen (Abbildung 33) Spermienpopulation. Auch hier unterteilten wir die Gesamtzahl aller Proben in E- (n = 11) und V-Gruppe (n = 24).

Wir konnten in E- und V-Gruppe keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie und der Rate an frühapoptotischen Spermien feststellen (E-Gruppe: $r = -0,16$; V-Gruppe: $r = 0,25$).

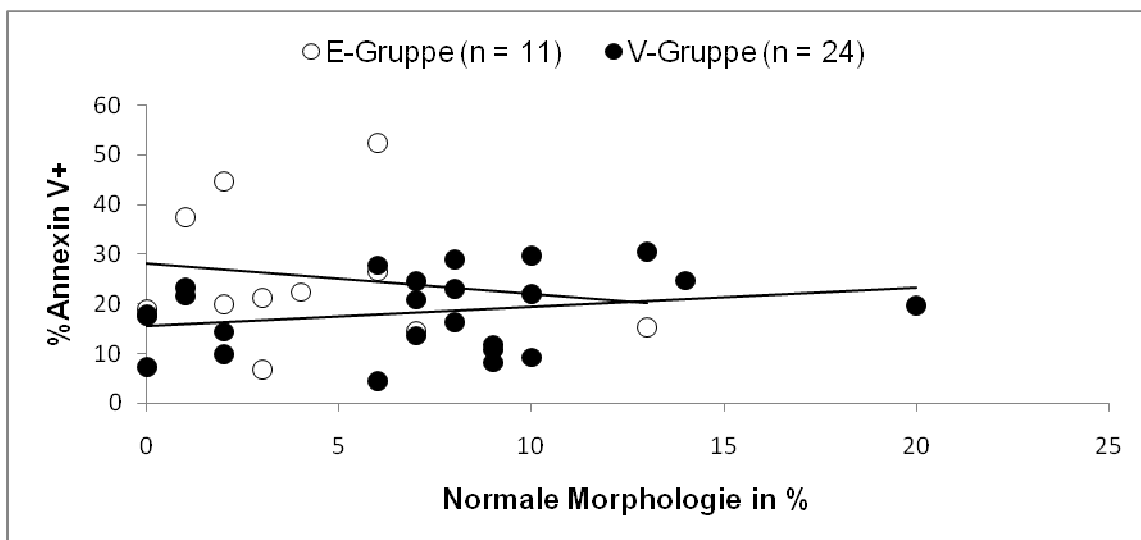


Abb. 32: Korrelation zwischen prozentualem Anteil frühapoptotischer Spermien mit morphologisch normalen Spermien im Ejakulat (E-Gruppe: $r = -0,16$; V-Gruppe: $r = 0,25$)

Ebensowenig bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie und der avitalen Spermienpopulation:

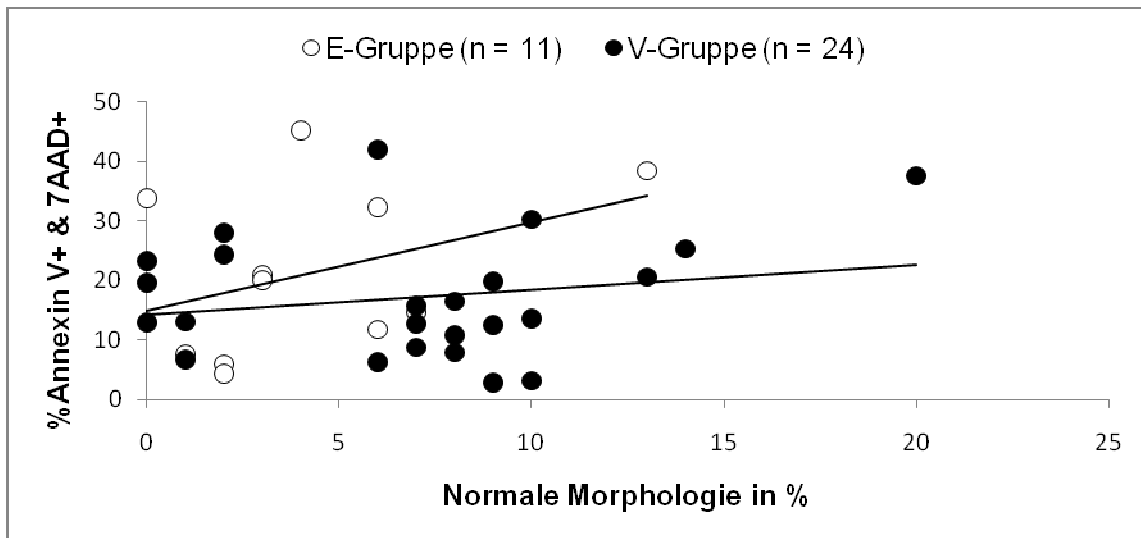


Abb. 33: Korrelation zwischen prozentualem Anteil avitaler Spermien mit morphologisch normalen Spermien im Ejakulat (E-Gruppe: $r = 0,38$; V-Gruppe: $r = 0,20$)

4.9 Korrelation Morphologiedefekte mit Annexin V

In 16 Ejakulaten untersuchten wir gemäß der Düsseldorfer Klassifikation vorliegende Morphologiedefekte der Spermien und korrelierten sie mit Annexin V.

4.9.1 Korrelation „Akrosomstörung“ mit Annexin V

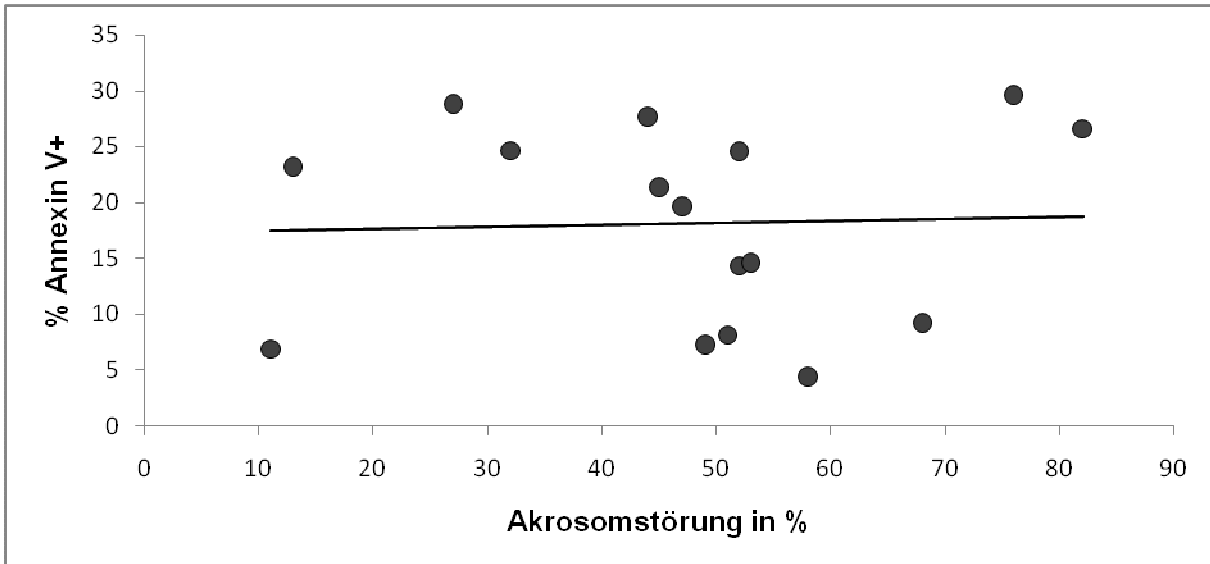


Abb: 34: Korrelation des prozentualen Anteils von Spermatozoen mit Akrosomstörung mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; r = 0,04)

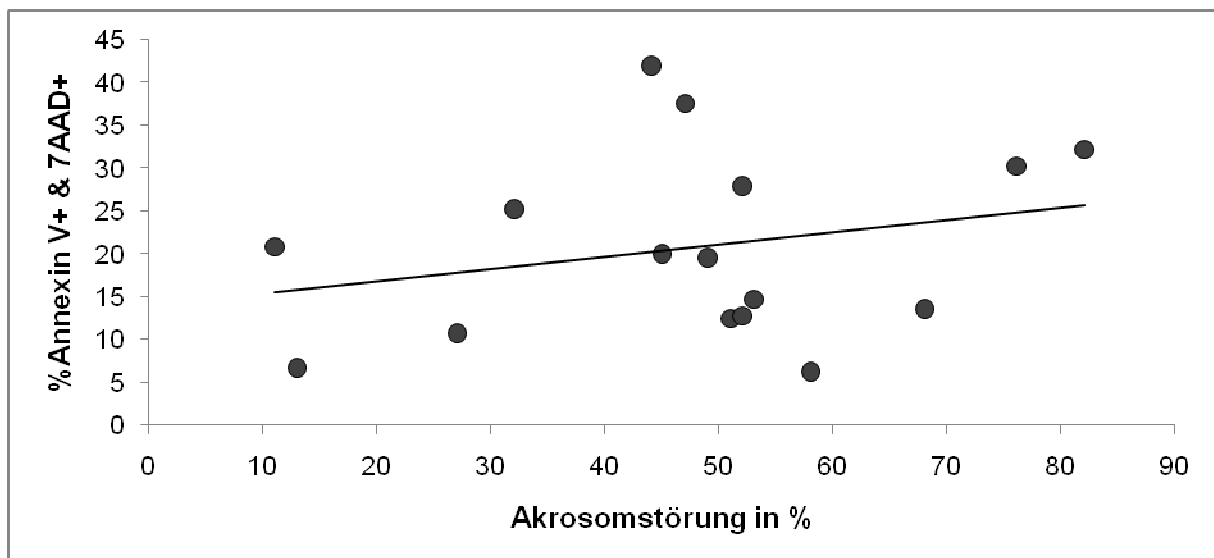


Abb: 35: Korrelation des prozentualen Anteils von Spermatozoen mit Akrosomstörung mit avitalen Spermien (n = 16; r = 0,26)

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil an akrosomgestörten Spermien und der frühapoptotischen bzw. avitalen Spermienpopulation festgestellt werden (vgl. Abbildungen 34 und 35, $r = 0,04$ und $r = 0,26$).

4.9.2 Korrelation „Überstreckung des Kopfes“ mit Annexin V

Wie Abbildung 36 zu entnehmen ist bestand keine statistisch signifikante Korrelation zwischen frühapoptotischen Spermien und der Rate an überstreckten Spermienköpfen ($r = -0,16$).

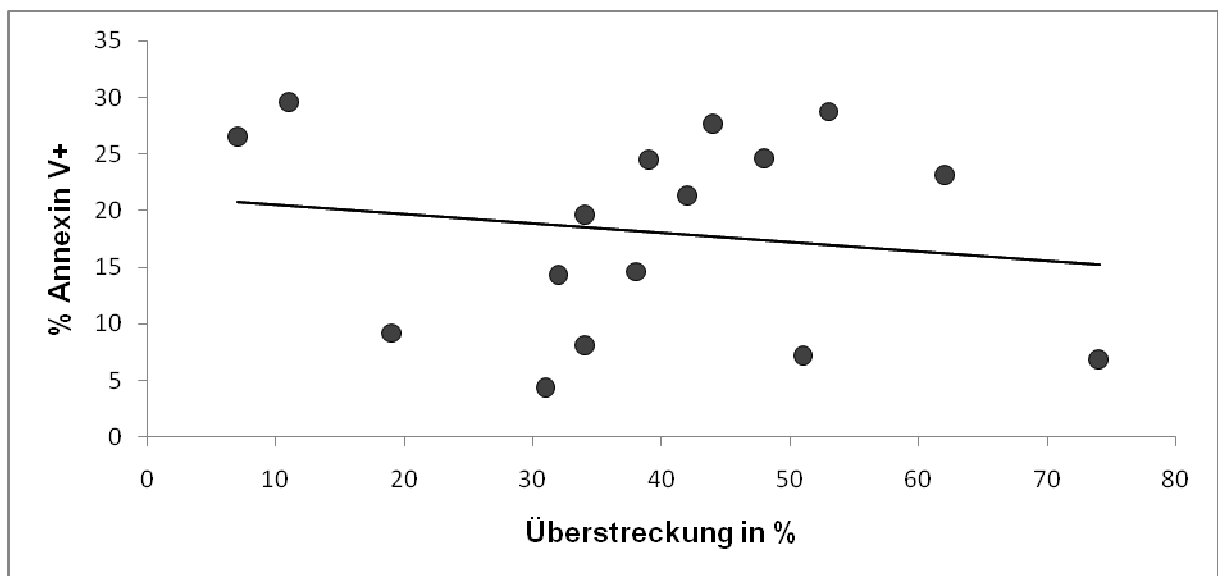


Abb. 36: Korrelation der Spermatozoen mit überstreckten Köpfen und frühapoptotischen Spermien (n = 16; $r = -0,16$)

Ebensowenig bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen avitalen Spermien und Spermatozoen mit überstreckten Köpfen (vgl. Abbildung 37, $r = -0,28$).

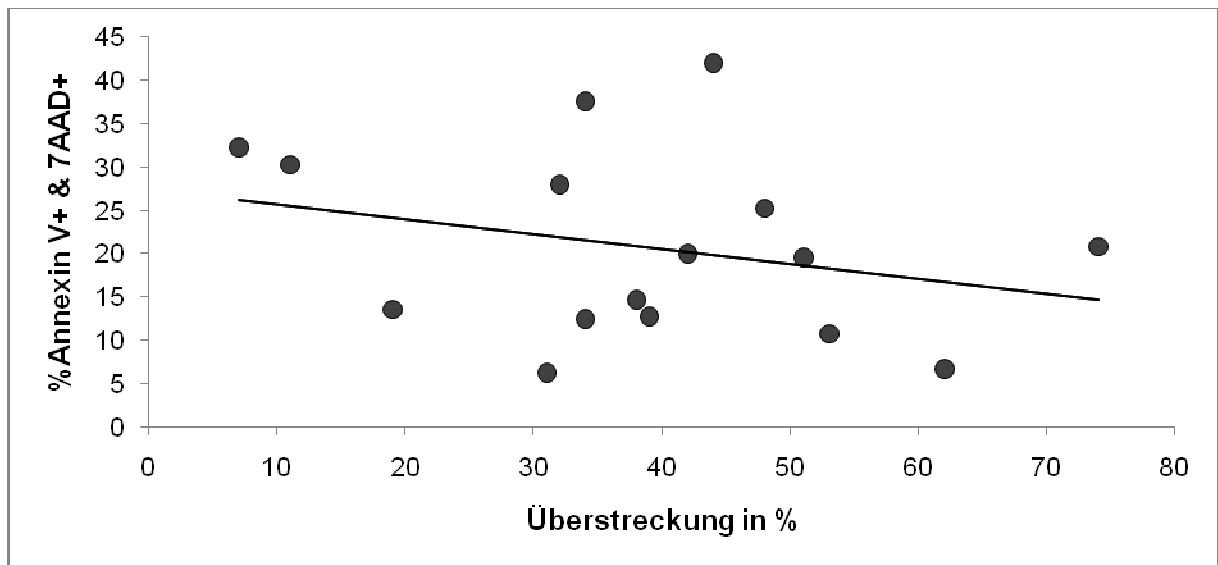


Abb. 37: Korrelation der Spermatozoen mit überstreckten Köpfen und avitalen Spermien (n = 16; r = -0,28)

4.9.3 Korrelation „Ü/A-Formen“ mit Annexin V

Wir korrelierten den Anteil an Spermien, die sowohl eine Überstreckung des Kopfes als auch eine Akrosomstörung aufwiesen, mit den Annexin V positiven Spermien.

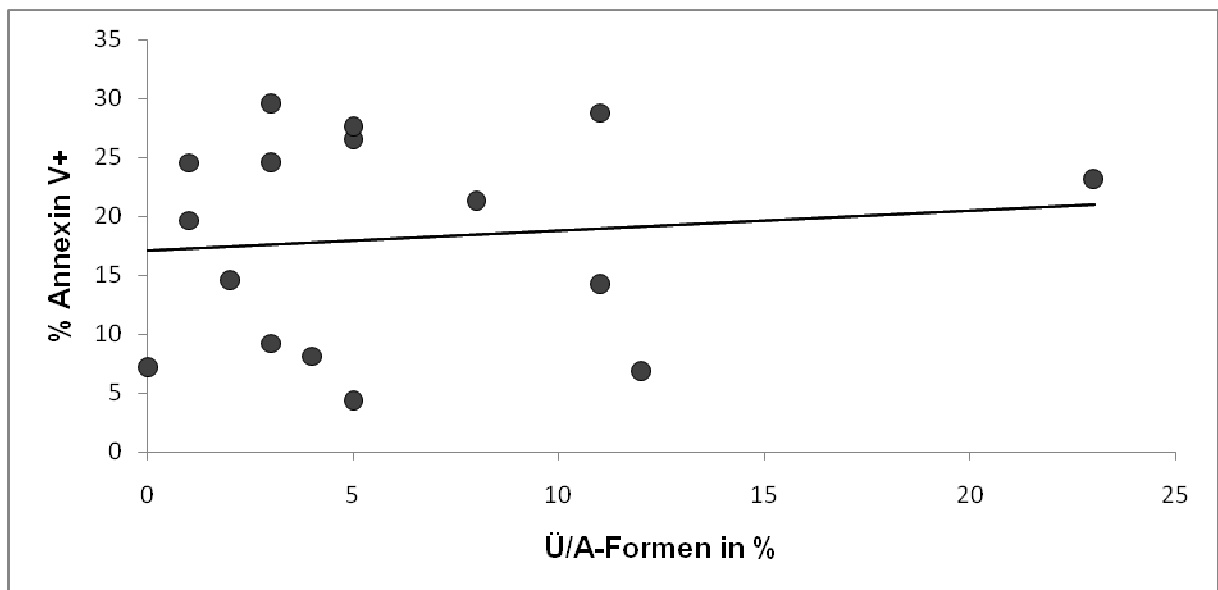


Abb. 38: Korrelation der Spermatozoen mit überstreckten Köpfen + Akrosomstörung mit frühapoptischen Spermien (n = 16; r = 0,11)

Es bestand keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Ü/A-Formen und Frühapoptose (vgl. Abbildung 38, $r = 0,11$).

Die Abbildung 39 zeigt, dass auch zwischen der Menge an avitalen Spermien und den Ü/A-Formen kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand ($r = -0,30$).

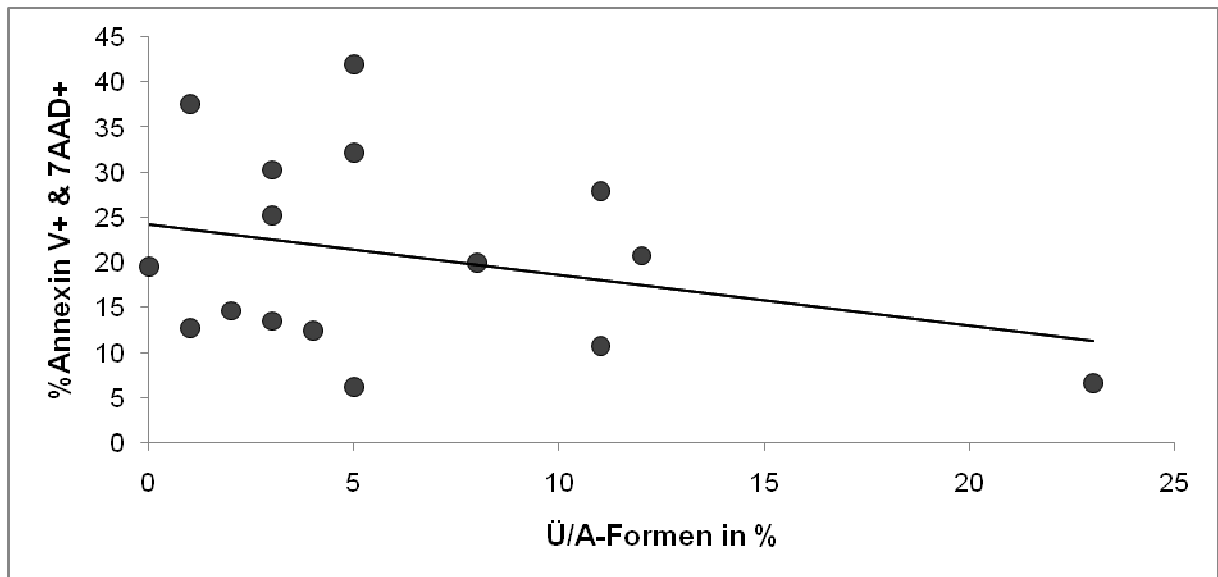


Abb. 39: Korrelation der Spermatozoen mit überstreckten Köpfen + Akrosomstörung mit avitalen Spermien (n = 16; $r = -0,30$)

4.9.4 Korrelation „Mittelstückdefekte“ mit Annexin V

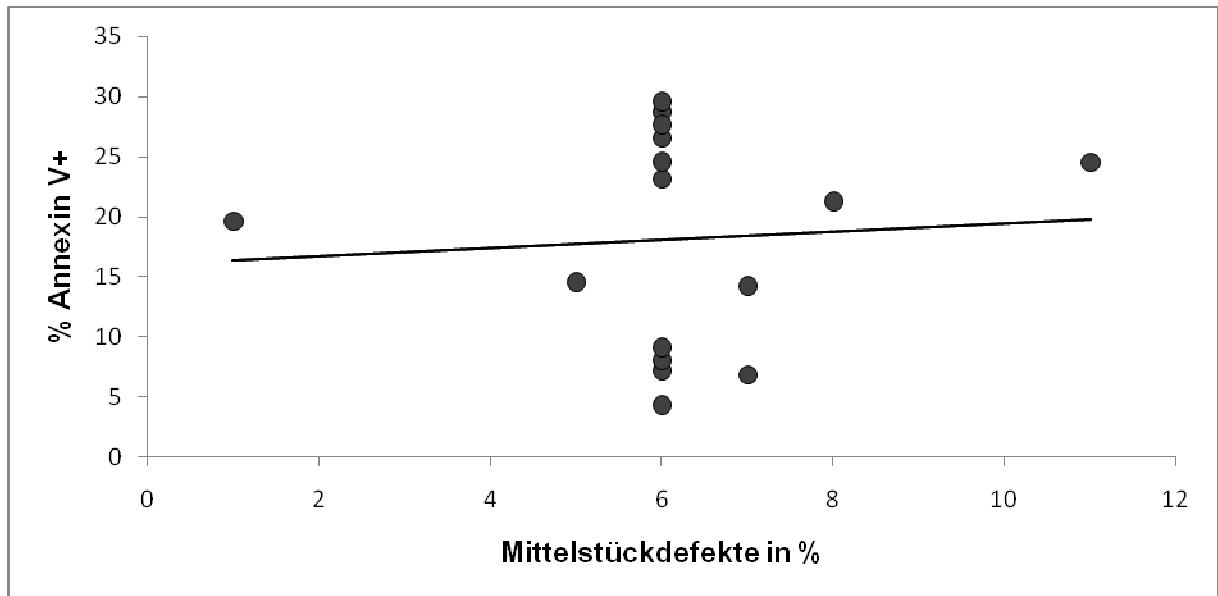


Abb. 40: Korrelation Spermien mit Mittelstückdefekten mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; r = 0,07)

Es bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Rate an Mittelstückdefekten und dem Anteil an frühapoptotischen (vgl. Abbildung 40, $r = 0,07$) bzw. avitalen Spermien (vgl. Abbildung 41, $r = -0,36$).

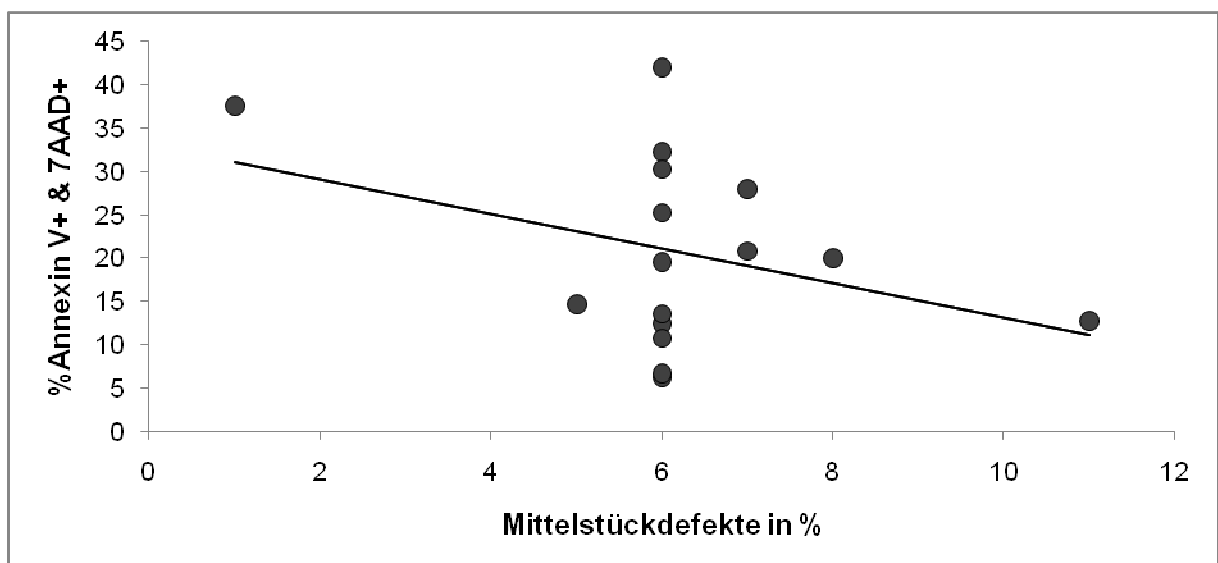


Abb. 41: Korrelation Spermien mit Mittelstückdefekten mit avitalen Spermien (n = 16; r = -0,36)

4.9.5 Korrelation „Flagellumdefekt IA“ mit Annexin V

Der Flagellumdefekt IA betrifft Flagellen, die sich atypisch anfärben. Wir korrelierten den Anteil der Spermatozoen mit diesem Defekt mit der frühapoptotischen und avitalen Spermienpopulation.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen frühapoptotischen Spermien und Flagellumdefekten Typ IA festgestellt werden (vgl. Abbildung 42, $r = -0,10$).

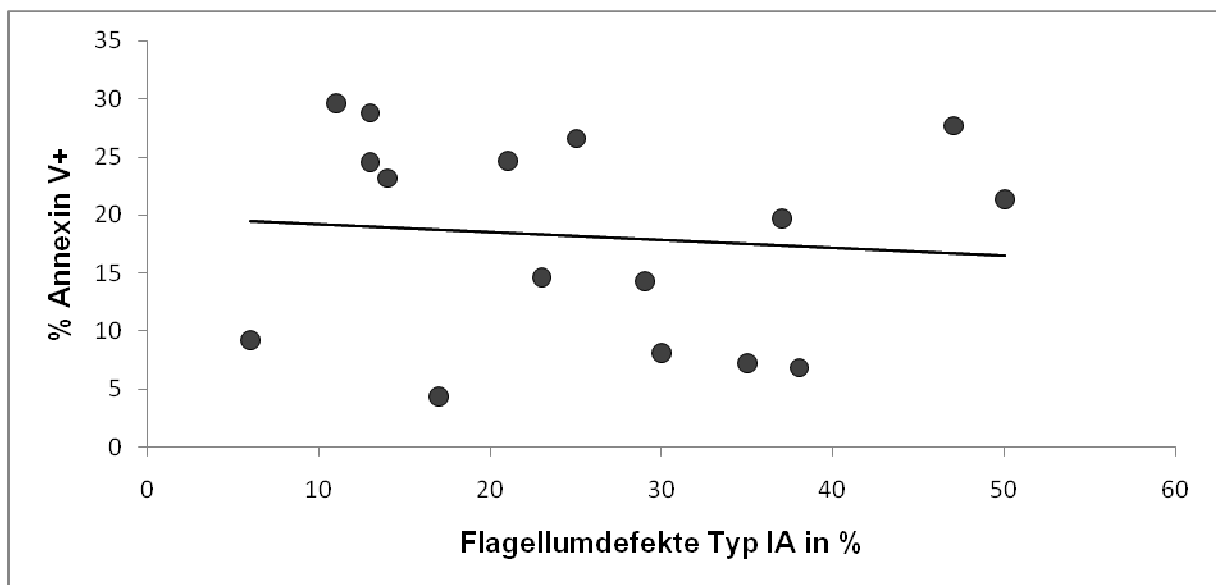


Abb. 42: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekt Typ IA mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; $r = -0,10$)

Wir konnten jedoch zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil an Flagellumdefekten Typ IA und der Menge an avitalen Spermien bestand (vgl. Abbildung 43, $r = 0,52$, $p < 0,05$).

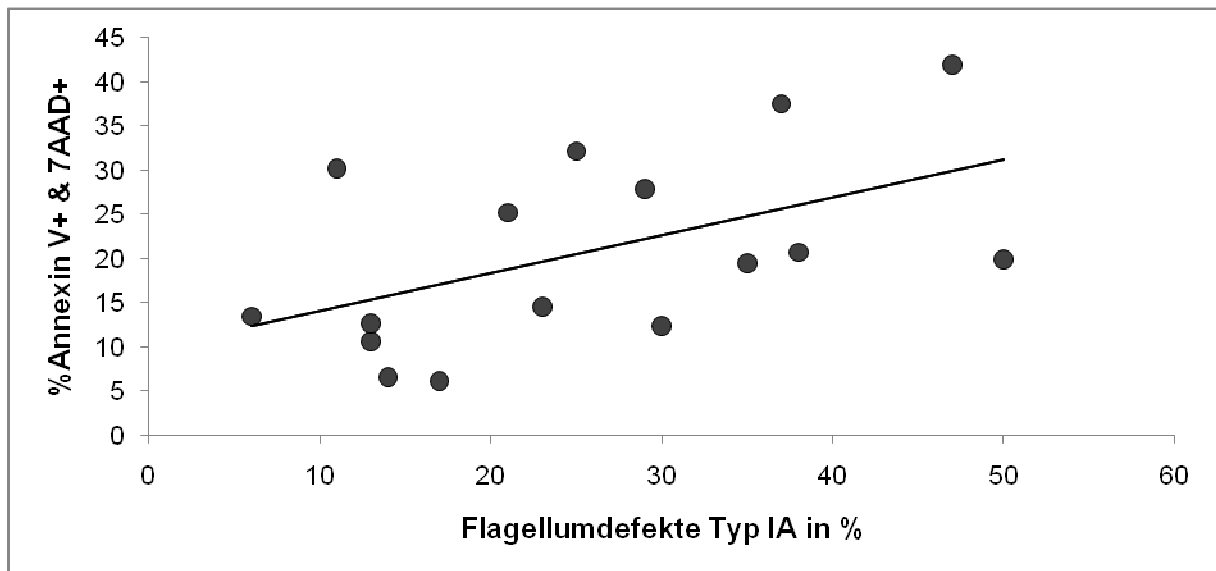


Abb. 43: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten IA mit avitalen Spermien (n = 16; $r = 0,52$, $p < 0,05$)

4.9.6 Korrelation „Flagellumdefekte Typ IB“ mit Annexin V

Strukturelle Defekte des Flagellums werden nach der Düsseldorf Klassifikation als Flagellumdefekte von Typ IB klassifiziert.

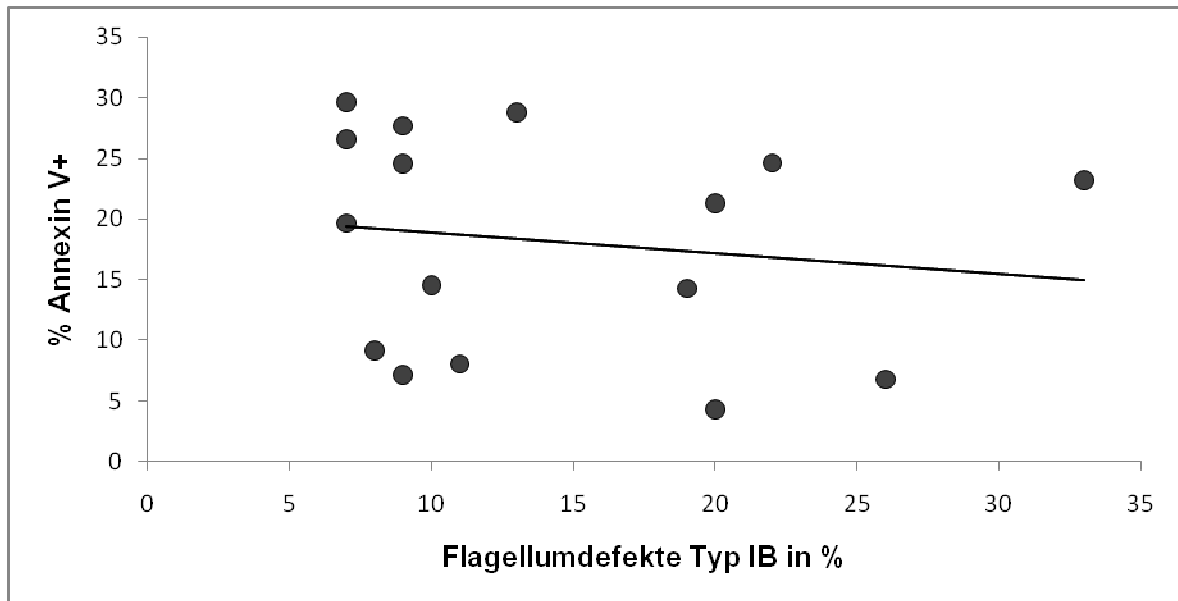


Abb. 44: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten IB mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; r = -0,15)

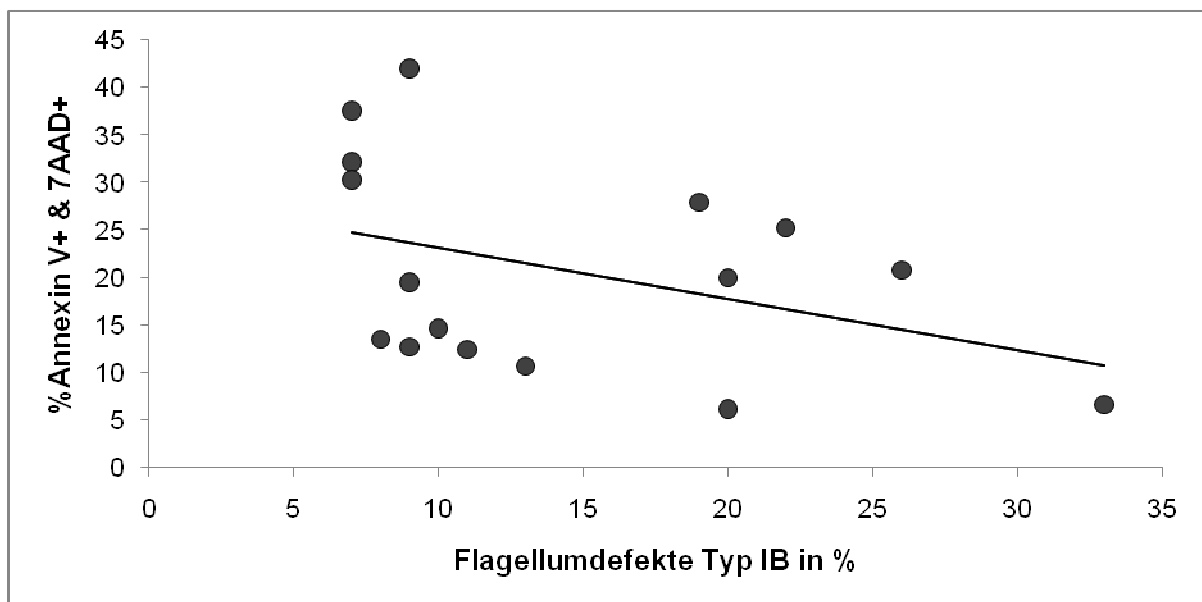


Abb. 45: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten IB mit avitalen Spermien (n = 16; r = -0,39)

Den Abbildungen 44 und 45 ist zu entnehmen, dass die Anzahl an Flagellumdefekten vom Typ IB weder mit der Menge an frühapoptotischen, noch mit der Zahl an avitalen Spermien korrelierte ($r = -0,15$ bzw. $r = -0,39$).

4.9.7 Korrelation „Flagellumdefekte Typ II“ mit Annexin V

Flagellumdefekte Typ II sind nach der Düsseldorfer Klassifikation Unterbrechungen und Windung des Flagellums.

Wie Abbildung 46 zeigt bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an Flagellumdefekten vom Typ II und der Anzahl an frühapoptotischen Spermien ($r = 0,07$).

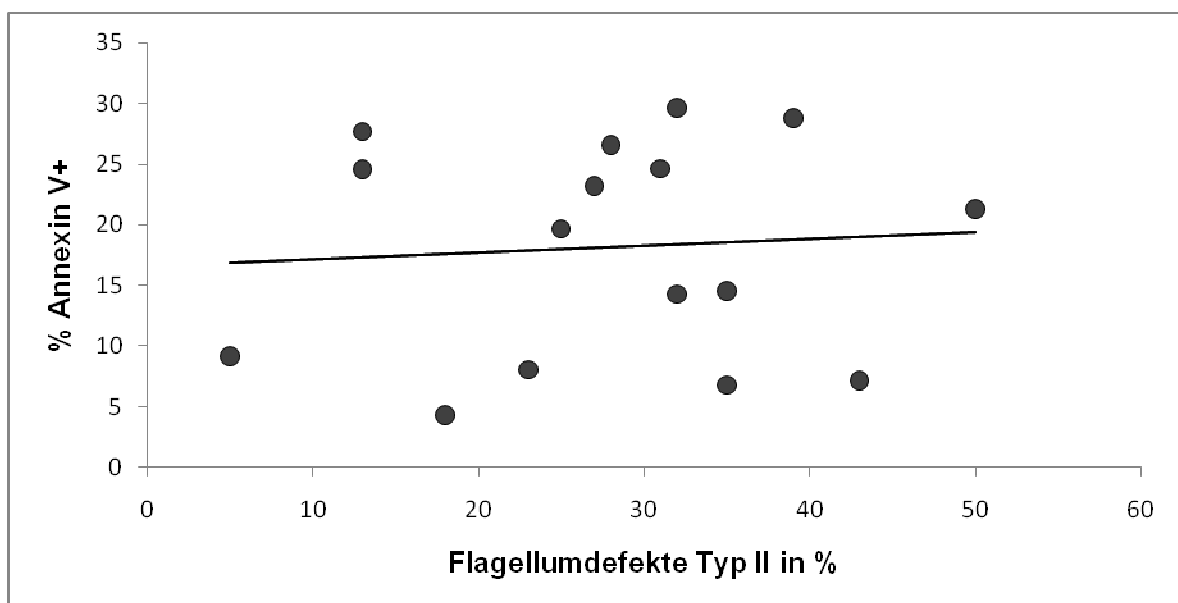


Abb. 46: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten Typ II mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; $r = 0,07$)

Abbildung 47 zeigt, dass auch keine signifikante Korrelation zwischen Flagellumdefekten vom Typ II und der avitalen Spermienpopulation bestand ($r = 0,01$).

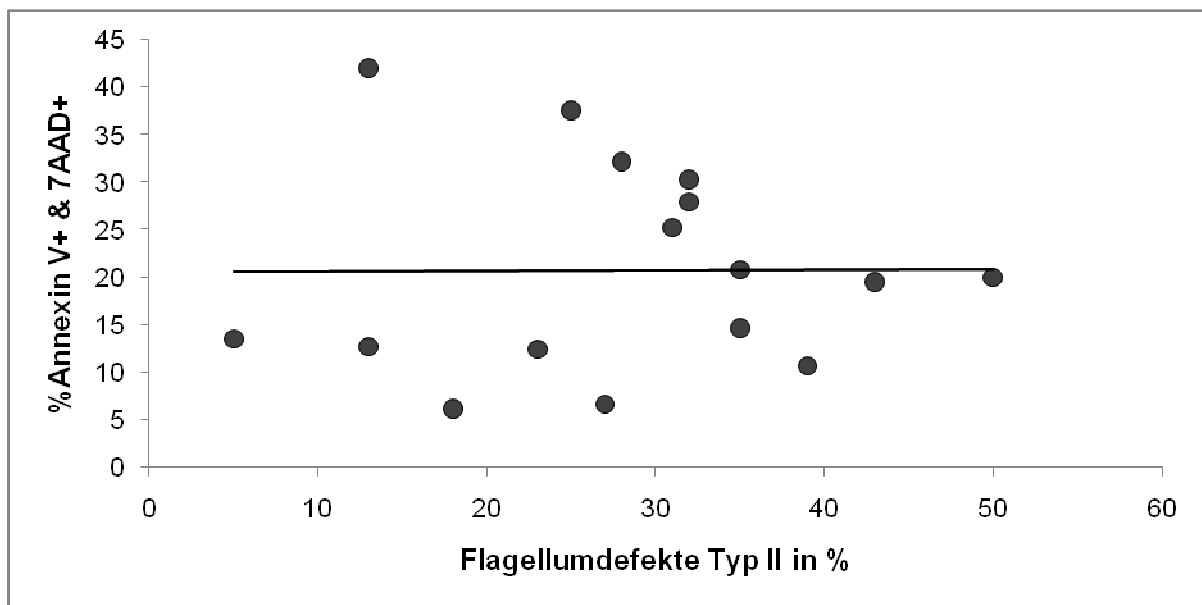


Abb. 47: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten Typ II mit avitalen Spermien (n = 16; r = 0,01)

4.9.8 Korrelation „Flagellumdefekte Typ III“ mit Annexin V

Nur rudimentär vorhandene Flagellen werden gemäß Düsseldorfer Klassifikation unter den Flagellumdefekten vom Typ III zusammengefasst.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Flagellumdefekten vom Typ III und der Menge an frühapoptotischen Spermien festgestellt werden (vgl. Abbildung 48, $r = -0,09$).

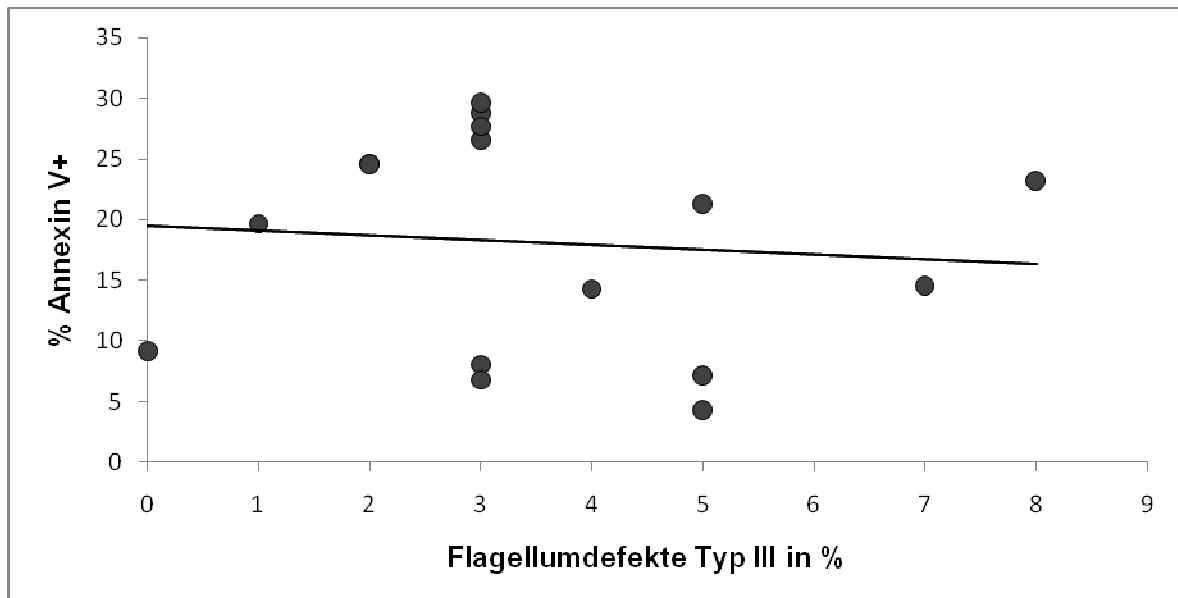


Abb. 48: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten Typ III mit frühapoptotischen Spermien (n = 16; $r = -0,09$)

Auch zwischen der avitalen Spermienpopulation und den Flagellumdefekten vom Typ III bestand keine statistisch signifikante Korrelation (vgl. Abbildung 49, $r = -0,39$).

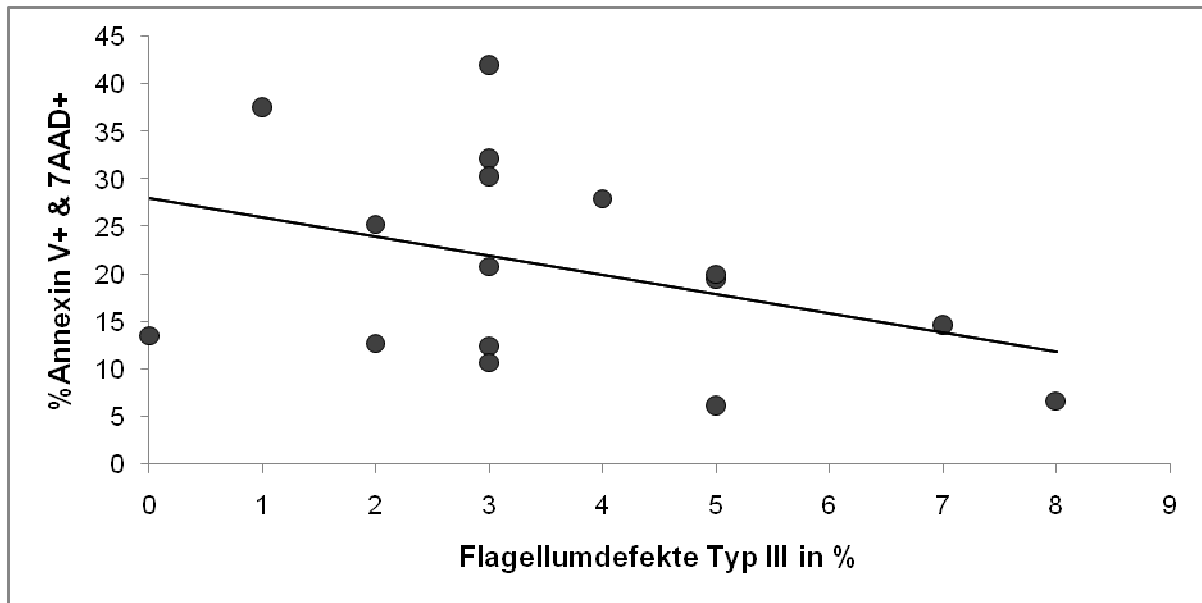


Abb. 49: Korrelation Spermatozoen mit Flagellumdefekten Typ III mit avitalen Spermien (n = 16; $r = -0,39$)

5 Diskussion

Entzündungen des Genitaltraktes, insbesondere solche, die subklinisch verlaufen, spielen in der andrologischen Praxis eine wichtige Rolle als mögliche Ursache für männliche Infertilität. Ebenso wurde wiederholt gezeigt, dass im Sperma infertiler Männer erhöhte Apoptoseraten nachweisbar sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals nachweisen, dass (i) ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der Granulozytenelastase im Seminalplasma und der Zahl apoptotischer Spermien besteht, (ii) die Menge an Annexin V +/7AAD - Spermien positiv mit der Granulozytenelastasekonzentration korreliert, (iii) zwar in allen Proben Apoptose nachweisbar war, jedoch in jenen aus der E-Gruppe signifikant höhere Apoptoseraten vorhanden waren als in den Proben aus der V-Gruppe, in denen keine erhöhten Leukozyten- oder Elastasekonzentrationen vorlagen.

Granulozytenelastase korreliert positiv mit frühapoptotischen Spermien

Die Granulozytenelastase als Marker für klinisch stumme Entzündungen des männlichen Genitaltraktes hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (Haidl et al., 2008; Kopa et al., 2005). Noch immer aber besteht Uneinigkeit über die Relevanz von erhöhten Leukozytenzahlen im Seminalplasma für die Spermienqualität (Aitken und Baker, 1995; Kiessling et al., 1995; Rajasekaran et al., 1995; Tomlinson et al., 1993; Yanushpolsky et al., 1996; Zorn et al., 2000). In einigen Fällen sind Entzündungsparameter wie ROS, Peroxidase oder Granulozytenelastase im Seminalplasma erhöht, ohne dass massenhaft Leukozyten vorhanden sind. Insbesondere bei chronischer Epididymitis liegt die Leukozytenzahl unter 10^6 /ml Ejakulat (Haidl et al., 2008; Kopa et al., 2005). Offenbar ist nicht nur allein die Anzahl der Leukozyten, sondern auch die Menge der von neutrophilen Granulozyten produzierten Elastase für das Schicksal der Spermien im inflammatorischen Milieu von Bedeutung. Dafür spricht unsere Beobachtung, dass die Menge an Granulozytenelastase positiv mit der Menge an frühapoptotischen Spermatozoen korreliert. In unserer Arbeitsgruppe wurde erst kürzlich die positive Korrelation zwischen TNF- α und Granulozytenelastase beobachtet (Allam et al., 2008). Perdichizzi et al. (2007) wiesen nach, dass TNF- α die Spermienapoptose begünstigen kann.

Innerhalb der E-Gruppe bestand kein Zusammenhang zwischen Annexin V positiven frühapoptotischen Spermien und der Spermienkonzentration, -gesamtzahl oder -morphologie. Nur das Ejakulatvolumen korrelierte in der E-Gruppe negativ mit der frühapoptotischen Spermienpopulation.

Apoptose und Fertilisation

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre legen nahe, dass der Vorgang der Apoptose mit reduzierter männlicher Fertilität einhergeht (Oehninger et al., 2003; Oosterhuis et al., 2000; Sakkas et al., 2003; Taylor et al., 2004). Erst kürzlich konnten einige Autoren an Hamsteroozyten zeigen, dass Annexin V positive Spermien deutlich in ihrer Kapazität die Zona pellucida zu penetrieren eingeschränkt sind (Grunewald et al., 2007; Said et al., 2008). Dies könnte Konsequenzen für assistierte Reproduktionstechniken wie die in vitro-Fertilisation haben, bei der die Spermien selbständig die weibliche Eizelle penetrieren müssen. Unklar ist, ob die Verwendung (früh-)apoptotischer Spermien bei der ICSI negative Konsequenzen für die embryonale Entwicklung haben und zu häufigeren Aborten führen könnte. Die Arbeit von Said et al. (2006) zeigte, dass in vitro zumindest die Dekondensation des Spermienchromatins von apoptotischen Prozessen nicht wesentlich beeinflusst wird. Hierbei handelt es sich allerdings um eine sehr frühe Phase der Fertilisation und es ist bislang vollkommen unklar, ob und wie spätere Stadien der Befruchtung von (früh-)apoptotischen Spermien beeinflusst werden.

Elimination von Annexin V positiven Spermien

Möglicherweise könnten die Chancen für eine Schwangerschaft nach Insemination und in vitro-Fertilisation erhöht werden, indem Annexin V positive Spermien aus dem Ejakulat vor der Durchführung des jeweiligen Reproduktionsverfahrens entfernt werden. Es wäre zum Beispiel möglich, mittels Annexin V- konjugierter Magnetpartikel Annexin V positive frühapoptotische Spermien aus dem Ejakulat zu entfernen. Bei diesem Verfahren handelt es sich um das sogenannte „Magnetic-activated Cell Sorting“ (MACS). Erste Vorstudien sind bereits erfolgt (Said et al., 2006; Said et al., 2008), kontrollierte doppelblinde klinische Studien stehen aber noch aus.

Wie sich in unserer Arbeit gezeigt hat, ist das Swim-up-Verfahren zur Elimination von apoptotischen Spermien ungeeignet, da in allen Überständen Annexin V positive und dabei motile Spermatozoen zu finden waren. Allerdings war die Anzahl frühapoptotischer Spermien nach Swim-up geringer als vor Swim-up. Eine Kombination von MACS und Swim-up könnte eine Strategie sein, um vitale progressiv-motile Spermien für die assistierte Reproduktion zu gewinnen. Alternativ zum MACS könnten Annexin V positive Spermien auch mit einem Durchflusszytometer wie FACScalibur (Becton Dickinson) gezielt aus der Gesamtspermienpopulation aussortiert werden (Hoogendijk et al., 2008).

Ursprung der apoptotischen Spermien

Einiges spricht dafür, dass die Apoptose bereits vor der Ejakulation in den Spermatozoen initiiert wird (Lachaud et al., 2004; Oosterhuis und Vermes, 2004). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde die Beobachtung gemacht, dass die Zahl apoptotischer Spermien drei Stunden nach Ejakulation nicht zugenommen hatte. Dazu passt auch, dass laut Perticarari et al. (2008) ejakulierte Spermien keine Fas Rezeptoren (= CD95) aufweisen.

Einige Autoren führen die Anwesenheit von apoptotischen Spermatozoen im Ejakulat auf eine fehlgeschlagene oder unvollständig abgelaufene Eliminierung defekter Spermien und Vorläuferzellen während der Spermatogenese zurück (Cayli et al., 2004; Oosterhuis und Vermes, 2004; Sakkas et al., 2003). Sakkas et al. sprechen in diesem Zusammenhang von „abortiver Apoptose“. Demnach handelt es sich bei den beobachteten apoptotischen Spermien vor allem um unreife Vorstufen von Spermien. Dies ist sicherlich zutreffend. Allerdings spricht unsere Beobachtung, dass die Apoptoserate im Ejakulat von Männern mit erhöhten inflammatorischen Parametern im Seminalplasma deutlich höher ist als in der Vergleichsgruppe, dafür, dass die Apoptose vor Ejakulation auch in reifen Spermien initiiert werden kann. In jedem Fall kann die Apoptose auch noch sehr spät im Rahmen der Spermienentwicklung aktiviert werden, da auch in Swim-up Überständen zahlreiche frühapoptotische Spermien beobachtet werden konnten. Auch gingen hohe Apoptoseraten in unseren Untersuchungen keineswegs mit vermehrten morphologischen Defekten einher.

In der vorliegenden Arbeit wurden Annexin V - Färbungen auch in sequenziellen B-Proben durchgeführt. Bislang ist nur sehr wenig über sequenzielle Spermaproben beim Menschen geforscht worden und es existieren nur wenige Arbeiten, die sich intensiver mit diesem Thema befassen. In der Reproduktionsmedizin werden B-Proben vor allem dann genutzt, wenn die Spermienqualität im ersten Ejakulat sehr schlecht war (Bar-Haval et al., 2000; Barash et al., 1995), wie etwa bei einer Oligoasthenozoospermie. Auch die reine Maximierung der zur Verfügung stehenden Spermamenge, etwa für eine intrauterine Insemination, kann eine B-Probe erforderlich machen (Kücük et al., 2008).

Frühapoptotische Spermien in sequenziellen B-Proben

Über die Apoptose in sequenziellen Spermaproben beim Menschen ist nach unserem Wissen noch keine Arbeit verfasst worden. Wir haben nachgewiesen, dass auch in den B-Proben Annexin V positive Spermien zu finden sind und dass die Apoptoserate in der sequenziellen Probe sogar deutlich höher ist als in der A-Probe. Dabei spielt es keine Rolle, ob ein inflammatorisches Geschehen vorliegt. Wir vermuten, dass der Anteil der Spermatozoen, bei denen eine abortive Apoptose im Rahmen der Spermatogenese vorliegt, höher ist als in den A-Proben, die ältere Spermien enthalten. Möglicherweise wird die Apoptose von vielen Spermien im Rahmen der Spermatogenese erst während der Lagerung in den Nebenhoden abgeschlossen. Erfolgen mehrere Ejakulationen in kurzen Intervallen aufeinander, so kann die Apoptose von vielen Spermien nicht abgeschlossen werden.

Es ist denkbar, dass die abortive Apoptose durchaus, zumindest für einige Spermien, einen evolutionsbiologischen Sinn hat und nicht lediglich einen am Zeitmangel gescheiterten Zellselbstmord darstellt. Vielleicht ist dies ein Mechanismus der Natur, der es notfalls auch Spermien niederer Qualität erlaubt mit viel Glück eine Eizelle zu befruchten, wenn nur geringe Menge hochqualitativer Spermatozoen in der Cauda des Nebenhodens gespeichert sind. Wir haben in unseren Studien gesehen, dass Annexin V positive, frühapoptotische Spermien durchaus progressiv motil sein können und dass kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie und der frühapoptotischer Spermienpopulation besteht. Im Gegensatz dazu werden heute mit Hilfe der ICSI sogar mit inmotilen, morphologisch abnormen, durch testikuläre

Spermienextraktion (TESE) gewonnenen, kaum ausgereiften Spermien erfolgreich Schwangerschaften eingeleitet (Schiff et al., 2007; Stalf et al., 2005). Das größte Hindernis für die erfolgreiche Befruchtung einer Oozyte durch ein Spermium im Stadium der abortiven Apoptose dürfte die offenbar eingeschränkte Penetrationsfähigkeit sein (Said et al., 2008).

Frühapoptotisch vs. avital

In dieser Arbeit haben wir bei der Färbung mit Annexin V und 7AAD zwischen frühapoptotischen (Annexin V + / 7AAD -) und avitalen (Annexin V + / 7AAD +) Spermien unterschieden. Die Bezeichnung „avital“ wurde von uns gegenüber der üblichen Bezeichnung „nekrotisch“ vorgezogen, da wir denken, dass die avitale Spermienpopulation nicht nur nekrotische, d.h. abgestorbene Spermatozoen enthält, sondern auch Spermien, die sich in einem späten Stadium der Apoptose befinden und deren Membranen im Rahmen der apoptotischen Prozesse anfälliger für die Penetration durch Farbstoffe wie 7AAD werden. Die Trennung zwischen apoptotischen und avitalen Spermien ist daher unscharf, weshalb wir es vorzogen im Falle von Annexin V + und 7AAD - Spermatozoen von frühapoptotischen Spermien zu sprechen.

Die avitale Population setzt sich vermutlich heterogen aus spätapoptotischen und nekrotischen Spermien zusammen. Dies erschwert eine Interpretation der Korrelationen zwischen avitalen Spermien und anderen Parametern.

Ausblick

Die klinische Relevanz einer Detektion von frühapoptotischen Spermien, insbesondere hinsichtlich assistierter Reproduktionsverfahren, lässt sich noch nicht endgültig abschätzen. Es ist möglich, dass Fertilisationsversagen im Rahmen einer ICSI und frühe Aborte unter anderem auf eine bereits vor seiner Injektion in die Eizelle im Spermium induzierte Apoptose zurückgeführt werden können.

In jüngerer Zeit wurde verstärkt eine Strategie verfolgt, die darauf abzielte, nur morphologisch einwandfreie Spermatozoen für eine ICSI zu verwenden (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection = IMSI). In einer klinischen Studie konnten Berkovitz et al. 2006 zeigen, dass mit IMSI im Vergleich zur Standard-

ICSI signifikant höhere Fertilisationsraten bei weniger Aborten und mehr Geburten erzielt werden können.

Wir haben gezeigt, dass frühapoptotische Spermien keine statistisch signifikanten Auffälligkeiten hinsichtlich Morphologie und Motilität zeigen. Eine Identifikation von frühapoptotischen Spermien mit Annexin V und deren Entfernung mit MACS oder durchflusszytometrischem Cellsorting könnte eine Option sein, die Erfolgsraten der ICSI zu steigern. Dazu bedarf es aber einer intensiven Zusammenarbeit mit den gynäkologischen und reproduktionsmedizinischen Kollegen, sowie der Durchführung klinischer Studien an ausreichend großen Patientenkollektiven.

Die Annexin V - Färbung in Kombination mit der Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung von großen Spermienzahlen in relativ kurzer Zeit. Sie könnte eine gute Ergänzung zur andrologischen Routinediagnostik sein, um Ejakulate auf erhöhte Apoptoseraten zu untersuchen und weitere Hinweise auf ein inflammatorisches Geschehen im Genitaltrakt zu finden, um ggf. eine antiinflammatorische Therapie, etwa mit NSRAs zu initiieren. So könnte vielleicht u.a. die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen verbessert werden. Auch hier bleiben die Resultate weiterer Studien abzuwarten.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Annexin V - Färbungen an Spermien vorgenommen, um das Phänomen „Apoptose“ im männlichen Ejakulat zu untersuchen.

Um (früh-)apoptotische Spermien von avitalen Spermien zu unterscheiden wurde zusätzlich mit 7-Aminoactinomycin gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Spermatozoen durchflusszytometrisch untersucht. Wir erhielten dabei drei Spermienpopulationen: Eine vitale (Annexin V-/7AAD-), eine frühapoptotische (Annexin V+/7AAD-) und eine avitale (Annexin V+/7AAD+).

Zusätzlich führten wir Färbungen mit Annexin V an sequenziellen B-Proben (60 Minuten nach der ersten Ejakulation) und an Swim-up-Überständen durch. Außerdem korrelierten wir Annexin V positive Spermien mit Spermienkonzentration, normaler und pathologischer Morphologie sowie Ejakulatvolumen.

Wir konnten erstmals zeigen, dass die Konzentration der Granulozytenelastase im Seminalplasma mit der Menge an Annexin V positiven, also frühapoptotischen, Spermien positiv korreliert.

Ferner beobachteten wir in allen Ejakulaten frühapoptotische Spermatozoen. In Proben, die erhöhte inflammatorische Parameter wie Elastase oder Leukozytenzahlen enthielten (E-Gruppe), fanden sich signifikant mehr Annexin V positive / 7AAD negative Spermien als in Proben ohne Anhalt auf ein inflammatorisches Geschehen (V-Gruppe).

Nach Aufarbeitung mit dem Swim-up Verfahren fanden sich in allen Überständen noch immer zahlreiche frühapoptotische Spermien. Sehr wahrscheinlich schließen sich also progressive Motilität und Apoptose nicht aus.

Erstmals konnten wir mit Hilfe der Annexin V - Färbung demonstrieren, dass in den sequenziellen B-Proben signifikant mehr frühapoptotische Spermatozoen vorhanden sind als in den A-Proben. Dies war auch nach Swim-up der Fall.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten neue Ansätze für die Erklärung von Ursachen der Infertilität von Männern mit einem inflammatorischen Geschehen im Genitaltrakt. Ferner deutet sich die Notwendigkeit an, Strategien zu entwickeln, um die Zahl apoptotischer Spermien vor einer künstlichen Befruchtung im verwendeten Sperma zu reduzieren.

7 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte

Annexin V (BD Pharmingen): Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I, Katalognummer 556547, Inhalt für 100 Tests: Annexin V - FITC, Propidiumiodid-Lösung, Annexin V Binding Buffer

Brutschrank (Heraeus): Modell "Function Line"

BD FACSTFlow Sheath Fluid (BD Biosciences Immunocytometry Systems): Katalognummer 342003: 20 Liter

BD FACSRinse Solution (BD Biosciences Immunocytometry Systems): Katalognummer 340346: 5 Liter

Durchflusszytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems): BD FACScan Flow Cytometer

Eosin Y Solution Aqueous (Sigma): Katalognummer HT110.2.16

Ethanol absolut zur Analyse (Merck): Katalognummer 1.00983.2511: 2,5 Liter in Kst.-Flasche

Ethanol 96% reinst (Merck): Katalognummer 1.00971.2500: 2,5 Liter in Glasflasche

FACS-Röhrchen (Sarstedt): Katalognummer 55.1578, 5ml Röhrchen aus Polypropylen

Mayers Hämalaulösung (Merck): Katalognummer 1.09249.0500: 500ml

Mikroskop (Olympus): Olympus BX40 Polarisationsmikroskop

Natriumchlorid (KMF): Katalognummer KM.010.1000: Natriumchlorid Reinst DAB, PH. EUR. 1000gr.

Objektträger (Engelbrecht): Objektträger geschliffen, ca. 76mm x 26mm x 1mm und Objektträger geschnitten, Mattrand, ca. 76mm x 26mm/3 x 1inch

PBS-Tabletten (Oxoid): Katalognummer BR0014G

PMN-Elastase-Kit (Milenia Biotec): Katalognummer MKEL-1: Enthält Mikrotiterplatte (beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen PMN- Elastase), PMN-Elastase-

Kalibrator, PMN Elastase - Kontrollen , Lösungspuffer, Enzymmarkierter anti- α PI Antikörper, TMB-Substrat Lösung in gepufferter Peroxidlösung, Stopplösung, Waschpufferkonzentrat, Abdeckfolie für Titelplatte

pH-Indikatorpapier pH 6,4 - 8,0 Spezialindikator (Merck): Katalognummer 1.09557.0003: 3 Rollen à 4,8 Meter

Photometer (Boehringer Mannheim [Roche]): Photometer 4010

Pipetten (Labsystems): Modell Pipetti (5-40 μ l, 40-200 μ l, 200-1000 μ l)

Pipettenspitzen, blau (Sarstedt): Katalognummer 70.762

Pipettenspitzen, gelb (Sarstedt): Katalognummer 70.760.002

Schraubbecher (Sarstedt): Katalognummer 75.563: 100ml Becher aus Polypropylen

Schraubdeckel (Sarstedt): Katalognummer 76.564

Shorr'sche Farblösung (Merck): Katalognummer 1.09275.0500: 500ml

Spermien Präparationsmedium (MEDICULT): Katalognummer 10700060: 60ml gebrauchsfertige Lösung mit Phenol-Rot

Transferpipetten (Sarstedt): Katalognummer 86.1171

Vortexierer (Scientific Industries [Carl Roth]): Vortex-Genie 2

Xylol zur Analyse (Merck): Katalognummer 1.08681.2500: 2,5 Liter in Glasflasche

Zählkammern (Labomedic): Katalognummer 191844272: Improved, 0,100mm Tiefe, 0,0025mm² Assistent Improved

Zentrifuge (Kendro-Heraeus [Thermo Scientific]): Heraeus-Sepatech-Megafuge-1.0R

Zentrifugenröhrchen, 15ml, steril (Nunc): Katalognummer 366036

7-Actinoactinomycin (Sigma): Katalognummer A9400

8 Verzeichnis der Firmenadressen

Becton Dickinson (PharMingen): Tullastr. 8-12, D-69126 Heidelberg, Tel.: +49 (0) 6221/ 305-0, www.bd.com

Carl Roth GmbH & Co. KG: Schoemperlenstraße 1-5, D-76185, Tel.: +49 (0) 721 5606-0, www.carlroth.de

Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH: Tiefenbachweg 13, D-34295 Edermünde, Tel.: +49 (0) 56 03 71 20, www.engelbrecht.de

Heraeus Holding GmbH (Thermo Fisher Scientific): Heraeusstraße 12-14, D-63450 Hanau, Tel.: +49 (0) 61 81 35-0, www.heraeus.de

KMF Laborchemie Handels-GmbH: Kirchstraße 1, D-53797 Lohmar, Tel.: +49 (0) 2246 9245-0, www.kmf1.de

Labomedic GmbH: Hohe Straße 75d, D-53119 Bonn, Tel.: +49 228-98874-0, www.labomedic.de

Labsystems GmbH: Harksheider Weg 5, D-25451 Quickborn, Tel.: +49 (0) 4106 611841

MediCult: Møllehaven 12, DK-4040 Jyllinge, Denmark, Tel: +45 46790200, www.medicult.com

Merck: Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt, Tel.: +49 (0) 6151/ 72-0, www.merck.de

Milena Biotec: Hohe Straße 4-8, D-61231 Bad Nauheim, Tel.: +49 (0) 6032 8040-0, www.milenia-biotec.de

Nunc GmbH & Co. KG (Thermo Fisher Scientific): Rheingaustraße 32, D-65201 Wiesbaden, Tel.: +49 (0) 611 18674-0, www.nunc.de

Olympus Deutschland GmbH: Wendenstraße 14-18, D-20097 Hamburg, Tel.: +49 (0) 40 23773-0, www.olympus.de

Oxoid GmbH (Thermo Fisher Scientific): Am Lippeglacis 4-8, D-46483 Wesel, Tel.: +49 (0) 281 153-0, www.oxoid.com

Roche Diagnostics GmbH: Sandhofer Straße 116, D-68305, Tel.: +49 (0) 621 759-0, www.roche.de

Sarstedt AG & Co.: Rommelsdorfer Straße, Postfach 1220, D-51582 Nümbrecht, Tel.: +49 (0) 2293 305-0, www.sarstedt.com

Sigma-Aldrich Biochemie GmbH: Georg-Heyken-Straße 14, D-21147 Hamburg, Tel.: +49 (0) 040 79 702 250, www.sigmaaldrich.com

Thermo Fisher Scientific: Robert-Bosch-Straße 1, D-63505 Langenselbold, Tel: +45 (0) 8001 536 376, www.kendro.com

9 Literatur

Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? Hum Reprod 1995; 10: 1736 - 1739

Al-Gazho MA, Bani-Hani KE, Amarin ZO. Tuberculous epididymitis and fertility in North Jordan. Saudi Med J 2005; 26: 1212 - 1215

Allam JP, Fronhoffs F, Fathy A, Novak N, Oltermann I, Schuppe HP, Haidl G. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. Andrologia 2008; 40: 329 - 334

Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Hum Reprod 2007; 22: 1413 - 1419

Bar-Haval I, Perri T, Ashkenazi J, Shelef M, Ben-Rafael Z, Orvieto R. The rationale for requesting a second consecutive sperm ejaculate for assisted reproductive technology. Gynecol Endocrinol 2000; 14: 433 - 466

Barash A, Lurie S, Weissman A, Insler V. Comparison of sperm parameters, in vitro fertilization results, and subsequent pregnancy rates using sequential ejaculates, collected two hours apart, from oligoasthenozoospermic men. Fertil Steril 1995; 64: 1008 - 1011

Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. Fertil Steril 2006; 85: 149 - 154

Berger RE, Alexander ER, Harnisch JP, Paulsen CA, Monda GD, Ansell J, Holmes KK. Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases. J Urol 1979; 121: 750 - 754.

Bergman J, Zeitlin SI. Prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Expert Rev Neurother* 2007; 7: 301 - 307

Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 634 - 638

Bizzarro A, Valentini G, Di Martino G, DaPonte A, De Bellis A, Lacono G. Influence of testosterone therapy on clinical and immunological features of autoimmune diseases associated with Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 32 - 36

Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir, Husznar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatin kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 365 - 372

Christiansen E, Tollefsrud A, Purvis K. Sperm quality in men with chronic abacterial prostates- vesiculitis verified by rectal ultrasonography. *Urology* 1992; 38: 395

Comhaire FH, Vermeulen L, Pieters O. Study of the Accuracy of Physical and Biochemical Markers in Semen to Detect Infectious Dysfunction of the Accessory Sex Glands. *J Androl* 1989; 10: 50 - 53

Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 393 - 398

Cooper GC, Yeung CH, Nashan D, Nieschlag E. Epididymal Markers in Human Infertility. *J Androl* 1988; 9: 91 - 101

Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase,

glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 1990; 13: 329 - 336

Crausaz M, Stettler E, Goy D, Urner F, Senn A, Germond M. Nationale Studie über die männliche Fruchtbarkeit in der Schweiz: Methoden und vorläufige Resultate. *J Fertil Reprod* 2006; 4: 12 - 15

Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1 - 5

Dansranjavin T. Untersuchung der Apoptose und der regulierenden Faktoren FAS/FAS-Ligand, p53 und bcl-2 in der normalen menschlichen Spermatogenese und in der Genese von Keimzelltumoren. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Dissertation, 2000

De Geyter C, De Geyter M, Meschede D, Behre HM. Assistierte Reproduktion. In: Nieschlag E, Behre HM, HRSG. *Andrologie*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: 377 - 406

De Kretser DM, Baker HWG. Infertility in Men: Recent Advances and Continuing Controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3443 - 3450

Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F. Chronic Prostatitis and male accessory gland infection - is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)? *Andrologia* 2003; 35: 325 - 330

Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 10711 - 10717

Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006; 213: 66 - 88

Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 109 - 115

Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 2001; 3: 251 - 258

Gröger CR. Das Verhalten der granulozytären Elastase-Konzentration im Stuhl bei ausgewählten gastrointestinalen Erkrankungen im Säuglings- und Kindesalter. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2003

Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signaling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2007; Onlinepublikation

Güth A. Flowzytometrische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen im menschlichen Ejakulat. Marburg, Universität Marburg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2005

Haidl G. Männliche Fertilitätsstörung - Untersuchung. In: Schirren C, HRSG. Unerfüllter Kinderwunsch - Leitfaden Reproduktionsmedizin für die Praxis. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2003: 259 - 279

Haidl G, Allam JP, Schuppe HC. Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 2008; 40: 92 - 96

Hashiguchi Y, Matsuo Y, Torii Y, Kajiwara T, Kayajima T, Irie K, Shimoda Y, Kudo S. Polyarteritis nodosa of the epididymis. *Abdom Imaging* 2001; 26: 102 - 104

Hedger MP. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 1997; 2: 38 - 47

Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol* 2003; 58: 1 - 26

Henkel R, Maass G, Jung A, Haidl G, Schill WB, Schuppe HC. Age-related changes in seminal polymorphonuclear elastase in men with asymptomatic inflammation of the genital tract. *Asian J Androl* 2007; 9: 299 - 304

Hofmann N, Haider SG. Neue Ergebnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogenesestörung. *Gynäkologe* 1985; 18: 70 - 80

Holstein AF. Männliche Geschlechtsorgane. In: Drenckhahn D, Zenker W, HRSG. Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. München - Wien - Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1994: Band 2: 69 - 113

Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PCD, Henekl RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril* 2008; 25. März, Onlinepublikation

Hori S, Tsutsumi Y. Histological differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis: nondestructive and proliferative versus destructive and abscess forming – immunohistochemical and clinicopathological findings. *Hum Pathol* 1995; 26: 402 - 407

Howards SS. Treatment of male infertility. *N Engl J Med* 1995; 332: 312 - 317

Hungerhuber E, Stief CG, Siebels M. Urogenital Infections in the Male and Their Implications on Fertility. *Reprod Contracept* 2004; 15: 193 - 200

Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immuno Biology – the immune system in health and disease*. New York – London: Garland Science Publishing, 2005.

Juul S, Karmaus W, Olsen J, The European Infertility and Subfecundity Group. Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. *Hum Reprod* 1999; 14: 1250 -1254

Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, Seibel MM, Eyre RC. Semen leukocytes: friends or foes? *Fertil Steril* 1995; 64: 196 - 198

Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 891 - 903

Kopa Z, Wenzel J, Papp GK, Haidl G. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation. *Andrologia* 2005; 37 (5): 188 - 194

Kret B, Milad M, Jeyendran RS. New discriminatory level for glucosidase activity to diagnose obstruction or dysfunction. *Arch Androl* 1995; 35: 29 - 33

Krieger JN. Epididymitis, orchitis and related conditions. *Sex Transm Dis* 1984; 11: 173 - 181

Krieger JN. Nyberg L. Nickel JC. NIH Consensus Definition and Classification of Prostatitis. *JAMA* 1999; 282: 236 - 237

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118 - 1123

Küçük T, Sozen E, Buluc B. Intrauterine insemination with double ejaculate compared to single ejaculate in male factor infertility: a pilot study. *J Androl* 2008; Onlinepublikation

Kulchavenya E, Khomyakov V. Male genital tuberculosis in Siberians. *World J Urol* 2006; 24: 74 - 78.

Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004; 19: 607 - 610

Leibz Z, Bartoov B, Eltes F, Servadio C. Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality? *Fertil Steril* 1994; 61: 1109 - 1116

Leschner A. Flowzytometrische Untersuchung der Apoptose humaner Spermatozoen mit Hilfe des Annexin V-Tests. Marburg, Universität Marburg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2006

Li HJ, Xu, P, Liu JS, Xing GW, Pan TM, Yang BL, Song YX, Huang YF. Prevalence of chronic prostatitis and its effects on male infertility. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 369 - 371

Li MW, Xia W, Mruk DD, Wang CQ, Yan HH, Siu MK, Lui WY, Lee WM, Cheng CY. Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol* 2006; 190: 313 - 329

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore, Darnell JE. Der Zelltod und seine Regulation. In: *Molekulare Zellbiologie*. Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag, 2001: 1128 - 1139

Ludwig M, Vidal A, Huwe P, Diemer T, Pabst W, Weidner W. Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Andrologia* 2003; 35: 152 - 156

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. München: Spektrum akademischer Verlag, 2004.

Luzzi GA, O'Brien TS. Acute epididymitis. *BJU Int* 2001; 87: 747 - 755

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000; 113: 2085 - 2090

Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens. *Hum Reprod* 2005; 20: 2567 - 2572

Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 29 - 55

Neulen J, Neises M. Infertilität und Sterilität - Reproduktionsmedizin. In: Kiechle M, HRSG. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. München - Jena: Urban & Fischer, 2007: 119 - 217

Nieschlag E. Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: Nieschlag E, Behre HM, HRSG. *Andrologie*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: 1 - 9

Nieschlag E, Behre HM, Meschede D, Kamischke A. Störungen im Bereich der Testes. In: Nieschlag E, Behre HM, HRSG. *Andrologie*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: 158 - 194

Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 469 - 476

Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245 - 250

Oosterhuis GJ, Vermes I. Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 115 - 119

Pentikainen V, Erkkilä K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol* 1999; 276: 310 - 316

Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Effects of tumor necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J Clin Immunol* 2007; 27: 152 - 162

Perticarari S, Ricci G, Boscolo R, De Santis M, Pagnini G, Martinelli M, Presani G. Fas receptor is not present on ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 2008; 11. April, Onlinepublikation

Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, Sikka SC. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *Fertil Steril* 1995; 64: 166 - 171

Sadek I, Biron P, Kus T. Amiodarone-induced epididymitis: report of a new case and literature review of 12 cases. *Can J Cardiol* 1993; 9: 833 - 836

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061 - 1067

Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Liang Li, Glander HJ, Thomas Jr. AJ, Paasch U. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod* 2006; 74: 530 - 537

Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008; 29: 134 - 142

Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 428 - 432

Schiff JD; Luna M, Barritt J, Duke M, Copperman A, Bar-Chama N. The morphology of extracted testicular sperm correlates with fertilization but not pregnancy rates. *BJU Int* 2007; 100: 1326 - 1329

Schill WB. Männliche Fertilitätsstörung - Ursachen und spermatologische Diagnosen. In: Schirren C, HRSG. Unerfüllter Kinderwunsch - Leitfaden Reproduktionsmedizin für die Praxis. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2003: 293 - 319

Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38 - 47

Siu MK, Lee WM, Cheng CY. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-alpha, gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloprotease-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 2003; 144: 371 - 387

Slavis SA, Scholz JN, Hewitt CM, Black KS, Campbell RS, Patel M, Zimmerman J, Peake ML, Martin DC. The effects of testicular trauma in fertility in the Lewis rat and comparison to isoimmunized recipients of syngeneic sperm. *J Urol* 1990; 143: 638 - 641

Stalf T, Mehnert C, Hajimohammad A, Manolopoulos K, Shen Y, Schuppe HC, Diemer T, Schill WB, Weidner W, Tinneberg HR. Influence of motility and vitality in intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Andrologia* 2005; 37: 125 - 130

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The Question of Declining Sperm Density Revisited: An Analysis of 101 Studies Published 1934 - 1996. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 961 - 966

Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 825 - 834

Terrone C, Poggio M, Bollito E, Cracco CM, Scarpa RM. Asymptomatic prostatitis: a frequent cause of raising PSA. *Recenti Prog Med* 2005; 96: 365 - 369

Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988 – 1989). *Hum Reprod* 1991; 6: 811 - 816

Tomlinson MJ, Barrat CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 1993; 60: 1069 - 1075

Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometrie* 1998; 31: 1 - 9

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245 - 254

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39 - 51

Viswaroop BS, Kekre N, Gopalakrishnan G. Isolated tuberculous epididymitis: a review of forty cases. *J Postgrad Med* 2005; 51: 109 - 111.

Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: Nieschlag E, Behre HM, HRSG. *Andrologie*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 2000: 27 - 67

Wolff H, Bezold G, Zebhauser M, Meurer M. Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen. *J Androl* 1991; 12: 331 - 334

World Health Organisation (WHO) Task Force on the Diagnosis and Treatment of Infertility. Towards more objectivity in diagnosis and management of male fertility. *Int J Androl Suppl* 1987; 7: 1 - 53

World Health Organisation (WHO). Anhang. In: WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Heidelberg: Springer, 1999: 73 - 129.

Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 35 - 56

Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril* 1996; 66: 822 - 825

Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 2008; 10: 227 - 235

Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. Semen granulocyte elastase: its relevance for diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod* 2000; 15: 1978 - 1984.

10. Danksagung

Dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Bonn, Professor Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber, danke ich für die Möglichkeit, in seinem Hause meine Dissertation anzufertigen.

Ich danke besonders meinem Doktorvater und Leiter der andrologischen Ambulanz, Professor Dr. med. Gerhard Haidl, für die Vergabe des Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Dank gebührt in hohem Maße Dr. med. Jean-Pierre Allam, der mir bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie der Auswertung der Ergebnisse mit Rat und Expertise zur Seite stand. Ich bedanke mich für die anregenden Diskussionen und die professionelle Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an die biologisch-technische Assistentin Frau Iris Oltermann. Sie war es, die mir bei den ersten Schritten im andrologischen Labor half und immer ein offenes Ohr für die Probleme eines Doktoranden hatte. Auch ihre beiden Kolleginnen Frau Sabine Reif (BTA) und Frau Martina Schlößer (MTA) waren immer sehr hilfsbereit und ließen die Arbeit im Labor zu einem Vergnügen werden.

Meiner lieben Kollegin Frau Andrea Karpawitz-Godt danke ich für den Hinweis auf die Möglichkeit einer Dissertation in der Andrologie.

In tief empfundener Dankbarkeit widme ich diese Arbeit meinen Eltern, deren Liebe und Unterstützung mich mein ganzes Studium über getragen und begleitet hat.