Aus der Hautklinik, Abteilung Andrologie
des Universitätsklinikums Charite'
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Engel)

Dissertation

Digitale Dissertation

„Optimierung der Glaswollefiltration von menschlichen Ejakulaten zum Zwecke der assistierten Reproduktion und für labordiagnostische Untersuchungen"

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Holm Weber
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter:

1. Prof. Weitze
   Institut für Reproduktionsmedizin der
   Tierärztlichen Hochschule Hannover

2. Prof. Kentenich
   Frauen- und Kinderklinik DRK Berlin

3. Prof. Engel
   Andrologische Abteilung der
   Dermatologischen Klinik Charité Berlin

eingereicht: September 1998

Datum der Promotion: April 1999

Abstract

An efficient procedure for sperm preparation is presented using glass wool (microfibre code 112) in a special filter arrangement. Centrifugation as a means of spermatozoa concentration, a process which is extremely harmful to the sperm cells, can be dispensed with by making use of a concentration effect induced by the form of the vessel. The results that follow are mean values from 30 measurements. Computer-Assisted Sperm-motility Analysis (CASA) shows a significant rise of the sperm cell contents in the filtrate (27,45 vs. 69,56 million/ml) as compared with the native ejaculate. The distribution ratio of sperm populations observed after glass wool filtration provides favourable conditions for assisted reproduction. Reduction of the immotile portion to one fifth (54,53 vs. 11,66 %) yields a consecutive rise of the portion of motile sperms (39,53 vs. 82,06 %). Further specification of motile spermatozoa shows a shift in favour of sperms moving in a straight line. The decrease of the portion moving in circles is significant (34,96 vs. 31,1 %) after filtration, whereas the reduction in the subpopulation of sperms not moving in a straight line is of a rather incidental nature. Of particular interest, however, is the increase in sperm cells moving in straight lines (7,36 vs. 12,43 %). Basing considerations on absolute figures , a nine-fold increase in spermatozoa moving in straight lines, from the native value of 0,8 to 7,1 million/ml, can be demonstrated (even for oligozoospermial ejaculates) after filtration. Their curvilinear velocity (VCL) rises, in this connection, to a disproportionately high degree (41,26 vs. 62,66 µm/sec), whereas a filtration-induced rise of the VCL by only 10 µm/sec is observed for all motile spermatozoa on the average. Furthermore, a Cell Counter + Analyser System (CASY®) was employed making use of a particle test procedure. In this way, it could be proved that glass wool filtration produces a marked enrichment in a population of sperm cells with a mean membrane diameter of 3,47 µm with simultaneous

reduction of the small- and large-corpuscular (cellular and non-cellular) fractions. In keeping with this are the results of the morphological differentiation (strict criteria). A significant increase in the standard form (13,33 vs. 19,16 %) with an adequate reduction in macro and micro heads (6,5 vs. 3,03 %) as well as in prestages (8,33 vs. 5,96 %) could be observed after filtration. Pictures taken with the electron-scan microscope clearly show that spermatozoa presenting membrane defects as well as mucous proteins, in particular, attach to the glass wool fibre surface.

Key words:

Glass wool filtration * Sperm preparation * Vessel form * Human

Zusammenfassung

Mittels Glaswolle (Microfibre code 112) in einer speziellen Filtrations-Anordnung steht ein effektives Spermienpräparations-verfahren zur Verfügung. Durch Ausnutzung eines gefäßform-induzierten Konzentrierungseffektes kann auf samenzellschädigende Zentrifugation zur Spermatozoen-Anreicherung verzichtet werden. Folgend aufgeführte Ergebnisse sind Mittelwerte aus 30 Messungen. Die Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA) zeigt eine gegenüber dem nativen Ejakulat signifikante Erhöhung der Spermienkonzentration im Filtrat (27,45 vs. 69,56 Mio/ml). Das Verteilungsverhältnis der Samenzell-Populationen nach Glaswolle-Filtration bietet gute Voraussetzungen für assistierte Reproduktion. Unter Abnahme des immotilen Anteils auf 1/5 (54,53 vs. 11,66 %), erhöht sich konsekutiv der motile Spermien-Anteil (39,53 vs. 82,06 %). In der weiteren Spezifisierung motiler Spermatozoen, kann eine Verschiebung zugunsten linear motiler Spermien registriert werden. Während die Verringerung der nicht linear motilen Subpopulation nur zufälligen Charakters ist, weist der Kreisläuferanteil post filtrationem einen signifikanten Rückgang auf (34,96 vs. 31,1 %). Der Zuwachs linear motiler Samenzellen ist jedoch von besonderem Interesse (7,36 vs. 12,43 %). Bei Zugrundelegung von Absolut-zahlenwerten, läßt sich (auch für oligozoosperme Ejakulate) ein nahezu 9-facher Anstieg linear motiler Spermatozoen von nativ 0,8 auf 7,1 Mio/ml nach Filtration demonstrieren. Ihre Spurgeschwindigkeit (curvilinear velocity-VCL) nimmt dabei überproportional zu (41,26 vs. 62,66 µm/s), während sich über alle motilen Spermien im Mittel nur eine filtrationsbedingte VCL-Erhöhung von 10 µm/s abzeichnet. Weiterhin kam ein Cell Counter + Analyser System (CASY®) zum Einsatz, das ein Verfahren der Partikelmeßtechnik nutzt. So gelang der Nachweis, daß die Glaswolle-Filtration unter Reduktion klein- und großkorpuskulärer Bestandteile (zelluläre und nichtzelluläre) eine deutliche

Anreicherung einer Samenzell-Population mit medianen Membrandurchmesser von 3,47 µm bewirkt. Die Ergebnisse der morphologischen Differenzierung (strict criteria) stehen damit im Einklang. Nach Filtration konnte eine signifikante Zunahme der Normalform (13,33 vs. 19,16 %) bei adäquater Verminderung von Makro- und Mikroköpfen (6,5 vs. 3,03 %) sowie Vorstufen (8,33 vs. 5,96 %) registriert werden.
Auf den raster-elektronen-mikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, wie besonders membrandefekte Spermatozoen und muköses Eiweiß der Glaswolle-Faseroberfläche verhaften.

Schlagworte:

Glaswoll-Filtration * Spermienpräparation * Gefäßform * Mensch

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	4
1.	Einführung	5
2.	Problemstellung	9
3.	Patienten und Untersuchungsmethoden	11
3.1.	Patientenauswahl	11
3.2.	Spermatologische Basisdiagnostik	11
3.3.	Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA)	12
3.4.	Cell Counter+Analyser System (CASY®)	13
3.5.	Morphologische Differenzierung	13
3.6.	Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse	14
3.7.	Statistische Verfahren	14
4.	Versuchsaufbau	16
4.1.	Materialien	16
4.2.	Filterpräparation	16
4.3.	Anordnung der Filterelemente	17
5.	Durchführung	19
5.1.	Vorversuch	20
5.2.	Hauptversuch	20
5.2.1.	Entnahme Gefäßboden	20
5.2.2.	Entnahme unterhalb Filtratspiegel	20
6.	Darstellung der Ergebnisse	22
6.1.	Vorversuch	22
6.2.	Hauptversuch	24
6.2.1.	Entnahme Gefäßboden	24

6.2.1.1. Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA) 24
6.2.1.2. Cell Counter+Analyser System (CASY®) 28
6.2.1.3. Morphologische Differenzierung 30
6.2.1.4. Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse 32
6.2.1.5. Statistische Verfahren 33
6.2.2. Entnahme unterhalb Filtratspiegel 36

7. Diskussion der Ergebnisse 39
7.1. Geeigneter Filteraufbau 39
7.2. Vorversuch 40
7.3. Hauptversuch 41
7.3.1. Entnahme Gefäßboden 41
7.3.1.1. Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA) 41
7.3.1.2. Cell Counter+Analyser System (CASY®) 43
7.3.1.3 Morphologische Differenzierung 43
7.3.1.4 Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse 44
7.3.1.5 Gefäßformeffekt 44
7.3.2. Entnahme unterhalb Filtratspiegel 49

8. Zusammenfassung 50

9. Literaturverzeichnis 52

10. Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

C	Counts (CASY®)
CASA	Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse
CASY®	CellCounter+Analyser-System (Schärfe System GmbH)
C/ml5	Counts/ml x 100000 (CASY®)
Immo	Immotile Spermatozoen (CASA)
IVF	in-vitro Fertilisation
Konz	Konzentration aller Spermatozoen (CASA)
Krs	Kreisläufer (CASA)
LMo	Linear motile Spermien (CASA)
LoMo	Lokal motile Spermatozoen (CASA)
Max	Maximum partikulärer Teilchenregistrierung (CASY®)
MDia	Mean Diameter der Partikel (CASY®)
Mo	Motile Spermatozoen
Mpd/1-10	detaillierte Morphologie 1 bis 10 (Spermiozytogramm)
NLMo	Nicht linear motile Spermien (CASA)
VCL	curvilinear-velocity = „Spurgeschwindigkeit“
VKrs	VCL der Kreisläufer (CASA)
VLMo	VCL der Linear motilen Spermien (CASA)
VMo	VCL der Motilen Spermatozoen (CASA)
VNLMo	VCL der Nicht linear motilen Spermien (CASA)

1. Einführung

In der internationalen Spermiogramm-Nomenklatur unterliegt die untere Grenze für Normozoospermie zeitlichem Wandel. In den Arbeitsanleitungen zur standardisierten Laboruntersuchung von Sperma und Hodenparenchym des Jahres 1983 wurde eine Spermatozoenzahl von 40 Mio/ml im nativen Ejakulat in der andrologischen Diagnostik für „normal“ angesehen (Andrologie-Report). Unter Berücksichtigung intraindividueller Variation erfüllen später bereits 30 Mio. Zellen pro ml den Anspruch der Normozoospermie. Das „WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion“ (Springer-Verlag) gibt 1993 eine Konzentration von 20 Mio/ml als untere Normgrenze an. Angesicht dieser Anpassung könnte man davon ausgehen, ein immer größerer Teil der Bevölkerung erfüllte diese Voraussetzung. Tatsächlich steigt die Zahl, sich in andrologische Behandlung begebender Männer. In deren Partnerschaften konnten häufig Störungen der weiblichen Fortpflanzungssorgane als Ursache der Kinderlosigkeit ausgeschlossen werden. Mit einer verringerten Spermienkonzentration geht meist eine Beeinträchtigung der Spermienmotilität, vor allem der Progressivbeweglichkeit, einher. Modernste Verfahren der assistierten Reproduktion finden bei therapeutisch nicht beeinflußbarer Oligoasthenozoospermie Zugang. So bieten sich bei schwersten Fällen von Oligozoospermie fachübergreifend mit der Einführung der ICSI-Methode neue Möglichkeiten. Durch ihren hohen Grad an Vereinzelung verwendeter Spermatozoen wirft sie ethische Fragen auf, stellt oft aber die letzte Behandlungsmöglichkeit bei ungewollter Kinderlosigkeit dar. Routineverfahren wie die homologe intrauterine artifizielle Insemination und die in-vitro Fertilisation bleiben jedoch nach wie vor Mittel der Wahl. Für deren Erfolgsaussichten kommt den Spermienpräparationstechniken eine Schlüsselrolle zu.

Die Bestandteile des Seminal-Plasmas beeinflussen die Fertilisierungskapazität menschlicher Spermatozoen (Reddy et al., 1979). Das Ziel der Samenpräparation für assistierte Reproduktionstechniken ist es, motile und morphologisch normale Spermien von immotilen, morphologisch anormalen und toten Spermatozoen, Epithelzellen aus dem Urethraltrakt, Spermienvorstufen, Leukozyten, Zelltrümmern und dem Seminalplasma zu trennen.

Als die bekanntesten stehen Swim-up, Fall-down, diskontinuierliche Percoll-Gradienten-Zentrifugation, SpermPrep* und Glaswollefiltration zur Verfügung.

Traditionell kam das single-tube Swim-up (ST-SU: Lopata et al., 1976) in vielen Infertilitätszentren zur Anwendung. Es wurde jedoch beobachtet, daß dieses Verfahren hinsichtlich seiner Fertilisationsrate bei oligozoospermen Samenmustern für die IVF menschlicher Oozyten ineffizient ist (Alper et al., 1985). 1985 schlugen Mahadevan et al. darauf aufbauend das multiple-tube Swim-up (MT-SU) für die Aufbereitung qualitativ schlechter Samenproben vor. Unter Nutzung der MT-SU-Technik konnten Tanphaichitr et al., 1987 eine Überlegenheit gegenüber dem ST-SU im Hamster-Ovum-Penetrations-Test nachweisen. Ein Vergleich zwischen dem MT-SU-Verfahren und der diskontinuierlichen Percoll-Gradienten-Zentrifugation zeigte in allen post-separativen Spermien-Parametern keinen signifikanten Unterschied. Beide Methoden sind gleichermaßen für die Aufbereitung normozoospermer Ejakulatproben im Rahmen einer Fertilitätsbehandlung geeignet (Chan et al., 1991).

Neben dem Swim-up, auch als Sperm-rise bezeichnet, wurde die Methode vom Sedimentationstyp, als Fall-down bekannt, entwickelt (McDowell, 1983). Im Vergleich mit anderen Präparationsverfahren zeigt es sowohl in der Ausbeute morphologisch normaler Spermien als auch bei der Reduzierung bakterieller Kontamination keinen signifikanten Unterschied. Die prozentuale Motilität, erzielt mittels Fall-down, liegt unter den Swim-up-Werten, entspricht weitestgehend der des nativen Ejakulates. In der Spermienzahl pro ml erweist sich die Sedimentationstechnik als überlegen (Sun et al.,1987).

Derzeitig hat das Verfahren gerade in Hinblick auf die Bewegungsparameter an Bedeutung verloren.

Auf der Grundlage des kontinuierlichen Percoll-Gradienten (Gorus & Pipeleers, 1981; Arcidiacono et al., 1983) ging die weitere Entwicklung in Richtung der Zentrifugation über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (Forster et al., 1983; Dravland & Mortimer, 1985; Berger et al., 1985). Mit der einfachen, 2-schichtigen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten-Zentrifugation steht ein leistungsfähiges Präparationsverfahren zur Verfügung. Bei einer Spermienkonzentration weit unter 20 Mio/ml und/oder mit weniger als 50% progressive Motilität aufweisenden Spermien ist es aufgrund der besseren Ausbeute sogar dem Swim-up vorzuziehen, denn Abstufung und Zusammensetzung des Percoll-Gradienten können speziellen Ejakulaterfordernissen angepaßt werden. Ord et al. (1990) ließen beispielsweise die Probe über mehrere Mini- Percoll-Gradienten laufen.

Eine Ein-Weg-Samen-Filtrations-Säule, SpermPrep* (Fertility Technologies Inc., Natick, MA) wurde auf der 45. Jahrestagung der „American Fertility Society“ in San Francisco, Californien, vorgestellt (Zavos PM, Centola GM.). Sie enthällt Polysaccharid- Kügelchen, die nach dem Anfeuchten rauhe Oberflächen- Vertiefungen entwickeln. Morphologisch defekte Spermatozoen und Seminalplasmabestandteile werden bei der Durchdringung der Säulenporen abgeschieden, wärend motile Spermien passieren. Eine Konzentrierung wird bei dieser Methode allerdings nicht erreicht. Da das gerade bei oligozoospermen oder asthenozoospermen Ejakulaten problematisch sein kann, wird eine 40% Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation vorangestellt. Der mittels SpermPrep-Methode erzielte Ertrag motiler Spermatozoen ist dabei signifikant höher, als bei 2-Schicht-Percoll-Dichtegradient- und Swim-up-Präparation. Die Spurgeschwindigkeitswerte heben sich allerdings nicht vom Niveau beider Vergleichsverfahren ab. Bereits ein Behandlungszyklus zeigt gute Konzeptionsraten nach IUI (Ohashi et al., 1992).

Durch kontinuierliche Weiterentwicklung verlor die Glaswolle-Filtration als konkurrierendes Präparationsverfahren nie an klinischer Relevanze. Nach Paulson & Polakoski, 1977, wurde durch Jeyendran et al., 1986 eine Standardisierung des Filteraufbaues gegeben. Das Separationsprinzip beruht zum Einen auf einer Filtrationswirkung der Glaswollfasern. Zum anderen ist die Eigenbeweglichkeit motiler Spermatozoen tragender Pfeiler. Die Vorzüge dieser Technik der Spermienpräparation gegenüber den vorgenannten Methoden sind vielfältig. Es handelt sich um ein einfaches, schnell durchführbares und effizientes Verfahren für die Gewinnung motiler Spermien. Der laborative Ausstattungs- und Arbeitsaufwand ist vergleichsweise gering.Eine schonende und vor allem frühzeitige Trennung vitaler von geschädigten Zellen ist gegeben. Die heute erzielte Reinheit des benutzten Glaswollfasermaterials schließt toxische Reaktionen aus. Glaswollfasern sind chemisch absolut inert. Bei der Gegenüberstellung mit den beiden Referenzverfahren: diskontinuierlicher Percoll-Gradient und Swim-up, war die Glaswolle-Filtration beiden überlegen. Während letztere kontinuierlich signifikant höhere effektive Konzentrationen an lebenden Spermien mit guter Beweglichkeit lieferte, schwankten die Swim-up-Ergebnisse bei Problem-Ejakulaten (Coetzee et al., 1994). Die Glaswolle-Filtration ist ebenfalls erfolgreicher als die Percoll-Zentrifugation, wenn die Ejakulate asthenozoosperm sind oder einen abnormen HOS-Test zeigen (Rhemrev et al., 1989).

2. Problemstellung

Welches Präparationsverfahren auch betrachtet wird, frühzeitige Isolation intakter Zellen und Konzentrierungsschritte nehmen eine zentrale Rolle ein - zwei Schwerpunkte, die über die Brauchbarkeit der Methode entscheiden. Ziel der Studie ist es, der Frage nachzugehen, wie effizient Glaswollefiltration dem qualitativen Maß zum einen und der quantitativen Ausbeute zum anderen genügt. Konkretisiert heißt das: Führt die Glaswolle-Filtration zu einer Abnahme des Anteils immotiler Spermien bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils motiler Spermatozoen, deren Motilität im Sinne einer Geschwindigkeitserhöhung gesteigert ist (entspricht Hauptaussage H1)? Durch gezielte Ausnutzunng der Behältnisform soll auf Zentrifugation verzichtet werden. Irreversible Schäden durch Übergang reaktiver Sauerstoffspezies auf „intakte" Spermatozoen (Aitken und Clarkson; 1988 und 1989) würden damit vermieden.
Grundlegend muß man sich jedoch Klarheit über den geeignetsten Filteraufbau verschaffen. Seit den Anfängen der Glaswolle-Filtration wurden verschiedenste Empfehlungen gegeben. Durch permanente Modifizierung ist die Aussagekraft, vor allem die Vergleichbarkeit mit den anderen Präparationstechniken, beeinträchtigt. Säulendurchmesser (Spritzenkaliber), Filterpackungsdichte (ein Maß aus verwendeter Glaswollmasse und Säulenhöhe bei vorgegebenem Säulendurchmesser) und Säulenwaschung (geeignetes Spülvolumen, das der Benetzung und Glasfaserpartikelausschwemmung genügt) sind dabei sich wechselseitig beeinflussende Parameter. Nur eine ausgewogene Abstimmung garantiert jene Fasergitterstruktur, deren Zwischenräume gerade groß genug sind, von vitalen normomorphen motilen Spermatozoen durchschwommen zu werden. Alles andere geht entweder auf Kosten der Filtrationswirkung oder liefert ein Filtrat, in dem selbst vitale und motile Spermien fehlen.
Die Optimierung des Glaswollefiltrationsverfahrens unter folgenden Gesichtspunkten:

- Standardisierung der Methode nach Verdünnungsverhältnis (natives Ejakulat : Dilutionslösung), Glaswolldichte, Durchflußzeit, Spülvolumen
- Trennung toter bzw. unbeweglicher von motilen Spermatozoen
- Abscheidung korpuskulärer Bestandteile nativen Ejakulats
- schonende Behandlung der Zellen (Verringerung der Abtropfhöhe des Filtrats vom Filterkonus)
- Überprüfung der Anreicherung parallel zur Selektion unter dem standardisierten Vorgehen mittels **CASA** (Parameter: Konz in Mio. /ml; Immo in %; LoMo in %; Mo in %; Krs in %; NLMo in %; Lmo in %; VMo in µm/s; Vkrs in µm/s; VNLMo in µm/s; VLMo in µm/s) und **CASY®** (Parameter: C absolut; C/ml5 relativ; MDia in µm; Max in µm), sowie Anfertigung eines Spermiozytogramms,

soll Gegenstand dieser Arbeit sein. Rasterelektronenmikroskopische Schichtenaufnahmen einzelner Filter sollen ergänzende Aussagen über die Filtrationsleistung liefern.

3. Patienten und Untersuchungsmethoden

3.1. Patientenauswahl

Genutzt werden konnten Ejakulate konsekutiver Patienten der andrologischen Ambulanz. Für den Vorversuch ergab sich ein Umfang von 10, für den Hauptversuch von 30 Patienten. Der Aufgabenstellung entsprechend, erfolgte eine Einschränkung der verarbeitbaren Ejakulate nur in Hinsicht auf ihre Zelldichte, Motilität und Konsistenz. Grundvoraussetzung war dabei ein ausreichendes Restvolumen nach Routinediagnostik von 500µl. Zur Filtration geeignet waren Samenmuster mit einer Zelldichte >5 Millionen/ml und einer Gesamtmotilität >20 %. Ausschlußkriterium war neben der Unterschreitung beider Werte eine abnorme Viskosität der verflüssigten Probe. Von dieser wurde ausgegangen, wenn sich nach Aspiration in eine 5-µl-Pipette eine Fadenlänge von mehr als 2 cm ergab. Die Gewinnung der Patientenejakulate erfolgte unter standardisierten Bedingungen:
Nach einer 3-5 tägigen sexuellen Karenz wurde das Ejakulat in der Klinik durch Masturbation gewonnen. Auf 37°C vorgewärmte sterile Plastik-Petrischalen dienten zum Auffangen und dem Transport. Bei Raumtemperatur verflüssigte die Probe in der Regel nach 20-30 Minuten.

3.2. Spermatologische Basisdiagnostik

Das gut durchmischte verflüssigte Ejakulat wurde anschließend nach WHO-Standart untersucht. Neben der Bestimmung von Farbe, Volumen, Konsistenz, ph-Wert, Spermienzahl pro ml, Gesamtzahl an Spermatozoen und Gesamtmotilität (WHO-Kategorie „a”, „b” und „c”), wurde eine morphologische Differenzierung und der Spermien-Antikörper-Test durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Erfassung der progressiven Motilität gemäß Ishii et al (1977): Eine Neubauer-Kammer wurde dabei mit 20-fach verdünntem Ejakulat

beschickt. Ungeachtet ihrer Bewegungsrichtung zählt man alle Spermatozoen aus, die in einer Minute die 0,1 mm Quadratlinie passieren. Die registrierte Anzahl wird durch die Spermienzahl pro ml geteilt und mit 100 multipliziert. Das Ergebnis in %/ml angegeben, stellt den Spermienmotilitätseffizienz(SME)- Index dar. Der Normalwert laut Ishii beträgt 70 %/min (im Bereich von 50-99 %/min). 3 Stunden nach Verflüssigung hingegen ergibt sich ein mittlerer Minimalwert von 35 %/min. Ermittelt wurde dieser Wert anhand von Untersuchungen an 1000 Patienten (Engel und Petzoldt; 1984). Folglich wurden SME-Werte 30 Minuten nach Verflüssigung (t1) und 3 Stunden nach Verflüssigung (t2) bestimmt.

3.3. Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA)

Nach dem Erfassen der unter 3.1. genannten Parameter, erfolgte eine vollautomatische Analyse der Bewegungsparameter. Dazu stand ein CASA-Gerät der neuen Generation zur Verfügung. Das mika motion analyzer-Programm (1993) der mika medical GmbH für Windows ist eine Weiterentwicklung des DOS-Programms CMA V4.4. Die Version 1.1 stellt eine Programmversion auf einer neuen Plattform dar. Die Datengewinnung erfolgte nach den neuesten WHO-Richtlinien. CASA-Messungen erfolgten im nativen Ejakulat, sowie nach der Filtration.

Meßstandart:

Felder.....6 Kammertiefe.. 10 µm

Temperatur.....37 °C Verdünnung 1

Geschwindigkeitsgrenze immotil..... 10 µm/sec

Geschwindigkeitsgrenze lokal motil..... 15 µm/sec

Linearitätsgrenze..... 90 %

Maximaler Radius für Kreisläufer..... 10 µm

3.4. Cell Counter + Analyser System (CASY®1)

CASY®1 (Modell TTC) als deutsche Entwicklung, ist eingetragenes Warenzeichen der Schärfe System GmbH. Es handelt sich um ein Produkt langjähriger Erfahrungen mit analytischen Arbeitsmethoden in der Zellbiologie und Mikrobiologie. Die Technologie verbindet ein bewährtes Verfahren der Partikelmeßtechnik, das „Widerstands-meßprinzip“, mit einer modernen Methode der Signalauswertung, der „Pulsflächenanalyse“. Anwendung findet es ursprünglich bei der qualitativen und quantitativen Beurteilung von Zellkulturen. Sowohl Partikel, als auch intakte Zellen verdrängen eine ihrem Volumen entsprechende Menge einer Elektrolytlösung. Die resultierende Widerstandserhöhung ist ein Maß für deren Volumen. Damit steht ein Registrierverfahren zur Verfügung, das neben Spermatozoen andere korpuskuläre Bestandteile des Ejakulats (zelluläre und nichtzelluläre) quantitativ erfaßt.

CASY®-Messungen des nativen Ejakulats in Relation zum Glaswolle-Filtrat sollen eine Aussage über den Filtrationseffekt liefern. Des weiteren ist zu zeigen, ob eine Anreicherung von Spermien stattfindet. Dynamische Bewegungsparametergewinnung mittels CASA und detailierte Konzentrationsbestimmung des CASY®-Systems sollen sich gegenseitig ergänzen.

Meßstandart:

Ein Cursorpaar, begrenzt den Bereich der Größenverteilung, für den CASY®1 die Messergebnisse berechnet.

- CL.....Cursor left: 2,5 µm / - CR.....Cursor right: 10,0 µm

3.5. Morphologische Differenzierung

Neben der unter 3.1. beschriebenen routinemäßigen morphologischen Differenzierung nativer Ejakulate in:

- Normalform
- Mittelstückveränderungen
- Frühformen,
- Kopfveränderungen
- Schwanzveränderungen

wurde im Hauptversuch ein detailiertes Spermiozytogramm nach Shorr-Färbung sowohl nativ, als auch nach Filtration erstellt:

- Normalform = 1
- Überstreckungsformen 1. und 2. Grades = 2
- Überstreckungsformen 3. Grades = 3
- Akrosomaler Defekt = 4
- Überstreckung und akrosomaler Defekt = 5
- Flagellumdefekte; Mittelstückdefekt = 6
- Schwanzdefekt = 7
- Färbungsdefekte der Flagella ohne strukturelle Defekte = 8
- Makro- und Mikroköpfe = 9
- Vorstufen = 10

3.6. Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse

Die Fixierung des Glaswolle-Filters erfolgte nach der Filtration mit 2,5% Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Lösung. Um eine völlige Durchtränkung der im Fasergitter zurückgehaltenen organischen Substanzen zu erzielen, wurde die Säule mit 1 ml der Lösung beschickt. Zirca 750µl liefen ab, bevor die Tuberkulin-Spritze an Konus und Oberseite verschlossen wurde. Der über dem Glaswolle-Paket stehende Glutaraldehydspiegel blieb so erhalten. Die Elektronen-Mikroskopischen Aufnahmen der Filterschichten erfolgten in der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus.

3.7. Statistische Verfahren

Die erhobenen Daten und Meßwerte wurden in Excel-4-Tabellen erfaßt und konnten als Grundlage der nachfolgend aufgeführten statistischen Aufarbeitung in einem SPSS-Programm eingelesen werden. Bei der Auswertung der Filtrationsergebnisse im Vergleich zum nativen Ejakulat wurde zunächst auf Normalverteilung geprüft. Dabei kam der Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit Test zur

Anwendung. Zum Teil wurde ein zusätzlicher histographischer Verteilungsüberblick geschaffen. Im Falle des Vorliegens normal verteilter Werte, schloß sich der Student-t-Test an. Mußte die Normalverteilung abgelehnt werden oder war diese erfüllt, jedoch der Stichprobenumfang (Vorversuch) zu gering, fogte der Nicht-Parametrische-Wilcoxon-Test.

Für die Anpassung der CASA-Spermienkonzentrationswerte an die „Klassische Zählung“ wurde ein Plot im Format der statistischen Regression erstellt.

4. Versuchsaufbau

4.1. Materialien

- Glaswolle: Microfibre code 112 (John Manville), USA
- Präzisionswaage
- Spitzpinzette
- Rundpinzette
- Tuberkulin-Einwegspritzen
- Geprüfte 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Deckelverriegelung
- Lochzange
- 15 ml-Reagenzgläser mit Ständer
- Polystyrol-Eppendorf-Ständer
- Kanülen:1,10 x 50 mm; 0,50 x 16 mm
- 100 µl-, 20 µl-, 10 µl-, 5 µl- Pipette mit Spitzen
- Medium CASYton® (Schärfe System GmbH)
- 10 ml-Dispensette® (BRAND)
- Rotrand-Microfilter: 0,2 µm; FP 030/3 (Schleicher & Schuell)
- gereinigte Casy-Meßbecher
- Neubauer-Meßkammer für CASA bzw. Mika-Kammer mit Tiefe 10µm
- 2,5% Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Lösung
- Parafilm® „M“-Folie
- Objektträger

4.2. Filterpräparation

In einer Reihe von Voruntersuchungen wurde zunächst das Problem des geeigneten Filteraufbaues angegangen. Anhand der Durchfluß-geschwindigkeiten von partikelfreier physiologischer Kochsalzlösung (CASYton®) und Seminalplasma wurde die Eignung beurteilt. Dabei kristallisierte sich eine Säulenpräparationsvariante heraus, die der bereits von Rhemrev et al., 1989 beschriebenen entspricht:

Zunächst werden 15 mg Glaswolle Microfaser Code 112 (John Manville) mit einer Präzisionswaage abgewogen. Das gleichmäßige Zerzupfen der Glaswolle-Portion ließ sich am besten mit einer kleinen Spitzpinzette und einer Kanüle durchführen. Der „Faserteppich“ wurde vorsichtig und locker in eine 1-ml-Einweg-Tuberkulin-Spritze, aus der man zuvor den Stempel entfernte, gestopft. Eine Komprimierung des chaotisch angeordneten Faserwerkes ist dabei zu vermeiden. Nach dem Einbringen der gesamten Portion wird der wieder eingesetzte Stempel langsam bis zur Markierung 0,1 vorgetrieben. Damit wird eine homogene Verdichtung der Glaswolle auf 6 mm Säulenhöhe erreicht.

4.3. Anordnung der Filterelemente

Polystyrol-Eppendorf-Ständer, 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Deckelverriegelung und Filtersäule sollten eine Einheit bilden. Mit einer Lochzange wird der Deckel des Reaktionsgefäßes auf Tuberkulin-Spritzen-Konus-Durchmesser zentral perforiert. Oberhalb der 1,5 ml-Graduierung bohrt man die 1,10-Luer-Kanüle wagerecht durch das weiche Polyethylen des Eppendorf-Gefäßes. Diese beiden seitlichen Luftlöcher dienen dem Druckausgleich im System. Die Sterilität wird dabei nicht beeinträchtigt. Das Gefäß kann nun verschlossen werden. Möglichst senkrecht arretiert man den Filterkonus im erzeugten Eppendorf-Deckelloch. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, daß nach der Filtration die lichte Höhe zwischen Filtratspiegel und Konusmündung konstant von Filteraufbau zu Filteraufbau nur 2 mm beträgt.
Zum Schluß werden die beiden verbundenen Elemente im Eppendorf-Ständer lotrecht positioniert.

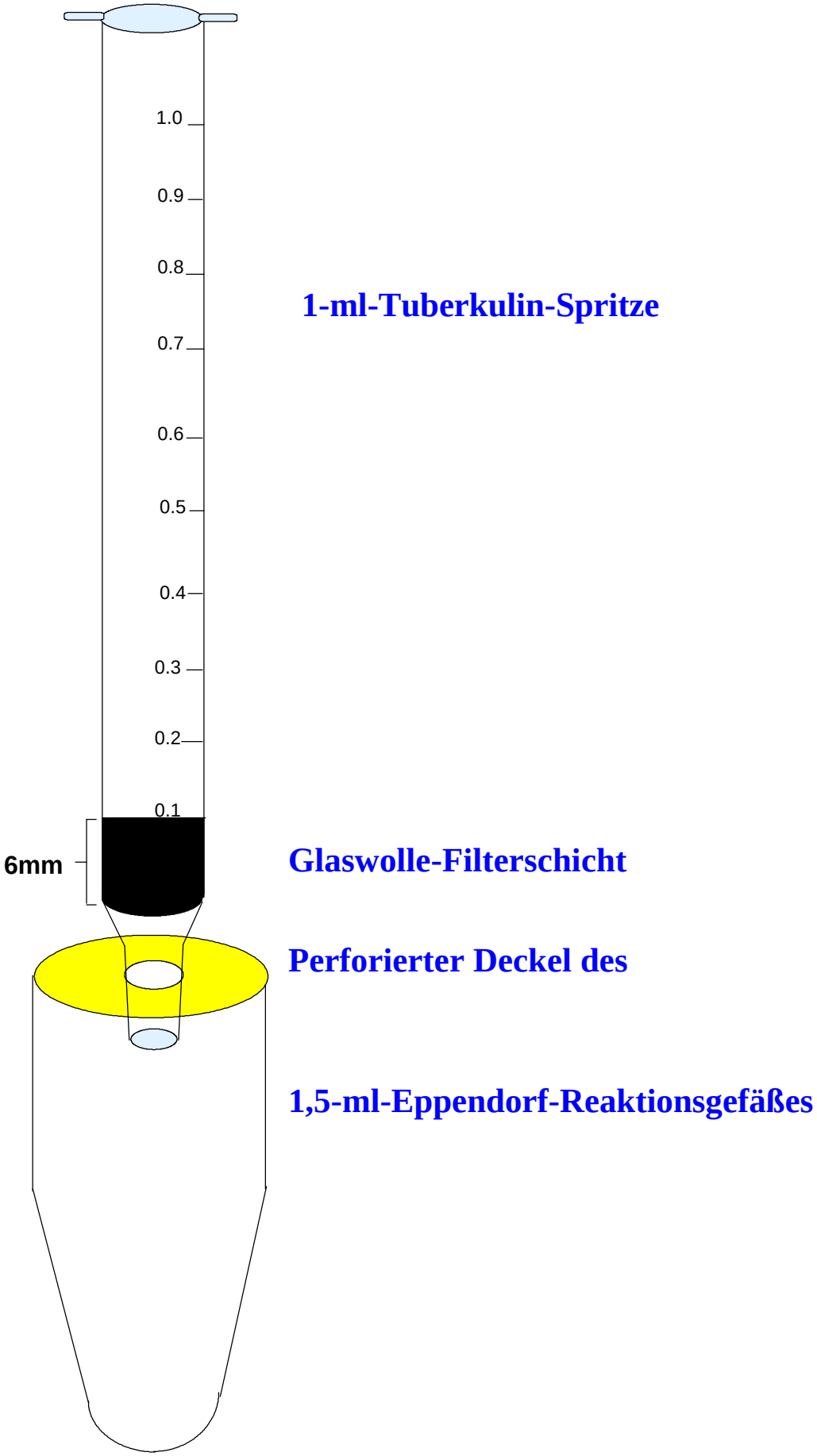


Abb.1: Modell der Filter-Gefäß-Einheit standardisiert für alle 3 Versuchsreihen

5. Durchführung

Als Vorleistung der Versuchsdurchführung sind die unter 4.2. und 4.3. aufgeführten apparativen Voraussetzungen zu schaffen. Gereinigte CASY®-Meßbecher müssen vor Gebrauch mit Aqua dest. gespült werden, um der geforderten Partikelfreiheit zu entsprechen. Die Meßbecher füllt man anschließend mit 10 ml filtriertem CASYton®. Das Aufsetzen des Rotrand-Microfilters auf die Dispensette® hat sich dabei bewährt. Da die CASY-Messungen bei 24°C stattfinden, muß nur ein gefüllter Meßbecher für die spätere Filterspülung im Thermoschrank auf 37°C temperiert werden. CASY®1 wird „saubergemessen“, wobei trotz großzügigerer Herstellerangaben der Background vor jeder Messung unter 20 counts/ml liegen sollte. Die Vorbereitungen am CASA-System beschränken sich auf die rechtzeitige Inbetriebnahme von Vormwärmplatte und beheizbarem Mikroskoptisch. Die Lagerung der Filterelemente, des nativen wie filtrierten Probenmaterials während des gesamten Versuchsablaufes, als auch die CASA-Messungen finden bei 37 °C statt. Nach der Verflüssigung des Ejakulats im Thermoschrank muß eine gleichmäßige Durchmischung erfolgen. Dazu wird das gesamte Proben-Volumen mit einer Einweg-Spritze vorsichtig 2 mal aufgezogen. Die mit 5 µl Nativejakulat beschickte Neubauer-Kammer bleibt dann für 3 Minuten auf der Vorwärmplatte. Indes kann die CASY®-Messung erfolgen. 20 µl der Probe gibt man dafür in einen der vorbereiteten Meßbecher. Damit eine Gleichverteilung des Ejakulats in den 10 ml CASYton® stattfindet, wird der verschlossene Becher 7 mal gewendet, nicht geschüttelt. Es erfolgt die Messung und anschließende Abspeicherung unter einem CASY®-file. Nun können am CASA-Gerät 6 Gesichtsfelder gemessen werden. Die Ausgangswerte liegen somit vor. Es kann filtriert werden.
Der im Thermoschrank vorbereitete CASY®-Meßbecher wird entnommen. 2 ml des Inhaltes dienen als Säulen-Spüllösung, 800µl als Medium. Zunächst wird der Filter in ein 15-ml-Reagenzglas gestellt. Nacheinander rinnt 2 mal 1 ml CASYton® durch den Filter und trägt Glasfaserpartikel hinaus. 800 µl temperaturgleichen Mediums füllt man

in ein nicht perforiertes Reaktionsgefäß und gibt 400 µl gut gemischten Ejakulats hinzu, was einer Verdünnung von 3:1 entspricht. Auch hier muß Gleichverteilung erzielt werden. Der Inhalt wird deshalb 3 mal vorsichtig aufgezogen und wieder ausgespritzt. Nach Abschluß der Spülung und Einpassung des Filters im Deckel des Eppendorf-Gefäßes, kann er behutsam mit dem Gemisch überschichtet werden. Dies geschieht unter Gebrauch einer 1,10 x 50mm langen Kanüle, die eine direkte Annäherung an die Filteroberfläche gewährleistet. Der folgende Umgang mit dem Filtrat variiert in den beiden Versuchsreihen:

5.1. Vorversuch

Sofort nach Filtration werden CASA- und CASY-Bestimmungen standardisiert durchgeführt. Das Eppendorf-Gefäß wird 7 mal gewendet, ohne zu schütteln. Die für beide Meßsysteme erforderliche Filtratmenge von 5 µl bzw. 20 µl annähernd gleichmäßig durchmischter Spermiensuspension wird entnommen.

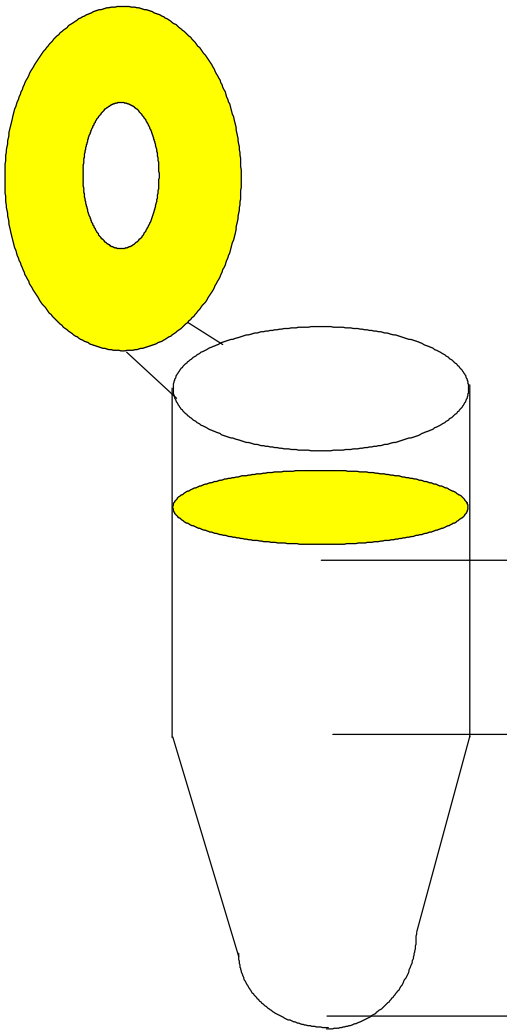
5.2. Hauptversuch

5.2.1. Entnahme Gefäßboden

Nach der Gewinnung des Filtrats wird der Eppendorf-Deckel entriegelt, um spätere Manipulationen zu vermeiden. Bei der anschließenden **30-minütigen** Lagerung im Thermoschrank kommt es auf den erschütterungsfreien senkrechten Stand des Gefäßes an. Ohne Turbulenzen oder gar aufsteigende Bläschen zu erzeugen, entnimmt man die Filtratmenge von 5 µl für die CASA-Analyse, 20 µl für die Partikelmessung sowie 5 µl für das Ausstrichpräparat des detailierten Spermiozytogramms strikt vom **Boden** des Eppendorf-Gefäßes.

5.2.2. Entnahme unterhalb Filtratspiegel

Zu Vergleichszwecken wird die entsprechende Menge **35 Minuten** nach Filtration unmittelbar unterhalb des Filtrat**spiegels** entnommen. Auch hierbei wird standardisiert gearbeitet.



Entnahmeort	im ... Versuch	Methoden	Meßzeitpunkt	Filtratdurch-mischung
unmittelbar unterhalb des Spiegels	Hauptversuch (2. Teil)	CASA; CASY	35 Minuten nach Filtration	nein
Mitte, an gedachter Linie der beginnenden Konuskrümmung	Vorversuch	CASA; CASY	sofort nach Filtration	ja
Boden	Hauptversuch (1. Teil)	CASA; CASY Spermiozytogramm Elektronen-mikroskopie	30 Minuten nach Filtration	nein

Abb. 2: Gegenüberstellung der Entnahmeorte und -bedingungen

6. Darstellung der Ergebnisse

6.1. Vorversuch

Nach schonender Durchmischung des Filtrats durch mehrmaliges Wenden des Gefäßes und Entnahme der für die Messung benötigten Materialmenge etwa aus der Gefäßmitte zeigt sich bei der computerassistierten Motilitätsanalyse, daß die Zelldichte im Filtrat, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der des Ausgangsejakulates entspricht. Bei einer Zunahme der Zahl motiler Spermien um 15 % und des Anteils nicht linear motiler Spermien um 20 %, nimmt die VCL der Gesamtheit der motilen Spermien leicht, die der nicht linear motilen Spermien jedoch drastisch ab. Mit einem gegenüber dem Ausgangsejakulat um 2/3 reduziertem Anteil linear motiler Spermatozoen auf 5,3 %, ergibt sich bei hoher Standard-abweichung nahezu eine Halbierung der VCL linear motiler Spermatozoen im Filtrat. Bei der Partikelmessung fällt eine Linksverschiebung des mittleren Durchmessers und des Maximums auf (siehe Tabelle 1).

Die Unterschiede sind für den Anteil immotiler und lokal motiler Spermien negativ signifikant, für den Anteil motiler Spermatozoen hingegen positiv signifikant. Betrachtet man die Populationen letztgenannter, findet sich für den Prozentsatz der nicht linear motilen Spermien eine deutlich positive, für den der linear motilen Spermien eine negative Signifikanz. Ebenfalls statistisch negativ signifikant vom nativen Ejakulat im Vergleich mit dem Filtrat sind die VCL linear motiler Spermatozoen und die CASY®- Meßergebnisse, ausschließlich des Maximums partikulärer Teilchenregistrierung.

Das Ergebnis entspricht sowohl im Hinblick auf die erwünschte Anreicherung von Spermien insgesamt, als auch bezüglich des Anteils motiler Spermatozoen und deren absolute Geschwindigkeit nicht der Zielstellung. Deshalb wurde der Versuch nach erfolgter Zwischenauswertung in dieser Form nicht fortgesetzt.

	N		*F*		Ranks *F* / *N*		
Merkmal	**MW**	**SD**	**MW**	**SD**	**Lt...Gt...Ties**	**2-tailed p=**	**H 1**
Konz Mio/ml	91,65	43,33	31,98	34,95	10- ; 0+	0,0051	-1
Immo %	47,8	22,58	37,2	21,64	7- ; 3+	0,0469	-1
LoMo %	8,1	4,43	3,7	3,4	9- ; 1+	0,0367	-1
Mo %	44,1	20,31	59,1	21,56	0- ; 10+	0,0051	1
Krs %	37	12,76	27,8	12,96	8- ; 2+	0,0745	0
NLMo %	47,8	12,42	66,9	12,84	1- ; 9+	0,0093	1
LMo %	15,2	9,24	5,3	7,61	8- ; 2+	0,0218	-1
VMo µm/s	61,9	13,92	59,5	15,29	6- ; 3+ ; 1=	0,4069	0
VKrs µm/s	53,2	8,81	52,4	14,43	6- ; 3+ ; 1=	0,6784	0
VNLMo µm/s	66,6	16,68	61	17,42	7- ; 3+	0,359	0
VLMo µm/s	64,6	19,19	33,7	38,68	7- ; 3+	0,0469	-1
C absolut	50181,9	10346,45	15327	7210,22	10- ; 0+	0,0051	-1
C/ml5 relativ	2,43	0,57	0,76	0,36	10- ; 0+	0,0051	-1
MDia µm	4,36	0,24	3,9	0,24	10- ; 0+	0,0051	-1
Max µm	2,84	0,56	2,61	0,34	3- ; 1+ ; 6=	0,2733	0

Tabelle 1: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der CASA- und CASY®-Meßergebnisse vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); statistische Aussage rechts mit Signifikanzen entsprechend Hauptaussage (H1); n = 10

6.2. Hauptversuch

6.2.1. Entnahme Gefäßboden

6.2.1.1. Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA)

30 min nach Filtration und Lagerung im Thermoschrank wurden im 1. Teil des Hauptversuches die Meßproben vom Gefäßboden entnommen. Bei dem 1. Merkmal, der Spermienkonzentration in Mio/ml, handelt es sich um einen Absolutwert, der zu 100 % gesetzt, sich in die Spermienkategorien: Immotile (Immo), lokal Motile (LoMo) und Motile (Mo) prozentual unterteilt. Die Letzteren wiederum lassen sich noch weiter spezifisieren in: Kreisläufer (Krs), nicht linear motile Spermien (NLMo) und die besondere Priorität besitzenden linaer motilen Spermatozoen (LMo). Da ein deutlicher Konzentrationssprung zu verzeichnen ist, erscheint es sinnvoll, reale Zahlenverhältnisse der Analyse zugrunde zu legen. In diesem Zusammenhang muß die Angleichung der gemessenen CASA-Spermienkonzentrationswerte an die „Klassische Zählung" erfolgen. Entsprechend dem WHO-Standard erfolgte die Bestimmung der nativen Spermienzahl pro ml unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Die klassische Methode der Auszählung in der Neubauer-Kammer liefert anerkanntermaßen nach wie vor die genauesten Werte. Die Darstellung des Nativ-Ergebnispaares beider Verfahren erfolgte in einem Plot im Format der statistischen Regression (6.2.1.6. Statistische Verfahren).

Anhand der Verteilung konnte der Anstieg (Slope) der resultierenden Geraden mit 1,72825 ermittelt werden. Damit ergibt sich die Gleichung: $y = 1{,}72825\ x$. x entspricht dabei den Werten der „Klassischen Zählung", y den CASA- Konzentrations-meßwerten. Nach Anpassung liegen folgende Verteilungs-verhältnisse vor (siehe Tabelle 2):

		N		F	
Merkmal		MW	SD	MW	SD
Konz	Mio/ml	27,45	13,97	69,56	43,21
Immo	%	54,53	15,77	11,66	7,96
LoMo	%	5,93	3	6,26	3,52
Mo	%	39,53	14,41	82,06	9,85
Krs	%	34,96	12,01	31,1	5,71
NLMo	%	57,66	12,43	56,46	7,7
LMo	%	7,36	7,47	12,43	8,38

Tabelle 2: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der CASA-Meßergebnisse in Korrelation mit der „Klassischen Zählung" vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); wiederspiegelt reale Zahlenverhältnisse; n=30

Ohne separaten Konzentrierungsschritt führt der entsprechend der Beobachtungen des Vorversuches modifizierte Ablauf der Glaswolle-Filtration zu einer Verdopplung der Spermatozoenzahl pro ml. An dieser Stelle muß noch einmal auf die vorgenommene Dilution von 400 µl verflüssigten nativen Ejakulats mit 800 µl temperatur-gleichen CASYton®'s hingewiesen werden. Hinter der aufgezeigten Verdopplung steckt also die potentiell stattgefundene Versechs-fachung! Das Ziel des Verdünnungsschrittes bestand in der für den Filtrationsprozeß essentiellen Herabsetzung der Viskosität des Seminalplasmas. Bei praktisch regelmäßig erzeugtem Spermiendichte-Anstieg um 100 %, bestand selbst bei oligozoospermen Ejakulaten keine Notwendigkeit, dem schonenden Filtrations- und Konzentrierungsverfahren einen weiteren Konzentrierungsvorgang anzuschließen, um die initiale Dilution aufzuheben.

Anhand der Graphik (siehe Abbildung 3) soll die Verteilung der Gesamtkonzentration von nativ 27,4 bzw. 69,5 Mio/ml nach Filtration auf die Spermatozoen-Fraktionen untersucht werden. Im Filtrat reduziert sich der Anteil immotiler Spermien von 54,5 % auf 11,7 %, was nur noch 1/5 des Ausgangswertes entspricht. Bei den lokal Motilen läßt sich mit einem Wert um die 6% ein Status quo verzeichnen.

Herausragend ist das Ergebnis im Bereich der gewünschten motilen Zellpopulation mit einer prozentualen Verdopplung. Wärend die Kreisläufer und nicht linear motilen Spermien als motile Untergruppen anteilig Ausgangsniveau beibehalten, erhöht sich die Zahl linear motiler Spermatozoen von 0,8 auf 7,1 Mio/ml um nahezu das 9-fache.

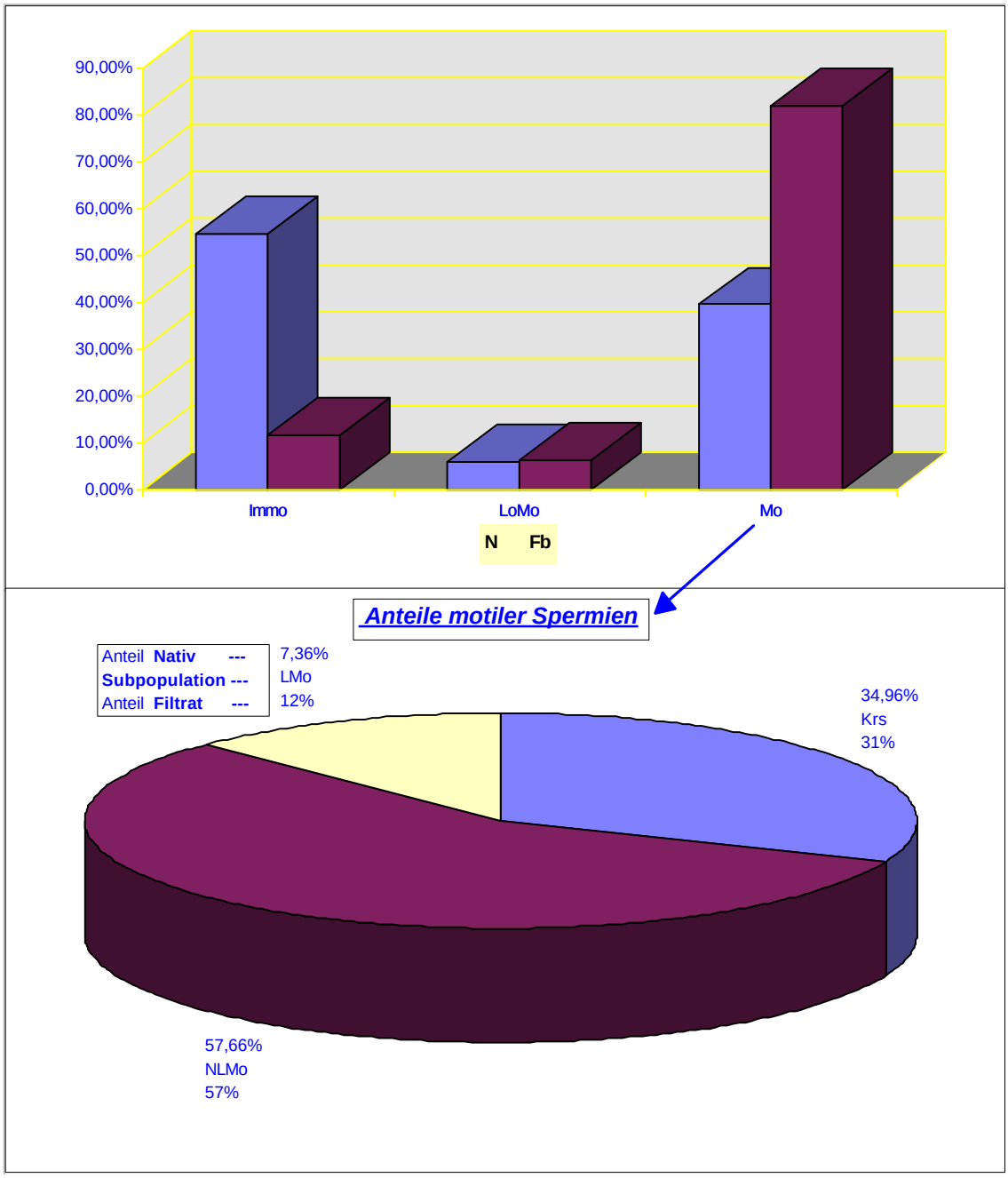


Abbildung 3: Graphische Darstellung der prozentualen Spermatozoen-Fraktionen; natives Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (Fb)

Daß sich am Boden des Eppendorf-Gefäßes, 30 min nach Filtration keine Fraktion niederer Qualität „ausruht”, soll die Auswertung der VCL (curvilinear-velocity) beweisen. Bei der CASA-Registrierung der Spurgeschwindigkeit in [µm/s] handelt es sich um Absolutwerte. Daher ist eine direkte Vergleichbarkeit zwischen nativem Ejakulat und Filtrat möglich.

Über alle motilen Spermatozoen wird eine mittlere VCL-Erhöhung von 10 µm/s verzeichnet. Diese Tendenz zeichnet sich auch spezifisch für die Kreisläufer und nicht linear motilen Spermien ab. Überraschend wiederum die linear motile Fraktion. Nicht genug, daß ihre Filtratkonzentration eine 9-fache Steigerung erfahren hat, weist diese Subpopulation mit 62 µm/s einen sehr hohen mittleren Spurgeschwindigkeitswert auf.

		N		*F*	
Merkmal		MW	SD	MW	SD
VMo	µm/s	49,26	10,77	61,1	9,01
VKrs	µm/s	42,16	8,52	54,9	7,97
VNLMo	µm/s	52,63	12,78	63,63	10,31
VLMo	µm/s	41,26	24,75	62,66	8,89

Tabelle 3: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der CASA-VCL-Werte vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); n = 30

6.2.1.2. Cell Counter+Analyser System (CASY®)

Welche Aussage liefern die CASY®-Messungen des nativen Ejakulats in Relation zum Glaswolle-Filtrat? Bedingt durch das genutzte Verfahren der Partikelmeßtechnick, dem „Widerstands-meßprinzip", werden neben Spermatozoen auch andere korpuskuläre Bestandteile im Seminalplasma (zelluläre und nichtzelluläre) quantitativ erfaßt. Die Filterleistung besteht nun gerade darin, sowohl diese korpuskulären Bestandteile als auch immotile Spermien im nativen Ejakulat zurückzuhalten. Mit Counts x 100000 pro ml werden demnach nativ neben der Spermienkonzentration oben genannte Bestandteile erfaßt. Post filtrationem sind diese als Ausdruck des Filtrationseffektes nicht mehr aufzufinden (siehe Abbildung 4).
Um von den mittels Cell Counter + Analyser System gewonnenen „Counts" (siehe Tabelle 4) eine reale Zahlenvorstellung zu bekommen, muß diesmal eine meßbedingte Dilution beachtet werden. Mit der Pipette wurde eine Meßprobe von 20 µl entnommen und in einen 10 ml (= 10000 µl) CASYton® enthaltenden Meßbecher pipettiert. Bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:500 ergeben somit 2,08 Counts x 100000 pro ml (C/ml5) im nativen Ejakulat eine „Teilchenzahl" von 104 Mio/ml und nach Fitration 1,28 C/ml5 eine Spermatozoenzahl von 64 Mio/ml. Dem zufälligen und systemischen Fehler Rechnung tragend, kann man bei einem CASA-Filtrationswert von 69,5 Mio/ml von einem übereinstimmenden Ergebnis beider Meßverfahren sprechen (siehe Abbildung 4).

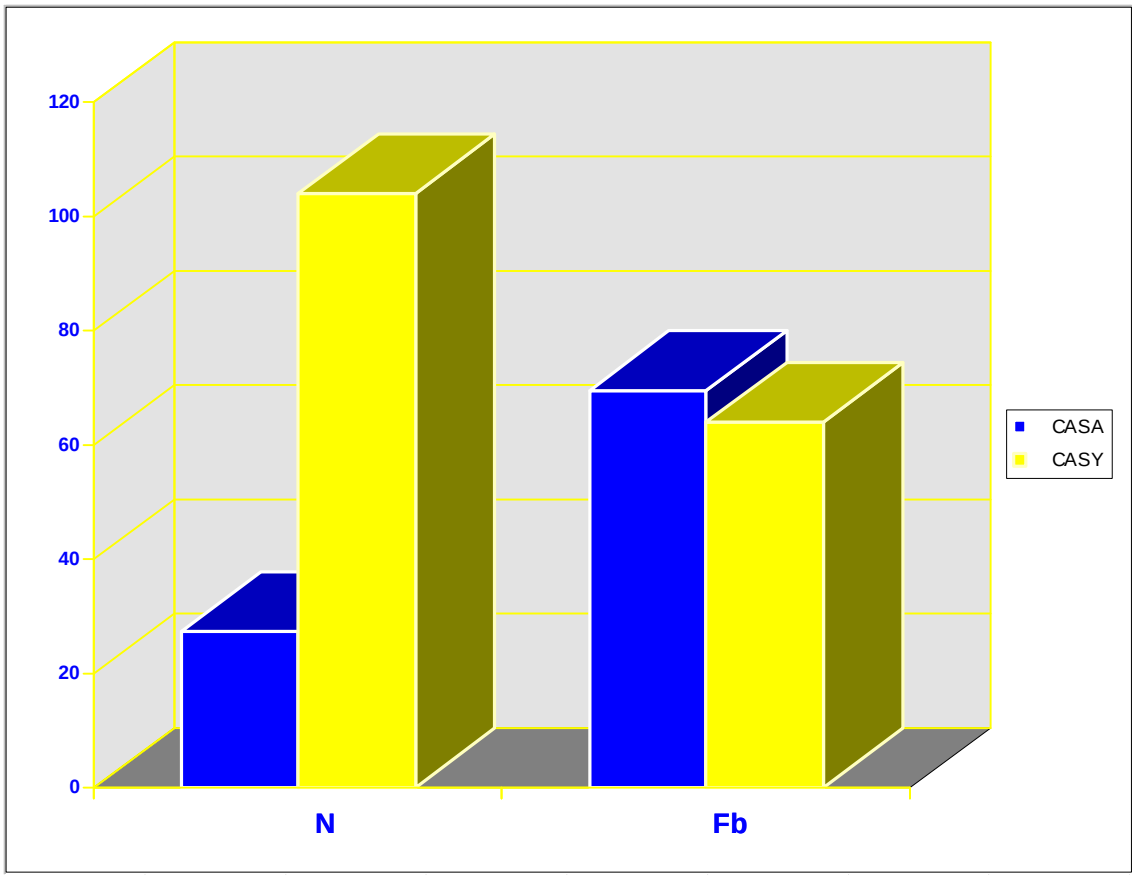


Abbildung 4: Spermatozoenkonzentrationswerte in Mio/ml beider apparativer Meßverfahren vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (Fb); n = 30

Die CASY®-Parameter -„Durchmesserhäufigkeit" (Max) und mittlerer Partikeldurchmesser (MDia)- zeigen die filtrationsbedingte Spermatozoen-Anreicherung. Innerhalb der Cursorgrenzen projiziert sich regelmäßig ein CASY-Graph in Form der Gaußschen Normalverteilungskurve, wobei Max dem Mittelwert µ der Gaußverteilung entspricht. Durch Elimination klein- und großpartikulärer Bestandteile nativen Ejakulates, erfaßt das der Zell- und Mikrobiologie entlehnte Analyse-System im Filtrat ein Maximum „partikulärer Teilchenregistrierung" von 3,47 µm. Bei gleichbleibendem mittleren Partikeldurchmesser von 4,3 µm selektiert sich somit eine Zellpopulation, deren Vertreter einen medianen Membrandurchmesser von 3,47 µm aufweisen (siehe Tabelle 4). Aus den CASA-Beobachtungen und -Meßwerten ergibt sich, daß es zulässig ist, „Partikel" dem Spermatozoon gleichzusetzen, womit die Ergebnisse der Zielstellung gerecht werden.

		N		*F*	
Merkmal		MW	SD	MW	SD
C	absolut	41787,26	12027,31	25623,2	8593,13
C/ml5	relativ	2,08	0,6	1,28	0,42
MDia	µm	4,31	0,2	4,35	0,18
Max	µm	2,52	0,05	3,47	0,43

Tabelle 4: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der CASY®-Meßergebnisse vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); n = 30

6.2.1.3. Morphologische Differenzierung

Als weiteres Kriterium zur Einschätzung des Filtrationseffektes erfolgte die Beurteilung der Spermatozoen-Morphologie. Entsprechend Punkt **3.5.** wurde ein detailliertes Spermiozytogramm nach Shorr-Färbung sowohl nativ, als auch nach Filtration erstellt und von Merkmal 1 (Mpd/1) bis 10 (Mpd/10) differenziert.
Unterschiede beider Meßreihen hinsichtlich geringer- und höher-gradiger Überstreckungsformen, Akrosomen-, Flagellum-, Mittelstück- und Schwanzdefekte sind dabei zufälligen Charakters, wie die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse zeigt (siehe Punkt 6.2.1.6.). Besonderes Augenmerk soll daher auf die im Filtrat signifikante Zunahme der Normalform (Mpd/1), sowie signifikante Abnahme von Kopfveränderungen (Makro- und Mikroköpfe; Mpd/9) und Vorstufen (Mpd/10) gelegt werden (siehe Tabelle 5).

Merkmal		N	F	H1
Mpd/1	%	13,33	19,16	sign. erhöht
Mpd/2	%	20,33	21,1	nicht sign.
Mpd/3	%	15,23	17	nicht sign.
Mpd/4	%	11,5	11,16	nicht sign.
Mpd/5	%	9	7,76	nicht sign.
Mpd/6	%	10,3	10,06	nicht sign.
Mpd/7	%	5,46	4,73	nicht sign.
Mpd/8	%	0	0	nicht sign.
Mpd/9	%	6,5	3,03	sign. erniedr.
Mpd/10	%	8,33	5,96	sign. erniedr.

Tabelle 5: Ergebnisse der detaillierten morphologischen Differenzierung vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); rechts statistische Signifikanz entsprechend Hauptaussage (H1); n = 30

Mit der Erhöhung des Anteils normomorpher Spermatozoen von nativ 13,3 % auf 19,1 % im Filtrat unter gleichzeitiger Abnahme kopfveränderter Spermien von 6,5 auf 3,0 % und Verringerung der Spermien-Vorstufen, entspricht das Ergebnis der Zielstellung (siehe Abbildung 5).

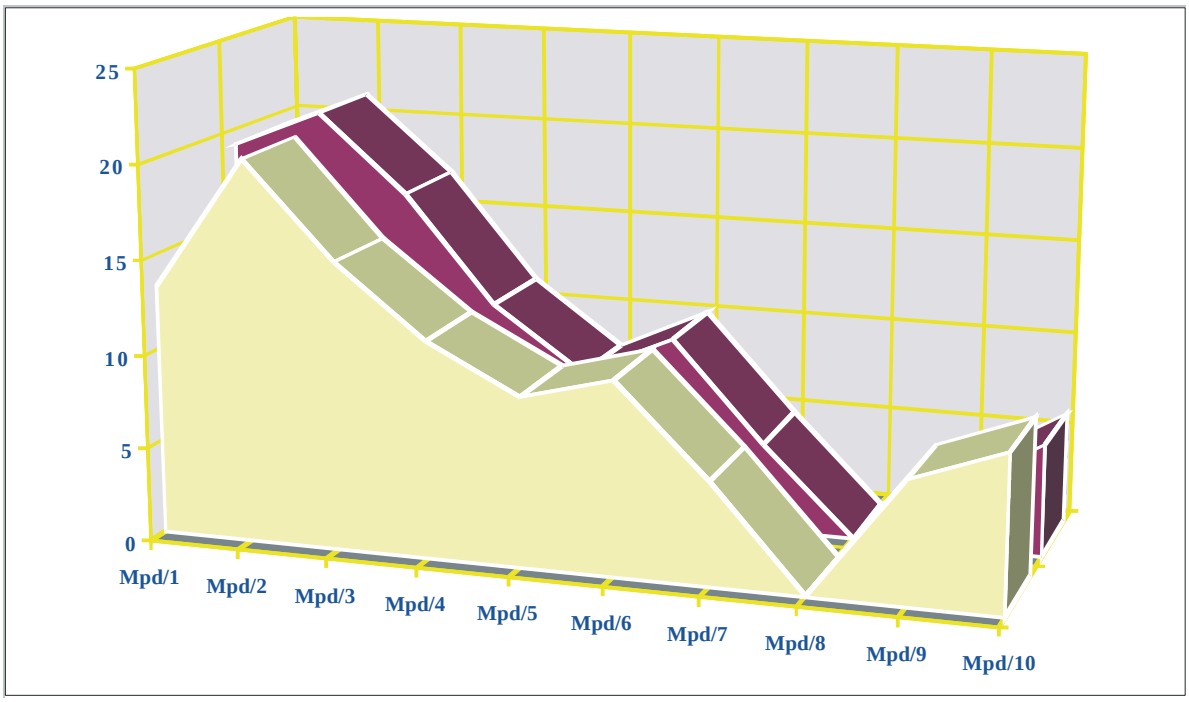


Abbildung 5: Graphische Darstellung der detaillierten morphologischen Differenzierung vom nativen Ejakulat (gelb) im Vergleich mit dem Filtrat (braun) in %; n = 30

6.2.1.4. Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse

Einführend muß festgehalten werden, daß die Interpretation der elektronen-mikroskopischen Aufnahmen nur hypothetischen, keinesfalls beweisenden Charakter haben kann. Betrachtet man den gesamten Filteraufbau als stabiles und weitgehend geschlossenes System, so führen die bisherigen Ergebnisse zu einer einfachen Gleichung. Dem „System", bestehend aus: Glaswolle-Filterelement, Eppendorf-Gefäß und Ejakulat-CASYton®-Gemisch, wird weder etwas hinzugefügt, noch etwas entzogen. Also gilt: Ejakulat-CASYton®-Gemisch = Filtrat + Filterablagerung. Die letztgenannte Variable der Gleichung entspricht dabei, in optischer Form der Wiedergabe, dem Inhalt der elektronen-mikroskopischen Aufnahmen. Durch Bildung der Differenz aus Nativ- und Filtrat-Messungen, einschließlich morphologischer Differenzierung, ergibt sich der Hinweis auf folgenden Filterinhalt post filtrationem:

- immotile Spermatozoen
- von der Normalform abweichende Samenzellen
- Spermien mit Makro- oder Mikroköpfen
- Frühformen.

Neben den aufgeführten Fraktionen, deren Wahrscheinlichkeit, der „Rückhaltefunktion" des Filters zu erliegen, erhöht ist, lagern sich weitere Ejakulat- und Seminalplasmabestandteile ab:

- Mukus
- polygonale Epithelialzellen aus dem Urethraltrakt
- weiße Blutzellen („Rundzellen"), vor allem neutrophile Leukozyten.

Alle korpuskulären Bestandteile, die einen größeren Durchmesser aufweisen als die Poorengröße des Filters zuläßt, werden selektiert (zurückgehalten). Die Beispiele raster-elektronen-mikroskopischer Aufnahmen gewähren einen optischen Einblick in diese „Welt" (siehe Anhang). Besonders eindrucksvoll stellen sich membrandefekte Spermatozoen und muköse Eiweißablagerungen entlang der Glaswollefasern dar.

6.2.1.5. Statistische Verfahren

Bezüglich der Abstimmung der mittels CASA registrierten Samenzellkonzentration auf die klassische Methode der Auszählung erschien es sinnvoll, sich eines Plots im Format der statistischen Regression zu bedienen. Dabei wurden die Nativ-Ergebnispaare beider Verfahren gegenübergestellt. Konsekutiv konnte anhand der Verteilung der Anstieg (Slope) der resultierenden Geraden mit 1,72825 ermittelt werden (siehe Abbildung 6). Der systematische Meßfehler des CASA-Systems fand somit Berücksichtigung. Mittels Anpassungsfaktor ergaben sich für weiterführende Betrachtungen reale Spermatozoen-dichteverhältnisse (siehe Punkt 6.2.1.1.).

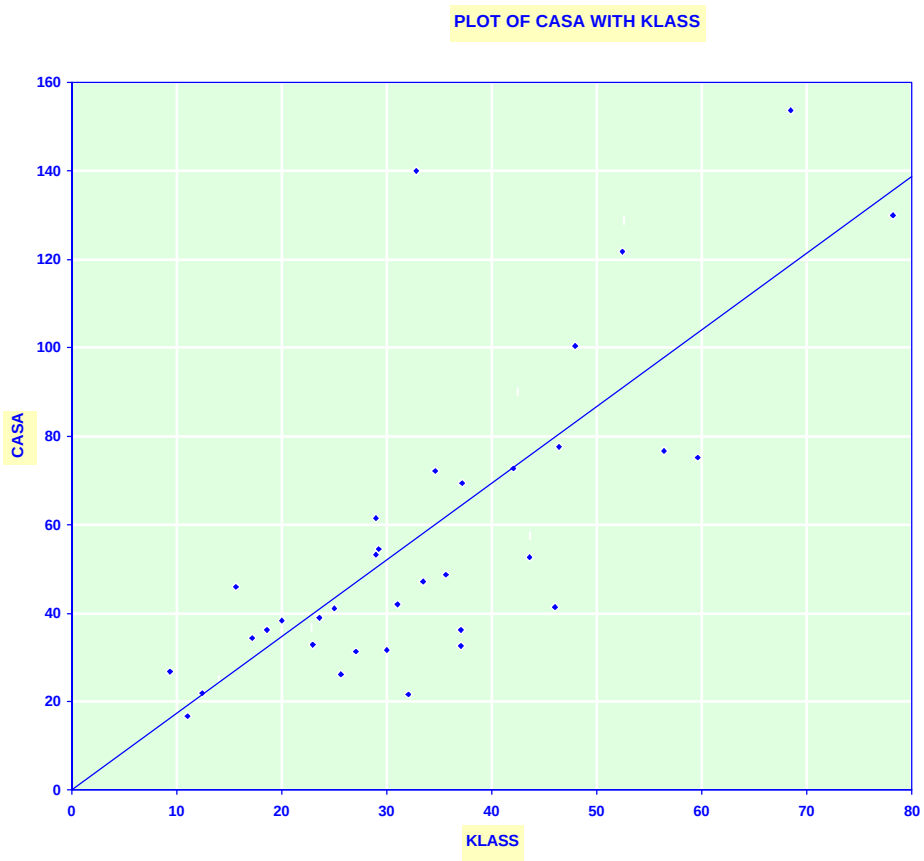


Abbildung 6: Plot im Format der statistischen Regression für die Nativ-Konzentrationswerte CASA/Klassische Zählung, einschließlich Vorversuch; n = 40

Ob die aufgetretenen Abweichungen zufälliger oder wesentlicher Natur sind, wird nachfolgend deren statistische Wertigkeit entscheiden (siehe Tabelle 6).

Im Kolmogorov-Smirnov-Test konnte für alle Merkmale sowohl nativ als auch nach Filtration Normalverteilung nachgewiesen werden. Damit war die Voraussetzung für die Anwendung des T-Test's nach Student erfüllt. Der Tafelwert der t-Verteilung für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von a = 5 % und f = n - 1 = 29 ist t = 2,05. Der Wert der Testgröße ist außer bei den lokal Motilen (LoMo), den nicht linear Motilen (LMo) und dem mittleren Spermiendurchmesser (MDia) größer als der Tafelwert. In diesem Falle muß die Nullhypothese, daß sich der Mittelwert einer normal verteilten Stichprobe (**F**) nur zufällig vom Mittelwert µ der normal verteilten Grundgesamtheit (**N**) unterscheidet, verworfen werden. Entsprechend wird für die Merkmale -Konzentration (Konz); Immotile (Immo); Motile (Mo); Kreisläufer (Krs); linear Motile (LMo); Spurgeschwindigkeit der Motilen (VMo), derKreisläufer (VKrs), der nicht linear Motilen (VNLMo) und der linear Motilen (VLMo); CASY®-Counts absolut (C); Counts pro ml (C/ml5) und Durchmesserhäufigkeit (Max)- die andere Möglichkeit des Entscheids, die Alternativhypothese, angenommen.

In Korrelation zur Richtung des signifikanten Unterschieds zwischen Nativ und nach Filtration, kann für den Hauptversuch die Hauptaussage H1 akzeptiert werden (letzte Spalte der Übersicht): Die Glaswolle-Filtration (Entnahme 30 min nach Filtration; Gefäßboden) führt zu einer Abnahme des Anteils immotiler Spermien bei adaequater Zunahme der motilen Fraktion, deren Spurgeschwindigkeit gesteigert ist.

	Kolmogorov-Smirnov		t-Test		
Merkmal	N	F	MW - F:N	2-tailed p=	H1
Konz	0,473...norm.	0,526...norm.	>	0	sign. erhöht
Immo	0,990...norm.	0,497...norm.	<	0	sign. erniedr.
LoMo	0,104...norm.	0,261...norm.	>	0,679	nicht sign.
Mo	0,874...norm.	0,728...norm.	>	0	sign. erhöht
Krs	0,991...norm.	0,862...norm.	<	0,04	sign. erniedr.
NLMo	0,781...norm.	0,744...norm.	<	0,578	nicht sign.
LMo	0,183...norm.	0,280...norm.	>	0,002	sign. erhöht
VMo	0,978...norm.	0,600...norm.	>	0	sign. erhöht
VKrs	0,998...norm.	0,944...norm.	>	0	sign. erhöht
VNLMo	0,977...norm.	0,900...norm.	>	0	sign. erhöht
VLMo	0,233...norm.	0,878...norm.	>	0	sign. erhöht
C	0,399...norm.	0,698...norm.	<	0	sign. erniedr.
C/ml5	0,400...norm.	0,700...norm.	<	0	sign. erniedr.
MDia	0,479...norm.	0,720...norm.	>	0,29	nicht sign.
Max	0 ...norm.	0,121...norm.	>	0	sign. erhöht

Tabelle 6: Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse des Hauptversuches; zunächst Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test; Student-t-Test zur Ermittlung des p-Wertes; abgeleitete Signifikanz entsprechend Hauptaussage (H1); n = 30

Die statistische Wertigkeit des Spermiozytogramms wurde unter Punkt 6.2.1.3. bereits angesprochen. An dieser Stelle sollen die zugrunde liegenden Berechnungen dargestellt werden (siehe Tabelle 7).

	Kolmogorov-Smirnov		t-Test		
Merkmal	N	F	MW - F:N	2-tailed p=	H1
Mpd/1	0,564...norm.	0,317...norm.	>	0	sign. erhöht
Mpd/2	0,913...norm.	0,967...norm.	>	0,538	nicht sign.
Mpd/3	0,774...norm.	0,959...norm.	>	0,081	nicht sign.
Mpd/4	0,851...norm.	0,779...norm.	<	0,763	nicht sign.
Mpd/5	0,904...norm.	0,292...norm.	<	0,103	nicht sign.
Mpd/6	0,766...norm.	0,621...norm.	<	0,777	nicht sign.
Mpd/7	0,343...norm.	0,181...norm.	<	0,257	nicht sign.
Mpd/8	0 ...n. norm.	0 ...n. norm.	=	no variance	nicht sign.
Mpd/9	0,578...norm.	0,044.n.norm.	<	0	sign. erniedr.
Mpd/10	0,661...norm.	0,098...norm.	<	0,002	sign. erniedr.

Tabelle 7: Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse des Hauptversuches; zunächst Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test; Student-t-Test zur Ermittlung des p-Wertes; abgeleitete Signifikanz entsprechend Hauptaussage (H1); n = 30

6.2.2. Entnahme unterhalb Filtratspiegel

Die Wahl dieses zweiten Entnahmeortes im Rahmen des Hauptversuches sollte zu Vergleichszwecken Aufschluß über die Filtratverhältnisse am „Gegenpol” des Eppendorf-Gefäßes geben. Es wird ersichtlich, daß 35 min nach Filtration (die Bodenmessungen waren zeitlich vorangestellt) unterhalb des Filtratspiegels im Mittel lediglich eine oligozoosperme Konzentration registrierbar ist. Wärend die übrigen Fraktionen weitestgehend anteilig Nativniveau erreichen, ist der Anteil linear motiler Spermatozoen an der Gesamtkonzentration von 3,7 Mio/ml von ursprünglich 7,4 % auf 2,5 % gravierend abgefallen. Nach Angleichung an die „Klassische Zählung” ist auch hier nur der rechnerische Verdünnungsausgleich für den Absolutwert -Konzentration- zulässig.
Daneben ragt noch ein zweites Ergebnis dieses 2. Teils des Hauptversuches heraus. Voraussetzung für erfolgreiche assistierte Reproduktion ist eine hohe Spurgeschwindigkeit (VCL) linear motiler Spermien. Von 41,3 auf 9,4 µm/s kommt es zu einer nicht tolerierbaren Abnahme auf ¼ der Ausgangsgeschwindigkeit (siehe Tabelle 8). Sowohl im Hinblick auf die erwünschte Anreicherung von Spermien insgesamt, als auch bezüglich des Anteils der linear motilen Spermatozoen und deren absolute Geschwindigkeit, entspricht das Ergebnis nicht der Zielstellung.

	N		F	
Merkmal	**MW**	**SD**	**MW**	**SD**
Konz Mio/ml	27,45	13,97	3,72	2,83
Immo %	54,53	15,77	60,46	14,92
LoMo %	5,93	3	3,86	5,7
Mo %	39,53	14,41	35,66	15,74
Krs %	34,96	12,01	22,56	24,46
NLMo %	57,66	12,43	68,23	30,05
LMo %	7,36	7,47	2,53	7,39
VMo µm/s	49,26	10,77	51,76	17,47
VKrs µm/s	42,16	8,52	30,66	26,49
VNLMo µm/s	52,63	12,78	52,43	21,33
VLMo µm/s	41,26	24,75	9,43	25,31
C absolut	41787,26	12027,31	7503,03	3108,7
C/ml5 relativ	2,08	0,6	0,37	0,15
MDia µm	4,31	0,2	3,69	0,16
Max µm	2,52	0,05	2,5	0,01

Tabelle 8: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der CASA- und CASY®-Meßergebnisse vom nativen Ejakulat (N) im Vergleich mit dem Filtrat (F); n = 30

Die Eindeutigkeit der Ergebnisse wird durch deren statistische Aufarbeitung dokumentiert (siehe Tabelle 9).

Um auf Normalverteilung zu prüfen, wurde der Kolmogorov- Smirnov-Test angewandt. Nur wenn das Merkmalspaar (**N**/**F**) diese Voraussetzung erfüllte, konnte der Student-T-Test, anderenfalls mußte der Wilcoxon-Test angeschlossen werden (siehe Spalte 3 und 4). Im Resultat beurteilt der t-Test das Verhältnis der Mittelwerte nach Filtration (**F**) zu Nativ (**N**), bezogen auf das jeweilige Merkmal. Hingegen wird durch den Wilcoxon-Test ersichtlich, in wieviel Fällen das Filtratergebnis kleiner (Lt: lower than), größer (Gt: greater than) oder gleich (Eq: equal) dem Nativwert ist. Für die beiden besonders stark differierenden Parameter, linear Motile (LMo) und deren Spurgeschwindigkeit (VLMo), zeichnet sich eine deutliche statistische Signifikanz ab. Die postulierte Hauptaussage (H1: Die Glaswolle-Filtration führt zu einer Abnahme des Anteils immotiler Spermien bei adequater Zunahme der motilen Fraktion, deren Spurgeschwindigkeit gesteigert ist.), muß für den 2. Teil des Hauptversuches abgelehnt werden.

	Kolmogorov-Smirnov		t-Test	Wilcoxon		
Merkmal	***N***	***F***	MW - F:N	***F/N*** LtGtEq	2-tailed p=	H1
Konz	0,473...norm.	0,037 n.norm		30- ;0+ ;0=	0	sign. erniedr.
Immo	0,990...norm.	0,874...norm.	>		0,048	sign. erhöht
LoMo	0,104...norm.	0,005 n.norm		23- ;6+ ;1=	0,0479	sign. erniedr.
Mo	0,874...norm.	0,928...norm.	<		0,204	nicht sign.
Krs	0,991...norm.	0,237...norm.	<		0,022	sign. erniedr.
NLMo	0,781...norm.	0,551...norm.	>		0,123	nicht sign.
LMo	0,183...norm.	0 ...n. norm.		22- ;2+ ;6=	0,0001	sign. erniedr.
VMo	0,978...norm.	0,239...norm.	>		0,348	nicht sign.
VKrs	0,998...norm.	0,058...norm.	<		0,017	sign. erniedr.
VNLMo	0,977...norm.	0,391...norm.	<		0,957	nicht sign.
VLMo	0,233...norm.	0 ...n. norm.		21- ;3+ ;6=	0,0001	sign. erniedr.
C	0,399...norm.	0,410...norm.	<		0	sign. erniedr.
C/ml5	0,400...norm.	0,411...norm.	<		0	sign. erniedr.
MDia	0,479...norm.	0,323...norm.	<		0	sign. erniedr.
Max	0 ...n. norm.	0 ...n. norm.		7- ;3+ ;20=	0,1536	nicht sign.

Tabelle 9: Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse des Hauptversuches (2. Teil); zunächst Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test; Student-t-Test zur Ermittlung des p-Wertes bzw. Wilcoxon-Test; abgeleitete Signifikanz entsprechend Hauptaussage (H1); n = 30

7. Diskussion der Ergebnisse

7.1. Geeigneter Filteraufbau

Mit der Tuberkulin-Spritze als Träger einer 15 mg Manville Glaswolle-Portion (Microfibre code 112), die auf eine Höhe von 6 mm verdichtet wird, steht ein brauchbarer, einfach herstellbarer Filter zur Verfügung. Für die Fließeigenschaften des mittels hydrostatischen Drucks passierenden Ejakulat-CASYton®-Gemisch's, sind die Spritzen-Abmaße von grundlegender Bedeutung. Die entscheidende Rolle spielt das Verhältnis zwischen Spritzen- und Konusansatzdurchmesser. Beim Gebrauch von Filterträgern, die von der Dimension der Tuberkulin-Spritze abweichen (der Konusansatz beträgt hier 50 % des Spritzendurchmessers), ist mit Turbulenzen und partieller Stase in der unteren Filterrandzone zu rechnen. Betroffen davon sind Spritzen, deren Konusansatz nicht zentriert ist und/oder nur einen Bruchteil des Gesamtdurchmessers aufweist. Vergleichbare Strömungsverhältnisse wie Turbulenzen, prästenotische Strömungsverlangsamung mit fortschreitender Ablagerung (Plaquebildung) finden sich pathophysiologisch im Bereich einer Gefäßstenose. Im Folgenden mußte im Rahmen der experimentellen Vorbereitung entschieden werden, welches Volumen die konstante Glaswollemasse von 15 mg im Filterträger einnehmen soll. Von hypothetischer Bedeutung waren dabei die beiden Extreme der Filterpräparation. Zu lockeres Beschicken der Tuberkulin-Spritze mit Glaswolle führt zum Durchlauf des zu filtrierenden Gemisches innerhalb weniger Sekunden ohne jeglichen Filtereffekt. Damit geht die eigentliche „Rückhaltefunktion" verloren. Auf der anderen Seite gestattet ein zu stark verdichtetes Filterelement keine Durchdringung. Hierbei wird der Filter seiner „Passagefunktion" nicht gerecht. Anhand der Meßgröße -Durchflußzeit- der beiden Medien, Casyton® und Seminalplasma, konnte gezeigt werden, daß die Glaswolle-Säulenhöhe von 6 mm einen kontinuierlichen

Filtrationsablauf garantiert, wobei ein guter Kompromiß zwischen „Rückhalte- und Passagefunktion” des Filters gefunden wurde.
Hinsichtlich der Glaswollepartikelausschwemmung stand zunächst nur die Minimierung des systematischen Fehlers im Mittelpunkt. Freiwerdende Glaswollepartikel gehen in die Bilanz als kleinkorpuskuläre Bestandteile ein. Durch siebenmalige CASYton®-Spülung von je 1 ml, konnte ein Plateau erniedrigter Partikel-ausschwemmung nachgewiesen werden, daß sich bereits nach dem 2. Durchlauf einstellte. Zunächst nur der experimentellen „Bereinigung” dienend, hat die Partikelreduktion weitreichendere Bedeutung. Im Rahmen der assistierten Reproduktion, steht am Ende der Ejakulat-Aufbereitungskette zum Beispiel die homologe Insemination. Für deren Erfolg ist eine Verminderung kleinkorpuskulärer Bestandteile als mögliche Induktoren entzündlicher Reaktion wünschenswert.

7.2. Vorversuch

Als erste Aufbereitungsmöglichkeit unter Anwendung genannter technologischer Vorleistungen, steht die Glaswolle-Filtration mit Probeentnahme gleich nach Filtration aus der Gefäßmitte zur Disposition. Anhand der Meßergebnisse wird ersichtlich, daß ein derartiges Verfahren keinen praktischen Wert hat. Bei der Betrachtung des ersten Merkmals -der mittels CASA gemessenen Spermienkonzentration in Mio/ml-, hatten sich die Erwartungen bestätigt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses wurde annähernd die gleiche Zelldichte wie vor Filtration erreicht. Genaueren Aufschluß über die Qualität des Filtrates, sollten die prozentualen Anteile der einzelnen Spermatozoen-Populationen liefern. Ein 15 %-iger Anstieg konnte bei den motilen Spermien verzeichnet werden, der mit einem Rückgang von 10 Prozent der immotilen und 5 Prozent der lokal motilen Samenzellen einhergeht. Die CASA-Filtrationsergebnisse hatten somit eine Entwicklung in die gewünschte Richtung genommen. Das besondere Augenmerk muß

allerdings auf jene Population gerichtet sein, dessen Ausbeute und zielgerichtete Beweglichkeit für den Erfolg einer homologen Insemination unabdingbar ist. An der um 2/3 reduzierten Dichte und einer Abnahme der Spurgeschwindigkeit von nativ 65 µm/s auf 34 µm/s wurde offensichtlich, daß das Filtrat hinsichtlich linear motiler Spermatozoen nicht den geforderten qualitativen Sprung verzeichnete. Im Gegenteil, es mußte kritisch festgehalten werden, daß die Glaswolle-Filtration entsprechend dem Prozedere des Vorversuchs an entscheidendem Punkt zu einer Regression führt. Die CASY®-Konzentrationswerte unterstreichen die CASA-Messungen. Erfolgt auch hier der rechnerische Ausgleich des Verdünnungs-verhältnisses, ergibt sich die gleiche Konzentration wie im nativen Ejakulat. Durch Homogenisierung und fehlende zeitliche Voraussetzungen, kann sich der im Hauptversuch genutzte gefäßformbedingte Konzentrierungseffekt hier nicht ausbilden. Ohne separaten Konzentrierungsschritt nicht brauchbar, war der Vorversuch für die Weiterentwicklung der Versuchsplanung unabdingbar. So wurde der zum Ende des Vorversuchs beobachteten fraglichen bodennahen Samenzellverdichtung in einer variierten Versuchsdurchführung (Hauptversuch) nachgegangen.

7.3. Hauptversuch

7.3.1. Entnahme Gefäßboden

7.3.1.1. Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA)

Nach Abschluß eines Vorversuches fiel vor dem Verwerfen des Filtrats eine wie Schneegestöber anmutende Verdichtung im Bereich der Konusspitze des mäßig durchscheinenden Eppendorf-Gefäßes auf. Es handelte sich um ein Ejakulat mit bereits nativ sehr hoher Spermatozoenzahl. Das Gefäß hatte nach Meßende ca. ½ Stunde gestanden. Probatorisch erfolgte die Probenentnahme vom Gefäßboden für eine CASA-Messung. Was sollte man vorfinden?

Überlegungen hinsichtlich zweier Gesetzmäßigkeiten prägten die Erwartungshaltung. **1)** Motile Spermatozoen ändern ihre Bewegungsrichtung an Grenzflächen, sind also in physiologischer Flüssigkeit stochastisch gleichverteilt. **2)** Avitale Spermien sinken zu Boden. Fazit: Am Boden müßte sich eine Fraktion niederer Qualität „abgelagert" haben.

Statt dessen fand sich in der mikroskopischen CASA-Übersichts-einstellung eine enorme Konzentrierung hochmotiler Spermatozoen. Das Filtrat wies einen Anteil von 15 % linear motiler Samenzellen mit einer Spurgeschwindigkeit von über 60 µm/s auf. Das Ergebnis überraschte, wurde jedoch mit Skepsis betrachtet. Die beiden noch ausstehenden Einzelversuche der Vorversuchsreihe waren daher nach Beendigung der Routine-Messungen von besonderem Interesse. Die Konzentrierung am Gefäßboden bestätigte sich.

Im daraus erwachsenen Hauptversuch wird ein Spermienselektions-verfahren aufgezeigt, daß quantitativ und qualitativ neue Maßstäbe setzt. 30 min nach Glaswolle-Filtration läßt sich am Gefäßboden des Filtrat-Auffanggefäßes eine Verdoppelung der Spermatozoen-ausgangskonzentration von 27,45 auf 69,56 Mio/ml bei gleichzeitiger Verringerung des immotilen auf 1/5 sowie Steigerung des motilen Samenzellanteils von nativ 39 % auf 82 % nach Filtration nachweisen. Gänzlich zerstreut werden die Vorstellung der stochastischen Gleichverteilung und die Annahme der Ablagerung einer minder qualitativen Fraktion. Ersterer widerspricht die „Unausgewogenheit" der Samenzellverteilung mit dem Negativ-ergebnis bei Entnahme unterhalb des Filtratspiegels einerseits und der bodennahen Spermienballung andererseits. Unter Spezifisierung obiger Merkmalswerte mit einer von nativ 0,8 auf 7,1 Mio/ml post filtrationem um nahezu das 9-fache gesteigerten Zahl linear motiler Spermien, die mit einer überproportionalen Zunahme der Curvilinear-Velocity um 20 µm/s aufwarten (VCL-Erhöhung um 10 µm/s über alle motilen Spermatozoen), ist auch die „Ablagerungstheorie" für konische Gefäße nicht länger haltbar.

7.3.1.2. Cell Counter+Analyser System (CASY®)

Nach den entsprechend des Hauptversuches veränderten Durchführungsbedingungen konnte erstmals vom Cell Counter + Analyser System ein Punktum maximum einer deutlich angereicherten Zell-Population gefunden werden. Die Verteilungskurve nativen Ejakulats fällt kontinuierlich von einer hohen Zahl kleiner „Partikel" zu größeren Partikeldurchmessern hin ab. Die Tatsache, daß der mittlere Partikeldurchmesser (MDia) sich filtrationsbedingt nicht ändert, beweist die gleichermaßen für klein- als auch großpartikuläre Ejakulat-Bestandteile wirkende „Rückhaltefunktion" des Glaswolle-Filters. Ergänzend belegt dies auch das detaillierte Spermiozytogramm, bei dem eine signifikante Abnahme makro- und mikrokopfveränderter Samenzellen registriert wird. Nach Filtration zeichnet sich somit eine Gauß'sche Normalverteilungskurve ab. Deren Median (= Maximum partikulärer Teilchenregistrierung) spiegelt die zelluläre Anreicherung wieder. In Korrelation mit den CASA-Parametern wird deutlich, daß sich eine Spermien-Population selektiert, die durch ein hochmotiles Spermatozoon mit einem Membrandurchmesser von 3,47 µm als typischer Vertreter repräsentiert wird.

7.3.1.3. Morphologische Differenzierung

Die Konzentrierung hochmotiler Spermatozoen als funktionaler Aspekt, bildet eine Einheit mit der Samenzell-Morphe. Um die Objektivität zu erhöhen, erfolgte die morphologische Einschätzung unter Anwendung der von Kruger et al. (1986) aufgestellten „strict criteria". Die Spermien-Morphologie ist als ein guter Indikator für die zu erwartende in vitro Fertilisations-Rate zu betrachten (Kaskar et al., 1993). Von daher kann das unter **6.2.1.3.** dargestellte Ergebnis der morphologischen Differenzierung, mit einer glaswolle-filtrationsbedingten Zunahme der Normalform von 13,3 auf 19,2 %, optimistisch stimmen.

7.3.1.4. Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteranalyse

Die hohe Filterselektionsleistung findet auch auf den raster-elektronen-mikroskopischen Aufnahmen ihren optischen Nieder-schlag. Im konkret vorliegenden Falle neigen von der Normomorphie, einem medianen Kopfdurchmesser von 3,47 µm abweichende oder gar membrandefekte Spermatozoen früher zur Glaswollefaseradhärenz. Physikalische Grundlage der somit zum Ausdruck kommenden „Filterleistung" sind, die der hydrostatischen „Passage" des gesamten Ejakulat-CASYton®-Gemisch's entgegenwirkende Adhäsionskräfte. Definiert als zwischenmolekulare Van-der-Waals-Kräfte, sorgen sie für Aneinanderhaften der Oberflächenschichten verschiedener Stoffe. Eigenbeweglichkeit motiler Samenzellen ist daher Grundvoraussetzung für deren Überwindung. Desweiteren ist dem Filter in Abhängigkeit von der Glaswolle-Fasergitter-Dichte eine rein mechanische Funktion eigen. Die gewonnenen raster-elektronen-mikroskopischen Schichtaufnahmen stellen die Wiederspiegelung der Gesetzmäßigkeiten dar.

7.3.1.5. Gefäßformeffekt

Welche Erklärung findet sich für die abgelaufene bodennahe Konzentrierung hochmotiler Spermatozoen? Bei dem erbrachten Nachweis einer 9-fachen Steigerung der Filtratkonzentration der linear motilen Fraktion und überproportionaler Zunahme ihrer Spurgeschwindigkeitswerte, drängte sich der Verdacht aktiver Leistung auf. Diesen Sachverhalt zu prüfen, war Aufgabe eines speziellen Versuchsaufbaues. Im Zentrum der Untersuchungen stand die Gefäßform.

1) Verfolgung der Spermienbewegungsbahnen

Das nur spärlich durchscheinende Eppendorf-Gefäß, für optische Analysen ungeeignet, wurde durch ein gläsernes Reaktionsgefäß mit nahezu identischer Konuskrümmung ersetzt (siehe Abbildung 7).

Ein Lichtmikroskop wurde derart aufgebaut, daß sein Strahlengang horizontal verlief. Indem man dem Ejakulat-CASYton®-Gemisch vor Filtration 2 Tropfen Eosin zusetzte, kontrastierten die Samenzellen im gleichmäßig angefärbten Filtrat. Ohne den senkrechten erschütterungsfreien Stand des Reagenzglases zu beeinträchtigen, war es bei 200-facher Vergrößerung möglich, durch Regulierung der Tiefenschärfe in den Schichten kontinuierlich zu „wandern". Neben dem Vorherrschen stochastischer Bewegungsbahnen, waren solche registrierbar, die bei spitzwinkeligem Wandauftreffwinkel, eine spitzwinkelige Richtungsänderung erfuhren. Im nicht konischen Teil des Reaktionsgefäßes hingegen, wo rechtwinkeliges Auftreffen wahrscheinlicher ist, waren an der Grenzfläche alternative Richtungswechsel zum Flüssigkeitsspiegel hin häufiger (siehe Abbildung 7; **rot** markierte Bewegungsbahn). Mit dem Fortschreiten der Zeit, noch vor dem Erreichen der ½ Stunde nach Filtration, war tendenziell Abwärtsbewegung häufiger zu registrieren, als Aufwärtsbewegung der Spermatozoen. Der sich konisch verjüngende untere Teil des Gefäßes gewann dabei zunehmend an Bedeutung. Jetzt hier spitzwinkelig auftreffende Spermien nahmen zunehmend regelmäßig einen spitzwinkeligen zum Boden gerichteten Richtungswechsel vor. Dabei imponierte die hohe Samenzelldichte am Gefäßboden wie ein „Schneegestöber".

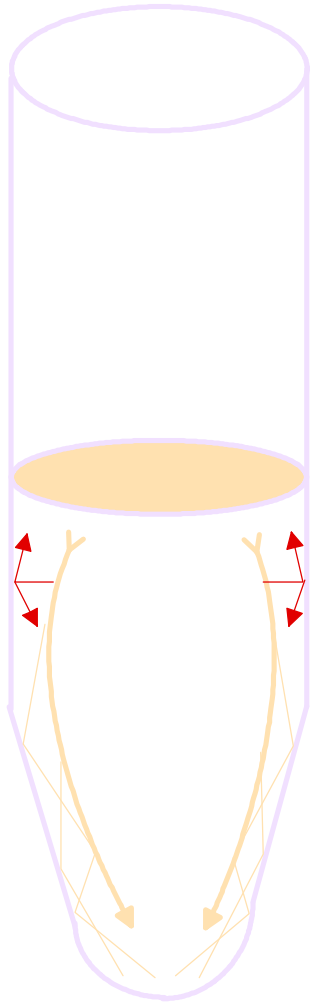


Abbildung 7: Konisches Reaktionsgefäß; Hauptstrom der Spermienbewegung (gelb)

2) „Parallelversuch”

Im letzten Abschnitt wurde die Hauptversuchsreihe um ein Element erweitert. Unter Gewährleistung weiteren standardisierten Vorgehens erfolgte mit dem selben Ausgangsejakulat parallel Filtration in ein herkömmliches Reagenzglas ohne Konusansatz. Bodenentnahmen nach 30 min konnten keinen Konzentrierungseffekt nachweisen. Spermienverteilung, Spurgeschwindigkeit und CASY®-Meßkanal der höchsten Samenzelldichte bei bestimmtem Membrandurchmesser (Max) ergaben Meßwerte, die dem Vorversuch (Entnahme Mitte, nach Filtration und Durchmischung) glichen. Lichtmikroskopisch konnten neben stochastischen, keine gerichteten Spermozoen-Bahnverläufe beobachtet werden.

3) „Schichtenversuch”

Aus den angestellten Beobachtungen erwuchs eine Frage ganz praktischer Bedeutung: „Wie hoch reicht der Spermatozoen-Konzentrationspool?” -oder anders formuliert- „Welche hochqualitative Filtratmenge ist verfügbar?”

Diese Überlegung war Ausgangspunkt für den „Schichtenversuch”. Das standardisierte Vorgehen entsprach dem des Hauptversuches. Bei einer Filtratmenge von circa 1100 µl (800 µl CASYton® + 400 µl durchmischtes Ejakulat - Filterrückstand) wurde nach 30 min vom Gefäßboden 100 µl-weise abpipettiert. Mit abfallender Spermienkonzentration ergab sich „Schicht” 1 bis 10, die der CASA-Konzentrationsmessung zugeführt wurden (siehe Tabelle 10).

Das native Ejakulat wies in drei Meßreihen nach Anpassung an die „Klassische Zählung” eine mittlere Spermatozoenkonzentration von 35,6 Mio/ml auf. Bei kontinuierlichem Spermatozoenabfall vom Gefäßboden in Richtung Filtratspiegel, ähnlich einer Titrationsreihe, konnte gezeigt werden, daß noch in der **5**. „Schicht” ein Mittelwert von 19,7 Mio/ml am Boden des Eppendorf-Gefäßes nachweisbar ist. Der Gefäßformeffekt der Spermienkonzentrierung wurde auch nach Pipettieren in jeder „Schicht” erneut wiksam. Somit stehen **500** µl hochqualitative Filtratmenge zur Verfügung.

In Abhängigkeit von der weiteren Nutzung (z. Bsp. homologe Insemination) und geforderter seminalplasmafreier Spermiensuspension, kann das gesamte Filtrat auch einem Zentrifugationsschritt unterzogen werden. Nach Dilution und Filtration beträgt der Seminalplasma-Anteil allerdings maximal 20 %. Eine Zentrifugation nach erfolgter Filtration ist als unproblematisch anzusehen, da das Filtrat kaum noch Leukozyten und defekte Spermatozoen enthält, die ja in erster Linie als Produzenten von freien Radikalen in Betracht kommen.

Schicht	Konz Mio/ml
1	90,4
2	42,7
3	28,7
4	24,7
5	19,7
6	11,2
7	4,1
10	3,7

Tabelle 10: Mittelwerte der CASA-Konzentrationswerte bei schichtweiser Entnahme von je 100 µl nach Filtration vom Gefäßboden; n = 3

Was nutzt ein effizientes Spermienselektionsverfahren ohne ausreichende Konzentrierung. Die Chronik der Glaswolle-Filtration reicht von Jeyendran et al. (1986) über Van der Ven et al. (1988) bis Rhemrev et al. (1989). Kontinuierlich wurde das Verfahren hinsichtlich des Filteraufbaues modifiziert. Den Versuchsabläufen gemein war dabei stets eine der Filtration vorangestellte Zentrifugation diluierten nativen Ejakulates. Anschließend erfolgte die **sanfte** Beschickung der Glaswolle-Filteroberfläche. Im Laufe der Vervollkommnung der Glaswolle-Filtration zu einem hocheffizienten Spermienpräparationsverfahren blieb jedoch die Zentrifugation stets essentieller Konzentrierungsschritt.

Aitken und Clarkson (1988 und 1989) zeigten, wie Zentrifugation unselektierter Spermienpopulationen nativen Ejakulats ursächlich für die Produktion von Hyperoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalen ist. Deren Übergang innerhalb der zellkompaktierten Pellets auf „intakte" Samenzellen, verursacht irreversible Schäden. Die besonders in oligozoospermen Ejakulaten von Spermatozoen selbst, als auch von Makrophagen und Neutrophilen freigesetzten reaktiven Sauerstoffradikale, führen durch ihr außerordentliches Schädigungspotential nachweislich zu einer Beeinträchtigung der Fertilisierungsfähigkeit. Aufgrund gleichen Schädigungsmechanismus', forderte Mortimer (1991) die Einstellung multipler Wasch-Schritte vor der Separation der motilen Population. Trotz einhelliger Meinung, daß Zentrifugation zu iatrogener Spermienmembran-schädigung führt -im Extremfall kann das bei einem Mann mit von vornherein verminderter Samenqualität eine Fertilisierung verhindern-, konnte mangels anderer Möglichkeiten der Konzentrierung bislang nicht auf diese verzichtet werden.

Damit wird die Tragweite des hier gefundenen gefäßformbedingten Konzentrierungseffektes deutlich. Während es sich bei Zentrifugation um von außen einwirkende Fliehkraft handelt, ist die an konischer Grenzfläche induzierte „Mechanotaxis" eine aktive gerichtete Leistung des Lebens.

Bei bislang gefundenen nicht zufälligen Unterschieden in Spermatozoenkonzentration, Spurgeschwindigkeit, Membrandurchmesser und Morphe erscheint die Vorabäußerung, es könne sich nur um passives zu Boden sinken qualitativ minderwertiger Spermien handeln, nicht realistisch.
In Anbetracht der Spermatozoenaszension im weiblichen Genitaltrakt als komplexen Vorgang, sind Erklärungsmuster nicht immer schlüssig. Schumacher (1987) schreibt von „Druckwirkung fördert den Eintritt der Spermatozoen in die Tuben" und „bemerkenswerter Fähigkeit der Tube". Anatomisch-physiologisch passiert das Spermium die als „Durchgangsstraße" fungierende Cavitas uteri. Der weitere Weg führt des Spermatozoon in Richtung eines sich verjüngenden Lumens, dem Ostium uterinum tubae, weiter durch den Isthmus tubae, der mit einem Durchmesser von 2-3 mm engsten Stelle des Eileiters. Sich unmittelbar anschließend, folgt der Ort der Befruchtung, die Ampulle. Neben physikalisch-chemischer Eigenschaften des Zervikalsekrets und hormoneller Steuerung im Sinne einer Chemotaxis, findet sich auch hier ein Anhalt für eine mechanische Komponente, welche die gerichtete Spermienmotilität anregt.

7.3.2. Entnahme unterhalb Filtratspiegel

Durch die Wahl dieses zweiten Entnahmeortes sollten zu Vergleichszwecken die Verhältnisse am „Gegenpol" des Eppendorf-Gefäßes untersucht werden. Die unterhalb des Filtratspiegels registrierten Ergebnisse demonstrieren, daß sich dort im Gegensatz zum „Konzentrationspol" Gefäßboden keine hochmotilen Spermatozoen befinden. Der Filtrat-„Überstand" hingegen ist mit einer Spermatozoenkonzentration nach Angleichung an die „Klassische Zählung" von 3,7 Mio/ml und einer drastischen Spurgeschwindigkeitsabnahme linear motiler Samenzellen auf ¼ des Nativwertes für assistierte Reproduktion nicht verwertbar.

8. Zusammenfassung

Mittels Glaswolle (Microfibre code 112) in einer speziellen Filtrations-Anordnung steht ein effektives Spermienpräparations-verfahren zur Verfügung. Durch Ausnutzung eines gefäßform-induzierten Konzentrierungseffektes kann auf samenzellschädigende Zentrifugation zur Spermatozoen-Anreicherung verzichtet werden. Folgend aufgeführte Ergebnisse sind Mittelwerte aus 30 Messungen. Die Computer-Assistierte Spermienmotilitäts-Analyse (CASA) zeigt eine gegenüber dem nativen Ejakulat signifikante Erhöhung der Spermienkonzentration im Filtrat (27,45 vs. 69,56 Mio/ml). Das Verteilungsverhältnis der Samenzell-Populationen nach Glaswolle-Filtration bietet gute Voraussetzungen für assistierte Reproduktion. Unter Abnahme des immotilen Anteils auf 1/5 (54,53 vs. 11,66 %), erhöht sich konsekutiv der motile Spermien-Anteil (39,53 vs. 82,06 %). In der weiteren Spezifisierung motiler Spermatozoen, kann eine Verschiebung zugunsten linear motiler Spermien registriert werden. Während die Verringerung der nicht linear motilen Subpopulation nur zufälligen Charakters ist, weist der Kreisläuferanteil post filtrationem einen signifikanten Rückgang auf (34,96 vs. 31,1 %). Der Zuwachs linear motiler Samenzellen ist jedoch von besonderem Interesse (7,36 vs. 12,43 %). Bei Zugrundelegung von Absolut-zahlenwerten, läßt sich (auch für oligozoosperme Ejakulate) ein nahezu 9-facher Anstieg linear motiler Spermatozoen von nativ 0,8 auf 7,1 Mio/ml nach Filtration demonstrieren. Ihre Spurgeschwindigkeit (curvilinear velocity-VCL) nimmt dabei überproportional zu (41,26 vs. 62,66 µm/s), während sich über alle motilen Spermien im Mittel nur eine filtrationsbedingte VCL-Erhöhung von 10 µm/s abzeichnet. Weiterhin kam ein Cell Counter + Analyser System (CASY®) zum Einsatz, das ein Verfahren der Partikelmeßtechnik nutzt. So gelang der Nachweis, daß die Glaswolle-Filtration unter Reduktion klein- und großkorpuskulärer Bestandteile (zelluläre und nichtzelluläre) eine deutliche Anreicherung einer Samenzell-Population mit medianen

Membrandurchmesser von 3,47 µm bewirkt. Die Ergebnisse der morphologischen Differenzierung (strict criteria) stehen damit im Einklang. Nach Filtration konnte eine signifikante Zunahme der Normalform (13,33 vs. 19,16 %) bei adäquater Verminderung von Makro- und Mikroköpfen (6,5 vs. 3,03 %) sowie Vorstufen (8,33 vs. 5,96 %) registriert werden.

Auf den raster-elektronen-mikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, wie besonders membrandefekte Spermatozoen und muköses Eiweiß der Glaswolle-Faseroberfläche verhaften.

Raster-Elektronen-Mikroskopische Filteraufnahmen und kompletter CASA-, CASY®-Meßzyklus im Anhang.

Literaturverzeichnis

Aitken RJ, Clarkson JS: Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. Int J Androl 9:367-376, 1988.

Aitken RJ et al.: Analysis of the Relationship Between Defective Sperm Function and the Generation of Reactive Oxygen Species in Cases of Oligozoospermia. Int J Androl 10:214-220, 1989.

Alper MM et al.: The relationship of semen parameters to fertilization in patients participating in a Programm of in vitro fertilization. J In Vitro Fertil Embryo Transfer 2: 217-223, 1985.

Arcidiacono A et al.: The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa. Int J Androl 6:433-445, 1983.

Berger T, Marrs RP, Moyer DL: Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. Fertil Steril 43:268-273, 1985.

Chan SYW, Chan YM, Tucker MJ: Comparison of characteristics of human spermatozoa selected by the multiple-tube swim-up and simple discontinuous Percoll gradient centrifugation. Andrologia 23:213-218, 1991.

Coetzee K et al.: Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. Andrologia 26:33-34, 1994.

Dravland JE, Mortimer D: A simple discontinuous Percoll gradient procedure for washing human spermatozoa. IRCS Med Sci 13:16-17, 1985.

Engel S, Petzoldt R: Über die Beziehungen zwischen Spermiendichte und Spermienmotilität im Ejakulat andrologischer Patienten. II. Magdeburger Symposium „Die kinderlose Ehe”. Abstracts 272-275, 1984.

Forster MS et al.: Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. Fertil Steril 40:655-660, 1983.

Gorus FK, Pipeleers DG: A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to the progressive motility. Fertil Steril 35:662, 1981.

Günther E.: Andrologie Report, Mitteilungen der Sektion Andrologie der Gesellschaft für Dermatologie der DDR, Jena, 1983.

Ishii N, Mitsukawa S, Shirai M: Sperm motile efficiency. Andrologia 9:55-62, 1977.

Jeyendran RS, Perez-Pelaez M, Crabo BG: Concentration of Viable Spermatozoa for Artificial Insemination. Fertil Steril 45:132-134, 1986.

Kaskar K et al.: The relationship between morphology, motility and zona pellucida binding potential of human spermatozoa. Andrologia 26:1-4, 1993.

Kruger TF et al.: Sperm morphologic features as a prognostic factor in IVF. Fertil Steril 46:118-123, 1986.

Lopata A et al.: A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil Steril 27:677-684, 1976.

Mahadevan MM et al.: Successful use of in vitro fertilization for patients with persisting low-quality semen. Ann NY Acad Sci 422:293-300, 1985.

Mc Dowell JS: Preparation of semen for in vitro fertilization. Infertility 6:149, 1983.

Mortimer D: Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. Hum Reprod 6:173-176, 1991.

Ohashi K et al.: Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep* semen filtration column. Fertil Steril 57:866-870, 1992.

Ord T et al.: Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. Hum Reprod 5:987-989, 1990.

Paulson JD, Polakoski KL: A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. Fertil Steril 28:178-182, 1977.

Reddy JM, Stark RA, Zaneveld LJD: A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. J Reprod Fertil 57:437-446, 1979.

Rhemrev J et al.: Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. Fertil Steril 51:685-690, 1989.

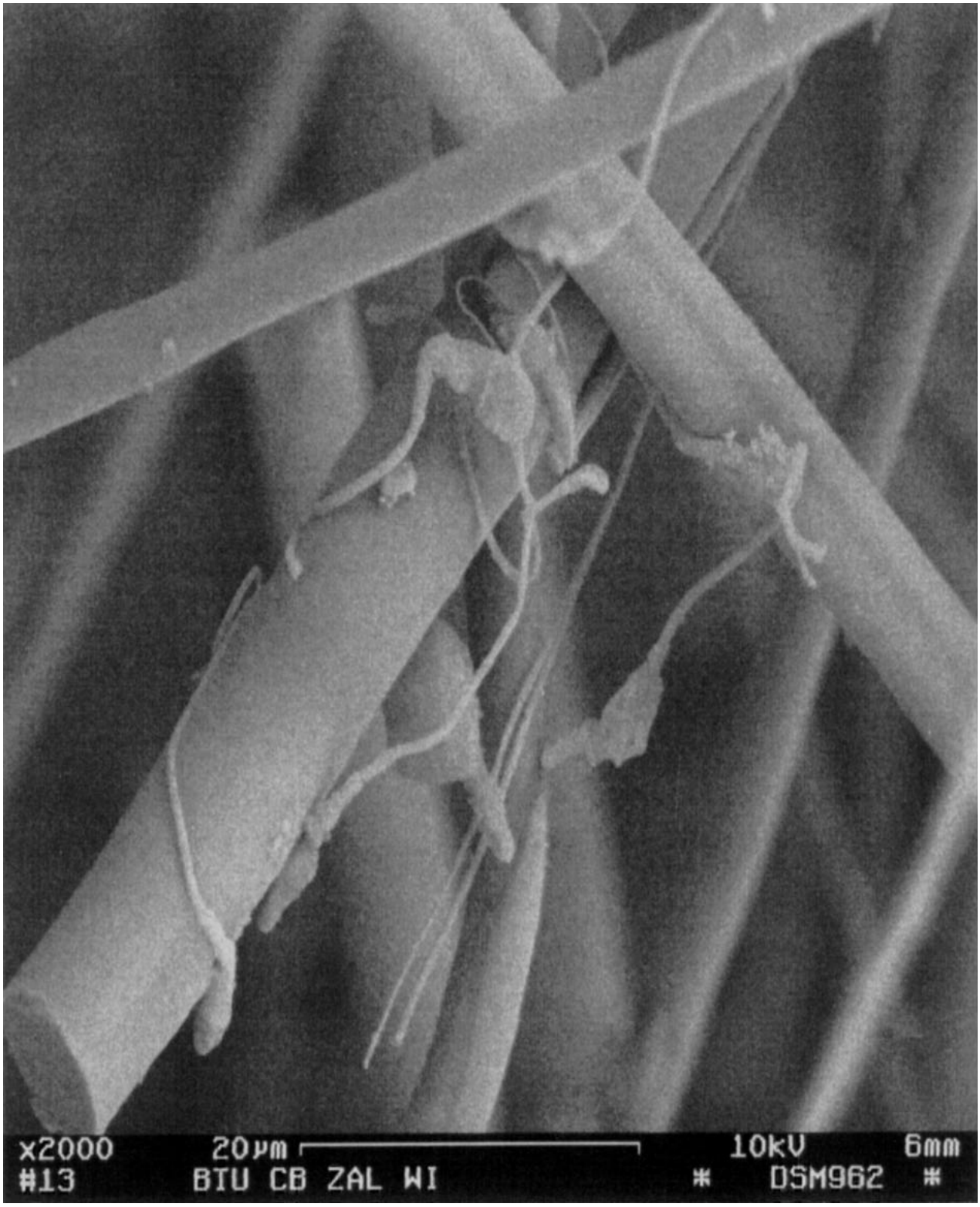
Schumacher GH: Embryonale Entwicklung des Menschen. Verlag Volk und Gesundheit Berlin 9:47-48, 1988.

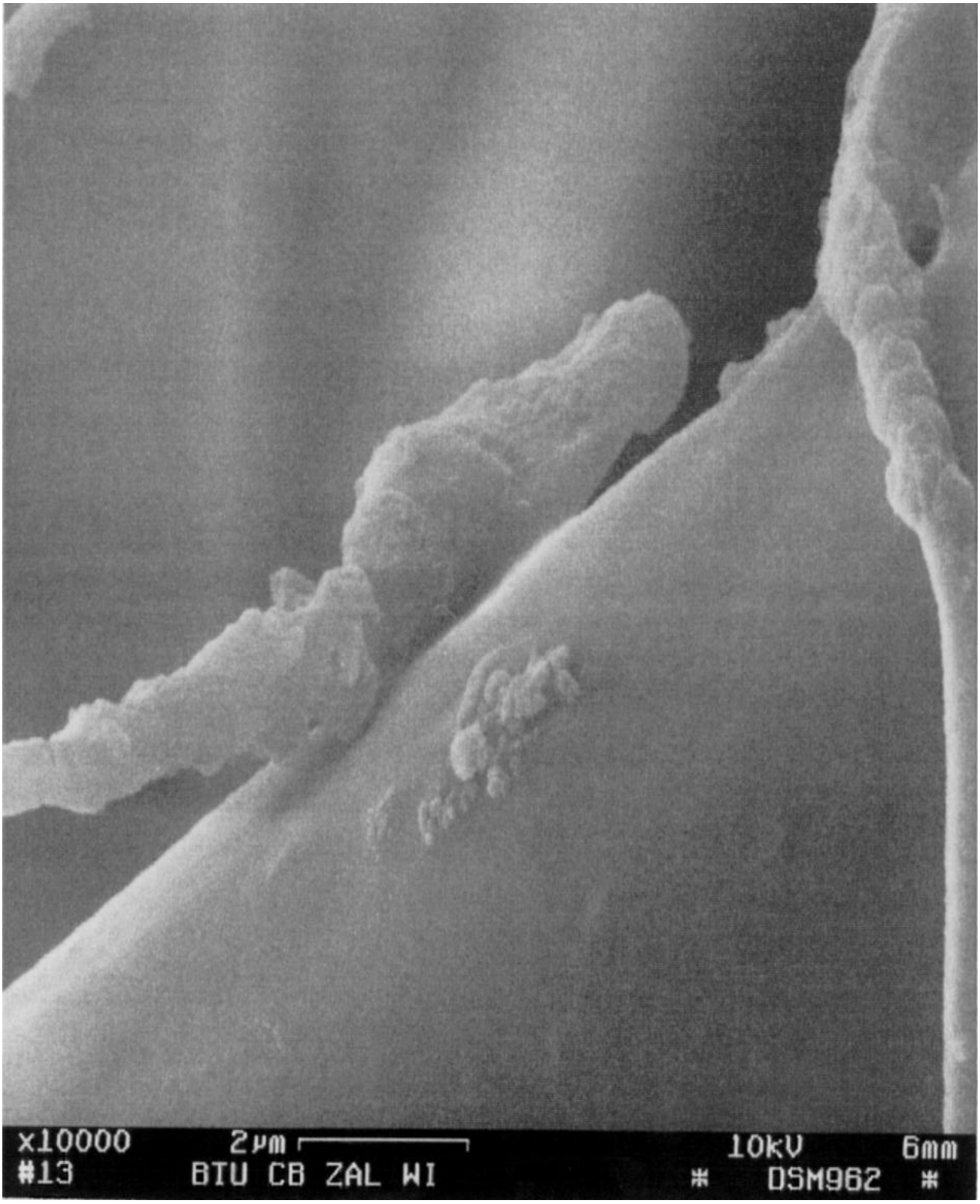
Sun LS et al.: Comparison of techniques for the selection of bacteria-free sperm preparations. Fertil Steril 48:659-663, 1987.

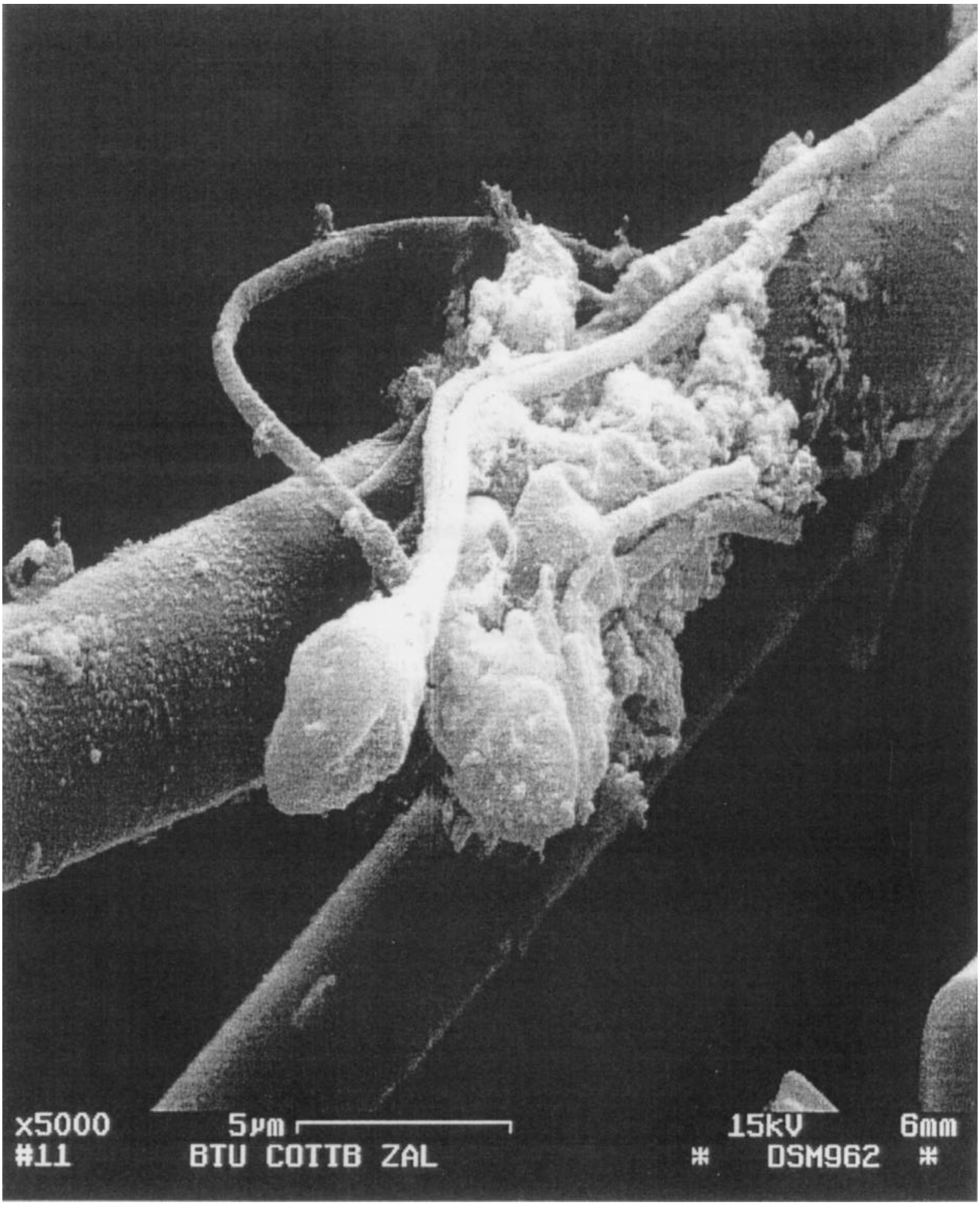
Tanphaichitr et al.: An increase in in vitro fertilization ability of low-density humansperm capacitated by multiple-tube swim-up. Fertil Steril 48:821-827, 1987.

Van der Ven HH et al.: Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. Hum Reprod 3:85-88, 1988.

World Health Organization: WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993.


x2000
20µm
10kV
6mm
#13
BTU CB ZAL WI
DSM962


x10000
2μm
10kV
6mm
#13
BTU CB ZAL WI
DSM962


x5000
5µm
15kV
6mm
#11
BTU COTTB ZAL
DSM962

Andrologisches Labor der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik

Schumannstr. 20 / 21, 10117 Berlin
Tel.: (030) 2802 2297

Name.....
Geb. Dat..... 27. 04. 59
ID-Nummer..... AO 3197
Untersuchung.... 1
Datum..... Tue Feb 27 10:01:23 1996

Untersucher..... W

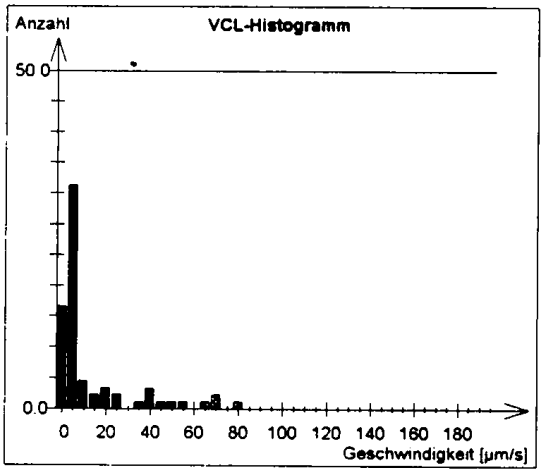
Motilitätsuntersuchung

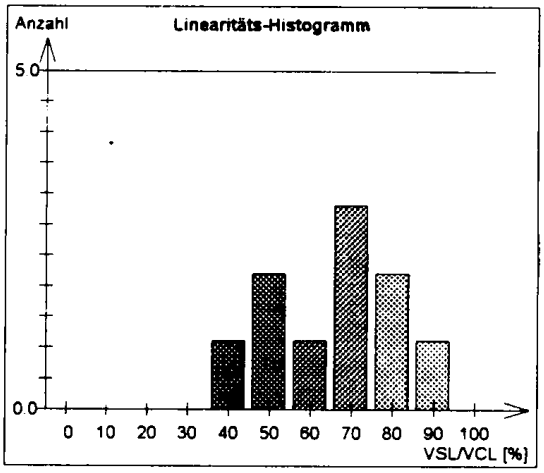
	Anz.	Proz %	Konz. mio/ml		VSL µm/s	VAP µm/s	VCL µm/s
Alle Spermatozoen.....	70		26.1	26.1			
»Immotile Spermatozoen..	55	79	20.5	20.5			
»Lok. mot. Spermatozoen.	1	1	0.3	0.3			
»Motile Spermatozoen....	14	20	5.2	5.2	23	35	49
» Kreisläufer.....	4	29	1.4	1.4	14	28	39
» Nichtlinear motil.	9	64	3.3	3.3	28	40	56
» Linear motil.....	1	7	0.3	0.3	20	21	21

gemessen « » unverdünnt

Untersuchungsparameter

Felder..... 6 Kammertiefe.. 10 µm
Temperatur..... 37 °C Verdünnung 1/ 1.0
Geschwindigkeitsgrenze immotil..... 10 µm/sec
Geschwindigkeitsgrenze lokal motil..... 15 µm/sec
Linearitätsgrenze..... 90 %
Maximaler Radius für Kreisläufer..... 10 µm

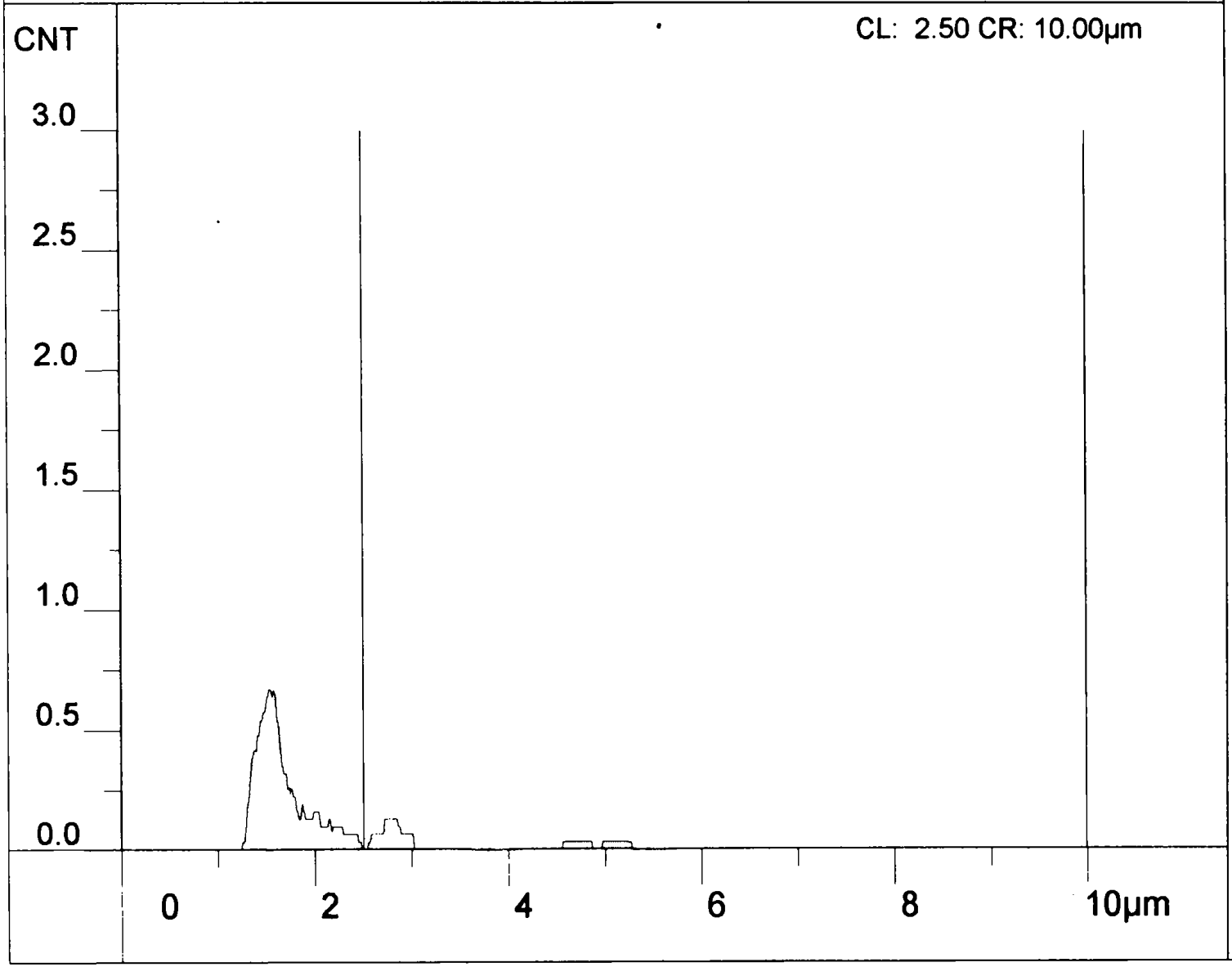




Kommentar: Nativ

Datum :27.02.1996

Date 2/27/1996 File



CASY® 1 - Measure
Calibration 0- 10 µm

Capillary 60 µm
Cal File K000_010.060

Volume 1 x 200 µl
Dilution 1

Counts 6
Counts/ml 30.00

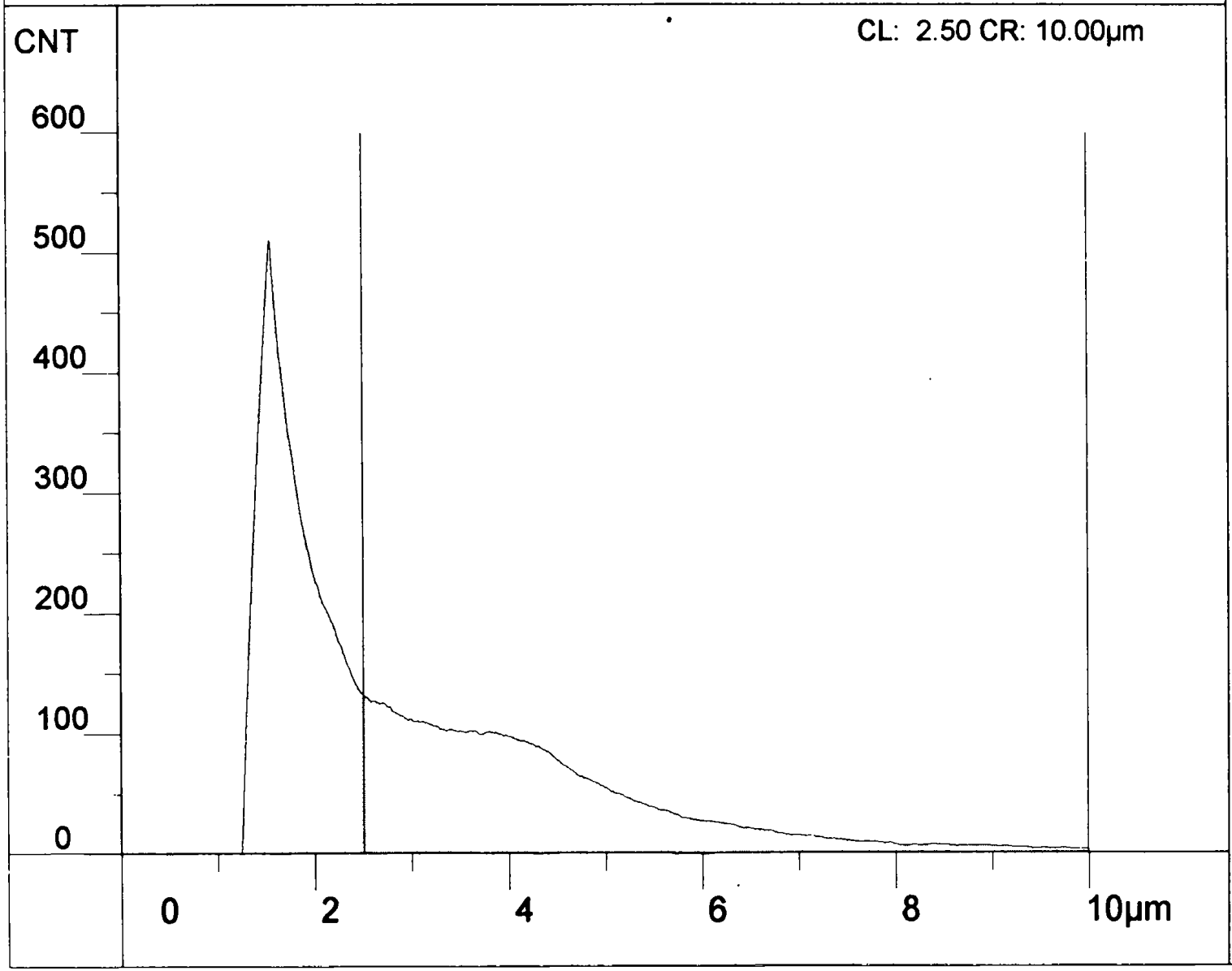
TotVol/ml 853.8 fl
Mean Vol 28.46 fl
Mean Dia 3.49 µm

Maximum 2.50 µm
Volume 8.229 fl

Smoothing 31
Above 10µm 0

Date 2/27/1996 File c:\weber\weber.616

Nativ



CASY® 1 - Measure
Calibration 0- 10 µm

Capillary 60 µm
Cal File K000_010.060

Volume 1 x 200 µl
Dilution 1

Counts 33052
Counts/ml 1.653E+05

TotVol/ml 9.879E+06 fl
Mean Vol 59.78 fl
Mean Dia 4.32 µm

Maximum 2.50 µm
Volume 8.229 fl

Smoothing 31
Above 10µm 2744

Andrologisches Labor der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik

Schumannstr. 20 / 21, 10117 Berlin
Tel.: (030) 2802 2297

Name.....
Geb. Dat..... 27. 04. 59
ID-Nummer..... AO 3197
Untersuchung.... 1
Datum..... Tue Feb 27 10:01:23 1996

Untersucher..... W

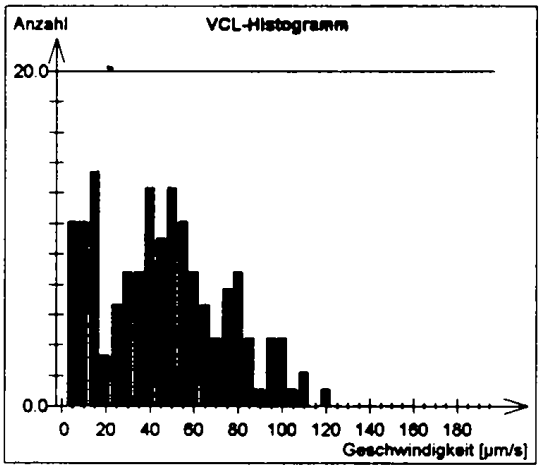
Motilitätsuntersuchung

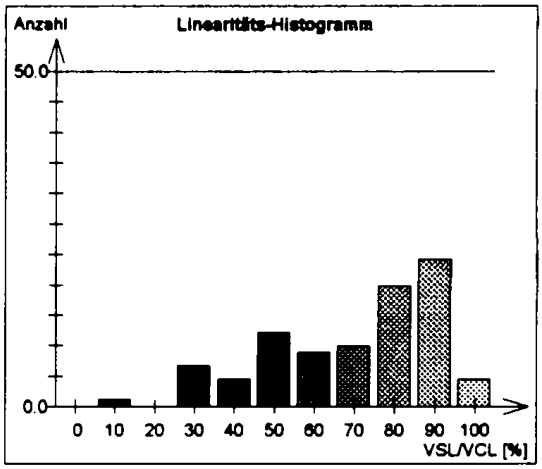
	Anz.	Proz %	Konz. mio/ml		VSL µm/s	VAP µm/s	VCL µm/s
Alle Spermatozoen.....	158		58.9	58.9			
»Immotile Spermatozoen..	30	19	11.1	11.1			
»Lok. mot. Spermatozoen.	14	9	5.2	5.2			
»Motile Spermatozoen....	114	72	42.5	42.5	30	41	60
» Kreisläufer.....	31	28	11.5	11.5	22	36	54
» Nichtlinear motil.	57	50	21.2	21.2	25	38	59
» Linear motil.....	26	22	9.7	9.7	52	54	71

gemessen « » unverdünnt

Untersuchungsparameter

Felder..... 6 Kammertiefe.. 10 µm
Temperatur..... 37 °C Verdünnung 1/ 1.0
Geschwindigkeitsgrenze immotil..... 10 µm/sec
Geschwindigkeitsgrenze lokal motil..... 15 µm/sec
Linearitätsgrenze..... 90 %
Maximaler Radius für Kreisläufer..... 10 µm



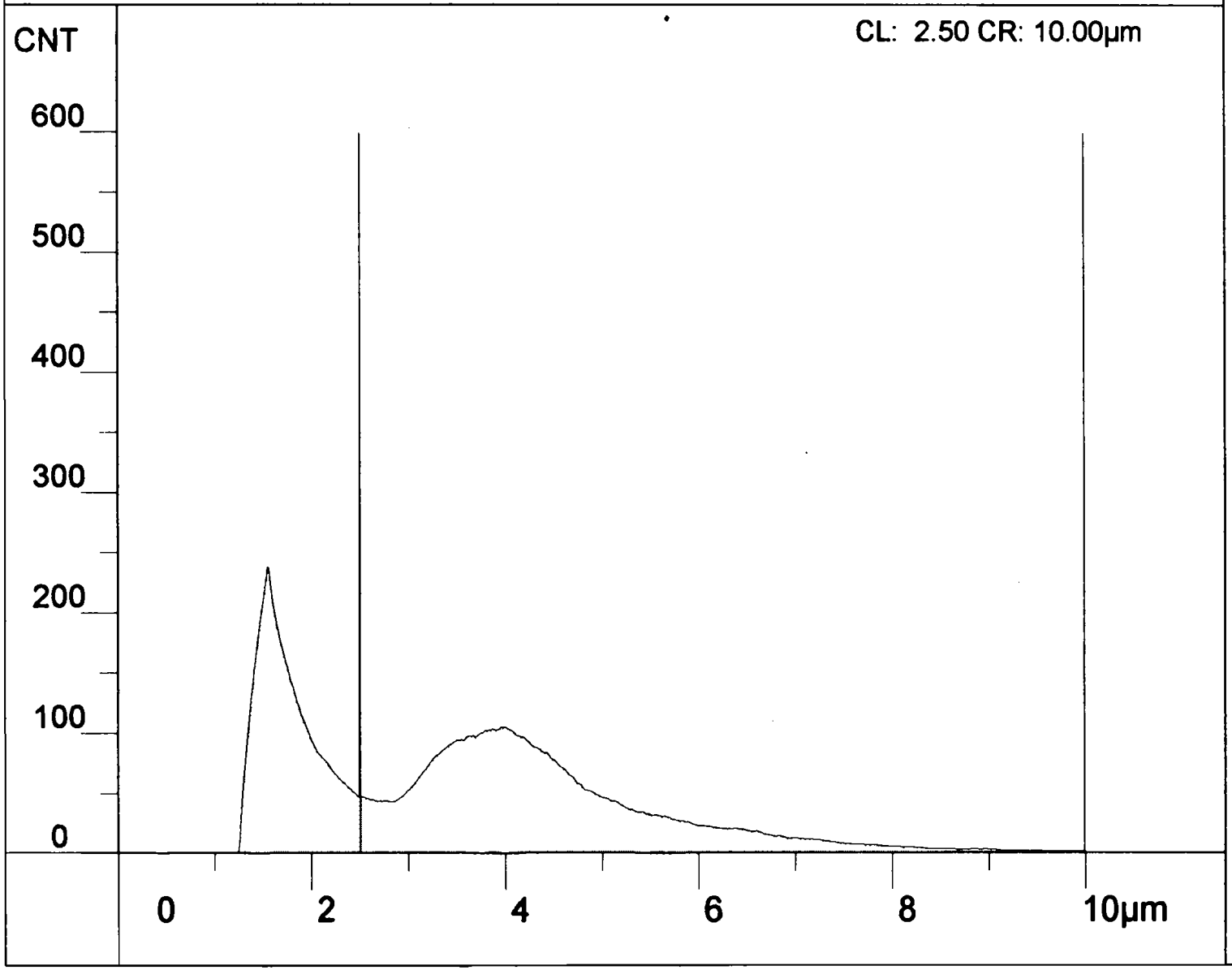


Kommentar: nach Filtration; Entnahme: Boden, n. 30 min Inkubation

Datum :27.02.1996

Date 2/27/1996 File c:\weber\weber.617

nach Filtration
Entnahme: Boden, nach 30 min Inkubation



CASY® 1 - Measure
Calibration 0- 10 µm

Capillary 60 µm
Cal File K000_010.060

Volume 1 x 200 µl
Dilution 1

Counts 25814
Counts/ml 1.291E+05

TotVol/ml 7.794E+06 fl
Mean Vol 60.38 fl
Mean Dia 4.46 µm

Maximum 3.96 µm
Volume 32.51 fl

Smoothing 31
Above 10µm 208

Andrologisches Labor der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik

Schumannstr. 20 / 21, 10117 Berlin
Tel.: (030) 2802 2297

Name.....
Geb. Dat..... 27. 04. 59
ID-Nummer..... AO 3197
Untersuchung.... 1
Datum..... Tue Feb 27 10:01:23 1996

Untersucher..... W

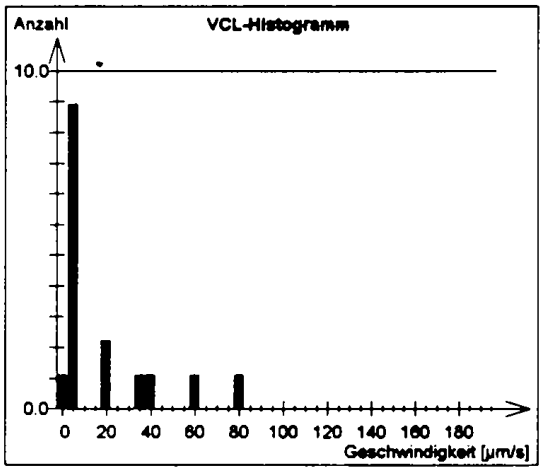
Motilitätsuntersuchung

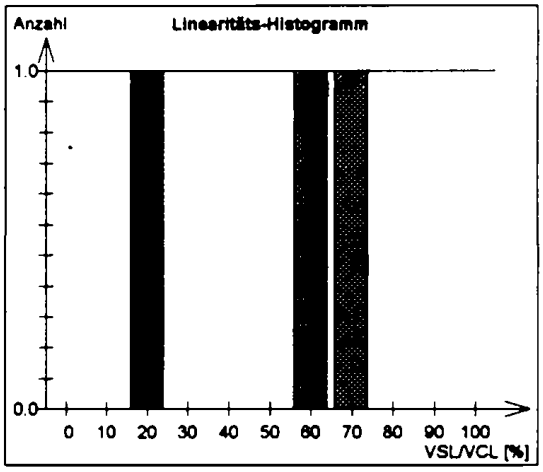
	Anz.	Proz %	Konz. mio/ml		VSL µm/s	VAP µm/s	VCL µm/s
Alle Spermatozoen.....	16		5.9	5.9			
»Immotile Spermatozoen..	11	69	4.1	4.1			
»Lok. mot. Spermatozoen.	2	13	0.7	0.7			
»Motile Spermatozoen....	3	18	1.1	1.1	24	41	54
» Kreisläufer.....	0	0	0.0	0.0	0	0	0
» Nichtlinear motil.	3	100	1.1	1.1	24	41	54
» Linear motil.....	0	0	0.0	0.0	0	0	0

gemessen « » unverdünnt

Untersuchungsparameter

Felder..... 6 Kammertiefe.. 10 µm
Temperatur..... 37 °C Verdünnung 1/ 1.0
Geschwindigkeitsgrenze immotil..... 10 µm/sec
Geschwindigkeitsgrenze lokal motil..... 15 µm/sec
Linearitätsgrenze..... 90 %
Maximaler Radius für Kreisläufer..... 10 µm



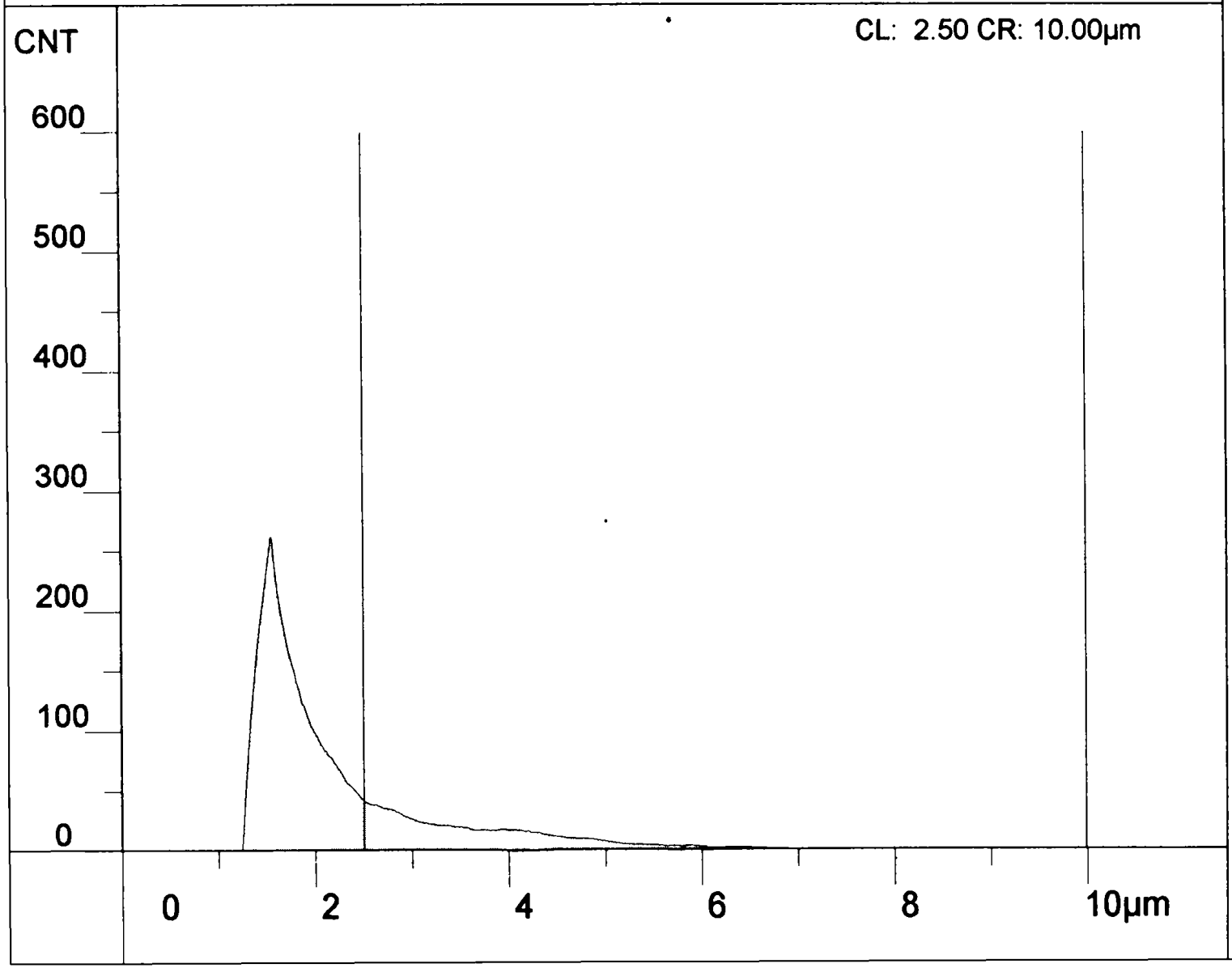


Kommentar: nach Filtration; Entnahme: Überstand, n. 35 min Inkubation

Datum :27.02.1996

Date 2/27/1996 File c:\weber\weber.618

nach Filtration
Entnahme: Überstand, nach 35 min Inkubation



CASY® 1 - Measure
Calibration 0- 10 µm

Capillary 60 µm
Cal File K000_010.060

Volume 1 x 200 µl
Dilution 1

Counts 5701
Counts/ml 2.850E+04

TotVol/ml 1.034E+06 fl
Mean Vol 36.27 fl
Mean Dia 3.75 µm

Maximum 2.50 µm
Volume 8.229 fl

Smoothing 31
Above 10µm 19

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne Benutzung unzulässiger Hilfsmittel verfaßt habe.

Der Literatur entnommenes Gedankengut ist so kenntlich gemacht, daß keine Mißverständnisse über die geistige Urheberschaft entstehen.

Mir ist bekannt, daß jeder Verstoß gegen diese Grundsätze ehrlich wissenschaftlicher Arbeit disziplinarisch geahndet wird.

Berlin, im Juli 1998

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. S. Engel, Leiter der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Klinik an der Charité Berlin, für die mir jederzeit erwiesene Hilfe und Beratung bei der Anfertigung der Arbeit aussprechen.

Wertvolle praktische und theoretische Anregungen erhielt ich auch durch Gespräche mit Herrn Dr. rer. nat., Dr. sc. R. Petzoldt, Technische Universität Cottbus, Fakultät Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik, der die Durchfürung der raster-elektronen-mikroskopischen Untersuchungen ermöglichte.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des andrologischen Labors der Charité-Hautklinik, Frau Herscher und Frau Deutsch, für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

In organisatorischen Angelegenheiten stand Frau Golde stets zur Verfügung, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Holm Weber
wohnhaft in:	10369 Berlin Erich-Kuttner-Str. 19
Geburtstag/ -ort:	06. 09. 1968, Freiberg
Familienstand:	ledig
Kinder:	keine
Staatsangehörigkeit:	BR Deutschland
Schulbildung:	1975-1985 Allgemeinbildende Oberschule Freiberg u. Berlin 1985-1987 Erweiterte Oberschule Berlin
Vorpraktikum / Armee:	1987-1989 Grundwehrdienst Mai. 1989-Aug. 1990 Fachkrankenhaus für Neurologie u. Psychiatrie „Herzberge“
Studium:	1990-1996 Studium d.Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
Arzt im Praktikum:	Aug. 1997- Humaine Klinikum Bad Saarow Klinik für Chirurgie