

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Stief



**Auswirkungen von Tabakkonsum auf die Spermien-Eileiter-Interaktion  
und die männliche Fertilität**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Rick Alexander Paschold  
aus Köln

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Armin Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Udo Jeschke

PD Dr. med. Tobias Rüther

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Matthias Trottmann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2022



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Männliche Infertilität	10
1.1.1	Definitionen	10
1.1.2	Prävalenz	10
1.1.3	Ätiologie	11
1.1.4	Grundlagen der Diagnostik	12
1.1.4.1	Basisuntersuchungen	12
1.1.4.2	Untersuchung des Ejakulats	14
1.1.4.3	Zusatzdiagnostik	16
1.2	Aufbau und Funktion humaner Spermatozoen	17
1.2.1	Funktion eines Spermiums	17
1.2.2	Morphologie einer Spermienzelle	18
1.2.3	Bildung, Aufbau und Funktion der Spermienplasmamembran	19
1.3	Grundlagen des Spermientransports im weiblichen Genitaltrakt	21
1.3.1	Spermientransport durch Vagina und Uterus	21
1.3.2	Spermientransport im Eileiter	22
1.3.2.1	Passage der uterotubalen Junktion	22
1.3.2.2	Passage von Isthmus und Ampulla	22
1.4	Auswirkung einer Tabakabhängigkeit auf die männliche Reproduktion	24
1.4.1	Auswirkungen des Tabakkonsums auf das Spermogramm	25
1.4.2	Auswirkungen des Tabakkonsums auf die Fertilität	25
<b>2</b>	<b>Fragestellung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Material	28
3.1.1	Setting und Patientenkollektiv	28
3.1.2	Datenerfassung	29
3.1.3	Studienablauf	29
3.1.4	Spermogramm	30
3.1.5	Geräte	30
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.7	Chemikalien	32
3.1.8	Puffer	34
3.1.9	FITC konjugierte Kohlenhydratreste	35
3.1.10	Biotinylierte Kohlenhydratreste	35
3.1.11	Antikörper	36

3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Probenaufbereitung und Lagerung.....	37
3.2.1.1 Proteinextraktion .....	38
3.2.1.2 Anfertigung von Ausstrichpräparaten.....	38
3.2.2 Fluoreszenzfärbung.....	38
3.2.2.1 Fluoreszenzfärbung mit FITC-konjugierten Kohlenhydratresten .....	38
3.2.2.2 Fluoreszenzfärbung mit FITC-konjugiertem-VIP36-Antikörper .....	39
3.2.2.3 Konfokalmikroskopie (CLSM) .....	39
3.2.2.4 Auswertung mit ImageJ.....	40
3.2.3 Kohlenhydratbindungssay- und Immunoblot .....	40
3.2.3.1 SDS-Page .....	40
3.2.3.2 Western Blot .....	41
3.2.3.3 Liganden Blot.....	41
3.2.3.4 Immunoblot.....	42
3.2.4 Durchflusszytometrie (FACS).....	43
3.2.5 Statistische Auswertung.....	44
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1 Patientencharakteristika.....	46
4.2 Ergebnisse der Spermioграммаauswertung .....	48
4.3 Bindung der Kohlenhydratreste .....	50
4.4 Bindung des VIP36-Antikörper .....	51
4.5 Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern .....	53
4.5.1 Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern mit Normozoospermie .....	56
4.6 Vergleich von Nie-Rauchern – Ex-Rauchern – Rauchern.....	56
4.6.1 Mögliche Reversibilität der Einflüsse des Tabakkonsums.....	58
4.7 Patienten mit eingeschränkten Spermioграмmparametern .....	61
4.8 Western Blot .....	63
4.9 Immunoblot (VIP36).....	64
4.10 Durchflusszytometrie (FACS).....	65

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
5.1	Auswahl der Studienpopulation .....	69
5.2	Beurteilung der methodischen Durchführung .....	70
5.2.1	Fallzahlen in der Studie .....	70
5.2.2	Subjektive Angabe des Tabakkonsums .....	71
5.2.3	Beurteilung von Spermioogrammen .....	72
5.2.4	Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen .....	72
5.2.5	Stellenwert von Galactose in den Untersuchungen .....	73
5.2.6	Durchflusszytometrie .....	74
5.2.7	Direkter Lektinnachweis .....	74
5.2.8	Statistische Auswertung .....	75
5.3	Mechanismus und Stellenwert der Spermien-Eileiter-Interaktion .....	75
5.4	Tabakkonsum als Risikofaktor für herabgesetzte Fertilität.....	79
5.4.1	Einfluss des Tabakkonsums auf die Spermioogrammparameter .....	79
5.4.2	Einfluss des Tabakkonsums auf das Seminalplasma .....	81
5.4.3	Einfluss des Tabakkonsums auf die Fertilität .....	83
5.4.4	Mögliche Störung der Spermien-Eileiter-Interaktion durch Tabakkonsum.....	84
5.4.5	Reversibilität der Effekte des Tabakkonsums.....	85
5.5	Zusammenhang zwischen Spermioogramm und Kohlenhydratbindung.....	86
5.6	Die Durchflusszytometrie als alternatives Verfahren .....	87
5.7	VIP36 - ein mögliches Lektin für die Spermien-Eileiter-Interaktion .....	89
5.8	Ausblick.....	90
5.8.1	"Sperm Proteomics": Diagnostik und Therapie der männlichen Infertilität? .....	90
5.8.2	Weitere Forschung auf dem Gebiet der Spermien-Eileiter-Interaktion .....	91
5.8.3	Lernen aus dem Wissen der Veterinärmedizin.....	91
5.8.4	Klinische Bedeutung und Umsetzung in die Praxis .....	92
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
8.1	Patientenfragebogen und Aufklärung .....	111
8.2	Veröffentlichungen zur Dissertation .....	115

**Eidesstaatliche Versicherung**

**Danksagung**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
BMI	body mass index
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
CLSM	confocal laser scanning microscope; Konfokalmikroskop
d	day, Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochlorid
EAU	European Association of Urology
etc.	et cetera
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter; Vorwärts Streulicht
FU	Fucose
g	Gramm
GA	Galactose
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-vitro-Fertilisation
IQR	Interquartilenabstand
kDa	Kilodalton (Atomare Masseneinheit)
kg	Kilogramm
l	Liter
LMAN-2	mannose-binding-lectin-2 (=VIP36)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MA	Mannose
MAR	mixed antiglobulin reaction
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
QuaDeGA	Qualitätskontrolle der deutschen Gesellschaft für Andrologie
RiLiBÄK	Richtlinien der Bundesärztekammer
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SA	Sialinsäure
SSC	Side scatter; Seitenstreulicht / 90° Streulicht
V	Volt
VIP36	Vesicular integral protein of 36 kDa (=LMAN2)
VZO	Verkehr zum Optimum
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
Zig	Zigaretten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hauptdiagnosen von Patienten des Instituts für Reproduktionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.....	12
Abbildung 2: Illustration verschiedener Zelltypen .....	17
Abbildung 3: Skizze eines Spermiums .....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Spermienplasmamembran .....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindung zwischen Spermium und Eileiter .....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung der angewendeten Methodik .....	37
Abbildung 7: Rauchgewohnheiten der eingeschlossenen Patienten .....	47
Abbildung 8: Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag.....	47
Abbildung 9: Spermioigrammparameter aller Patienten.....	48
Abbildung 10: Spermioigrammparameter und -diagnosen aller Patienten.....	49
Abbildung 11: CLSM humaner Spermatozoen .....	50
Abbildung 12: CLSM humaner Spermatozoen .....	51
Abbildung 13: CLSM humaner Spermatozoen .....	52
Abbildung 14: Vergleich der Spermioigrammparameter bei Nichtrauchern und Rauchern.....	53
Abbildung 15: Vergleich der Bindungskapazität bei Nichtrauchern und Rauchern.....	54
Abbildung 16: Vergleich der Bindungskapazität bei Nie-Rauchern, Ex-R. und Rauchern.....	57
Abbildung 17: Vergleich der Bindungskapazität bei Nie-Rauchern, Rauchern und Patienten, die innerhalb des letzten Jahres mit dem Rauchen aufgehört haben.....	59
Abbildung 18: Vergleich der Bindungskapazität bei Patienten mit/ohne Normozoospermie ...	61
Abbildung 19: Western Blot humaner Spermienplasmaproteine.....	63
Abbildung 20: Immunoblot humaner Spermienplasmaproteine .....	64
Abbildung 21: Auswertung der Fluoreszenzfärbung von SYBR®/PI .....	65
Abbildung 22: Auswertung der Fluoreszenzfärbung JC-1.....	66
Abbildung 23: Auswertung der Fluoreszenzfärbung FITC-gekoppelter Kohlenhydratreste.....	67
Abbildung 24: Schematische Darstellung einiger Moleküle auf der Eileiter- bzw. Spermienoberfläche.....	77
Abbildung 25: Zusammenfassung einiger Mechanismen, die zu Schädigungen der Spermien-DNA führen können .....	79

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Referenzwerte der Spermogramm-Diagnostik gem. WHO 2010, 5th edition .....	14
Tabelle 2: WHO-Nomenklatur zur Spermogramm-Beurteilung .....	15
Tabelle 3: Gründe für Ausschluss aus der Studie trotz Zustimmung der Patienten.....	29
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte .....	30
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	31
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien .....	32
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Puffersubstanzen .....	34
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten FITC-Kohlenhydratreste .....	35
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten biotinylierten Kohlenhydratreste .....	35
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	36
Tabelle 11: Einstellungen des Konfokalmikroskops Olympus iX 81.....	40
Tabelle 12: Rezeptur für Sammel- und Trenngel (10%) .....	41
Tabelle 13: Deskriptive Statistik aller Patienten nach Auswertung der Fragebögen.....	46
Tabelle 14: Relevante Vorerkrankungen der eingeschlossenen Patienten .....	48
Tabelle 15: Beurteilung der Spermogramme der Studienpatienten .....	49
Tabelle 16: Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern .....	55
Tabelle 17: Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern mit Normozoospermie .....	56
Tabelle 18: Vergleich von Patienten nach ihren aktuellen Rauchgewohnheiten.....	58
Tabelle 19: Vergleich von Nie-Rauchern, Rauchern und Patienten, die innerhalb des letzten Jahres mit dem Rauchen aufgehört haben.....	60
Tabelle 20: Vergleich der Patienten mit und ohne Normozoospermie .....	62
Tabelle 21: Spermogrammparameter der FACS-Probanden .....	65
Tabelle 22: Monosaccharide in eukaryotischen Glykoproteinen .....	78

## **1 Einleitung**

### **1.1 Männliche Infertilität**

#### **1.1.1 Definitionen**

Laut dem International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) besteht eine Infertilität nach klinischer Definition, wenn bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr über 12 Monate keine Schwangerschaft eintritt. Die Begriffe Unfruchtbarkeit oder Sterilität werden hierbei weitestgehend synonym verwendet, wobei sich im deutschsprachigen Raum der Ausdruck Infertilität durchgesetzt hat [1].

Unterschieden wird dabei nach primärer und sekundärer Infertilität. Beim Mann spricht man von primärer Infertilität, wenn bisher weder mit der aktuellen, noch mit einer früheren Partnerin eine Schwangerschaft eingetreten ist. Sekundäre Infertilität liegt vor, wenn mit der aktuellen oder einer früheren Partnerin mindestens eine Schwangerschaft eingetreten ist, nun aber eine Infertilität nach WHO-Definition vorliegt [2].

Beim Mann beschreiben die Begriffe Fertilität oder Zeugungsfähigkeit dementsprechend die Fähigkeit zu konzipieren beziehungsweise eine Schwangerschaft zu erzeugen [2].

Eine Subfertilität beschreibt eine eingeschränkte Zeugungsfähigkeit und kann über Jahre unentdeckt bestehen. Sie kann bei Kinderwunsch durch Einschränkungen der Reproduktion auffällig werden [2].

Von idiopathischer Infertilität des Mannes spricht man bei herabgesetzter Qualität der Spermio-grammparameter, für die sich jedoch keine Erklärung und folglich keine Therapie finden lässt [2]. Die allgemeine Definition der idiopathischen Infertilität meint jedoch, dass trotz ausführlicher Abklärung eine Ursache der Zeugungsunfähigkeit nicht beschrieben werden kann [3]. Somit handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose. In der folgenden Arbeit wird diese Definition von idiopathischer Infertilität zugrunde gelegt.

#### **1.1.2 Prävalenz**

Daten zur Prävalenz der Infertilität und ungewollter Kinderlosigkeit unterliegen in der Literatur großen Schwankungen. Verschiedene Studien geben an, dass in Deutschland und Europa ca. 15% der Paare ungewollt kinderlos sind [4-8]. Allerdings scheinen sich erhebliche regionale Unterschiede innerhalb Europas und sogar zwischen West- und Ostdeutschland zu ergeben [4].

In ungefähr 50% der Fälle liegt eine Fertilitätsstörung beim Mann zugrunde [2, 6]. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass ca. 7% der Männer im Laufe des Lebens mit Problemen ihrer

reproduktiven Funktion konfrontiert werden. Diese Prävalenz liegt in etwa auf dem Niveau mit der sogenannten „Volkskrankheit“ Diabetes mellitus [9].

Je nach Quelle ist bei 8-15% der ungewollt kinderlosen Paare keine objektivierbare Störung erkennbar (idiopathische Infertilität) [2, 6, 10]. Bei Männern, die sich wegen Infertilität in Behandlung befinden, wird diese Diagnose in über einem Drittel der Fälle gestellt [2].

### 1.1.3 Ätiologie

Die männliche Zeugungsfähigkeit ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Dies führt häufig dazu, dass bei der Abklärung einer Infertilität keine einzelne, definitive Ursache zugrunde gelegt werden kann.

Dementsprechend lassen sich Ursachen für männliche Infertilität auf verschiedenen anatomisch-funktionellen Ebenen feststellen [2, 3]:

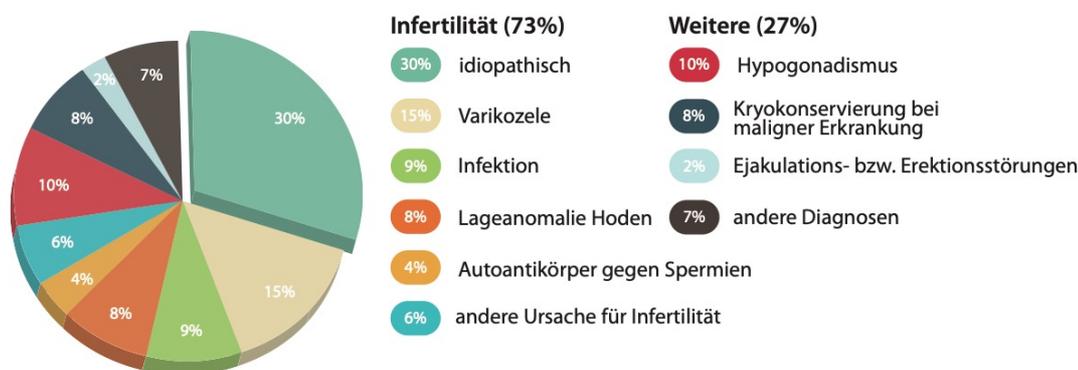
- Hypothalamus oder Hypophyse
- Zielorgane der Androgene
- Hoden
- ableitende Samenwege oder akzessorische Geschlechtsdrüsen
- Störungen der Samendeposition

Auf diesen Ebenen kann es wiederum verschiedene Gründe für männliche Infertilität geben. Folgende Auflistung gibt einen Überblick über Prozesse, die zur Entwicklung einer Infertilität beitragen können [2, 3, 11]:

- kongenitale urogenitale pathologische Veränderungen
- Malignome
- Infektionen des Urogenitaltrakts
- erhöhte Temperatur des Hodens (häufig als Folge einer Varikozele)
- endokrine pathologische Veränderungen
- genetische Veränderungen
- immunologische Faktoren
- Beeinträchtigung durch Toxine (z.B. Tabakkonsum)

Wie bereits erwähnt liegt bei 50% der Paare mit ungewollter Kinderlosigkeit eine reproduktive Störung beim Mann vor. Nachfolgend sind die Anteile der häufigsten Diagnosen von Männern in einer Reproduktionsmedizinischen Klinik dargestellt (Abbildung 1). Es fällt auf, dass sich bei mehr als einem Drittel der Patienten keine eindeutige Ursache für eine Infertilität finden lässt. Die am häufigsten vergebene Diagnose ist daher, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, die sogenannte „idiopathische Infertilität“.

Abbildung 1: Hauptdiagnosen von 12.945 Patienten des Instituts für Reproduktionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster [2].



### 1.1.4 Grundlagen der Diagnostik

Da bei ca. 65% der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch eine Störung der weiblichen Reproduktion vorliegt, empfiehlt die European Association of Urology, neben einer ausführlichen Diagnostik des Mannes, ebenfalls die Partnerin einer Untersuchung zu unterziehen (interdisziplinäre Paarabklärung) und vor allem Augenmerk auf das Alter der Frau zu legen. Selbiges gilt besonders bei unerfülltem Kinderwunsch und einer diagnostizierten männlichen Subfertilität (Evidenzgrad „strong“)[11].

#### 1.1.4.1 Basisuntersuchungen

Die andrologische Abklärung einer männlichen Infertilität stützt sich auf folgende Basisuntersuchungen:

- Anamnese/Sexualanamnese: Die Grundlage der Analyse einer männlichen Infertilität bildet immer eine ausführliche Anamnese. Einige Punkte sollen an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden:
  - » Alter des Mannes: Die Fertilität des Mannes kann aufgrund hormoneller und physiologischer Faktoren im fortgeschrittenen Alter erheblich reduziert sein. Dies geht unter anderem mit einer Verschlechterung des Spermioграмms (vor allem Volumen, Spermienzahl, Motilität, Morphologie) einher und sollte bei jeder Diagnostik berücksichtigt werden. Weiterhin kann durch vaskuläre Faktoren die Erektion im Alter eingeschränkt sein [12, 13].
  - » Fragen zum Kinderwunsch: Dauer des Kinderwunsches; bisherige Schwangerschaften, auch mit ehemaligen Partnerinnen.
  - » Stattgehabte Infektionen und Vorerkrankungen: Besonders Mumpsinfektionen in der Kindheit sowie Urethritis, Prostatitis oder Epididymitis sind zu erfragen.

- Bei den Vorerkrankungen sind besonders chronische Erkrankungen, Tumorleiden, Diabetes mellitus und Hormonerkrankungen wie Schilddrüsenfunktionsstörungen von großer Relevanz.
- » Kindheit des Patienten: Maleszensus testis, Pendel- oder Gleithoden, Hodentraumata/-torsion, Pubertätsentwicklung.
  - » Frage nach Konsum/Abhängigkeit verschiedener Substanzen (Marihuana, Kokain aber auch anabole Steroide).
  - » Tabakabhängigkeit: Studien konnten zeigen, dass die Wirkung des Nikotins und seiner Metaboliten unter anderem mit einer höheren Prävalenz der Asthenozoospermie und Teratozoospermie einhergeht. Weitere negative Auswirkungen auf die Fertilität des Mannes werden diskutiert (siehe 1.4).
  - » Medikamentenanamnese [14].
  - » Fragen zur Sexualität: Verhütung, Libido, Erektion, Ejakulation, Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs.
  - » Fragen zur psychosozialen Situation.
- Körperliche Untersuchung: Nach einer grundlegenden körperlichen Basisuntersuchung steht in der Andrologie die Beurteilung des Phänotyps sowie der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale im Vordergrund. Besonderes Augenmerk sollte dabei, vor allem bei Verdacht auf Störungen des Sexualhormon-Haushalts, auf Körperproportionen, Knochenbau, Fettverteilung, Körperbehaarung und Geschlechtsmerkmale gelegt werden. Dies schließt die Inspektion der Brustdrüse bei Frage nach Gynäkomastie mit ein. Weiterhin erfolgt eine Untersuchung der primären Geschlechtsorgane. Am Penis sollte das Augenmerk auf Phimose, Deviation und Hypospadie gerichtet werden. Die Hoden und Nebenhoden werden auf Lage, Konsistenz, Größe/Volumen (mittels Orchidometer), Raumforderung und Druckschmerz überprüft. Bei der Palpation ist außerdem auf eine Erweiterung des Plexus pampiniformis, beispielsweise im Sinne einer Varikozele, zu achten.
  - Digital-rektale Untersuchung: Die vollständige andrologische Untersuchung schließt außerdem bei besonderen Fragestellungen eine digital-rektale Untersuchung mit ein. Dabei sollte, sofern nicht bereits sonografisch analysiert, die Prostata auf Größe, Druckschmerz und Konsistenz untersucht werden.
  - Sonografie: Die andrologische Diagnostik wird außerdem durch apparative Methodik unterstützt. Die Sonografie der Hoden liefert Informationen zu Echogenität und Homogenität des Parenchyms sowie zu Hodengröße und -volumen. Weiterhin lässt sich eine Varikozele oder eine Hydro- oder Spermatozele darstellen. Mit Hilfe einer rektalen Sonografie ist es möglich, weitere Organe wie Prostata und Samenbläschen zu untersuchen. Hierbei wird nach Hinweisen auf Fehlbildungen, stattgehabten Entzündungen und Obstruktionen (z.B. Utriculuszysten) gesucht.

- Grundlegendes endokrinologisches Labor (FSH, LH, Gesamttestosteron; optional auch: Inhibin B, Anti-Müller-Hormon (AMH), Sexualhormonbindendes Globulin (SHBG), Östradiol, Prolaktin).
- Ejakulatdiagnostik/Spermiogramm (siehe 1.1.4.2).

#### 1.1.4.2 Untersuchung des Ejakulats

Bei der vollständigen Abklärung einer männlichen Infertilität spielt die Ejakulatdiagnostik eine zentrale Rolle.

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist die Standardisierung der laboratorischen Auswertung des Ejakulats essentiell. Als Referenz gilt das von der WHO herausgegebene „WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edn.)“ nachdem in einem andrologischen Labor gearbeitet und ausgewertet werden sollte [11, 15].

Um die große physiologische, intraindividuelle Variabilität der Spermienzahl und -qualität auszugleichen, sind bei einem auffälligen Spermiogramm mindestens zwei Untersuchungen mit einem zeitlichen Abstand erforderlich. Bei bestehenden Auffälligkeiten sollte eine weitergehende andrologische Diagnostik durchgeführt werden (Evidenzgrad A, nach EAU Guidelines on Male Infertility, 2015) [11].

Die Patienten sollten vor der Abgabe eine sexuelle Karenz von mindestens zwei und maximal sieben Tagen einhalten. Beim Vergleich verschiedener Ejakulatanalysen muss auf eine ähnliche Karenzzeit geachtet werden. Nach einer kürzeren Karenzzeit ist meist die Spermienanzahl erniedrigt, wohingegen bei einer Karenz über sieben Tagen die Spermienmotilität vermindert ist. Die Proben werden durch Masturbation gewonnen und anschließend zeitnah (unter einer Stunde) nach Verflüssigung des Ejakulats analysiert.

Folgende Tabelle zeigt, welche Parameter bei einer grundlegenden Ejakulatdiagnostik ermittelt werden und welche Grenzwerte nach WHO Laborhandbuch gelten:

*Tabelle 1: Referenzwerte der 5. Perzentile der Parameter der Spermiogramm-Diagnostik gem. WHO 2010, 5th edition; CI: Konfidenzintervall [15].*

Parameter	Untere Referenzwerte (95% CI)
Ejakulatvolumen	1,5 ml (1,4-1,7)
Spermienkonzentration	15 Mio./ml (12-16)
Spermiengesamtzahl	39 Mio./Ejakulat (33-46)
Spermienmotilität	
– progressive Motilität	32% (31-34)
– Gesamt- (progressive & nicht-progressive) Motilität	40% (38-42)
Spermienmorphologie	4% normale Formen (3,0–4,0)

Parameter	Untere Referenzwerte (95% CI)
Spermienvitalität	58% (55-63)
pH-Wert	≥ 7,2
Peroxidase-positive Leukozyten	1,0 Mio/ml
MAR-Test (motile Spermatozoa mit gebundenen Partikeln)	< 50%

Weiterhin gilt die von der WHO festgelegte Nomenklatur zur Spermiogramm-Beurteilung:

Tabelle 2: WHO-Nomenklatur zur Spermiogramm-Beurteilung [15].

Klassifikation	Parameter (gem. WHO-Referenzen siehe Tabelle 1)
Normozoospermie	Spermienzahl (Gesamtzahl oder Konzentration), Anteil der progressiv motilen und morphologisch normalen Spermien im Normbereich.
Oligozoospermie	Spermiengesamtzahl oder Konzentration unter dem Normbereich.
Asthenozoospermie	Anteil der progressiv motilen Spermien unter dem Normbereich.
Teratozoospermie	Anteil der morphologisch normalen Spermien unter dem Normbereich.
Asthenoteratozoospermie	Anteil der progressiv motilen und der morphologisch normalen Spermien unter dem Normbereich.
Oligoasthenozoospermie	Spermienzahl (Gesamtzahl oder Konzentration) und Anteil der progressiv motilen Spermien unter dem Normbereich.
Oligoteratozoospermie	Spermienzahl (Gesamtzahl oder Konzentration) und Anteil der morphologisch normalen Spermien unter dem Normbereich.
Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom)	Spermienzahl (Gesamtzahl oder Konzentration) und Anteil der progressiv motilen und der morphologisch normalen Spermien unter dem Normbereich.
Nekrozoospermie	Niedriger Anteil lebender und hoher Anteil immotiler Spermien im Ejakulat.
Kryptozoospermie	Spermatozoen im zentrifugierten Pellet nachweisbar, aber nicht im nativen Präparat.
Hämatospermie	Erythrozyten im Ejakulat nachweisbar.
Leukospermie	Leukozyten im Ejakulat nachweisbar.
Azoospermie	keine Spermien im Ejakulat.
Aspermie	kein Ejakulat (z.B. bei retrograder Ejakulation).

Wichtig für die Beurteilung eines SpermioGRAMMS ist es, dass anhand der Ergebnisse keine Vorhersage bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines Schwangerschaftseintritts gemacht werden kann. Eine Ausnahme stellt hier die Azoospermie dar. Das SpermioGRAMM bildet damit für den Andrologen ein wichtiges Werkzeug in der Diagnostik, definitive Aussagen zur Kausalität und Therapie sind jedoch meist nicht möglich.

Neben der oben genannten Basisdiagnostik kann bei entsprechendem Bedarf eine weiterführende Ejakulatuntersuchung durchgeführt werden. Gängig ist die Bestimmung von Antikörpern im Ejakulat bei Verdacht auf immunologisch bedingte Infertilität oder biochemische Verschlussparameter zur Abschätzung der Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Zink, Fruktose, alpha-Glucosidase im Ejakulat).

### 1.1.4.3 Zusatzdiagnostik

Weiterhin können in speziellen Fällen zusätzliche Untersuchungen indiziert sein:

Neben einer weiterführenden Ejakulatdiagnostik (siehe 1.1.4.2) bieten sich unter Umständen spezielle humangenetische Analysen an. In diesem Bereich ist zwar aktuell keine kausale Therapie möglich, das Wissen um eine chromosomale oder genetische Störung ist jedoch zur Abschätzung potenzieller Vererbungen oder dem Erfolg operativer Spermienextraktionen von großer Wichtigkeit.

Neben einer Karyotypisierung zur Suche nach chromosomalen Störungen (Klinefelter-Syndrom, 46XX-Mann, Translokationen) kann weiterhin eine Suche nach genetischen Störungen erfolgen. Typische Beispiele sind Mutationen des CFTR-Gens, Mikrodeletionen im Bereich des Azoospermie-Faktors (AZF), Mutationen des FGFR1-Gens auf Chromosom 8 oder KAL 1-Mutationen auf dem X-Chromosom.

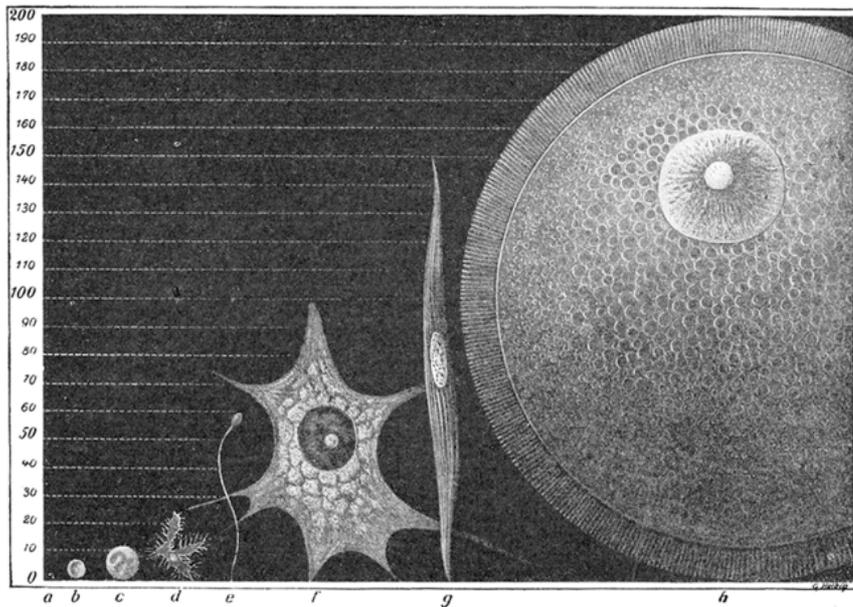
Neben der bereits angesprochenen Sonografie spielt weitere Bildgebung, wie die Magnetresonanztomographie eine Rolle: In der Sellaregion kann der Ausschluss hypophysärer Ursachen (z.B. Prolaktinom) erfolgen. Ein ektopter Hoden wäre bei einem abdominalen MRT zu diagnostizieren.

Als obsolet anzusehen ist die früher häufiger durchgeführte Vasografie, bei der die Gefahr der Verklebung der ableitenden Samenwege besteht.

In einigen Fällen kann die Untersuchung des Urins von großer Bedeutung sein. Bei Spermien im postmasturbatorischen Urin kann der Verdacht auf retrograde Ejakulation gestellt werden. Eine Analyse des Urinsediments und -mikrobiologie sollte bei Verdacht auf Infektion der ableitenden Samenwege erfolgen.

## 1.2 Aufbau und Funktion humaner Spermatozoen

Abbildung 2: Illustration verschiedener Zelltypen aus der Literatur Anfang des 20. Jahrhunderts [16]. Die Spermienzelle (e) wird hier mit einer Oozyte (h) verglichen. Die Differenzierung der Urkeimzellen resultiert in hochspezialisierten männlichen und weiblichen Gameten mit einzigartiger Morphologie und Funktion. Aus den beiden komplementären Zellen soll beim Aufeinandertreffen im Zuge der Fertilisierung eine neue Zygote hervorgehen.



### 1.2.1 Funktion eines Spermiums

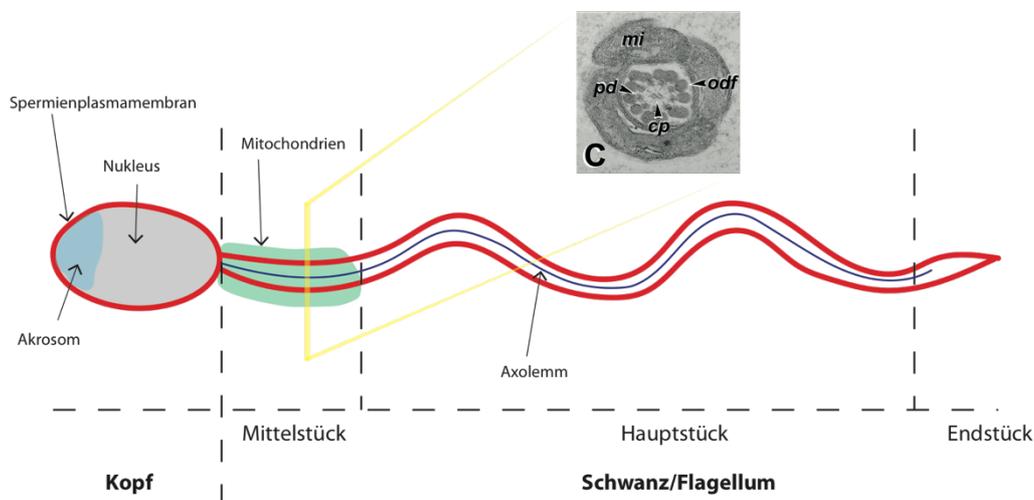
Spermienzellen sind hochspezialisierte Zellen, deren wesentliche Aufgabe die Befruchtung der weiblichen Eizelle und damit die Weitergabe des Erbguts in Form von DNA ist. Die Differenzierung der Keimzellen zu den Gameten geschieht im Prozess der Spermio- und Spermatogenese und resultiert in Zellen mit haploidem Genom und einer im menschlichen Organismus einzigartigen Zusammensetzung von Organellen. Ziel ist es, auf männlicher und weiblicher Seite jeweils Zellen mit komplementärer Ausstattung zu bilden. Beim Zusammentreffen sollen sie die gemeinsame Bildung einer Zygote ermöglichen, aus der sich ein neues Individuum entwickeln kann [17].

Hierfür ist es notwendig, dass der Aufbau der Spermatozoen eine eigenständige Motilität und Fortbewegung sowie ein Überleben außerhalb des männlichen Körpers ermöglicht. Weiterhin muss ein sekundärer Reifungsprozess (Kapazitation), die Wegfindung zur weiblichen Eizelle und die Akrosomreaktion möglich sein [18].

### 1.2.2 Morphologie einer Spermienzelle

Um die oben genannten Funktionen zu ermöglichen sind Spermienzellen aus zwei funktionell und strukturell getrennten, subzellulären Kompartimenten aufgebaut: Der Spermienkopf als Träger des haploiden genetischen Materials in Form von DNA sowie das Flagellum als Motoreinheit der Zelle.

Abbildung 3: Skizze eines Spermiums. Zu erkennen sind die zwei getrennten Kompartimente Kopf und Flagellum mit ihren einzelnen Bestandteilen. C: Querschnitt des Mitochondrien-reichen Mittelstücks [Aufnahme aus 17]. Die motorische Einheit, das Axolemm, besteht aus den "outer dense fibers" (odf) und den peripheren Mikrotubuli (peripheral microtubule doublets, pd) und in deren Mitte das zentrale Mikrotubuli-Paar (central pair, cp). Im Mittelstück wird das Axolemm von Mitochondrien umschlossen (mi).



Der Kopf besteht hauptsächlich aus dem Zellkern (Nukleus) und dem akrosomalen Vesikel (Akrosom). Der Schwanz eines Spermiums unterteilt sich in das mitochondrienreiche Mittelstück, das Hauptstück und das Endstück [19]. Zwischen Kopf und Schwanz liegt die Nacken-Region des Spermiums, in der  $Ca^{2+}$  gespeichert und für Signalwege freigesetzt werden kann [20].

Der Kopf einer Spermienzelle lässt sich in das Akrosom und die postakrosomale Region unterteilen. Das Akrosom bildet die proximale Hemisphäre des Kopfes und entsteht während der Spermatogenese durch Fusion einzelner, aus dem Golgi-Apparat abgeschnürter Vesikel [21]. Der Inhalt des Akrosoms setzt sich vor allem aus Proteasen und verschiedenen Rezeptoren zusammen. Diese werden bei Kontakt mit der glykoproteinreichen Hülle der Eizelle (Zona pellucida) exozytiert. Die Proteasen lösen die Hülle partiell auf, was den Übertritt des Spermiums in den perivitellinen Raum mit nachfolgender Penetration der Oozyte ermöglicht (Akrosomreaktion) [22-25].

Der restliche Teil des Kopfes wird hauptsächlich vom Nukleus und seinen Hüllen gebildet. Im Zellkern findet sich ein stark kondensierter, haploider Chromosomensatz, dessen platzsparende Struktur einen kompakten, hydrodynamischen Spermienkopf ermöglicht [17].

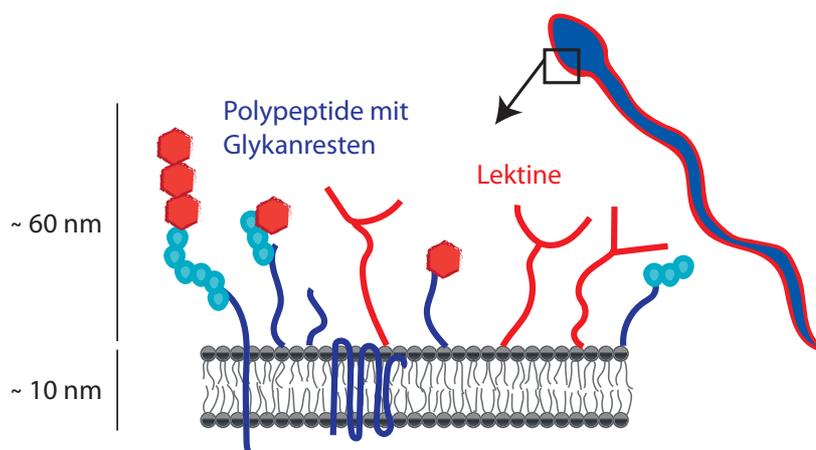
Das Flagellum eines Spermiums gliedert sich in Mittelstück, Hauptstück und Endstück, wobei die ersten beiden vom sogenannten Axonem durchzogen werden. Das Axonem, die eigentliche Motoreinheit, besteht aus der für Spermien typischen 9+2 Mikrotubuli-Struktur. Im Querschnitt betrachtet umringen neun untereinander durch das Motorprotein Dynein vernetzte Mikrotubuli-Paare das zentrale Paar (siehe Abbildung 3). Die Dynein Aktivität wird durch die radialen Speichen reguliert und bewirkt die wellenartige Bewegung des Flagellums. Umschlossen werden diese Strukturen von Mitochondrien [26].

### 1.2.3 Bildung, Aufbau und Funktion der Spermienplasmamembran

Da ein Spermium nur wenige Zellorganellen enthält, es fehlen unter anderem Ribosome und Endoplasmatisches Retikulum (ER) [27], findet bis auf wenige Ausnahmen keine Transkription und Translation statt. Änderungen der Spermienfunktion müssen damit über posttranslationale Modifikationen erfolgen. Wichtig sind hierbei Protein-Phosphorylierungen sowie Änderungen des zytoplasmatischen pH-Werts und der second-messenger- und Ionenkonzentrationen. Die Regulierung der Hypermotilität des Spermiums wird beispielsweise über Änderung von cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  ermöglicht [20, 26-29].

So wie alle lebendigen Zellen besitzen auch Spermien den typischen Membranaufbau aus Lipiden und Eiweißen (ca. 10 nm), die eine Abgrenzung gegen die Umwelt bietet und das interne Milieu aufrechterhält. Auf der Außenseite der Membran findet sich eine Glykokalix, die beim humanen Spermium ca. 20-60 nm dick ist und aus diversen Glykoproteinen, Glykolipiden und GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerten Glykoproteinen besteht (Abbildung 4). Die Diversität der Spermienplasmamembran ist damit enorm, sowohl inter- als auch intra-individuell [30].

*Abbildung 4: Schematische Darstellung der Spermienplasmamembran mit ihrer Oberflächen-Glykokalix. Auf Membran und Polypeptiden sitzen Glykane und Glykokonjugate. Kohlenhydratreste und Peptide in Form von Lektinen spielen eine wichtige Rolle in der Spermien-Eileiter-Interaktion. Die Membran wird außerdem von Cholesterol und Phosphatidylinositol durchzogen.*



Die Bildung der Membran ist ein komplexer Prozess, der während der Spermatogenese beginnt und durch diverse Modifikationen die gesamte Überlebenszeit eines Spermiums andauert [30]. Die Neusynthese der Glykokonjugate geschieht co- und posttranslational im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. Die anschließende Modifizierung erfolgt durch Glykosyltransferasen an den Glykoproteinen und Glykolipiden [30]. Im Gegensatz dazu werden Glykan-Strukturen nicht direkt vom Genom kodiert, sondern von diversen Transferasen aufgebaut [31]. Selbst nach der Spermatogenese wird die bestehende Membran noch modifiziert, indem beispielsweise Kohlenhydratreste und Proteine aus dem Epididymis und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen [32-35] oder aus dem Seminalplasma [36-38] von außen aufgenommen werden.

Die Funktionen der Spermienplasmamembran kann anhand des zeitlichen Ablaufs von der Spermatogenese bis zur Fertilisation zusammengefasst werden [bearbeitet nach 30]:

- Spermatogenese: Proteinfaltung während Spermatogenese durch N-Glykosylierung und Zelladhäsion zwischen Sertoli-Zellen und Spermatisden [39].
- Seminalplasma: Komponenten, wie Glycodelin S (GdS) [36-38] aus dem Seminalplasma werden zur Glykokalix hinzugefügt und verhindert vorzeitige Kapazitation.
- Zervikaler Mukus: Passage durch den zervikalen Mukus erfordert intakte Glykokalix [40].
- Uterus: Verbessertes Überleben der Spermien durch Schutz vor zellulärer und humoraler Immunreaktion [41, 42] auch durch GPI-verankerte Antigene wie mrt-CD52 [43, 44].
- Uterotubale-Junktion: Passage der uterotubalen Junktion erfordert glykosylierungsabhängige Faltung von bestimmten Proteinen auf der Plasmamembran [45].
- Kapazitation: Modifikationen der Glykokalix [46, 47], z.B. durch Verlust von Sialinsäuren [48, 49] während Kapazitation.
- Isthmus/Ampulla: Formierung eines Spermienreservoirs durch Lektin-Glykan-Interaktionen mit dem Eileiterepithel [18, 50-52].
- Fertilisation: Spermien-Oozyten-Interaktion wird durch Verlust von Glykanen und Glykokonjugaten ermöglicht, die Moleküle auf der Plasmamembran maskieren [53].

Bisher ist noch nicht endgültig verstanden, wie die Spermienplasmamembran zur Fertilität beiträgt [54, 55]. Trotzdem werden Veränderungen der Membran mit diversen Verschlechterungen der Überlebensfähigkeit und Funktion der Spermien im weiblichen Genitaltrakt in Verbindung gebracht [47, 54, 56, 57].

Für die Bindung an den Eileiter scheinen vor allem Lektine eine entscheidende Rolle zu spielen. Lektine (von lat. legere = lesen) stellen eine Gruppe spezialisierter (Glyko-)Proteine dar, die ihre besondere Aufgabe in der Erkennung und Bindung von diversen Kohlenhydratstrukturen haben. Lektine sind im gesamten menschlichen Körper vor allem auf der Oberfläche von

Zellmembranen zu finden. Sie sind dabei an essenziellen Funktionen, wie Immunreaktionen, Proteinbiosynthese oder Agglutination von Zellen (z.B. Erythrozyten) beteiligt [58].

Die bereits angesprochene Heterogenität der Plasmamembran erzeugt die intraindividuellen Unterschiede. Diese Heterogenität kommt durch verschiedene Modifikationen während und nach der Bildung der Glykokalix zustande.

Ein vollständiges, verständliches Profil der Spermienplasmamembran besteht bisher nicht. Weitere Erkenntnisse in diesem Bereich würden sowohl die Grundlagenforschung als auch den klinischen Einsatz deutlich voranbringen.

### **1.3 Grundlagen des Spermientransports im weiblichen Genitaltrakt**

#### **1.3.1 Spermientransport durch Vagina und Uterus**

Die typische Zusammensetzung des Ejakulats ist nur außerhalb des Organismus zu finden. Die Grundlage hierfür ist die Bildung der einzelnen Bestandteile in Prostata, Ampulla des Ductus deferens, Nebenhoden und in den Samenbläschen. Die Zusammensetzung und Abgabe geschieht erst während der Ejakulation. Nach anfänglicher Koagulation des Ejakulats beginnt nach einer halben bis einer Stunde die enzymatische Liquefizierung [59]. Wichtigster Faktor des Abbaus ist dabei das Prostata-spezifische-Antigen (PSA) [60]. Es wird vermutet, dass die anfängliche Koagulation dazu dient, dass sich das Ejakulat am Muttermund sammeln und halten kann [61].

Nach der Liquefizierung verlassen die Spermien die Vagina in Richtung des äußeren Muttermunds, um das schädliche Säuremilieu und Immunreaktionen zu vermeiden. Als weiteren Schutzmechanismus puffert das alkalische Ejakulat das stark saure Milieu ab [62] und schützt dadurch die Spermien, die sonst immobilisiert werden können [63]. Dem Seminalplasma werden außerdem weitere Schutzfunktionen zugeschrieben, die sowohl die schädliche Immunreaktion inhibieren, als auch direkte, protektive Komponenten zum Schutz der Spermien enthalten [64, 65].

Der Weg in Richtung Oozyte wird durch eine Kombination aus Chemotaxis und Thermotaxis gebildet. Bei der Aszension im weiblichen Geschlechtstrakt gibt es dabei mehrere große Hindernisse, die auf der einen Seite der Selektion der Spermien dienen, auf der anderen Seite aber auch die Chance der Fertilisierung erhöhen sollen: Spermien sind allogenetisch zum weiblichen Organismus, werden damit als potenziell infektiöse Organismen erkannt und bewirken eine Reaktion des Immunsystems. Dies zeigt sich in der Migration von Leukozyten, Neutrophilen und Makrophagen sowohl in der Vagina als auch in der Zervix [41, 66, 67]. Eine weitere Selektion betrifft die Morphologie und Motilität der Spermien: Der zervikale Mukus kann von abnormal geformten oder langsam schwimmenden Spermien nicht gut durchdrungen werden [68-70].

Über den zeitlichen Ablauf und die Länge der Passage der Spermien durch den Uterus ist wenig bekannt. Allerdings konnten auch in der humanen Zervix motile Spermien bis zu fünf Tage nach Insemination nachgewiesen werden [71].

### **1.3.2 Spermientransport im Eileiter**

Die verschiedenen Regionen des Eileiters (uterotubale Junktion, Isthmus und Ampulla) spielen unterschiedliche Rollen beim Spermientransport und deren Selektion:

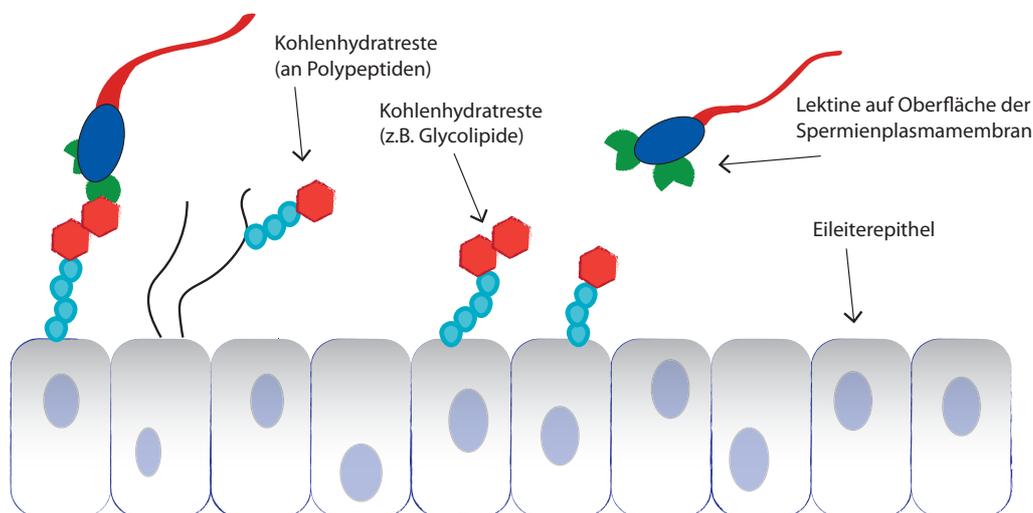
#### **1.3.2.1 Passage der uterotubalen Junktion**

Von den ursprünglich mehreren Millionen Spermien passieren letztendlich nur einige tausend das enge Lumen zwischen Uterus und Eileiter. Ähnlich wie in der Zervix kann der vor Ort gebildete Mukus nur von progressiv motilen Spermien durchdrungen werden. Entscheidend für die Passage scheint außerdem die Expression verschiedener Proteine zu sein. Beispiele hierfür sind das Spermatogenese-spezifische Chaperon-Protein Calmegin oder das Plasmamembran-Protein Fertilin  $\beta$ . In Versuchen mit Mäusen konnten motile und normal geformte Spermien von entsprechenden knock-outs weder die uterotubale Junktion passieren, noch an die Zona pellucida binden [72, 73]. Es besteht außerdem Evidenz dafür, dass jedes einzelne Spermium die entsprechenden Proteine exprimieren muss. In weiteren Versuchen wurden hierfür Spermien von knock-out Mäusen mit Wildtyp-Spermien gemischt. Letztere waren nicht fähig, die Uterus-Eileiter-Verbindung für die knockout Spermien zu öffnen [45]. Der genaue funktionelle Mechanismus der Interaktion zwischen der uterotubalen Junktion und den Spermien-Oberflächenproteinen ist bisher jedoch noch unbekannt.

#### **1.3.2.2 Passage von Isthmus und Ampulla**

Nach der Passage in den Eileiter bindet der Großteil der Spermien an das Eileiterepithel (schematische Darstellung siehe Abbildung 5). Wie im Tiermodell bereits mehrfach gezeigt, geht man auch beim Menschen davon aus, dass ein Spermienreservoir in der Isthmus-Region des Eileiters gebildet wird, das einen wichtigen Bestandteil für eine erfolgreiche Fertilisierung darstellt [18, 74]. Bereits 1963 konnte das erste Mal ein Spermienreservoir im Tubenisthmus des Hamsters nachgewiesen werden [75]. Seitdem wurden diese Erkenntnisse in vielen weiteren Spezies bestätigt (Maus [76], Hase [77, 78], Schaf [79], Kuh [80], Schwein [81]).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bindung zwischen Spermium und Eileiter. Die Bindung wird über Lektine auf der Oberfläche der Spermienplasmamembran und Glykanresten auf dem Eileiterepithel vermittelt.



Drei verschiedene Funktionen des Reservoirs werden in der Literatur diskutiert:

*Erstens* scheint sich durch die Bindung an den Eileiter die Lebensdauer und die Fertilität der Spermien zu verlängern. In vitro Versuche konnten die längere Überlebensfähigkeit und bessere Motilität von humanen Spermien zeigen, wenn sie zusammen mit Eileiterepithel inkubiert wurden [82].

*Zweitens* konnte ebenfalls im humanen Modell gezeigt werden, dass das Reservoir den Spermien ermöglicht, sich zum Zeitpunkt der Ovulation im richtigen physiologischen Status zu befinden. Verschiedene Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass die Kapazitation der gebundenen Spermien verzögert ist [83, 84]. Während des Haltens der Spermien im Reservoir verbrauchen diese außerdem weniger  $\text{Ca}^{2+}$  und können dadurch die begrenzte Energie sparen. Beim Lösen aus dem Reservoir konnte eine verstärkte Hypermotilität nachgewiesen werden [83, 85]. Die genauen Mechanismen hinter der verringerten zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sind jedoch bisher nicht genauer beschrieben.

*Drittens* scheint das Spermienreservoir Mehrfachbefruchtungen der Oozyte (Polyspermie) zu vermindern, indem sich die Spermien graduell aus der Bindung lösen. Dies wurde beispielsweise durch Injektion einer großen Spermienzahl in den Eileiter [86, 87] oder die lokale Progesteron-Gabe in die Muskularis des Eileiters zur Verminderung der Kontraktionen des Lumens [88, 89] experimentell untersucht. In beiden Fällen wurde damit das Spermienreservoir umgangen, woraus eine erhöhte Polyspermie-Inzidenz resultierte.

Im Tiermodell konnte vor allem eine Bindung der Akrosomen-Region der Spermien an zilientragende Zellen beobachtet werden [52]. Weitere Untersuchungen zeigen aber, dass eine Bindung an Mikrovilli nicht-zilientragender Zellen auch vorkommen kann [90, 91]. Im humanen Modell konnte unsere Forschungsgruppe wiederum die Bindung an sekretorische Zellen des Eileiterepithels zeigen [92]. Auf molekularer Ebene geht man davon aus, dass verschiedene Kohlenhydrat-Reste auf Seite des Eileiters eine Bindung mit Lektinen auf der Oberfläche der Spermienplasmamembran eingehen [18]. Bisher konnte gezeigt werden, dass auf dem Epithel Sialinsäure- [93], Fucose- [94], N-acetylglucosamin- [95], Galactose- [96] und Mannose-Reste [97, 98] für die Bindung entscheidend sind. Interessant ist dabei, dass für jede bisher untersuchte Tierart ein Spezies-spezifischer Zucker eine tragende Rolle spielt.

Unklar ist, wie diese Bindung beim Menschen aussieht und welche exakte Rolle sie spielt. Ob auch hier, wie beim Tiermodell, eine Kohlenhydraterkennung vonnöten ist [18] oder eine Erkennung über Integrine erfolgt, ist nicht ausreichend untersucht [99, 100].

Das Lösen der Spermien aus dem Reservoir wird durch hormonelle Faktoren der Frau eingeleitet, die zwei wichtige Veränderungen der Spermien triggern [101]: Zum einen findet durch die beginnende Kapazitation eine Veränderung der Plasmamembran der Spermien statt [18], auf der anderen Seite werden die Spermien zunehmend hypermotil [102, 103]. Beides führt letztendlich dazu, dass sich die Spermien vom Eileiterepithel lösen können. Die Hyperaktivierung der Spermien ist auch auf dem weiteren Weg zur Oozyte für eine erfolgreiche Befruchtung essentiell. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass hyperaktivierte Spermien den viskoelastischen Mukus in der Ampulla des Eileiters besser durchdringen können [104, 105] (siehe auch 1.3.2.2). Eine wichtige Rolle spielt die Hyperaktivität außerdem beim Durchdringen der Hüllen der Zona pellucida der Oozyte.

Wie genau die Spermatozoen den weiteren Weg zur Oozyte finden ist bisher nicht abschließend geklärt. Eine Kombination aus verschiedenen chemotaktischen, chemokinetischen, olfaktorischen und thermotaktischen Reizen wird diskutiert [18, 101, 106].

### **1.4 Auswirkung einer Tabakabhängigkeit auf die männliche Reproduktion**

Trotz der mittlerweile umfangreich erforschten negativen Auswirkungen des Rauchens auf die Gesundheit des Organismus gibt es weiterhin eine hohe Anzahl an Rauchern weltweit.

Nach Daten der Weltgesundheitsorganisation WHO ist die Prävalenz der männlichen Raucher über 15 Jahre weltweit auf 36% gefallen [107]. Gemäß statistischer Erhebungen aus dem Jahr 2018 rauchen in Deutschland im Jahr 2010 26,4% der männlichen Bevölkerung zwischen 18 und 64 Jahre - Tendenz jedoch sinkend [108].

In dieser Arbeit soll vor allem auf die Effekte des Tabakkonsums auf die männliche Reproduktion eingegangen werden. Die Auswirkungen auf die weibliche Zeugungsfähigkeit sind teilweise noch gravierender [109-115].

Ein Großteil der negativen Effekte von Tabak und seinen Inhaltsstoffen auf den menschlichen Körper ist weitgehend gut beschrieben. Die meisten Menschen in der Bevölkerung wissen von den entsprechenden Risiken, die von malignen Prozessen über respiratorische Erkrankungen bis zu negativen Auswirkungen auf das Herz-/Kreislaufsystem reichen. In der Bevölkerung weniger verbreitet ist jedoch das Wissen, dass Tabakrauchen zur Infertilität beider Geschlechter beitragen kann [116].

Zigarettenrauch besteht aus zwei Komponenten: In der gasförmigen Phase wird gesundheitsschädliches Kohlenstoffmonoxid frei [117]. Dazu finden sich in der partikelhaltigen Phase vor allem Stoffe wie Teer und Nikotin. Durch chemische Prozesse werden beim Rauchen über 4000 weitere Bestandteile freigesetzt. Eine Vielzahl von ihnen werden als potenziell mutagen, aneugen oder karzinogen mit direkter Wirkung auf männliche und weibliche Keimzellen und menschliche Embryonen angesehen [118, 119].

#### **1.4.1 Auswirkungen des Tabakkonsums auf das Spermogramm**

Obwohl die Auswirkungen des Tabakrauchens auf die Spermienqualität und -parameter kontrovers diskutiert werden, zeigen viele Arbeiten eine Verschlechterung des Spermogramms bei Rauchern [119-126].

Der genaue Mechanismus ist hierbei noch nicht endgültig verstanden. Vermutet werden neben einer Schädigung der Spermien-DNA vor allem der Einfluss auf das Epithel der Keimdrüsen [118], die chemische Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse [127], die Änderung der Mikrozirkulation im Hoden [128, 129] und Pathologien an den Mikrotubuli-Strukturen [130].

Studien zur Beurteilung der funktionellen Spermienqualität bei Rauchern existieren bisher nicht. Das Seminalplasma spielt während Reifung und Transport eine wichtige Rolle für eine uneingeschränkte Spermienfunktion (siehe auch 1.3). Weitere Erklärungen für die Schädigung der Spermien und Verschlechterung der Ejakulatparameter bei Rauchern sind deshalb bei Veränderungen des Seminalplasmas zu suchen. Hier lassen sich bei Rauchern erhöhte Spiegel von Nikotin-Abbauprodukten [131, 132], Schwermetallen wie Kadmium und Blei [133, 134] sowie vermehrt freie reaktive Oxidantien [135] nachweisen.

#### **1.4.2 Auswirkungen des Tabakkonsums auf die Fertilität**

Obwohl einige Studien auf die Verschlechterung der Spermogrammparameter bei Rauchern hindeuten, ist es nicht möglich, eine endgültige Aussage zur Fertilität bei Selbigen zu treffen. Ein

Studiendesign, das den direkten Zusammenhang zwischen Rauchen und männlicher Fertilität bei natürlicher Reproduktion misst, ist schwer umsetzbar. Trotzdem stellen verschlechterte SpermioGrammparameter, wie es bei Rauchern der Fall sein kann (siehe 1.4.1), einen Baustein für verminderte männliche Fruchtbarkeit dar.

Die Auswirkungen des Rauchens auf die Fertilität des Mannes scheinen sowohl bei natürlicher als auch bei assistierter Reproduktion gegeben, auch wenn die genauen Mechanismen weiterhin nicht endgültig geklärt sind [116, 119, 136, 137].

## 2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Grundlagen dieser vorliegenden Arbeit sind aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und Kooperationspartner zum Thema Spermien-Eileiter Interaktion beim Menschen [138-140]:

- Die Spermien-Eileiter-Interaktion beruht sowohl im tier- als auch im humanen Modell auf einer Lektin-Kohlenhydrat-Interaktion.
- Diese Bindung wird als Grundlage für die Bildung eines Spermienreservoirs in Isthmus und/oder Ampulla des Eileiters gesehen.
- Durch das Reservoir kann für die Spermien eine längere Überlebensfähigkeit im weiblichen Geschlechtstrakt resultieren und das Risiko der Polyspermie vermindert werden. Weiterhin hilft die Eileiterbindung, dass möglichst viele Spermienzellen zum Zeitpunkt der Ovulation im richtigen physiologischen Status sind.
- Die beschriebene Interaktion scheint daher die Wahrscheinlichkeit für eine Befruchtung zu erhöhen und spielt somit für eine erfolgreiche Reproduktion eine wichtige Rolle.

Von Seiten der Spermien ist für die Interaktion mit dem weiblichen Reproduktionstrakt eine vollständige Funktion der Spermienplasmamembran erforderlich:

- Eine veränderte Spermienplasmamembran, beispielsweise durch Einfluss von Tabakkonsum, steht im Verdacht ein Baustein für das komplexe Geschehen einer männlichen Infertilität zu sein.
- Modifizierte oder fehlende Moleküle auf der Oberfläche könnten die Bindungsfähigkeit des Spermiums im weiblichen Reproduktionstrakt herabsetzen und damit die Erfolgchancen einer Befruchtung vermindern.

Weiterhin ist es bisher nicht möglich die „funktionelle Spermienqualität“ zu untersuchen. Entsprechend wird aktuell bei einem Drittel der Infertilitäts-Patienten die Diagnose „idiopathische Infertilität“ als Ausschlussdiagnose vergeben.

Die Ziele der Arbeit sind daher:

- Die Untersuchung, ob und welche, für eine Spermien-Eileiter-Interaktion relevanten Kohlenhydrat-bindenden Strukturen auf der Spermienplasmamembran vorhanden sind.
- Die Analyse, ob Tabakkonsum zu einer Veränderung der Plasmamembran führt und damit die Bindungskapazität der Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt verringern könnte.
- Eine mögliche Reversibilität des Effekts nach Beendigung des Tabakkonsums zu untersuchen.
- Ansätze für die Optimierung der Untersuchung der „funktionellen Spermienqualität“ zu liefern.

### **3 Material & Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Setting und Patientenkollektiv**

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Ambulanz der Andrologie der Urologischen Klinik und Poliklinik der LMU München. Das Sammeln der Proben erstreckte sich über einen Zeitraum von Februar 2016 bis Juli 2017. Die Patienten kamen vor allem aus folgenden Gründen zur Ejakulatabgabe:

- Abklärung eines unerfüllten Kinderwunsches
- Kontrollen vor oder nach einer Chemotherapie
- Kontrollen vor oder nach einer Operation (bspw. Varikozelen-OP, Vaso-Vasostomie)
- diagnostische Zwecke bei genetischen Erkrankungen oder hormonellen Störungen

In diese Studie wurden alle Patienten eingeschlossen, die

- vom 01.02.2016 bis 31.07.2017 erstmalig oder zum wiederholten Male Ejakulat zu diagnostischen Zwecken in der Ambulanz der Andrologie der Urologischen Klinik und Poliklinik der LMU München abgegeben hatten,
- bisher nicht in eine parallellaufende oder dieselbe Studie eingeschlossen wurden,
- keine Aspermie vorlag,
- keine Azoospermie vorlag,
- die Ejakulatmenge und Spermienanzahl ausreichend für die nachfolgenden Versuche war,
- keine weitere Diagnostik mithilfe des Ejakulats geplant war (Verschlussparameter etc.)
- zum Zeitpunkt der Untersuchung über 18 Jahre alt und zustimmungsfähig waren,
- der Teilnahme nach Aufklärung per Unterschrift zustimmten.

Die Teilnahme an der Studie erfolgte freiwillig und unverblindet. Die Patientendaten wurden mit Hilfe einer Patientenliste mit fortlaufender Nummerierung pseudonymisiert. Im Falle einer Rückfrage des Patienten oder des nachträglichen Widerrufs des Einverständnisses konnte so von der fortlaufenden Nummer auf den Namen rückgeschlossen werden und umgekehrt.

Die Aufklärungs- und Fragebögen werden datenschutzgerecht und nicht einsichtig aufbewahrt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission bewilligt (Antrag NR. 505-14).

Bei Nicht-Teilnahme entstand den Patienten kein Nachteil, sie wurden in der gleichen Weise medizinisch betreut wie die Studienpatienten. Die Patienten, die initial einer Studienteilnahme zugestimmt hatten, konnten jederzeit ohne Angabe von Gründen ihr Einverständnis widerrufen.

Insgesamt konnten 102 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. 10 Patienten konnten nach oben genannten Kriterien nicht in die Studie eingeschlossen werden, obwohl sie ihre Zustimmung gegeben hatten (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Gründe für Ausschluss aus der Studie trotz Zustimmung der Patienten.

Gründe für Studienausschluss	Anzahl ausgeschlossener Patienten
Azoospermie oder Kryptozoospermie	9
Zu geringes Ejakulatvolumen (<0,5mL)	1

### 3.1.2 Datenerfassung

Vor der Ejakulatabgabe wurden die Patienten in einem Gespräch ausführlich aufgeklärt (Patienteninformation und Einverständniserklärung) und per Fragebogen zu folgenden Faktoren befragt (siehe Kapitel 8.1):

- Alter
- Größe
- Gewicht
- relevante Vorerkrankungen (erfolgte Chemotherapie, Hodenhochstand (beidseitig/einseitig, urogenitale Vor-OP, bekannte genetische Auffälligkeiten, bösartige Erkrankung, Urogenitale Infektionen, Mumpsinfektionen, Sonstiges)
- Medikamentenanamnese
- Kinder (wenn „Ja“: Anzahl und Alter der Kinder)
- unerfüllter Kinderwunsch (wenn „Ja“: Dauer)
- Rauchen (wenn „Ja“: seit wann und wie viel; wenn „Früher“: seit wann aufgehört, wie viel vor dem Aufhören)
- weitere Bemerkungen

Mit Hilfe der Arztbriefe aus der Patientenakte (elektronisch über das MedPortal der LMU München (SAP)) konnten einige wichtige fehlende Informationen (vor allem zum Zeitraum eines bestehenden Kinderwunsches) ergänzt werden.

### 3.1.3 Studienablauf

Nach beschriebener Aufklärung und Befragung des Patienten wurde das abgegebene Ejakulat zuerst für die normale Diagnostik verwendet. Die restliche Menge wurde in dieser Zeit auf einer Wärmeplatte bei 37°C beheizt und konnte anschließend im Andrologischen Labor in den Räumlichkeiten des Laserforschungslabors (LFL) der LMU für die wissenschaftlichen Zwecke unserer Studie aufbereitet werden (siehe 3.2.1).

### 3.1.4 Spermogramm

Durch die Kooperation mit dem Andrologischen Labor der Urologischen Klinik und Poliklinik konnten uns die Spermogramme der Patienten aus unserer Studie zur Verfügung gestellt werden. Die Erhebung der Spermogramme erfolgte stets durch die selbe medizinisch-technische Assistentin (MTA), die an regelmäßigen Qualitätskontrollen (QuaDeGa) teilnahm. Es wurden folgende Daten gemäß den WHO Kriterien 2010 ausgewertet [15]:

- Abgabedatum und -zeit
- Ejakulatvolumen
- PH-Wert
- Konzentration in Mio/ml
- Motilität in A, B, C, D (schnell progressiv beweglich, langsam progressiv beweglich, nicht progressiv beweglich, immotil), gem. WHO-Kriterien 1999 [141]
- Verflüssigungszeit
- Leukozytentest
- Rundzellen
- Vitalität
- Morphologie (pathologische Formen, Normalformen)

### 3.1.5 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte.

Artikel	Hersteller
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG; Hamburg, GER
chemiPRO XL6 Western Blot Imaging System	Cleaver Scientific Ltd; Warwickshire, UK
Counter AC-8	Karl Hecht GmbH; Sondheim, GER
Cyberscan 100 pH measuring	Eutech Instruments; Landsmeer, NL
Electrophoresis supply – EPS 301	Amersham Biosciences; Amersham, GBR
FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, GER
Feinwaage BP 310 S	Sartorius AG; Göttingen, GER
Heizplatte	Peqlab – Biotechnologie GmbH; Erlangen, GER
Heizplatte histoplate	Leica; Wetzlar, GER
Leica DFC450	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
Leica DM IRBE	Leica Microsystems; Wetzlar, GER

Artikel	Hersteller
Leica DM1000	Leica Microsystems; Wetzlar, GER
Magnetrührer	HANNA Instruments, Langnau, CH
NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Olympus iX 81 confocal microscope	Olympus K.K.; Tokio, Japan
Pipetten Eppendorf research plus	Eppendorf; Hamburg, GER
Spezial Feinwaage BP310 S	Sartorius AG; Göttingen, GER
Ultraschallbad CD-7920	Sharpertek; Pontiac, USA
Wärmeschrank MiniTherm CT	VIVASCIENCE; Göttingen, GER
XCELL II <sup>tm</sup> blot module	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
XCELL SureLock <sup>tm</sup> electrophoresis cell	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Kat. No.	Hersteller/Lieferand
100er- SliBo Objektträgerbox	733011	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, GER
Bolt <sup>tm</sup> Empty Mini Gel Cassette Combs, 10-well	NW3010	Life Technologies; Carlsbad, USA
Bolt <sup>tm</sup> Empty Mini Gel Cassettes	NW2010	Life Technologies; Carlsbad, USA
Deckgläser (High Precision) 24x50 mm	DH50	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Deckgläser 24x50 mm	D263 M	SCHOTT AG; Mainz, GER
Falcon <sup>tm</sup> 15 mL Conical Tubes	352096	BD Biosciences; Durham, USA
Falcon <sup>tm</sup> 50 mL Conical Tubes	352070	BD Biosciences; Durham, USA
Glas Pasteur Pipetten	7477.15	Brand GmbH, Wertheim, GER
Handschuhe Vasco Basic M	6066624	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, GER
Immobilon-P Transfermembran, PVDF, 0,45 µm	IPVH00010	Merck KGaA; Darmstadt, GER
Kimtech Präzisionswischtücher	5511	Kimberly Clark; Reigate, USA

Artikel	Kat. No.	Hersteller/Lieferand
Menzel-Gläser, Objektträger 76x26 mm	1401683	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Reloads 0,1-20 µl	0030073762	Eppendorf AG; Hamburg, GER
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Reloads 2-200 µl	0030073800	Eppendorf AG; Hamburg, GER
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Reloads 50-1000 µl	0030073843	Eppendorf AG; Hamburg, GER
Reaktionsgefäße mit Deckel, 0,5ml	RK05	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Reaktionsgefäße mit Deckel, 1,5 ml	RK1G RK11-RK13	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Safe-Lock Tubes 2,0ml	0030120094	Eppendorf AG; Hamburg, GER
Sponge Pad for XCell II™ Blotting	EI9052	Life Technologies; Carlsbad, USA
SuperFrost™ Plus Mikroskopobjektträger, 75 x 25 x 1 mm	J1800AMNZ	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Wägeschalen 100 ml, 115x85x15	WAB2	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Wägeschalen 100 ml, 80x80x25	WAE2	A. Hartenstein GmbH; Würzburg, GER
Western Blotting Filter Paper	84783	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA

### 3.1.7 Chemikalien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Artikel	Kat. No.	Hersteller
Acrylamid 4K - Lösung (30 %) - Mix 37,5 : 1	A1672	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
Albumin (BSA) Fraktion V (pH 7,0)	A1391	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
Ammoniumpersulfat (APS)	A3678	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Avidin-Alkaline Phosphatase	A7294	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
BCIP®/NBT Liquid Substrate System	B1911	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Bromphenolblau	B0126	Sigma Aldrich; St. Louis, USA

Artikel	Kat. No.	Hersteller
CaCl <sub>2</sub> Pulver	C2661	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Dako Fluorescent Mounting Medium	S302380-2	Agilent Technologies; Glostrup, DEN
Ethanol absolut EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	1.00983.5000	Merck KGaA; Darmstadt, GER
Glycerol	G2025	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Glycin	A1067	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
KCl	7447-40-7	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P5655	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit (SYBR® 14/ propidium iodide (PI))	L7011	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
MagicMark™ XP Western Protein Standard	LC5603	Life Technologies; Carlsbad, USA
Methanol, ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	131091.1214	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
MgCl <sub>2</sub>	M9272	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
MitoProbe JC-1 Assay Kit	M34152	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
MitoTracker™ Deep Red FM	M22426	Invitrogen, life technologies; Carlsbad, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	T9281	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.06559.0500	Merck KGaA; Darmstadt, GER
NaCl	231-598-3	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
NiCl <sub>2</sub> Pulver	339350	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Normal Donkey Serum	ab7475	Abcam plc; Cambridge, UK
NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (DAPI)	R37606	Life Technologies; Carlsbad, USA
PFA	158127	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	32209	Life Technologies; Carlsbad, USA
Salzsäure 6mol/l (6N)	182883.1211	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER
SDS - Lösung 20 %	A0675	AppliChem GmbH; Darmstadt, GER

Artikel	Kat. No.	Hersteller
SeeBlue™ Pre-stained Protein Standard	LC5625	Life Technologies; Carlsbad, USA
SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets	S8820	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Sodium orthovanadate	S6508	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Sodium phosphate decahydrate	04273	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Triton X-100	X100	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Trizma® Base	T1503	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Trizma® HCT	T6666	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Tween® 20	P1379	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	M3148	Sigma Aldrich; St. Louis, USA

### 3.1.8 Puffer

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Puffersubstanzen.

Puffer	Inhaltsstoffe
Binding Buffer	2mM CaCl <sub>2</sub> 1mM NiCl <sub>2</sub> 154mM NaCl 0,05% Tween-20 ad Aqua dest.
Blotpuffer für Western Blot (1000 ml)	3,032g Tris Base 14,4g Glycin 200ml Methanol ad Aqua dest.
Fixierlösung (50 ml)	2 % PFA 0,3 % Tween-20 0,2 % Triton X-100 ad Aqua dest.
Laufpuffer für SDS-Page 10x (1000 ml)	30g Tris Base 144g Glycin 10g SDS 20% ad Aqua dest.
Loading Buffer 5x pH 6,8 (10 ml) Lagerung: 4°C	2,4 ml Tris HCL (1 M) 3 ml 20 % SDS 3 ml Glycerol 1,6 ml β-Mercaptoethanol 0,004 % Bromphenolblau

Puffer	Inhaltsstoffe
Lower Tris 4x pH 8,8 (1000 ml)	181,7 g Tris Base 20 ml SDS 20 % ad Aqua dest.
PBS pH 7,4 (1000 ml)	8g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad Aqua dest.
Protein extraction solution, pH 6,8 (50 ml), Lagerung: -20°C	0,302g Tris Base 5ml SDS 20% 20ml Glycerol 22,3mg Sodium phosphate decahydrate 9,2mg Sodium orthovanadate ½ Tbl. Protease Inhibitor ad Aqua dest.
TBST 10x pH 7,5 (1000 ml)	100 ml Tris-HCl (1 M) pH 8 300 ml NaCl (5 M) 20 ml Tween-20 ad Aqua dest.
Upper Tris 4x pH 6,8 (1000 ml)	60,6 g Tris Base 20 ml 20 % SDS ad Aqua dest.

### 3.1.9 FITC konjugierte Kohlenhydratreste

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten FITC-Kohlenhydratreste.

Artikel	Kat. No.	Hersteller
α-D-Galactose-PAA-fluor.	03-003	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
α-D-Mannose-PAA-fluor.	03-005	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
α-L-Fucose-PAA-fluor.	03-007	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
β-GlcNAc-PAA-fluor.	03-009	GlycoTech Corporation; Frederick, USA

### 3.1.10 Biotinylierte Kohlenhydratreste

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten biotinylierten Kohlenhydratreste.

Artikel	Kat. No.	Hersteller
α-D-Mannose-PAA-biotin	01-005	GlycoTech Corporation; Frederick, USA
α-Neu5Ac-PAA-biotin	01-012	GlycoTech Corporation; Frederick, USA

### 3.1.11 Antikörper

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Artikel	Kat. No.	Hersteller
Anti-LMAN2/VIP36 (AB1) antibody produced in rabbit	AV46788	Sigma Aldrich; St. Louis, USA
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	R37118	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	31466	Life Technologies; Carlsbad, USA

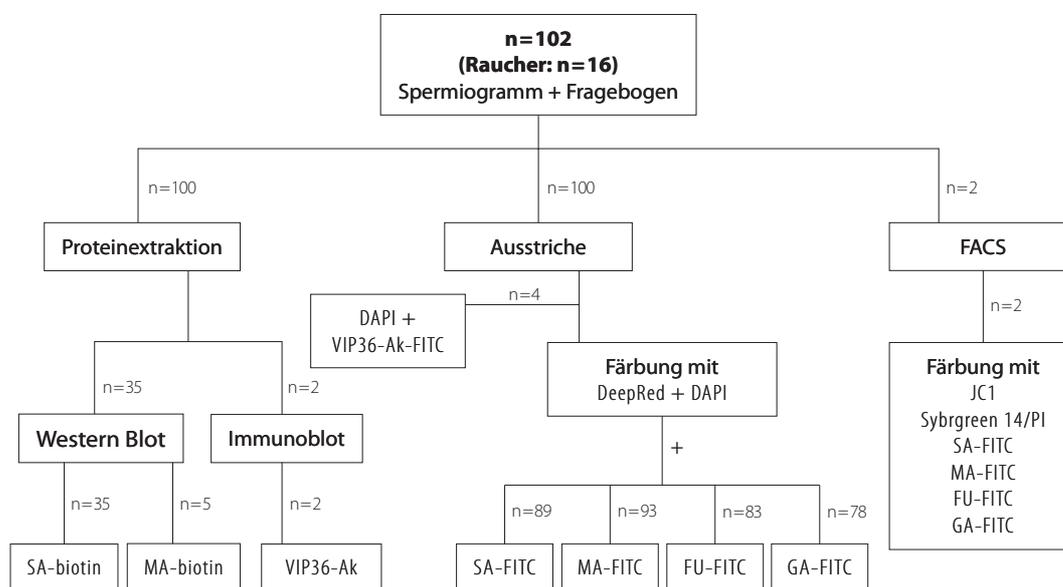
### 3.2 Methoden

Insgesamt konnten 102 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Von 100 Ejakulaten wurden Proteinextraktionen und Ausstriche auf Objektträgern angefertigt. Die Proteinextraktionen wurden für Western- und Immunoblot benutzt. Die Ausstrichpräparate wurden nach Dreifachfärbung oder nach Inkubation mit dem VIP36-Ak konfokalmikroskopisch analysiert. Bei zwei Patienten wurde exemplarisch eine Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Die folgende Abbildung stellt den genauen methodischen Ablauf dar:

Abbildung 6: Schematische Darstellung der angewendeten Methodik mit den entsprechenden Patientenzahlen.

FACS = fluorescence-activated cell sorting, VIP36 = Vesicular integral protein of 36 kDa, Ak = Antikörper,

FITC = Fluoresceinisothiocyanat, SA = Sialinsäure, MA = Mannose, FU = Fucose, GA = Galactose.



#### 3.2.1 Probenaufbereitung und Lagerung

Während der Analyse der Proben im andrologischen Labor und Anfertigung der Spermio-gramme wurden die Proben auf einer Wärmeplatte gewärmt. Maximal 60 min nach Abgabe konnte die Aufbereitung der frischen Ejakulatproben erfolgen. Durchgeführt wurden eine Prote-  
teinextraktion sowie parallel Ausstriche für die Konfokalmikroskopie.

Pro Ejakulatprobe wurden zweimal 500 µl des Ejakulats 1:3 mit PBS verdünnt. Von beiden Pro-  
ben wurde das Seminalplasma abzentrifugiert (8 min bei 800 rpm) und verworfen. Anschließend wurde je eine Probe für die Proteinextraktion beziehungsweise für die Ausstriche genutzt.

### 3.2.1.1 Proteinextraktion

Das nach dem Zentrifugieren übrig gebliebene Pellet wurde mit 500 µl PBS resuspendiert und erneut bei 8 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl protein extraction solution gelöst. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Probe mit einer Mikropistille. Die Probe wurde 3 min ins Ultraschallbad gegeben und anschließend 5 min auf 100°C erhitzt. Bei 2400 rpm wurde 5 min zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Per Nanodrop (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Aus drei Messwerten wurde der Mittelwert gebildet, mit dessen Hilfe beim SDS-Page (siehe 3.2.3) eine Normierung der Proteinmenge durchgeführt werden konnte.

Die extrahierten Proteine wurden bei -20°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut.

### 3.2.1.2 Anfertigung von Ausstrichpräparaten

Die Spermienkonzentration in der zweiten Probe wurde mit PBS auf eine Konzentration von ca. 20 Mio Spermien pro ml gebracht.

Anschließend wurden die Proben auf Objektträgern verteilt. Jedes Präparat erhielt 8 µl der hergestellten Probe. Auf einer Heizplatte wurde die Flüssigkeit getrocknet und bei -20°C tiefgefroren.

## 3.2.2 Fluoreszenzfärbung

### 3.2.2.1 Fluoreszenzfärbung mit FITC-konjugierten Kohlenhydratresten

Vor der Mikroskopie wurden die tiefgefrorenen Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und nach einem standardisierten Protokoll behandelt. Gefärbt wurde mit DAPI (Zellkernfärbung, 405 nm UV) und einem FITC-konjugierten Zuckerrest (488 nm). Verwendet wurden Sialinsäure- (SA), Mannose- (MA), Fucose- (FU) und Galactose-Reste (GA) der Firma GlycoTech Corporation; Frederick, USA.

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und für 30 min in einer Fixierlösung (siehe 3.1.8) inkubiert. Während den gesamten Arbeitsschritten lagerten die Präparate lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Die Fixierlösung wurde entfernt und anschließend für weitere 30 min mit 1% BSA-Lösung in PBS unspezifische, proteinbindende Flächen abgesättigt. Die Färbelösung (DAPI + 30 µg/ml FITC-konjugierter Zucker) wurde währenddessen lichtgeschützt hergestellt.

Die BSA-Lösung wurde entfernt und die Präparate mit 50 µl Färbelösung für eine Stunde bedeckt. Auch dieser Schritt fand lichtgeschützt in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur statt. Nach

der Inkubation wurden die Objektträger drei Mal mit PBS gewaschen und damit die Reste der Färbelösung entfernt. Die Objektträger wurden mit fusselfreien Tüchern getrocknet und mit „Dako Mounting Medium“ und Deckglas bedeckt.

Negativkontrollen wurden ohne die jeweiligen FITC-konjugierten Zuckerreste bei ansonsten gleichem Protokoll durchgeführt.

Bei 20 Proben wurde zusätzlich der Mitotracker Deep Red (633nm) ergänzt. Diese Färbung muss an frischen Spermien durchgeführt werden, bei denen das Membranpotenzial erhalten ist und somit die Mitochondrien angefärbt werden können. Für die Inkubation wurde 300 ng/ml Farbstoff zu der entsprechenden frischen Probe gegeben und 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Anfertigung der Ausstriche erfolgte.

#### **3.2.2.2 Fluoreszenzfärbung mit FITC-konjugiertem-VIP36-Antikörper**

Tiefgefrorene Objektträger mit Ejakulatausstrichen der Patienten 065, 066, 067 wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und die Schnitte für 5 min mit PBS gewaschen. Die Flüssigkeit wurde schonend abgetupft und anschließend unspezifische Bindungen blockiert: Die erste Inkubation erfolgte 5 min in Blocking Buffer (1 g BSA in 70 ml PBS), die zweite in normal donkey serum 5% / Triton X 0,05 % in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Über Nacht wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper (Anti-LMAN2/VIP36 produced in rabbit, 1:100 in Blocking Buffer) inkubiert. Dazugegeben wurden zwei Tropfen DAPI. Die Lagerung fand dabei bei 4°C in einer Feuchtkammer statt.

Am nächsten Tag wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und in dunkler Umgebung die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Alexa488 Donkey anti-rabbit, 1:100 in Blocking Buffer) durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für je 5 min konnte mit Aqua dest. gespült und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt werden.

Eine Negativkontrolle wurde durchgeführt. Hierfür wurde bei ansonsten gleicher Prozedur der 1. AK durch PBS ersetzt.

#### **3.2.2.3 Konfokalmikroskopie (CLSM)**

Anschließend wurden die gefärbten Präparate mit einem Olympus iX 81 Konfokalmikroskop analysiert. Pro Präparat wurden fünf repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt und für die Auswertung gespeichert.

Für alle Bilder wurde das 60x Objektiv verwendet. Die Anregung erfolgte durch Laser der Wellenlänge 405 nm, 488 nm und 633 nm. Folgende Einstellungen lagen dabei zugrunde:

Tabelle 11: Einstellungen des Konfokalmikroskops Olympus iX 81.

Wellenlänge	Voltage	Gain	Offset	Intensität
405 nm	400-500 V	1x	8%	37,0%
488 nm	430-520 V	1x	0%	33,0%
633 nm	500-550 V	1x	15%	32,0%

### 3.2.2.4 Auswertung mit ImageJ

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.51) in Kombination mit dem Bioformats-Plugin. Mithilfe des ersten Kanals (DAPI) konnten alle Spermien gezählt werden, die auf der Aufnahme zu sehen sind. Im zweiten Kanal wurden mithilfe der „Lookup Table“ Funktion „Green Fire Blue“ die fluoreszierenden Spermien ausgezählt. Die Auszählung erfolgte händisch mit dem eingebauten „Multi Point Tool“.

Die Analyse und anschließende Auswertung erfolgte verblindet, d.h. ohne die Kenntnis der Patientendaten und des Fragebogens und immer vom gleichen Untersucher. Die Auszählung wurde unabhängig hiervon, stichprobenartig und verblindet von einem weiteren Untersucher durchgeführt und lieferte dieselben Resultate.

Auf den in dieser Arbeit abgebildeten Aufnahmen (Beispiel siehe Abbildung 11) stellen sich die Färbungen wie folgt dar:

- rot: Mitochondrien; Mitotracker DeepRed
- blau: Zellkerne; DAPI
- grün: Bindungsstellen mit FITC-konjugierten Zuckerresten (Sialinsäure, Mannose, Fucose oder Galactose)

Die abgedruckten Aufnahmen in dieser Arbeit wurden zur besseren Darstellbarkeit nachbearbeitet.

### 3.2.3 Kohlenhydratbindungssay- und Immunoblot

#### 3.2.3.1 SDS-Page

Verschiedene Protokolle zur Herstellung von Sammel- und Trenngel (10%) wurden vor Versuchsstart getestet. Die beste Auftrennung und Schärfe der Banden ergab sich mit folgendem Protokoll, das bei den anschließenden Versuchen verwendet wurde:

Tabelle 12: Rezeptur für Sammel- und Trenngel (10%).

Sammelgel		Trenngel 10%	
H <sub>2</sub> O	4,9 ml	H <sub>2</sub> O	6,10 ml
Upper Tris 4x	1,7 ml	Lower Tris 4x	3,75 ml
Acrylamid (37,5:1)	925 µl	Acrylamid (37,5:1)	925 µl
APS (10%)	75 µl	APS (10%)	75 µl
TEMED	7,5 µl	TEMED	7,5 µl

TEMED wurde als Letztes zum Trenngel hinzugefügt, welches direkt danach in die leere Kassette gegossen, mit 70% Ethanol bedeckt und 20 min ausgehärtet wurde. Nach dem Abkippen des Ethanols und dem Entfernen der Alkoholreste wurde dem Sammelgel das TEMED hinzugefügt, ebenfalls in die Kassette gegossen und mit einem 10-Well-Kamm bedeckt. Nach der Aushärtungszeit von 20 min konnte der Kamm entfernt werden. Die Wells wurden mit Laufpuffer ausgewaschen, die Kassette nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer komplett aufgefüllt.

Bis zu neun Proteinproben mit je 20 µl (25 µg Protein, 4 µl Loading Buffer 5x, ad H<sub>2</sub>O) wurden 5 min gekocht und jeweils neben 3,5 µl des Marker „See Blue“ aufgetragen.

Durch das Anlegen einer Spannung von 80 V wurde die Elektrophorese gestartet. Sammelten sich die Proben an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel wurde die angelegte Spannung auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der sichtbare Marker den unteren Teil des Gels erreicht hatte.

### 3.2.3.2 Western Blot

Im Folgenden wurde ein Wet Western Blot durchgeführt. Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach Geräteanleitung. Die Membran wurde auf die richtige Größe gebracht und anschließend in 100%igem Methanol für 1 min aktiviert. Das Gel aus der Elektrophorese wurde zwischen Membran, Filterpapier und Schwämmen möglichst frei von Luftblasen platziert, die Apparatur zusammengesetzt und mit Blotpuffer befüllt. Das Anlegen einer Spannung von 20 V startete den Transfer der Proben auf die Membran. Nach zwei Stunden konnte das Blotting gestoppt werden und die Membran per Kohlenhydratbindungs- oder Immunoblot weiterbearbeitet werden.

### 3.2.3.3 Liganden Blot

Der Liganden Blot wurde wie bei Cortés et al., 2004 vorbeschrieben durchgeführt und entsprechend angepasst [142]. Nach dem Protein Blot wurde die Membran mit Binding Buffer

gewaschen und über Nacht bei 4°C in Selbigem inkubiert, um nichtspezifische Bindungsstellen zu blockieren und die geblotteten Proteine zu renaturieren.

Am nächsten Tag wurde die Membran für 2 h in 500 ng/ml des entsprechenden biotinylierten Kohlenhydratrests ( $\alpha$ -Neu5Ac-PAA-biotin und  $\alpha$ -D-Mannose-PAA-biotin, GlycoTech Corporation; Frederick, USA) in Binding Buffer inkubiert. Anschließend wurde dreimal für jeweils 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran in 1:100.000 Avidin-Phosphatase in Binding Buffer für 1 h und drei weitere Waschungen mit TBST für je 5 min. Die Aktivität der Avidin-Phosphatase wurde während der Zugabe von 500  $\mu$ l BCIP®/NCP Substrats (Sigma Aldrich; St. Louis, USA) detektiert. Nach Sichtbarwerden der Banden konnte die Färbung durch Waschen mit Binding Buffer gestoppt werden. Es erfolgte eine Dokumentation der sichtbaren Banden und der Abgleich mit dem Spektrum des SeeBlue Markers.

Vor den Versuchsreihen erfolgte die Ermittlung der idealen Konzentration des Kohlenhydratrests und der Avidin-Phosphatase. Negativkontrollen ohne den jeweiligen Kohlenhydratrest wurden durchgeführt.

### 3.2.3.4 Immunoblot

Als Vorlage für die Methodik des Immunoblots diente "Current Protocols in Molecular Biology - Kapitel 10: Immunoblotting and Immunodetection" [143]. Nach laborinternen Standards und Vorversuchen wurde das Protokoll wie folgt angepasst:

Der Marker "MagicMark" und Proben der Patienten 060 und 068 (je 25  $\mu$ g Protein) wurden zur Elektrophorese aufgetragen. Anschließend wurde das Protokoll nach 3.2.3.1 und 3.2.3.2 durchgeführt.

Nach dem Western Blot wurde die Membran für 30 Minuten in 5% Milchpulver in TBST geblockt. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C auf einem Shaker in einer Lösung mit dem LMAN2/VIP36-Ak (1:400, Anti-VIP36 antibody produced in rabbit; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in 5% Milchpulver in TBST inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal je 10 min mit TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper (1:5000, goat anti rabbit IgG, secondary antibody, HRP; Life Technologies, Carlsbad, USA) für 1 h in TBST dazugegeben werden konnte. Nach weiteren drei Waschvorgängen mit jeweils 10 min in TBST wurden die beiden Bestandteile des Pierce™ ECL-Substrats 1:1 nach Anleitung gemischt. Die Membran wurde 1 min mit der Mischung bedeckt, anschließend getrocknet und zwischen Plastikfolien gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen. In einer Dunkelkammer wurde die Membran in eine Kassette gegeben und für 20-30 Sekunden belichtet (chemiPRO XL6 Western Blot Imaging System; Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK).

### 3.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das auf Einzelzellebene zur Analyse und Quantifizierung dient. Die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting; FACS) stellt eine spezielle Form der Durchflusszytometrie dar. Hierbei werden Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend im FACS-Gerät analysiert. Verwendet wurde das Gerät FACSCalibur der Firma Becton Dickinson.

Die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotenzials erfolgte mithilfe des Farbstoffes 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin jodid (JC-1, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) nach einem Verfahren beschrieben von Gravance et al., 2000, modifiziert nach Herstellerangaben und internen Laborstandards [144]. JC-1 liegt bei niedrigem mitochondrialem Membranpotenzial als monomeres Fluoreszenzfarbstoff vor und fluoresziert nach Laseranregung mit 488nm im grünen Spektrum. Bei einem hohen Mitochondrien-Membranpotenzial werden reversible JC-1 Aggregate gebildet, die orangenes Licht emittieren.

Die Plasmamembranintegrität der Spermien konnte mittels einer Färbung mit SYBR<sup>®</sup>14/PI dargestellt werden. Verwendet wurde dabei das LIVE/DEAD<sup>®</sup> Sperm Viability Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Das von Garner et al., 1999 beschriebene Verfahren wurde auch hier entsprechend angepasst [145]. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine hohe Affinität zur DNA. SYBR<sup>®</sup>14 ist membranpermeabel und färbt jede Zelle unabhängig vom funktionellen Zustand. PI hingegen ist nicht membranpermeabel, verdrängt jedoch bei geschädigter Plasmamembran SYBR<sup>®</sup>14 und führt zu einer Kernfärbung im roten Spektrum.

Die verwendeten FITC-Farbstoffe der Firma GlycoTech Corporation; Frederick, USA sind unter 3.1.9 dargestellt. Die optimale Konzentrationen der Farbstoffe für die Analyse humaner Spermatozoen wurden in Vorversuchen optimiert. Eine Negativkontrolle wurde durchgeführt.

Für die Experimente wurden Ejakulate von je einem Nichtraucher (Patient 101) und einem Raucher (Patient 102) verwendet. Von beiden Ejakulaten wurde ein Spermiogramm erstellt.

Pro Probe wurden 1 ml frisches Ejakulat mit PBS aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugierung bei 1000 rpm für 4 min und die Abnahme des Überstands. Das Pelett wurde mit PBS resuspendiert, wobei die Menge an PBS so gewählt wurde, dass die Spermienkonzentration nach dem Waschen bei 30-40 Mio/ml lag. Zu jeweils 60 µl der hergestellten Ejakulatverdünnung wurden die entsprechenden Färbelösungen gegeben, so dass folgende Endkonzentrationen erreicht wurden.

- JC 1 (2  $\mu$ M)
- Sybrgreen 14 (100 nM) + PI (12  $\mu$ M)
- Sialinsäure - FITC (30  $\mu$ g/ml)
- Mannose - FITC (30  $\mu$ g/ml)
- Fucose - FITC (30  $\mu$ g/ml)
- Galactose - FITC (30  $\mu$ g/ml)

Die hergestellte Lösung wurde 15 min lichtgeschützt inkubiert und anschließend am FACS-Gerät gemessen.

Das FACS wurde so eingestellt, dass pro Probe und Farbstoff je 50.000 Zellen gezählt wurden. Die Einstellungen der Kompensation wurden aus den Vorversuchen übernommen und nur geringfügig den Bedürfnissen angepasst, um die Trennschärfe zwischen den verschiedenen Populationen zu erhöhen.

Die optische Anregung erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 488nm. Die Emission von grüner Fluoreszenz von JC-1 (geringes mitochondriales Membranpotenzial) und von SYBR<sup>®</sup>14 (lebende Zellen) wurde mit dem Filter FL-1 bei 530nm detektiert. Bei hohem mitochondrialem Membranpotenzial formt JC-1 Aggregate und emittiert orange Fluoreszenz, die, ebenso wie die Fluoreszenz von PI (nicht membranpermeabler Farbstoff, Kernfärbung nur bei geschädigter Plasmamembran), mit dem Filter FL-2 (590nm) detektiert wurde. Für die FITC markierten Zellen wurde ebenfalls der Filter FL-1 (530nm) verwendet.

Die Eingrenzungen der einzelnen Spermienpopulationen erfolgte subjektiv nach laborinternen Standards mithilfe des Analyseprogramms Flowing Software 2.5.1.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Durch einen standardisierten Fragebogen wurden Informationen von jedem in die Studie eingeschlossenen Patienten erhoben. Die ausgewerteten Daten stellen den Status vom Tag der Ejakulatabgabe für die Studie dar („Kinderwunsch seit zwölf Monaten“: zum Zeitpunkt der Ejakulatabgabe bestand seit einem Jahr Kinderwunsch).

Nicht von allen Patienten konnten alle Daten erhoben werden. Die prozentualen Angaben beziehen sich daher nur auf die Patienten, für die entsprechende Informationen vorlagen (korrigierte Fallzahl).

Dargestellt werden die Mediane der Daten sowie in runden Klammern der IQR. Die statistischen Analysen erfolgten mit den Statistikprogrammen IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics Version 26 und GraphPad Prism 7<sup>®</sup>. Eine statistische Signifikanz wird für einen p-Wert  $\leq 0,05$  angenommen. In der Arbeit werden nur für die Fragestellung relevante Daten dargestellt.

Die Gruppen wurden folgendermaßen definiert:

Konsum der Raucher:

- mittlere Raucher (< 15 Zigaretten pro Tag)
- starke Raucher (15 - 29 Zigaretten pro Tag)
- sehr starke Raucher ( $\geq 30$  Zigaretten pro Tag)

Konsum der ehemaligen Raucher:

- mittlere ehemalige Raucher (früher <15 Zigaretten pro Tag)
- starke ehemalige Raucher (früher 15 - 29 Zigaretten pro Tag)
- sehr starke ehemalige Raucher (früher  $\geq 30$  Zigaretten pro Tag))

Der Grenzwert für Raucher, die vor kurzem mit dem Rauchen aufgehört haben, wurde auf  $\leq$  zwei Jahre gesetzt.

Als Nichtraucher werden alle Probanden bezeichnet, die zum Zeitpunkt der Studie angaben, keine Zigarette zu rauchen.

Der Body Mass Index (BMI) der Patienten berechnet sich aus dem Gewicht in Kilogramm geteilt durch die Körpergröße in Meter zum Quadrat ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Die Diagnosen werden entsprechend der WHO-Definition eingeteilt: Patienten mit Übergewicht haben einen BMI von  $\geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ ; Patienten mit Adipositas haben einen BMI  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  [146].

Die deskriptiven Daten wurden mittels Median und IQR (in Klammern) angegeben. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde der Zusammenhang zwischen metrischen Daten zweier Patientengruppen ermittelt. Bei dem Vergleich von metrischen Daten in mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis- mit anschließendem Dunn's-Test (Post-hoc-Test) angewendet. Beim Vergleich von nominalen Variablen wurde der Exakte-Fisher-Test angewendet. Eine Korrelation zwischen metrischen Daten wurde mittels Spearman Rangkorrelation berechnet.

Bei der Darstellung der Boxplots findet sich der Median als Strich innerhalb der Box markiert. Die Box entspricht dem Interquartilenabstand. Oberer und unterer Whisker markieren die maximalen Werte, sind jedoch nach Definition von John W. Tukey maximal auf das 1,5-fache des Interquartilenabstands begrenzt. Außerhalb der Whisker liegende Werte werden einzeln als Ausreißer gekennzeichnet [147].

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientencharakteristika

Im Median (IQR) waren die Patienten zum Zeitpunkt der Befragung 37 (IQR 9) Jahre alt. Der jüngste Patient war 23 Jahre, der älteste 58 Jahre alt. Der durchschnittliche BMI der Probanden betrug  $25 \text{ kg/m}^2$ , davon waren 66,7 % übergewichtig ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) und 14,1 % adipös ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

Von 87 Patienten konnte erhoben werden, ob ein Kinderwunsch vorlag. Dies war bei 83,9 % der Fall, wobei dies auch Patienten einschließt, deren Partnerin wegen einer bekannten Infertilität in Behandlung waren. Weiterhin waren 80,4 % der Patienten kinderlos.

Tabelle 13: Deskriptive Statistik aller Patienten nach Auswertung der Fragebögen.

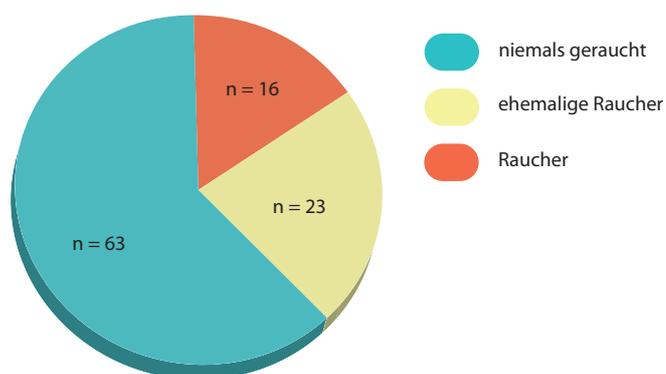
Charakteristika ( $n = 102$ )	alle eingeschlossenen Patienten <sup>a</sup>
<b>Basisparameter</b>	
Alter – [Jahre] (IQR)	37 (9)
BMI – [ $\text{kg/m}^2$ ], $n = 99$	25 (4)
Übergewicht ( $\text{BMI} \geq 25$ ) – [n] (%), $n = 99$	66 (66,7)
Adipositas ( $\text{BMI} \geq 30$ ) – [n] (%), $n = 99$	14 (14,1)
kinderlos – [n] (%)	82 (80,4)
Kinderwunsch – [n] (%), $n = 87$	73 (83,9)
<b>Rauchgewohnheiten</b>	
Raucher – [n] (%)	16 (15,7)
Nichtraucher – [n] (%)	86 (84,3)
raucht seit – [Jahre] Median (IQR)	10 (9,8)
raucht < 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)	10 (62,5)
raucht > 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)	5 (31,3)
raucht > 30 Zigaretten/Tag – [n] (%)	1 (6,3)
niemals geraucht – [n] (%)	63 (61,8)
ehemalige Raucher – [n] (%)	23 (22,5)
Rauchen innerhalb der letzten 2 Jahre aufgehört – [n] (%)	8 (7,8)

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu. Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

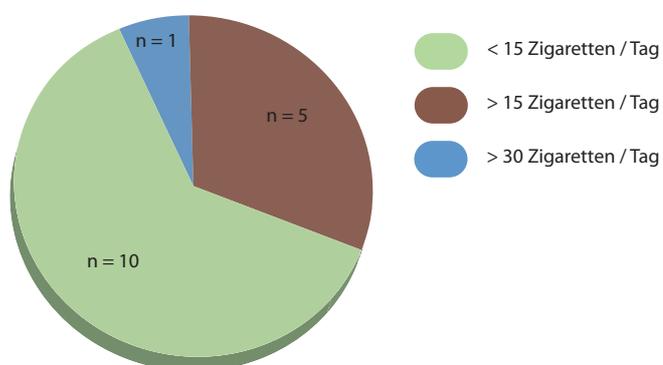
Die Rauchgewohnheiten der eingeschlossenen Patienten sind in Abbildung 7 zu sehen. 86 Probanden in unserer Studie waren damit Nichtraucher. Von den Nichtrauchern hatten 23 früher geraucht.

Abbildung 7: Rauchgewohnheiten der eingeschlossenen Patienten.



Die 16 Raucher konsumierten seit 17,5 (IQR 6,5) Jahren Zigaretten. Die Menge der konsumierten Zigaretten pro Tag ist in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Tag (n = 16 Raucher).



Die Angaben der Patienten zu den relevanten Vorerkrankungen erfolgte mit Antworten zum Ankreuzen und/oder per Freitext:

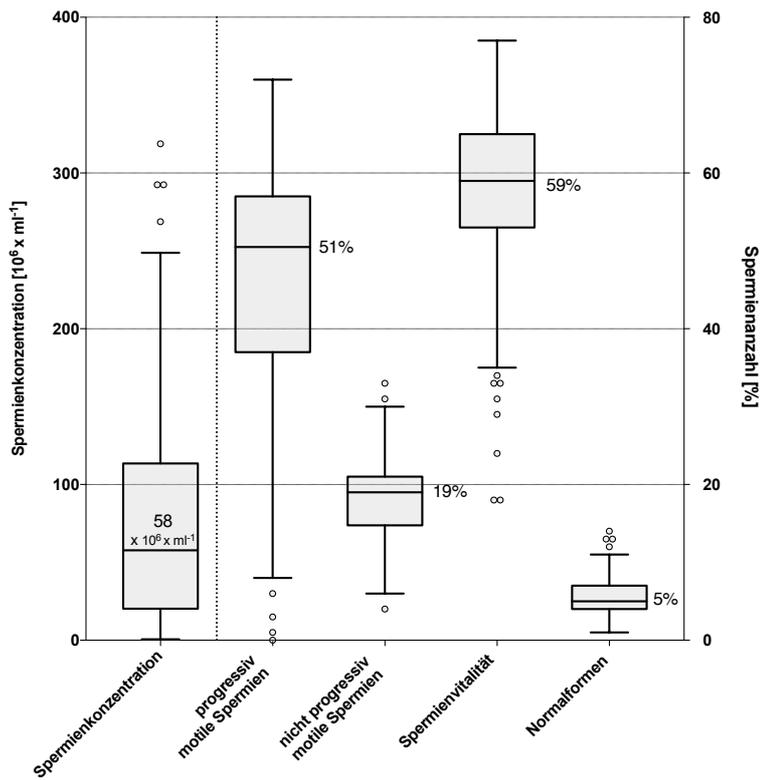
Tabelle 14: Relevante Vorerkrankungen der eingeschlossenen Patienten.

Vorerkrankungen (n = 102)	
	alle Patienten
Hodenhochstand – [n](%)	5 (4,9)
Varikozele – [n](%)	3 (2,9)
abgelaufene Mumps-Infektion – [n](%)	6 (5,9)
abgelaufene urogenitale Infektion – [n](%)	4 (3,9)

#### 4.2 Ergebnisse der Spermioagrammauswertung

Von 97 Probanden lag ein komplettes Spermioagramm mit Angaben zu Konzentration, Beweglichkeit, Vitalität und Morphologie vor.

Abbildung 9: Spermioagrammparameter aller Patienten.



Folgende Diagnosen konnten durch das Spermogramm nach WHO Kriterien gestellt werden:

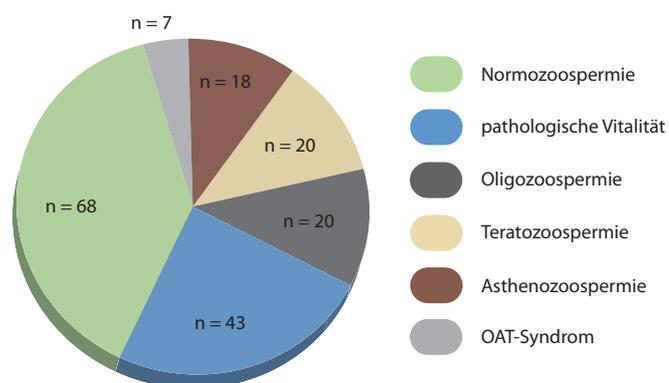
Tabelle 15: Beurteilung der Spermogramme der Studienpatienten.

Charakteristiken ( $n = 102$ )	alle eingeschlossenen Patienten <sup>a</sup>
<b>Spermogramm</b>	
Konzentration – [ $10^6 \text{ ml}^{-1}$ ]	57,8 (93,3)
progressive Motilität – [%]	51 (20)
nicht-progr. Motilität – [%]	19 (6)
immotil – [%]	30 (18)
Vitalität – [%], $n = 98$	59 (12)
Normalformen – [%], $n = 97$	5 (3)
<b>Spermogramm-Diagnosen – [n] (%)</b>	
Oligozoospermie	20 (19,6)
Asthenozoospermie	18 (17,6)
Teratozoospermie, $n = 97$	20 (20,4)
pathologische Vitalität, $n = 98$	43 (43,9)
OAT-Syndrom, $n = 97$	7 (7,2)
Normozoospermie, $n = 97$	68 (70,1)

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu. Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

Abbildung 10: Spermogrammparameter und -diagnosen aller Patienten.



### 4.3 Bindung der Kohlenhydratreste

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Dreifachfärbung der Spermien und der anschließenden konfokalmikroskopischen Analyse dargestellt.

Mit Hilfe der FITC-konjugierten Zucker, konnte im humanen Modell nachgewiesen werden, dass auf der Oberfläche der Spermien Strukturen existieren, die Kohlenhydratreste wie Sialinsäure, Mannose, Fucose oder Galactose erkennen und binden.

Abbildung 11: CLSM humaner Spermatozoen. Beispielbilder der ausgewerteten Kohlenhydrate. rot = Mitochondrien; Mitotracker DeepRed. blau = Zellkerne; DAPI. grün = FITC-konjugierter Kohlenhydratrest. \* = Beispiele für Spermien, die entsprechenden Kohlenhydratrest binden können. Bild 1+2: Pat. 024 (Nichtraucher), Bild 3+4: Pat. 030 (Raucher).

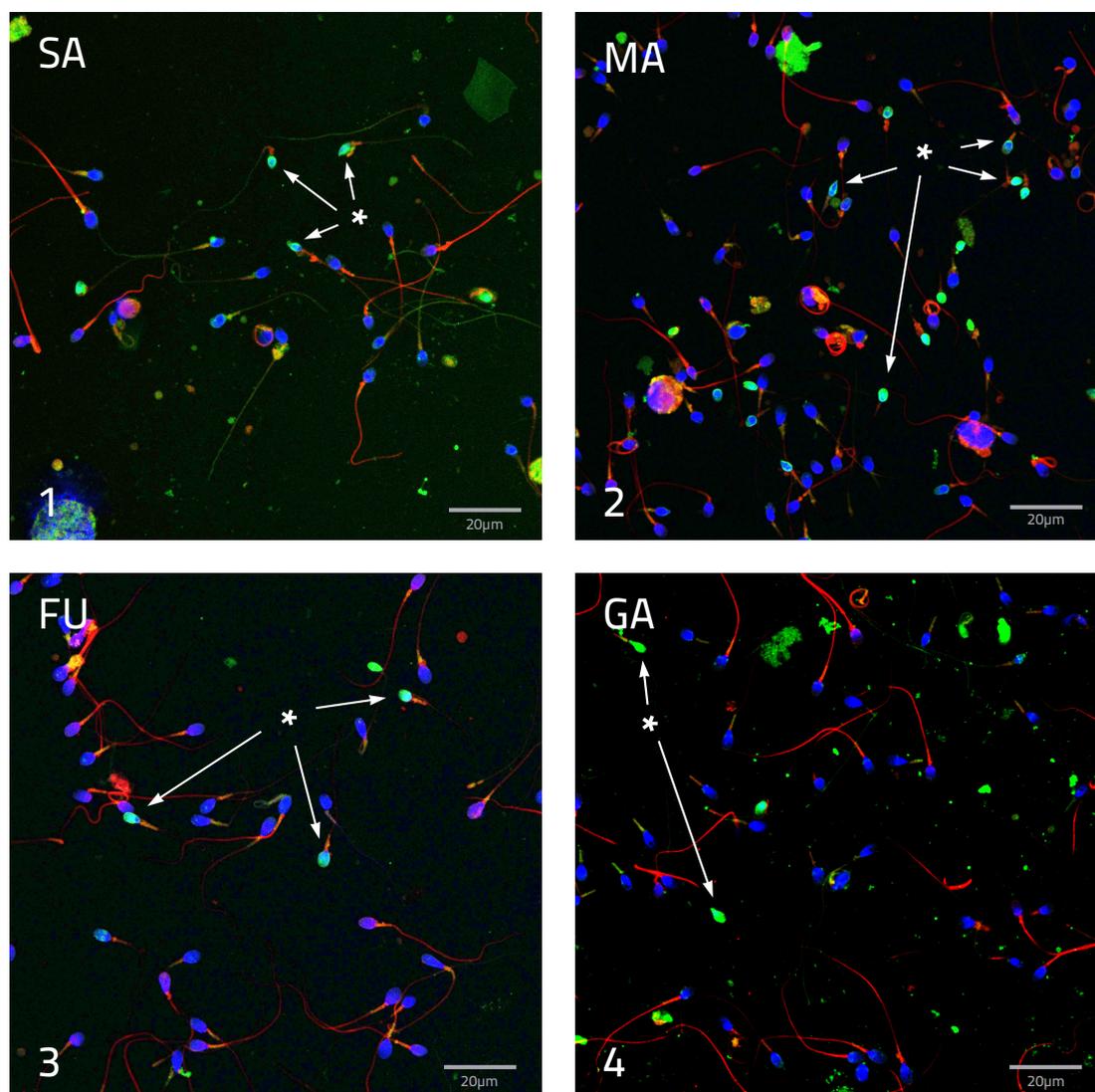
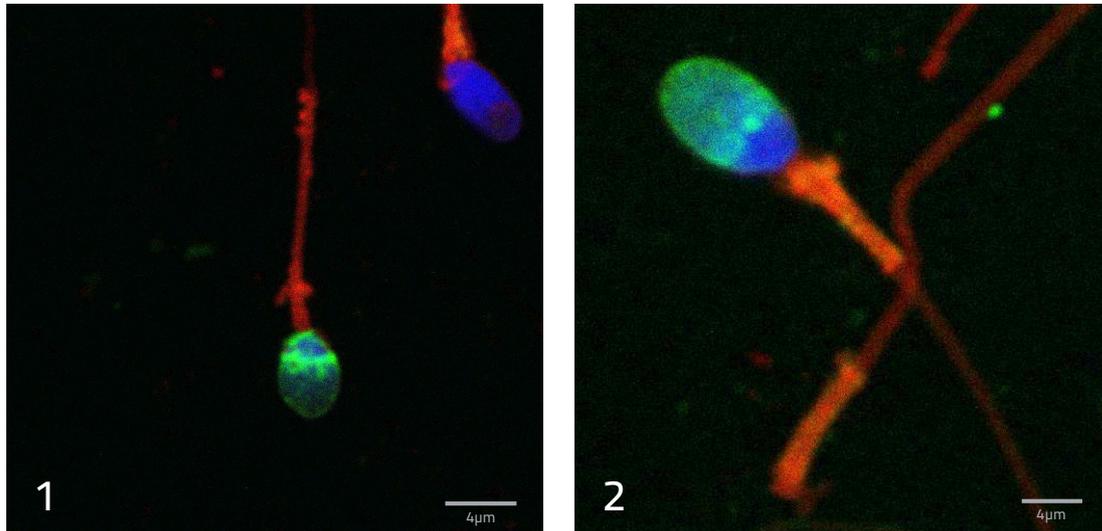


Abbildung 12 zeigt die genaue Lokalisation der gebundenen Zucker, die meist auf den vorderen sowie teilweise den hinteren Teil des Kopfes beschränkt ist.

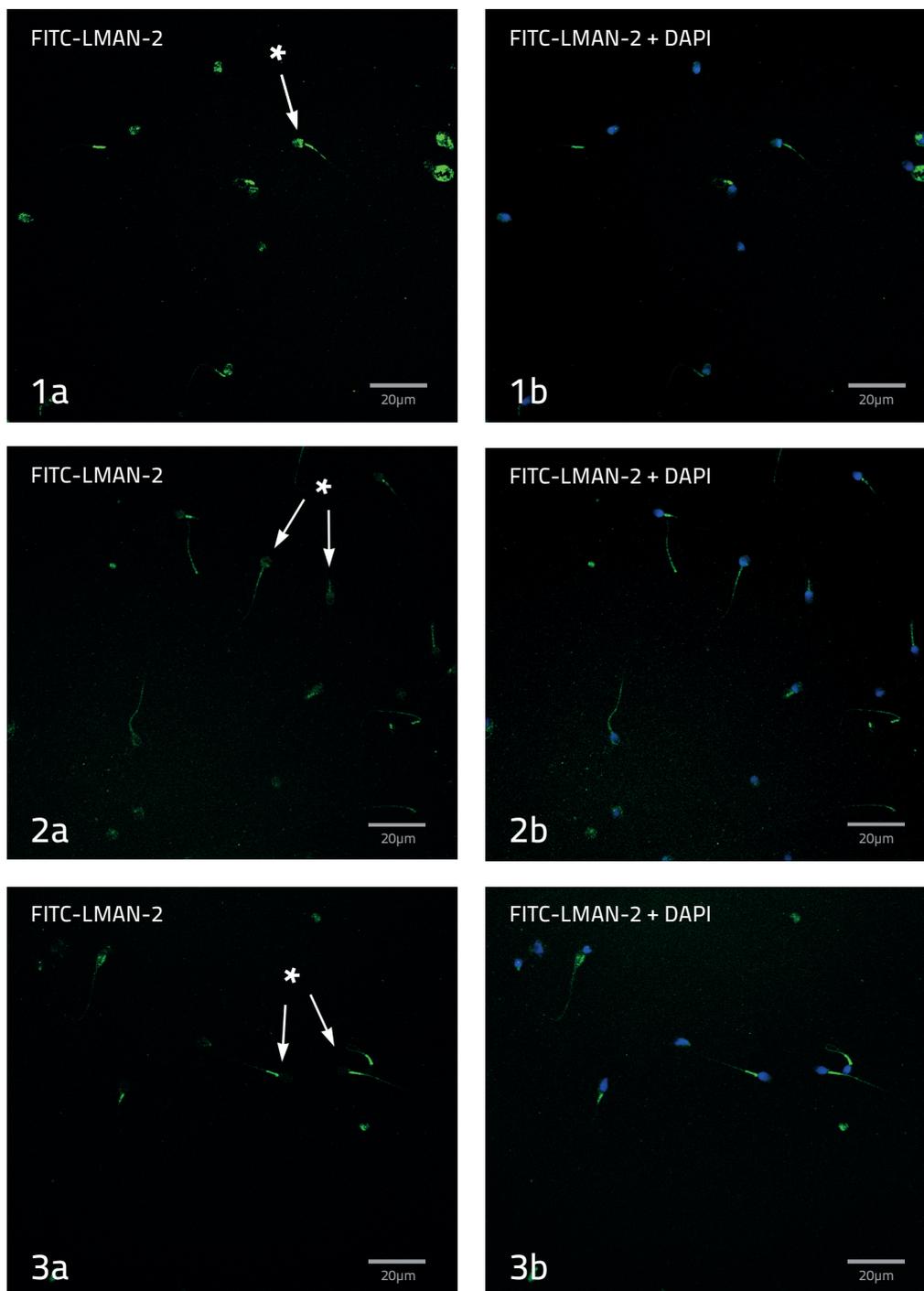
Abbildung 12: CLSM humaner Spermatozoen. rot = Mitochondrien, blau = Zellkerne, grün = FITC-konjugierter Kohlenhydratrest. Bild 1+2: Fucose (Pat. 030, Raucher).



#### 4.4 Bindung des VIP36-Antikörper

Bei drei Patienten wurde exemplarisch erstmals im humanen Modell die Existenz von VIP36 (= LMAN2, möglicher Bindungspartner für Mannose-Reste) auf der Spermienplasmamembran nachgewiesen. Lokalisiert werden konnte das Lektin auf dem gesamten Spermienkopf sowie am Mittelstück und teilweise am Schwanz der Spermien. Folgende Abbildungen zeigen die Bindung des FITC-konjugierten-VIP36-Antikörpers. Eine Negativkontrolle wurde durchgeführt.

Abbildung 13: CLSM humaner Spermatozoen. \* = Beispiele für Spermien, mit VIP-36-Antikörper-Bindung. grün = VIP-36-Ak-FITC, blau = DAPI. Zur besseren Detektion der Spermien ist auf der rechten Seite der FITC- und der DAPI-Kanal (Zellkernfärbung) überlagert. Bilder 1: Pat. 065, Bilder 2: Pat. 066, Bilder 3: Pat. 067 (alle Nichtraucher).

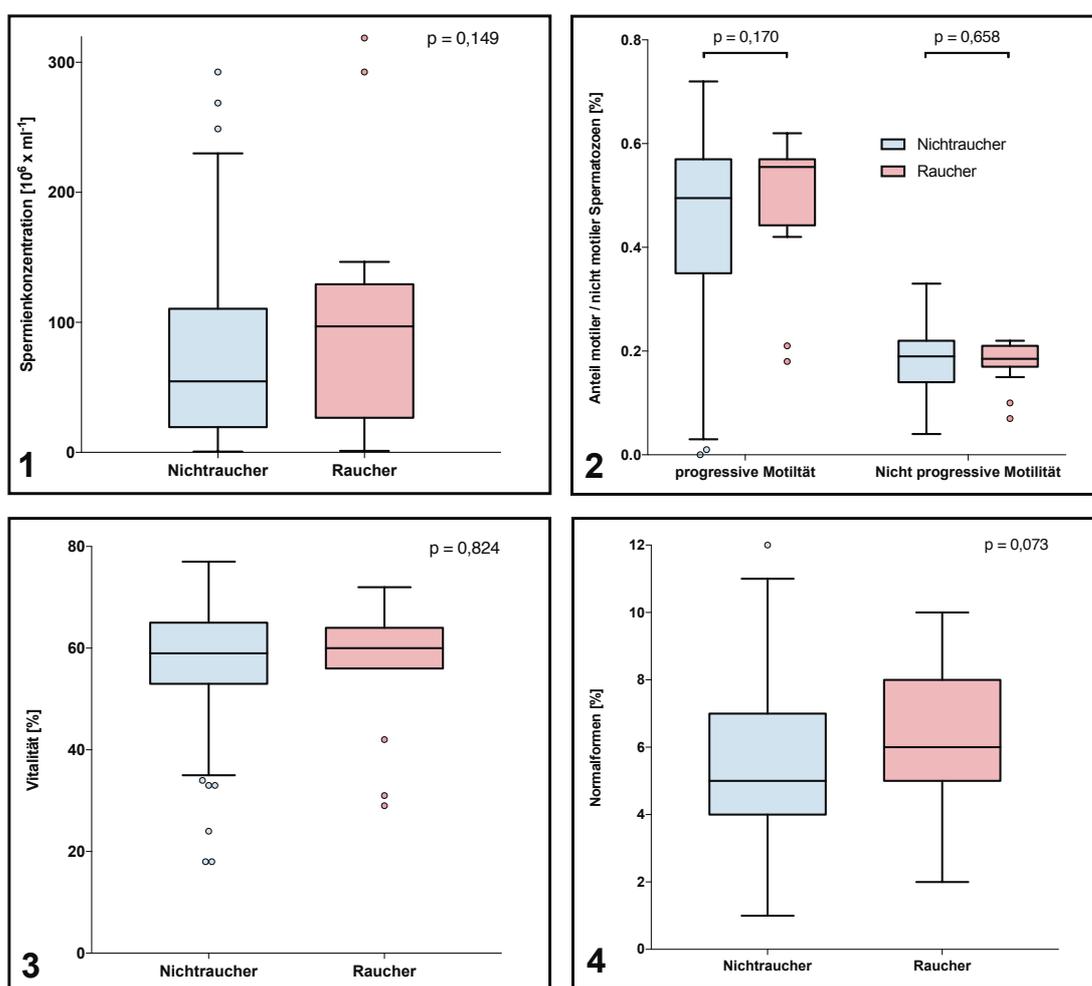


#### 4.5 Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern

In den Basisparametern stellten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen dar. Die Raucherpopulation zeigte eine nicht-signifikant höhere Rate an übergewichtigen (BMI  $\geq 25$ ) Patienten (78,6 % vs. 64,7 %,  $p = 0,374$ ).

Die Spermioigrammparameter der Raucher waren im Vergleich mit den Nichtrauchern vor allem in den Kategorien Spermienkonzentration ( $p = 0,149$ ) und progressive Motilität ( $p = 0,170$ ) nicht-signifikant besser (siehe Abbildung 14).

Abbildung 14: Vergleich der Spermioigrammparameter zwischen Nichtrauchern und Rauchern.



Die Raucherpopulation in der Studie wies einen nicht-signifikant geringeren Anteil von Pathologien im Spermioigramm (z. B. Oligozoospermie: 12,5 % vs. 20,9 %) sowie eine höhere Normozoospermierate (86,7 % vs. 67,1 %) auf (siehe hierzu auch 4.7, Seite 61).

Nichtraucherspermien binden signifikant mehr FITC-konjugierte-MA- ( $p = 0,007$ ) und FU-Reste ( $p < 0,001$ ) als Raucherspermien. Bei SA und GA zeigte sich dies auf nicht-signifikantem Niveau (Abbildung 15).

Abbildung 15: Vergleich der Bindungskapazität für Kohlenhydratreste zwischen Nichtrauchern und Rauchern.

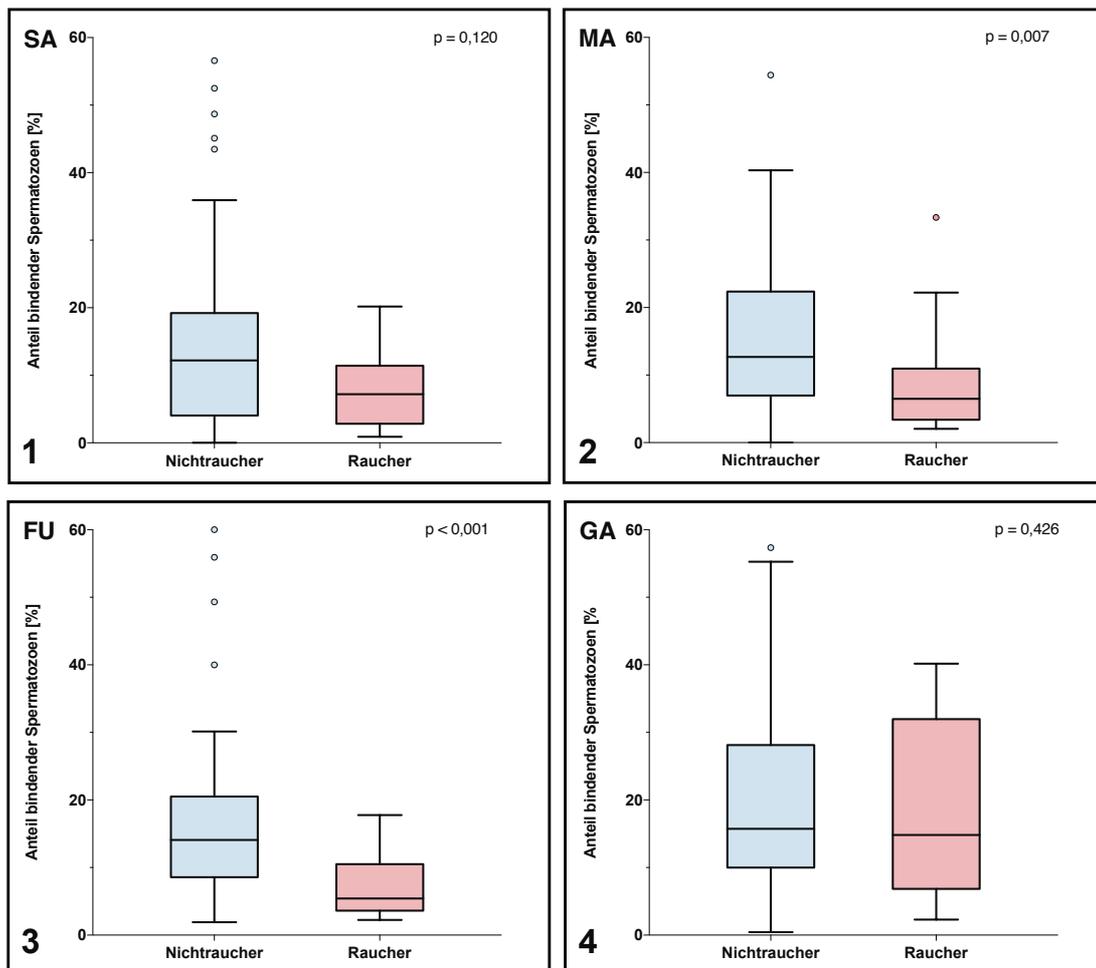


Tabelle 16: Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern.

Charakteristiken ( <i>n</i> = 102)	aktuelle Rauchgewohnheiten		p-Wert <sup>b</sup>
	Nichtraucher ( <i>n</i> = 86) <sup>a</sup>	Raucher ( <i>n</i> = 16) <sup>a</sup>	
<b>Basisparameter</b>			
Alter – [Jahre] (IQR)	37 (9)	36 (9)	0,053
BMI – [kg/m <sup>3</sup> ], <i>n</i> = 99	25 (4)	26 (4)	0,649
Übergewicht (BMI ≥ 25) – [n] (%), <i>n</i> = 99	55 (64,7)	11 (78,6)	0,374
Adipositas (BMI ≥ 30) – [n] (%), <i>n</i> = 99	12 (14,1)	2 (14,3)	1,000
kinderlos – [n] (%)	67 (77,9)	15 (93,8)	0,186
Kinderwunsch – [n] (%), <i>n</i> = 87	61 (77,9)	12 (80)	0,702
<b>Rauchgewohnheiten</b>			
raucht seit – [Jahre] Median (IQR)		18 (7)	
raucht < 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)		10 (62,5)	
raucht > 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)		5 (31,3)	
raucht > 30 Zigaretten/Tag – [n] (%)		1 (6,3)	
ehemalige Raucher – [n] (%)	23 (26,7)		
Rauchen innerhalb der letzten 2 Jahre aufgehört – [n] (%)	8 (9,3)		
<b>Spermiogramm</b>			
Konzentration – [10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> ]	54,6 (91,0)	97,0 (102,7)	0,149
progressive Motilität – [%]	50 (22)	56 (13)	0,170
nicht-progr. Motilität – [%]	19 (8)	19 (4)	0,658
immotil – [%]	30 (19)	27 (11)	0,240
Vitalität – [%], <i>n</i> = 98	59 (12)	60 (8)	0,824
Normalformen – [%], <i>n</i> = 97	5 (3)	6 (3)	0,073
<b>Spermiogramm-Diagnosen – [n] (%)</b>			
Oligozoospermie	18 (20,9)	2 (12,5)	0,732
Asthenozoospermie	16 (18,6)	2 (12,5)	0,731
Teratozoospermie, <i>n</i> = 97	18 (22,0)	2 (13,3)	0,729
pathologische Vitalität, <i>n</i> = 98	38 (45,8)	5 (33,3)	0,412
OAT-Syndrom, <i>n</i> = 97	6 (7,3)	1 (6,7)	1,000
Normozoospermie, <i>n</i> = 97	55 (67,1)	13 (86,7)	0,218
<b>Kohlenhydratbindung – [%] (IQR)</b>			
SA, <i>n</i> = 89	12,2 (15,2)	7,2 (8,6)	0,120
MA, <i>n</i> = 93	12,7 (15,4)	6,5 (7,6)	<b>0,007*</b>
FU, <i>n</i> = 83	14,1 (12,0)	5,43 (6,9)	<b>&lt;0,001*</b>
GA, <i>n</i> = 78	15,7 (18,1)	14,8 (25,1)	0,426

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu.

Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

<sup>b</sup> mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. Exakter Fisher-Test.

#### 4.5.1 Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern mit Normozoospermie

Die Basis- und Spermioigrammparameter stellten sich ohne signifikante Unterschiede dar.

Spermien von Nichtrauchern hatten wiederum eine höhere Bindungsfähigkeit zu SA, MA und FU-Resten als Raucherspermien. Signifikant zeigte sich dies für MA ( $p = 0,005$ ) und FU ( $p = 0,003$ ).

Tabelle 17: Vergleich von Nichtrauchern und Rauchern mit Normozoospermie.

Charakteristiken ( $n=68$ ) nur Patienten mit Normozoospermie	aktuelle Rauchgewohnheiten		p-Wert <sup>b</sup>
	Nichtraucher ( $n=55$ ) <sup>a</sup>	Raucher ( $n=13$ ) <sup>a</sup>	
<b>Basisparameter</b>			
Alter – [Jahre] (IQR)	36 (8)	35 (8)	0,089
BMI – [kg/m <sup>3</sup> ], $n=67$	25 (4)	25 (4)	0,882
Übergewicht (BMI $\geq 25$ ) – [n] (%), $n=67$	34 (61,8)	9 (75,0)	0,515
Adipositas (BMI $\geq 30$ ) – [n] (%), $n=67$	9 (16,4)	1 (8,3)	0,676
kinderlos – [n] (%)	42 (76,4)	12 (92,3)	0,275
Kinderwunsch – [n] (%), $n=56$	38 (69,1)	10 (83,3)	1,000
<b>Spermioigramm</b>			
Konzentration – [10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> ]	91,0 (74,5)	104,8 (55,0)	0,268
progressive Motilität – [%]	53 (10)	56 (6)	0,226
nicht-progr. Motilität – [%]	20 (4)	19 (4)	0,246
immotil – [%]	27 (7)	25 (4)	0,351
Vitalität – [%]	62 (9)	60 (3)	0,894
Normalformen – [%]	6 (4)	7 (3)	0,178
<b>Spermioigramm-Diagnosen – [n] (%)</b>			
pathologische Vitalität	15 (27,3)	3 (23,1)	1,000
<b>Kohlenhydratbindung – [%] (IQR)</b>			
SA, $n=64$	8,6 (12,9)	6,7 (8,1)	0,180
MA, $n=64$	9,6 (9,1)	5,1 (6,5)	<b>0,005*</b>
FU, $n=59$	10,8 (11,2)	5,4 (4,8)	<b>0,003*</b>
GA, $n=57$	14,1 (21,7)	16,7 (25,2)	0,737

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu.

Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

<sup>b</sup> mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. Exakter Fisher-Test.

#### 4.6 Vergleich von Nie-Rauchern – Ex-Rauchern – Rauchern

Raucher waren in den Untersuchungen häufiger kinderlos als Ex-Raucher und Nie-Raucher (93,8% vs. 82,6% vs. 76,2%). Der Anteil der Kinderwunschpatienten war trotzdem unter den Nie-Rauchern mit 88,5% am größten.

Das Patientenkollektiv der Raucher zeigte abermals und nicht-signifikant die besten Spermioigrammwerte auf.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, wiesen die Raucherspermien im Vergleich mit den Ex-Rauchern für MA und FU signifikant die niedrigste Bindungskapazität auf ( $p = 0,012$ ,  $p = 0,007$ ). Für FU zeigte sich der signifikante Unterschied auch zwischen Rauchern und Nie-Rauchern ( $p = 0,006$ ). Die Ex-Raucher waren dabei auf einem ähnlichen Niveau wie Probanden, die niemals geraucht haben.

Abbildung 16: Vergleich der Bindungskapazität für Kohlenhydratreste zwischen Nie-Rauchern, Ex-Rauchern und Rauchern.

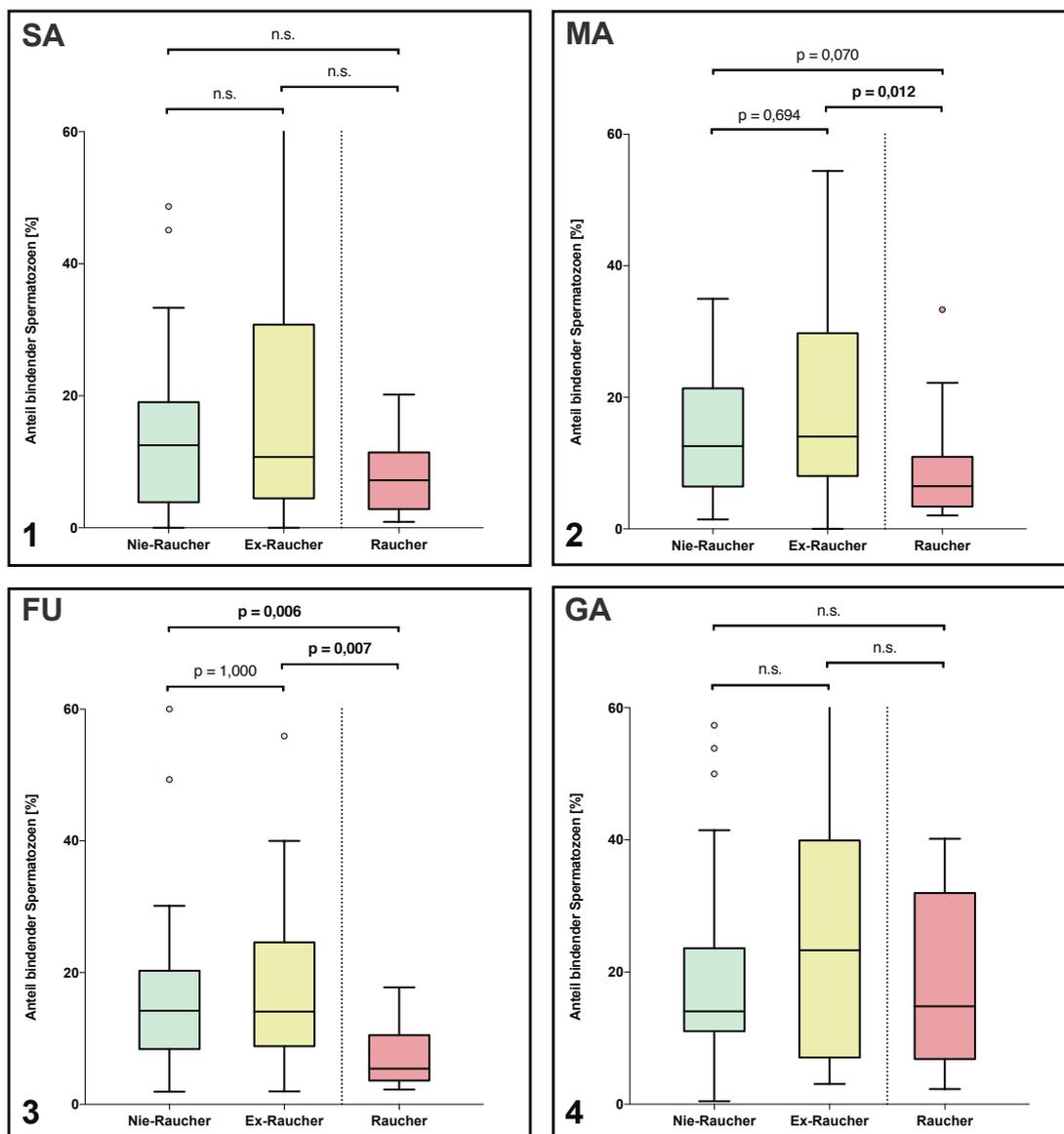


Tabelle 18: Vergleich von Patienten nach ihren aktuellen Rauchgewohnheiten.

Charakteristiken ( <i>n</i> = 102)	aktuelle Rauchgewohnheiten			p-Wert <sup>b</sup>
	Nie-Raucher ( <i>n</i> = 63) <sup>a</sup>	Ex-Raucher ( <i>n</i> = 23) <sup>a</sup>	Raucher ( <i>n</i> = 16) <sup>a</sup>	
<b>Basisparameter</b>				
Alter – [Jahre] (IQR)	37 (9)	36 (10)	36 (9)	0,141
BMI – [kg/m <sup>3</sup> ], <i>n</i> = 99	25 (4)	27 (5)	26 (4)	0,534
Übergewicht (BMI ≥ 25) – [n] (%), <i>n</i> = 99	38 (61,3)	17 (73,9)	11 (78,6)	0,373
Adipositas (BMI ≥ 30) – [n] (%), <i>n</i> = 99	8 (12,9)	4 (17,4)	2 (14,3)	0,914
kinderlos – [n] (%)	48 (76,2)	19 (82,6)	15 (93,8)	0,313
Kinderwunsch – [n] (%), <i>n</i> = 87	46 (88,5)	15 (75,0)	12 (80)	0,299
<b>Spermiogramm</b>				
Konzentration – [10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> ]	49,2 (88,3)	57,3 (108,4)	97,0 (102,7)	0,348
progressive Motilität – [%]	50 (20)	43 (26)	56 (13)	0,283
nicht-progr. Motilität – [%]	19 (7)	18 (9)	19 (4)	0,363
immotil – [%]	30 (14)	37 (32)	27 (11)	0,281
Vitalität – [%], <i>n</i> = 98	60 (12)	57 (20)	60 (8)	0,688
Normalformen – [%], <i>n</i> = 97	5 (3)	5 (4)	6 (3)	0,161
<b>Spermiogramm-Diagnosen – [n] (%)</b>				
Oligozoospermie	12 (19,0)	6 (26,1)	2 (12,5)	0,554
Asthenozoospermie	10 (15,9)	6 (26,1)	2 (12,5)	0,565
Teratozoospermie, <i>n</i> = 97	11 (18,6)	7 (30,4)	2 (13,3)	0,430
pathologische Vitalität, <i>n</i> = 98	26 (43,3)	12 (52,2)	5 (33,3)	0,544
OAT-Syndrom, <i>n</i> = 97	2 (33,9)	4 (17,4)	1 (6,7)	0,075
Normozoospermie, <i>n</i> = 97	41 (69,5)	14 (60,9)	13 (86,7)	0,226
<b>Kohlenhydratbindung – [%] (IQR)</b>				
SA, <i>n</i> = 89	12,5 (15,2)	10,7 (26,3)	7,2 (8,6)	0,263
MA, <i>n</i> = 93	12,6 (15,0)	14,0 (21,7)	6,5 (7,6) <sup>c</sup>	<b>0,015*</b>
FU, <i>n</i> = 83	14,2 (11,9)	14,1 (15,8)	5,4 (6,9) <sup>c, d</sup>	<b>0,004*</b>
GA, <i>n</i> = 78	14,1 (12,6)	23,3 (32,9)	14,8 (25,1)	0,449

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu.

Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

<sup>b</sup> mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Post-hoc-Test bzw. Exakter Fisher-Test.

<sup>c</sup> signifikant zu Ex-Rauchern.

<sup>d</sup> signifikant zu Nie-Rauchern.

#### 4.6.1 Mögliche Reversibilität der Einflüsse des Tabakkonsums

In der vorliegenden Studie fanden sich fünf Männer, die das Rauchen innerhalb des letzten Jahres beendet hatten. Davon hatten drei Patienten vor einem halben Jahr, einer vor zehn Monaten und einer vor einem Jahr den Konsum eingestellt.

Es zeigte sich eine höhere Anzahl an Pathologien im Spermiogramm (signifikant für OAT-Syndrom, *p* = 0,026) bei den Männern, die im letzten Jahr mit dem Rauchen aufgehört hatten.

Die Kohlenhydratbindungskapazität dieser Gruppe war auf einem ähnlichen Niveau wie bei den Nie-Rauchern. Signifikant war auch hier die höhere Bindungskapazität der Nie-Raucher im Vergleich zu den Rauchern bei FU ( $p = 0,006$ ).

Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch zeigen, wenn alle Männer untersucht wurden, die innerhalb der letzten zwei Jahre mit dem Rauchen aufgehört haben ( $n = 8$ ).

Abbildung 17: Vergleich der Bindungskapazität für Kohlenhydrate zwischen Nie-Rauchern, Rauchern und Patienten, die innerhalb des letzten Jahres mit dem Rauchen aufgehört haben.

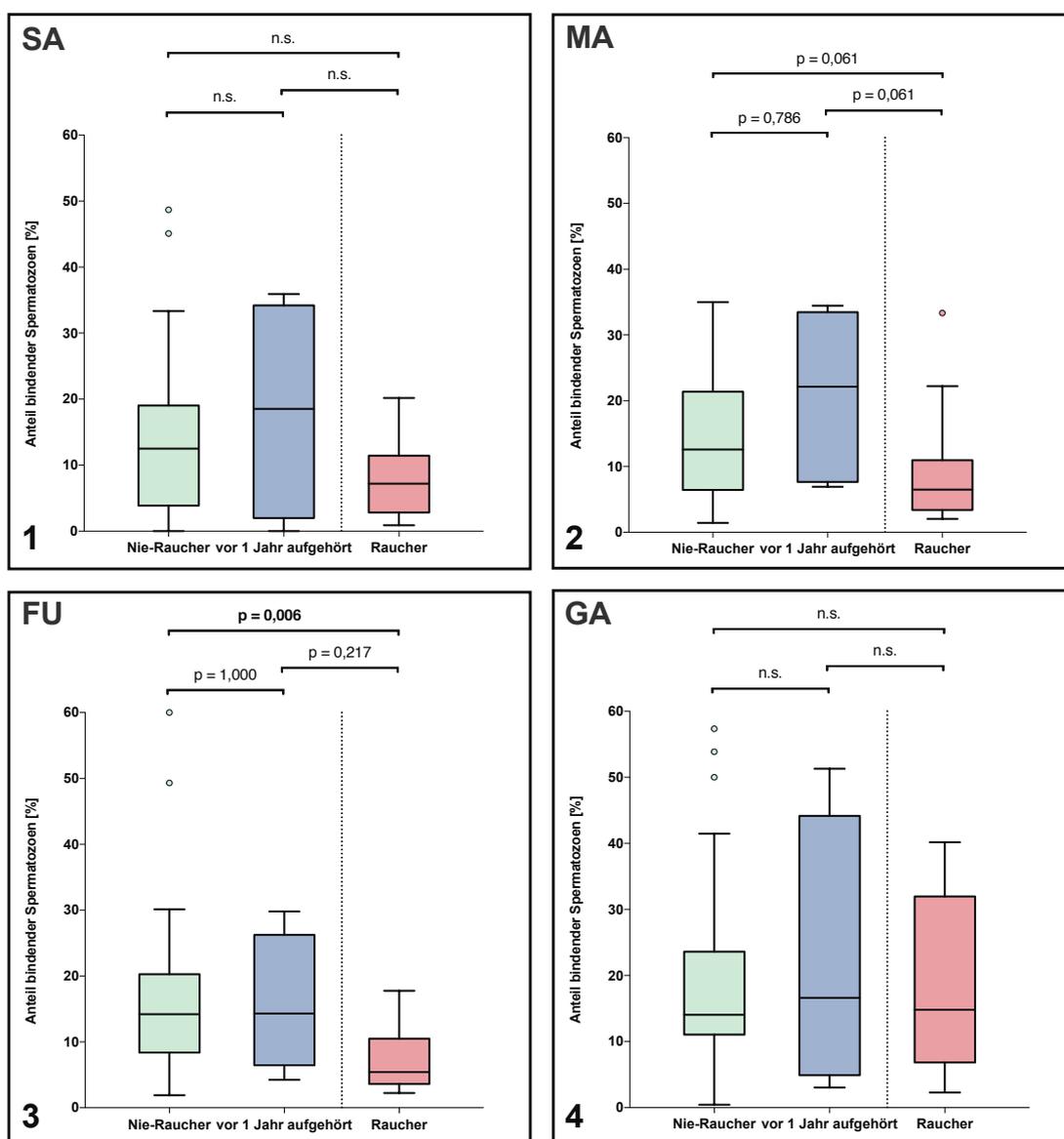


Tabelle 19: Vergleich von Nie-Rauchern, Rauchern und Patienten, die innerhalb des letzten Jahres mit dem Rauchen aufgehört haben.

Charakteristika (n = 84)	aktuelle Rauchgewohnheiten			p-Wert <sup>b</sup>
	Nie-Raucher (n = 63) <sup>a</sup>	Rauchen vor ≤ 1 Jahr aufgehört (n = 5) <sup>a</sup>	Raucher (n = 16) <sup>a</sup>	
<b>Basisparameter</b>				
Alter – [Jahre] (IQR)	37 (9)	34 (12)	36 (9)	1,000
BMI – [kg/m <sup>2</sup> ], n = 81	25 (4)	25 (6)	26 (4)	0,624
Übergewicht (BMI ≥ 25) – [n] (%), n = 81	38 (61,3)	3 (60,0)	11 (78,6)	0,532
Adipositas (BMI ≥ 30) – [n] (%), n = 81	8 (12,9)	0	2 (14,3)	1,000
kinderlos – [n] (%)	48 (76,2)	5 (100,0)	15 (93,8)	0,186
Kinderwunsch – [n] (%), n = 71	46 (88,5)	4 (100,0)	12 (80)	0,660
<b>Spermiogramm</b>				
Konzentration – [10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> ]	49,2 (88,3)	26,0 (119,9)	97,0 (102,7)	0,268
progressive Motilität – [%]	50 (20)	51 (37)	56 (13)	0,387
nicht-progr. Motilität – [%]	19 (7)	19 (12)	19 (4)	0,501
immotil – [%]	30 (14)	30 (49)	27 (11)	0,518
Vitalität – [%], n = 80	60 (12)	57 (22)	60 (8)	0,579
Normalformen – [%], n = 79	5 (3)	2 (5)	6 (3)	0,119
<b>Spermiogramm-Diagnosen – [n] (%)</b>				
Oligozoospermie	12 (19,0)	2 (40,0)	2 (12,5)	0,405
Asthenozoospermie	10 (15,9)	2 (40,0)	2 (12,5)	0,300
Teratozoospermie, n = 79	11 (18,6)	3 (60,0)	2 (13,3)	0,089
pathologische Vitalität, n = 80	26 (43,3)	4 (80,0)	5 (33,3)	0,201
OAT-Syndrom, n = 79	2 (33,9)	2 (40,0)	1 (6,7)	<b>0,026</b>
Normozoospermie, n = 79	41 (69,5)	2 (40,0)	13 (86,7)	0,121
<b>Kohlenhydratbindung – [%] (IQR)</b>				
SA, n = 71	12,5 (15,2)	18,5 (32,2)	7,2 (8,6)	0,321
MA, n = 75	12,6 (15,0)	22,1 (25,8)	6,5 (7,6)	0,024 <sup>c</sup>
FU, n = 66	14,2 (11,9)	14,3 (19,8)	5,4 (6,9) <sup>d</sup>	<b>0,008</b>
GA, n = 62	14,1 (12,6)	16,6 (39,2)	14,8 (25,1)	0,850

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu.

Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

<sup>b</sup> mittels Kruskal-Wallis-Analyse und Post-hoc-Test bzw. Exakter Fisher-Test.

<sup>c</sup> im Post-hoc-Test zeigt sich keine Signifikanz mit  $p \leq 0,05$ .

<sup>d</sup> signifikant zu Nie-Rauchern.

#### 4.7 Patienten mit eingeschränkten Spermogrammparametern

In den folgenden Untersuchungen wurden eingeschränkte Spermogrammparameter definiert als Abwesenheit von Normozoospermie nach WHO Definition (siehe Tabelle 2, Seite 15).

Wie in Abbildung 18 zu sehen, präsentierten Patienten mit nicht normozoospermen Ejakulatparametern signifikant mehr SA-, MA- und FU-bindende Strukturen auf der Spermienoberfläche als Patienten mit Normozoospermie ( $p = 0,006$ ,  $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,001$ ).

Abbildung 18: Vergleich der Bindungskapazität für Kohlenhydratreste zwischen Patienten mit und ohne Normozoospermie.

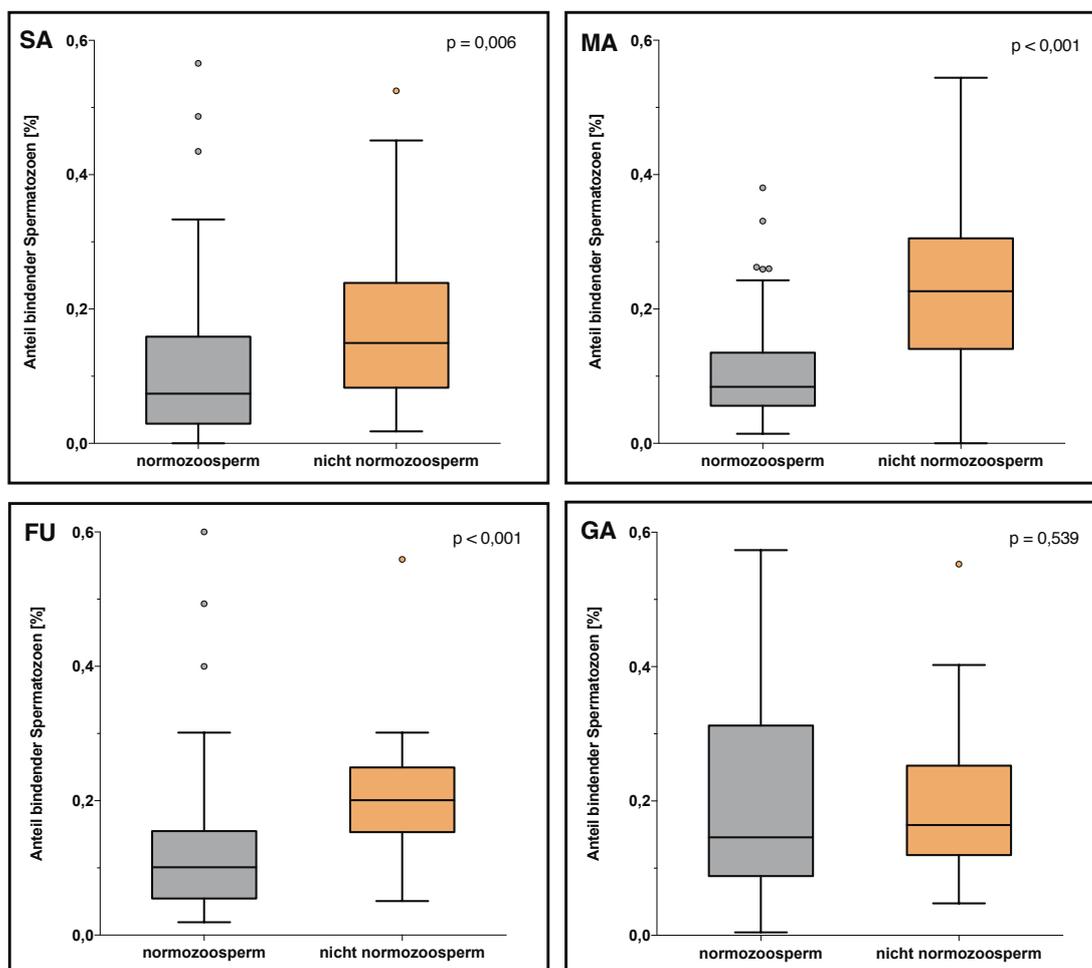


Tabelle 20: Vergleich der Patienten mit und ohne Normozoospermie.

Charakteristiken ( <i>n</i> =97)	Spermiogramm-Diagnose		p-Wert <sup>b</sup>
	normozoosperm ( <i>n</i> =68) <sup>a</sup>	nicht- normozoosperm ( <i>n</i> =29) <sup>a</sup>	
<b>Basisparameter</b>			
Alter – [Jahre] (IQR)	36 (9)	38 (9)	0,148
BMI – [kg/m <sup>3</sup> ], <i>n</i> =96	25 (4)	26 (5)	0,430
Übergewicht (BMI ≥ 25) – [n] (%), <i>n</i> =96	43 (64,2)	20 (71,4)	0,635
Adipositas (BMI ≥ 30) – [n] (%), <i>n</i> =96	10 (14,9)	3 (10,7)	0,749
kinderlos – [n] (%)	54 (79,4)	23 (79,3)	1,000
Kinderwunsch – [n] (%), <i>n</i> =82	48 (85,7)	23 (88,5)	1,000
<b>Rauchgewohnheiten</b>			
Raucher – [n] (%)	13 (19,1)	2 (6,9)	0,218
raucht seit – [Jahre] Median (IQR)	17 (6)	24 (1)	
raucht < 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)	9 (69,2)	1 (50,0)	
raucht > 15 Zigaretten/Tag – [n] (%)	3 (23,1)	1 (50,0)	
raucht > 30 Zigaretten/Tag – [n] (%)	1 (7,7)	0	
niemals geraucht – [n] (%)	41 (60,3)	18 (62,1)	0,328
ehemalige Raucher – [n] (%)	14 (20,6)	9 (31,0)	0,226
Rauchen innerhalb der letzten 2 Jahre aufgehört – [n] (%)	5 (7,4)	3 (10,3)	0,693
<b>Spermiogramm</b>			
Konzentration – [10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup> ]	95,0 (77,9)	6,1 (21,5)	<0,001 *
progressive Motilität – [%]	54 (10)	31 (23)	<0,001 *
nicht-progr. Motilität – [%]	20 (4)	13 (9)	<0,001 *
immotil – [%]	27 (6)	54 (23)	<0,001 *
Vitalität – [%], <i>n</i> =96	62 (9)	48 (20)	<0,001 *
Normalformen – [%]	6 (3)	3 (2)	<0,001 *
<b>Spermiogramm-Diagnosen – [n] (%)</b>			
Oligozoospermie	0	18 (62,1)	<0,001 *
Asthenozoospermie	0	16 (55,2)	<0,001 *
Teratozoospermie	1 (1,5)	19 (65,5)	<0,001 *
pathologische Vitalität, <i>n</i> =96	18 (26,5)	28 (96,6)	<0,001 *
OAT-Syndrom	0	7 (24,1)	<0,001 *
<b>Kohlenhydratbindung – [%]</b>			
SA, <i>n</i> =88	7,4 (12,9)	14,9 (15,6)	0,006 *
MA, <i>n</i> =92	8,4 (7,9)	22,7 (16,5)	<0,001 *
FU, <i>n</i> =81	10,1 (10,0)	20,1 (9,6)	<0,001 *
GA, <i>n</i> =78	14,6 (22,4)	16,4 (13,3)	0,539

Werte sind, falls nicht anders beschrieben, als Median (IQR) dargestellt.

<sup>a</sup> Wegen fehlender Daten trifft die Zahl der Beobachtungen nicht für alle Variablen zu.

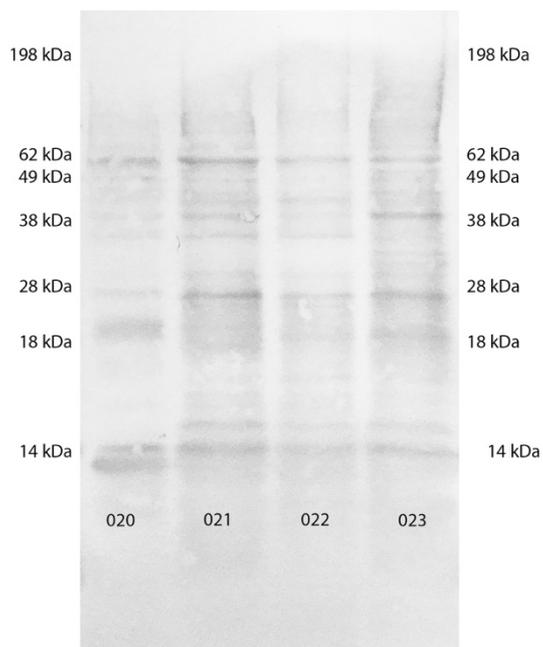
Die korrigierte Fallzahl ist in der linken Spalte angegeben.

<sup>b</sup> mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. Exakter Fisher-Test.

#### 4.8 Western Blot

Abbildung 19 zeigt ein Beispiel eines durchgeführten Western Blot mit Sialinsäure-Konjugat. Auffällig sind die vielen unspezifischen Bindungen über das gesamte Spektrum, die eine gute Analyse und die Identifizierung eines einzelnen Proteins nicht zulassen.

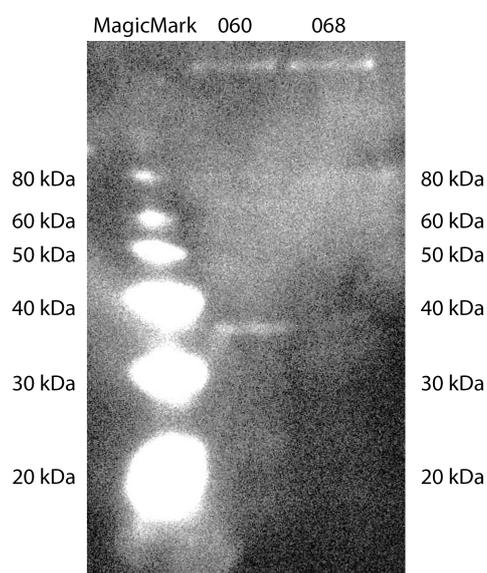
*Abbildung 19: Western Blot humaner Spermienplasmaproteine. Proteinextraktion von Spermienproben von vier Nichtrauchern (020-023). Durchführung von SDS-Page gefolgt von einem Liganden Blot mit Sialinsäure-biotin-Konjugat.*



#### 4.9 Immunoblot (VIP36)

Im Immunoblot war bei einem Patienten eine spezifische Bande bei ca. 35 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 20). Die gesuchte Produktgröße von VIP36 liegt bei 36 kDa und scheint daher mit der dargestellten Bande übereinzustimmen. Die Bande stellte sich bei Patient 060 dar, bei Patient 068 jedoch nicht. Beide Patienten haben bisher noch nie geraucht. In den Geltaschen verbliebenes Protein ist bei beiden Patienten im oberen Bereich zu sehen. Weitere Banden zeichneten sich nicht ab.

Abbildung 20: Immunoblot humaner Spermienplasmaproteine (Pat 060 und 068, Nichtraucher).  
Nachweis des Proteins VIP36 bei 36 kDa.



#### 4.10 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die durchflusszytometrischen Versuche wurden zwei etwa gleichaltrige, kinderlose Männer ohne Kinderwunsch ausgewählt. Patient 101 hatte bisher noch nie geraucht, Patient 102 rauchte seit acht Jahren ca. 20 Zigaretten pro Tag. Beide Patienten hatten keine relevanten Vorerkrankungen und keine regelmäßige Einnahme von Medikamenten zu berichten.

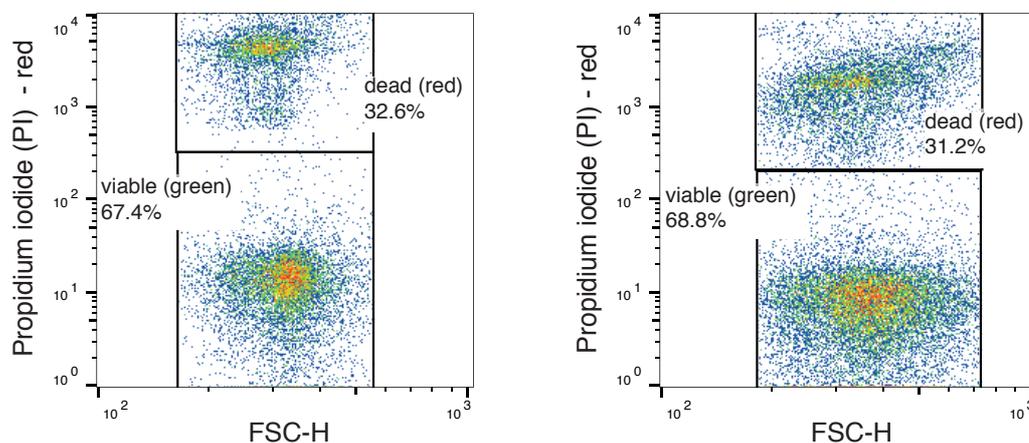
Folgende Übersicht stellt die Ejakulatparameter der zwei Probanden für die durchflusszytometrischen Versuche dar:

Tabelle 21: Spermioqrammparameter der FACS-Probanden.

Spermioqrammparameter	FACS - Patienten	
	Nichtraucher (Pat. 101)	Raucher (Pat. 102)
Konzentration – [ $10^6 \text{ ml}^{-1}$ ]	49,2	23,8
progressive Motilität – [%]	54	21
nicht-progr. Motilität – [%]	10	21
immotil – [%]	37	59

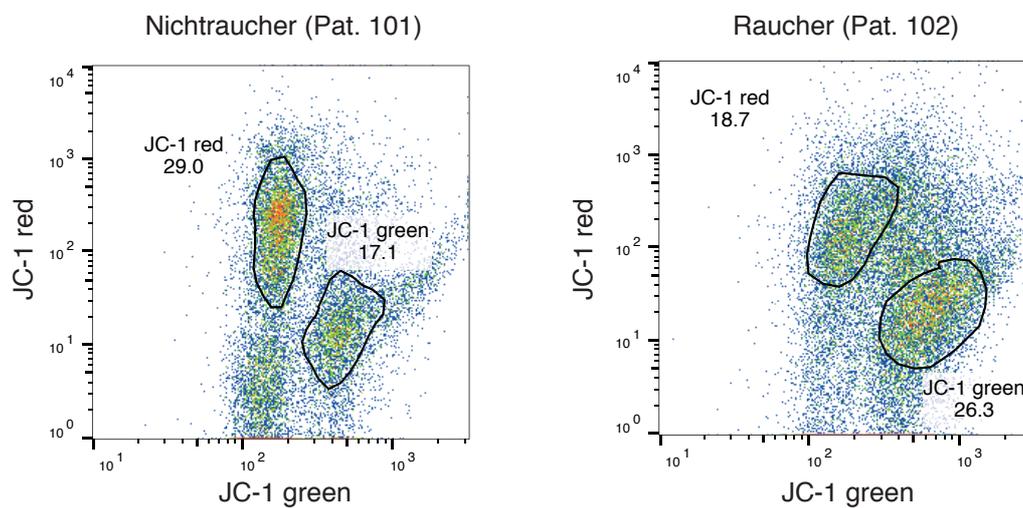
Mittels SYBR<sup>®</sup>/PI-Markierung zeigte sich eine ähnliche Permeabilität der Spermienmembran beider Probanden (Abbildung 21). Eine rote SYBR<sup>®</sup>/PI-Färbung steht für eine geschädigte Plasmamembran und weist daher auf nicht vitale Spermien hin.

Abbildung 21: Auswertung der Fluoreszenzfärbung von SYBR<sup>®</sup>/PI. Dargestellt ist die rote Fluoreszenz des Farbstoffs PI. Im Vergleich beider Probanden zeigten sich ähnliche Werte und damit eine ähnliche Membranpermeabilität.



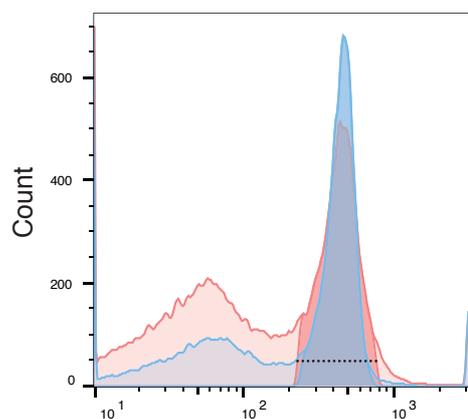
Die Spermienzellen des Nichtrauchers zeigten jedoch im Vergleich mit den Raucherspermien eine etwas höhere Zellzahl mit intaktem Mitochondrienmembranpotenzial gemessen mittels roter Fluoreszenz von JC-1 (Abbildung 22).

Abbildung 22: Auswertung der Fluoreszenzfärbung JC-1. Auswahl der Populationen von roter (intaktes Mitochondrienmembranpotenzial) und grüner (niedriges Mitochondrienmembranpotenzial) Fluoreszenz von JC-1. Zu erkennen waren etwas mehr intakte Mitochondrien bei Pat. 101 (Nichtraucher).

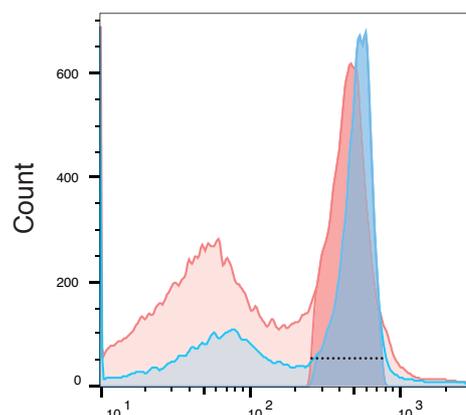


Beim Nichtraucher gingen insgesamt mehr Spermatozoen eine Bindung mit den vier untersuchten FITC-gekoppelten Kohlenhydratreste ein (Abbildung 23).

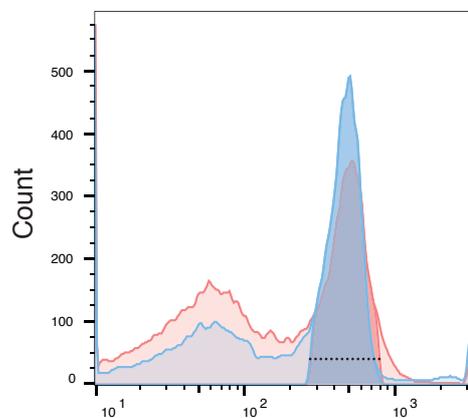
Abbildung 23: Auswertung der Fluoreszenzfärbung FITC-gekoppelter Kohlenhydratreste. Pat. 101 (Nichtraucher, blau) bindet mehr Kohlenhydratreste als Pat. 102 (Raucher, rot). SA = Sialinsäure, MA = Mannose, FU = Fucose, GA = Galactose.



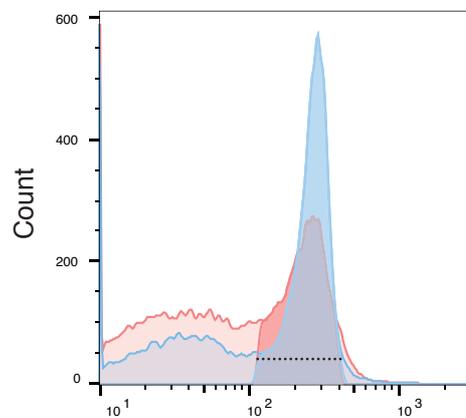
	total [n]	gated [n]	freq. of total [%]
NR	24990	14595	58,4
R	39465	15625	39,6



	total [n]	gated [n]	freq. of total [%]
NR	26505	15312	57,8
R	50000	18268	36,5



	total [n]	gated [n]	freq. of total [%]
NR	23400	12391	53,0
R	29040	10643	36,6



	total [n]	gated [n]	freq. of total [%]
NR	22755	13512	59,4
R	26220	10113	38,6

■ Nichtraucher, Pat. 101 (NR)  
 ■ Raucher, Pat. 102 (R)

## 5 Diskussion

In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass auf der Plasmamembran humaner Spermatozoen Strukturen existieren, die die Kohlenhydratreste Sialinsäure, Mannose, Fucose und Galactose erkennen und binden (Kapitel 4.3). Auf der Oberfläche humaner Eileiter wurden bereits Kohlenhydrate dargestellt [138, 139], die das Pendant einer Spermien-Eileiter-Interaktion bilden könnten.

Im humanen Modell ist, im Gegensatz zur Veterinärmedizin, das Wissen über diese Interaktion begrenzt [51]. Ein Überleben und Erhalt der Funktion der Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt ist jedoch Voraussetzung für eine erfolgreiche Befruchtung [18]. Die Bildung eines Spermienreservoirs im Eileiter scheint ein wichtiger Baustein für die Paarfertilität zu sein [51]. Ein Fehlen von Faktoren, die das Binden und Halten der Spermien in diesem Reservoir ermöglichen, könnte zu einer bisher als idiopathisch eingeordneten Reproduktionsstörung führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Bindung potentiell relevanter Kohlenhydrate an die Spermienmembran untersucht und die Bindungskapazität zwischen verschiedenen Patientengruppen verglichen:

In der Literatur ist der Konsum von Tabak als negativer Einflussfaktor auf die Zeugungsfähigkeit beschrieben [119, 148]. Diese Arbeit zeigt beim Vergleich verschiedener Patientengruppen, dass Raucher für einige Kohlenhydratreste eine signifikant verminderte Bindungsfähigkeit aufweisen (Kapitel 4.5). Unsere Daten deuten darauf hin, dass dieser Effekt bei Beenden des Zigarettenkonsums reversibel zu sein scheint (4.6).

Mögliche Bindungspartner der Kohlenhydratreste sind Lektine [149]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir das Lektin VIP36 erstmals als möglichen Bindungspartner von Mannose auf der Plasmamembran humaner Spermatozoen nachweisen (Kapitel 4.4).

Durch die hohe Relevanz der Interaktion der Spermatozoen im weiblichen Reproduktionstrakt könnte eine verminderte Bindungskapazität zu einer herabgesetzten Fertilität führen. Männer, auch mit makroskopisch normalen SpermioGrammparametern gemäß WHO-Kriterien [15], könnten bei verringerter Expression Kohlenhydrat-bindender Strukturen auf der Plasmamembran unter einer, bis dato als idiopathische Infertilität klassifizierten Reproduktionsstörung leiden. Die Bindungsfähigkeit im Eileiter ist somit Teil der bisher nur wenig untersuchten funktionellen Spermienqualität. Das Wissen könnte neue diagnostische und therapeutische Ansätze bei infertilen Männern ermöglichen.

## 5.1 Auswahl der Studienpopulation

Für unsere Studie wurden Patienten aus der Andrologischen Sprechstunde der LMU München unabhängig vom aktuellen Konsultationsgrund rekrutiert.

In den Analysen lag das mediane Alter bei 37 Jahren. Insgesamt wurden Männer zwischen 23 und 58 Jahren eingeschlossen. Untersuchungen zum Alter von (verheirateten) Vätern zum Zeitpunkt der Geburt in der Schweiz zeigte, dass Männer bei der Zeugung des Kindes durchschnittlich 34 Jahre alt waren [150]. Die Studienpopulation dieser Arbeit entspricht damit der Altersstruktur von Männern, die erfolgreich Kinder zeugen könnten. Insgesamt sind jedoch 80,4% der eingeschlossenen Patienten bisher kinderlos und 71,6% haben einen aktuellen Kinderwunsch (Tabelle 13, Seite 46). Dies passt zu dem typischen Klientel einer andrologischen Sprechstunde [2].

In unserer Studie gaben 15,7% der teilnehmenden Männer einen Zigarettenkonsum an. In Umfragen von 2018 wird die Zahl der rauchenden Männer in Deutschland sogar mit 26,4% angegeben [108], für das Alter zwischen 18-64 Jahren sogar mit 39% [151]. Der Mikrozensus 2013 erbrachte in Bayern eine Quote von 27,2% rauchenden Männern [152]. Oberbayern liegt mit einer Gesamtraucherquote von 21,5% im bayrischen Mittelfeld [153]. Es kann angenommen werden, dass die meisten unserer Patienten in dieser Region wohnhaft waren. Laut dem Marktforschungsinstitut RIM lässt sich innerhalb von München sogar eine noch niedrigere Quote von 19% rauchenden Männern ermitteln [154].

Da es sich bei den eingeschlossenen Männern zum Großteil um Patienten mit Kinderwunsch handelte (71,6%), kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass Einigen bereits bei einer vorangegangenen Beratung oder nach selbstständiger Information empfohlen wurde, den Tabakkonsum zu beenden. Der Anteil der Männer, die in den letzten zwei Jahren mit dem Rauchen aufgehört haben, liegt demnach immerhin bei 7,8%.

Die insgesamt niedrige Quote ehemaliger Raucher (22,5%) in unserer Studie könnte mit der Altersstruktur der Probanden erklärt werden. In Analysen von Männern im Alter von 18-79 Jahren haben 33,7% früher geraucht und ebenso 33,7% niemals geraucht [151]. Der Mikrozensus 2013 kommt außerdem zu dem Ergebnis, dass ab 60 Jahren nur noch 16,3% der Männer rauchen und damit mehr als halb so wenig, wie zwischen 30-39 Jahren (40,7%). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur Männer zwischen 23-58 Jahren untersucht, was die Verschiebung der Daten erklären könnte. Vom Marktforschungsinstitut RIM wurde außerdem innerhalb des Raumes München für Männer zwischen 30 und 60 Jahren ein Anteil von 28% ehemalige Raucher ermittelt [154]. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Rauchgewohnheiten der untersuchten Population ein gutes Abbild von Kinderwunschpatienten im Münchner Raum darstellt.

Der mittlere BMI-Wert der Patienten in der vorliegenden Studie lag bei  $25 \text{ kg/m}^2$ . Daten des Statistischen Bundesamtes und des Robert-Koch-Instituts von 2017 geben für Männer in Deutschland im Alter zwischen 20 und 60 Jahren einen durchschnittlichen BMI von  $25 \text{ kg/m}^2$  an. Davon

sind 47% übergewichtig ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) und 14% adipös ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) [155]. Ähnliche Werten zeigen sich in Bayern und der Region Oberbayern [156]. In unserer Studie leiden ebenfalls 14% an Adipositas, mit 67% allerdings etwas mehr Männer an Übergewicht als im lokalen Schnitt. In der Verteilung unserer Daten zeigt sich jedoch, dass 33,9% der Männer mit Übergewicht einen errechneten BMI von genau  $25 \text{ kg/m}^2$  haben, was eine Verschiebung erklären könnte.

Die Beantwortung der Frage nach aktuellen Erkrankungen und Vorerkrankungen erscheint durch die niedrigen Prävalenzen lückenhaft (Tabelle 14, Seite 48). Die Prävalenz der Varikozele wird in der Gesamtbevölkerung beispielsweise bei 5-20% gesehen, bei Patienten mit primärer Fertilitätsstörung sogar bei ca. 20% [2]. In unserer Studie berichteten lediglich 3 Patienten (2,9%) von einer ihnen bekannten Varikozele. Dies lässt sich sicher damit erklären, dass die meisten Patienten ihre Vorerkrankungen als nicht relevant einstufen. In einer ausführlichen mündlichen Anamnese könnten bisherige Erkrankungen exakter erfragt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studienpopulation ein repräsentatives Abbild einer typischen andrologischen Sprechstunde darstellt. Das Kollektiv ist vor allem durch die hohe Prävalenz des Kinderwunsches nicht mit einer Normalbevölkerung gleichzusetzen. Es muss angenommen werden, dass mehr Männer als im gleichaltrigen Querschnitt einer Normalbevölkerung an einer Einschränkung der Fertilität leiden.

## 5.2 Beurteilung der methodischen Durchführung

### 5.2.1 Fallzahlen in der Studie

Im Vergleich mit aktuellen Analysen der Auswirkungen des Rauchens auf die Spermio-graphqualität (siehe 5.4.1) verfügt unsere Studie über vergleichsweise geringe Fallzahlen. Der experimentelle Aufwand bei dieser Art von Studien ist deutlich geringer als in der vorliegenden Arbeit und stützt sich meistens auf retrospektive Daten oder Datenbanken einer Klinik. Eine höhere Fallzahl wäre die Voraussetzung, um eine Aussage über die Dosisabhängigkeit des Zigarettenkonsums treffen zu können.

Dennoch scheint die vorliegende Arbeit angesichts des experimentellen Aufwands und der bisherigen Datenlage zur humanen Spermien-Eileiter-Interaktion und deren Auswirkungen auf die Fertilität geeignet, Tendenzen zu beschreiben und eine Grundlage für weitere Untersuchungen zu schaffen.

Die Ergebnisse zeigen, dass zwischen der Expression bestimmter Kohlenhydrat-bindender Strukturen und dem Zigarettenkonsum der Männer ein Zusammenhang besteht. Trotz kleiner Fallzahlen in der Rauchergruppe ( $n = 16$ ) kann eine statistische Signifikanz beobachtet werden.

### 5.2.2 Subjektive Angabe des Tabakkonsums

Die Beurteilung und Definition der Stärke des Rauchens und Kategorisierung der Patienten fällt vor allem durch die niedrigen Fallzahlen schwer. Die Angabe erfolgte nach subjektiver Einschätzung der Patienten selbst. Angeboten wurden den Männern auf dem Fragebogen, ähnlich wie in anderen Studien zur Auswirkung auf die Spermienqualität, die drei Kategorien <15 Zig/d, >15 Zig/d und >30 Zig/d [120, 157]. Die Angabe wurde von allen ehemaligen und aktuellen Rauchern ausgefüllt. Vorab wurden die Patienten dazu ermutigt, wahrheitsgemäße Aussagen zu treffen, da eine Pseudonymisierung der Datensätze durchgeführt wurde und in keiner Weise Nachteile entstanden. Es kann trotzdem vermutet werden, dass durch die subjektive Angabe die Anzahl der Zigaretten pro Tag eher unterschätzt wird. Mehrere Studien berichten jedoch über eine sehr gute Korrelation zwischen den subjektiven Angaben zum Zigarettenkonsum und den Cotinin-Levels in Serum und Urin [158-160].

Die Aufteilung der Menge an gerauchten Zigaretten in drei Kategorien erschien uns im Vorfeld der Studie als angemessen. Auch andere Studien haben eine Einteilung des Konsums in „mild“, „moderate“ und „heavy“ vorgenommen [120, 157]. Aufgrund von geringen Fallzahlen stellte sich bei der vorliegenden Studie die detaillierte Auswertung nach den Kategorien jedoch als nicht zielführend heraus. Eine ähnliche Konsequenz wurde auch in anderen Veröffentlichungen, wie beispielsweise bei Sepaniak et al., 2006, gezogen [157].

Die Klassifizierung und Auswertung nach pack years, wie oft in der Medizin üblich, halte ich bei dem vorliegenden Studiendesign nicht für angebracht. Da ein direkter Einfluss des Tabakkonsums auf die Spermatozoen und die Spermatogenese vermutet werden kann, erscheint es sinnvoll die Patienten nach dem aktuellen Zigarettenkonsum zu befragen, da durch die stetige Spermio-genese eventuelle Schädigungen bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar sein könnten [161, 162] (siehe hierzu auch 5.4.3 und 5.4.4). Fehlerquellen entstehen hierbei jedoch durch Gelegenheitsraucher.

Besser als die rein subjektive Angabe der Patienten wäre eine Messung von Tabakprodukten im Blutserum, im Urin oder im Ejakulat der Patienten. Dies würde eine bessere Objektivierung schaffen, da der Nikotingehalt der Zigaretten sowie die Aufnahme- und Metabolisierungskapazität der Produkte interindividuell stark variieren. Die Menge an aufgenommenen Inhaltsstoffen hängt außerdem davon ab, wie die Zigarette geraucht wird, beispielsweise wie tief eingeatmet wird [163]. Außerdem kann durch die Messung der Produkte im Körper das Passivrauchen miteinbezogen werden, was in unserer Studie nicht berücksichtigt wurde.

Am meisten verwendet ist hierbei die direkte Messung von Nikotin oder dessen Abbauprodukt Cotinin im Serum [164]. Bei andrologischem Schwerpunkt ist auch die Messung von Nikotin, Cotinin oder trans-3'-hydroxycotinin im Seminalplasma möglich [132]. Neben dem hohen Aufwand und teils invasiven Eingriffen, stellt sich die Frage, welche Produkte des Tabakrauches die Schädigung der Spermienmembran auslösen und ob dies beispielsweise mit den gemessenen

Cotinin-Levels korreliert. Wie bereits dargestellt, werden neben Kohlenstoffmonoxid, Teer und Nikotin beim Rauchen über 4000 weitere Bestandteile freigesetzt, von denen viele als potenziell mutagen, aneugen oder karzinogen angesehen werden.

Am exaktesten wäre eine Messung der schädlichen Produkte im Hodengewebe, was jedoch nur durch eine ethisch nicht vertretbare Biopsieentnahme zu klären wäre. Diese Methodik würde außerdem die Schädigung der Spermien an anderen Orten, beispielsweise durch Sekret aus Prostata oder Samenbläschen nicht exakt genug erfassen.

Insgesamt stellt für die Fragestellung der Arbeit die subjektive Befragung der Patienten einen guten Parameter zur Erfassung der Stärke des Tabakkonsums dar.

### **5.2.3 Beurteilung von Spermogrammen**

Nach Richtlinien der WHO ist die Beurteilung der Spermienqualität auf Grundlage nur eines Spermigramms häufig nicht endgültig aussagekräftig [15]. Die Spermienqualität variiert, wie beschrieben, stark intraindividuell und unterliegt großen physiologischen Schwankungen. Die WHO spricht deshalb von mindestens zwei notwendigen Spermigrammanalysen, um reliabel Diagnostik durchführen zu können [165].

Weiterhin kann die Beurteilung der Spermigramme stark untersucherabhängig sein [166]. Die Spermigramme für diese Arbeit wurden daher alle von derselben Untersucherin angefertigt. Das Andrologische Labor des Klinikums der LMU arbeitet dabei nach den bundeseinheitlichen Kriterien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) [167]. Seitdem diese Richtlinien zur Qualitätssicherung eingeführt wurden, ist die Teilnahme an Ringversuchen für alle Untersucher verpflichtend (QuaDeGA) [168].

Viele Patienten in unserer Studie kamen mehrmals zu Ejakulatuntersuchungen. Auf Grund der gesicherten Qualität der Untersuchungen wurden pro Patient nur die Parameter von einem Spermogramm herangezogen, was außerdem notwendig war, um die weiteren Ergebnisse (Bindungskapazität der Kohlenhydratreste) nicht zu verfälschen und mit den Spermogrammparametern und den Daten des Fragebogens in Verbindung setzen zu können.

### **5.2.4 Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen**

Die Auswertung der fluoreszierenden Spermien wurde durch verschiedene Faktoren erschwert. Eine optimale Reinigung der Spermien von weiteren Ejakulatbestandteilen wurde durch das ausgewählte Protokoll angestrebt, konnte aber nicht bei allen Patienten in gleicher Weise erfolgen. Durch Verunreinigung der zu mikroskopierenden Proben wurde das Auszählen erschwert und eventuell einige Spermien bei der händischen Auswertung übersehen, was sich besonders bei niedrigen Spermienzahlen auf das Ergebnis auswirken könnte. Gerade durch dieses Problem ist eine maschinelle Auszählung der fluoreszierenden Spermien nicht möglich, was eine weitere

Objektivierung nicht zulässt. Je nach Ejakulat finden sich im Seminalplasma außerdem Bestandteile, die ebenfalls die FITC-konjugierten-Kohlenhydratreste binden können. Dies könnte bei nicht sauber aufgereinigten Ejakulaten zusätzlich zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen.

Dieses Problem wurde minimiert, indem nur Spermien gezählt wurden, die sich auch durch den Farbstoff DAPI anfärben ließen. Hiermit wird der DNA-reiche Kopf der Spermien dargestellt. Da jedoch auch andere Zellen im Ejakulat vorkommen können, die sich teilweise durch die Reinigung nicht entfernen lassen und deren DNA sich ebenfalls mit DAPI anfärbt, wurde weiterhin nach der typischen Form der Spermien beurteilt. Das Hellfeld-Bild und der dritte Kanal (Mito-tracker DeepRed), der das Mittelstück und den Spermischwanz anfärbt, konnten außerdem zur besseren Differenzierung herangezogen werden. Mithilfe dieser Methodik wurde, soweit möglich, sichergestellt werden, dass nur Spermienzellen in die Zählung aufgenommen werden.

Als Alternative zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wird im nächsten Kapitel die Analyse mittels Durchflusszytometrie diskutiert.

Generell lässt sich außerdem anmerken, dass die experimentelle Untersuchung humaner Ejakulate deutlich anspruchsvoller ist als die Untersuchung von Ejakulaten aus der Tierwelt (bspw. Bullenspermien). Im Regelfall ist die Spermienqualität humaner Proben deutlich schlechter. Es besteht meist eine geringere Spermienanzahl, eine niedrigere Motilität und geringeres Volumen. Eine Aufreinigung der Ejakulate ist weiterhin durch häufigere Verunreinigung mit diversen anderen Zellen beim Menschen erschwert. Durch die gute Verfügbarkeit und vielen Erfahrungswerten aus der Literatur wurden unsere Experimente vorab mit kryokonservierten Bullenspermien entwickelt und getestet. Die Untersuchungen, speziell die Aufreinigung der Ejakulate und das Auszählen der gefärbten Spermien, gestaltete sich hier deutlich leichter als später mit humanen Proben.

### **5.2.5 Stellenwert von Galactose in den Untersuchungen**

Die Auswertung von Galactose (GA) in der Fluoreszenzmikroskopie gestaltete sich komplizierter als bei den anderen Kohlenhydratresten. Die GA-Reste wurden bei unseren Patienten im Seminalplasma sehr stark gebunden, was teilweise zu Schwierigkeiten beim Auszählen führte (siehe Abbildung 11). Häufig lag außerdem, trotz korrekter Anwendung, eine Verklumpung des Farbstoffs vor, was das Auszählen zusätzlich erschwerte.

Bei SA, MA und FU ließen sich weiterhin über alle Patientengruppen hinweg ähnliche Ergebnisse darstellen. GA jedoch zeigte eine breite Streuung der Bindungskapazität (siehe beispielsweise Abbildung 16). Zur Überprüfung der Ergebnisse wäre, insbesondere für Galactose der Vergleich mit einer weiteren Methodik (beispielsweise Durchflusszytometrie) wünschenswert.

### 5.2.6 Durchflusszytometrie

Als Alternativmethode zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung und Auszählung der Spermatozoen wurden zwei frische Ejakulate (ein Raucher, ein Nichtraucher) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Aufgrund der geringen Probenzahl war eine statistische Auswertung der Versuche nicht geplant. Das Ziel war die Darstellung eines weiteren Verfahrens zur Untersuchung der Kohlenhydratbindungskapazität humaner Spermienproben.

Generell ist die Durchflusszytometrie ein häufig eingesetztes Verfahren in der Forschung und Diagnostik. Die Vorteile dieser Methode bestehen vor allem in der guten Verfügbarkeit in medizinischen Laboren sowie in der schnellen Untersuchung von mehreren tausend Zellen innerhalb weniger Sekunden. In der Durchflusszytometrie kann außerdem während eines Durchlaufs eine Zelle nach verschiedenen Merkmalen analysiert werden.

Erschwert wurde die Methodik, ebenso wie bei der Fluoreszenzmikroskopie, durch die schwierige Aufbereitung humaner Proben. Vor allem im Vergleich mit Tierejakulaten waren auch im FACS vermehrt andere Zellen zu sehen, die eine Abgrenzung der Spermienpopulationen erschwerten (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22, Seite 65). Für einen weiterführenden Vergleich wäre weiterhin ein vollständiges Spermioogramm (mit Vitalität und Morphologie) wünschenswert. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse müsste auch hier mit mehreren Ejakulaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unabhängig voneinander durchgeführten Messungen erfolgen. Für die Etablierung der Messung der Kohlenhydratbindungskapazität humaner Spermatozoen könnten dann FACS und Fluoreszenzmikroskopie nebeneinander eingesetzt werden, um die Methoden zu vergleichen und zu validieren.

### 5.2.7 Direkter Lektinnachweis

Spermienpräparation, Elektrophorese und Lektin Blot wurden analog zu dem Protokoll von Cortés et. al., 2004 durchgeführt [142]. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die mit Rattenspermien durchgeführten Experimente nicht auf das humane Modell übertragen werden können. In der Auswertung beobachteten wir, trotz vielfältiger Modifikationen der Methodik, diverse unspezifische Banden (siehe Kapitel 4.8), so dass die gesuchten Proteine nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnten.

Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Immunoblot konnten wir erstmals das Lektin VIP36 auf der Plasmamembran humaner Spermatozoen nachweisen. Dieses Protein wäre fähig, den Kohlenhydratrest Mannose zu binden und könnte damit eine Rolle in der Spermien-Eileiter-Interaktion spielen. Exemplarisch wurden für den Versuch Ejakulate von zwei zufälligen ausgewählten Nichtrauchern untersucht, von denen schließlich einer das Lektin exprimierte. Aufgrund der aufwendigen Methodik und der Fokussierung auf die Hauptfragestellung, beschränkten sich die Forschungen zu dieser Arbeit auf diese geringe Probandenzahl.

Mit dem Nachweis des Lektins VIP36 möchten wir einen möglichen Bindungspartner für die in der Arbeit untersuchten Kohlenhydratreste aufzeigen sowie Anregung für Folgestudien geben. Für weitere Arbeiten wäre ein Vergleich zwischen verschiedenen Patientengruppen interessant. Die Untersuchung des Eileiterepithels nach einer Bindungsfähigkeit von VIP36 könnte weiterhin Aufschluss über eine mögliche Relevanz für die Bildung des Spermienreservoirs aufzeigen. Die weitere Charakterisierung des Lektins VIP36 ist in Kapitel 5.7 zu finden.

### 5.2.8 Statistische Auswertung

Wie vorangehend dargestellt fand sich, aufgrund des hohen experimentellen Aufwands, häufig das Problem einer kleinen Gruppengröße. Auch wenn nach statistischen Tests kein signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ) vorlag, wurde in dieser Arbeit versucht, den klinischen und in den Daten der Gruppen sichtbaren Unterschied zu beschreiben.

Eine interessante Möglichkeit in der statistischen Auswertung bieten Regressionsmodelle: Hier könnten mehrere Variablen untersucht werden und Störfaktoren herausgerechnet werden. Wünschenswert wäre es zum Beispiel, zu untersuchen, welche unabhängigen Variablen (beispielsweise Rauchen, Gewicht, SpermioGrammparameter) einen Einfluss auf die Kohlenhydratbindungskapazität haben. Es würde weiterhin ermöglichen, verschiedene Störgrößen (beispielsweise unterschiedliches Alter der Männer) herauszurechnen. Für ein solches Modell waren jedoch, neben sehr kleinen Gruppengrößen, bestimmte Voraussetzungen wie Normalverteilung, Homoskedastizität und Linearität nicht gegeben.

## 5.3 Mechanismus und Stellenwert der Spermien-Eileiter-Interaktion

In vitro Versuche konnten zeigen, dass humane Spermatozoen bei Raumtemperatur bis zu fünf Tage ihre Befruchtungsfähigkeit erhalten können [169]. Wie bereits beschrieben, kann diese Überlebensfähigkeit durch die in vitro Inkubation mit Eileiterepithel sogar noch verlängert und die Motilität der Spermien verbessert werden [82, 170]. Zusammen mit dem Wissen, dass ein Schwangerschaftseintritt bei einmaligem Geschlechtsverkehr bis zu fünf Tage vor der Ovulation stattfinden kann [171], lässt sich daraus schließen, dass eine Speicherung der Spermien im weiblichen Geschlechtstrakt erfolgen muss, die es den Spermien ermöglicht, ihre Fähigkeit zur Fertilisierung aufrecht zu erhalten:

Die Speicherung und Konservierung der Spermien findet im sogenannten Spermienreservoir statt. Aus mehreren Tierversuchen der letzten 20 Jahre gibt es Belege, dass Kohlenhydratreste auf dem Eileiterepithelium und Lektine auf der Spermienoberfläche eine Bindung eingehen können [51]. Relevant für diese Bindung könnten folgende Monosaccharide auf der Eileiteroberfläche sein: Fetuin beziehungsweise dessen terminaler Zucker N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) [93], Asialofetuin beziehungsweise dessen terminaler Zucker Galactose [96, 172], Fucose [94, 95,

173] und Mannose [97, 98, 174]. Diese Erkenntnisse stellten die Grundlage für die Auswahl der entsprechenden Kohlenhydratreste in dieser Studie dar.

Weiterhin scheinen auch Oligosaccharide, vor allem Verbindungen mit N-Acetylglucosamin, wie Lewis-a (N-Acetylglucosamin in einer alpha 1-4 Bindung zu Fucose) [95] und Lewis-X (N-Acetylglucosamin in einer alpha 1-3 Bindung zu Fucose) [175] eine wichtige Rolle für die Interaktion zu spielen. Insgesamt zeigte sich jedoch eine Bindung mit einem Spezies-spezifischem Kohlenhydrat.

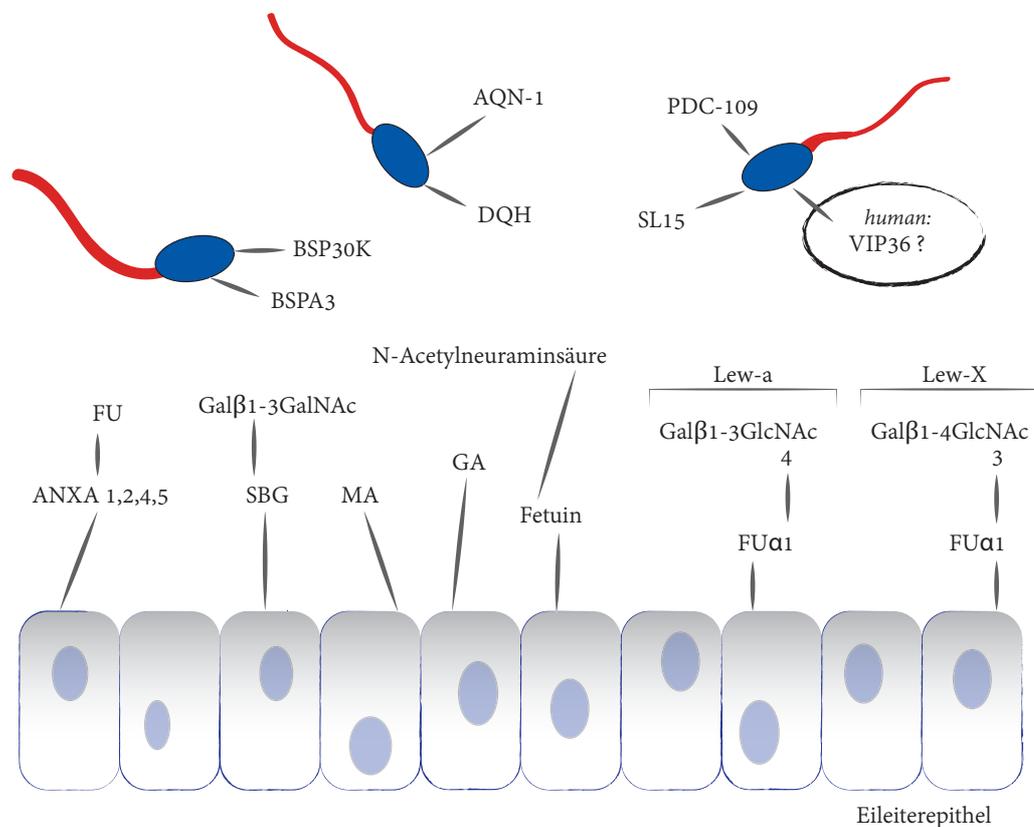
Wie bereits erwähnt wurden in den genannten Studien ausschließlich Tiermodelle verwendet, ein humanes Modell stellt ein Novum dar. Beim Menschen wurde bis dato, auch im Rahmen unserer bisherigen Forschungsarbeiten, eine Bindung der Spermatozoen im weiblichen Reproduktionstrakt nachgewiesen [92, 103, 138-140] und die Relevanz dieser Interaktion aufgezeigt [170]. Es wäre naheliegend, dass, wie im Tiermodell gezeigt, eine Lektin-Kohlenhydrat-Interaktion eine zentrale Rolle einnimmt. Im menschlichen Körper sind jedoch ebenfalls Zell-Adhäsions-Moleküle, wie zum Beispiel Integrine, an vielen Zell-Matrix-Interaktionen [18, 176] und auch an Fertilisation und Implantation [100] beteiligt. Es kann vermutet werden, dass auch diese Bausteine für eine Spermien-Eileiter-Interaktion in Frage kommen. Auch hier fehlt jedoch der experimentelle Beweis.

Ebenso gibt es bisher keine publizierten Ergebnisse, die auf der Plasmamembran humaner Spermatozoen einen Bindungspartner der Kohlenhydrate des Eileiterepithels untersucht haben.

Mithilfe der Methodik des humanen Lektin-Microarrays entwickeln aktuelle Forschungsarbeiten das Bild der Spermienglykokalix weiter. Untersucht wurden dabei die Kohlenhydratreste auf der Oberfläche der Plasmamembran, nicht aber die Lektine. Bindungsfähigkeit wurde hierbei für die Lektine Galectin-1, 7, 8, GalNAc-T6, und ERGIC-53 (LMAN1) nachgewiesen. Weitere Analysen zeigen interessante funktionelle Auswirkungen: Die Bindung von Galectin-8 scheint die Akrosomreaktion zu beschleunigen [56]. Ob Kohlenhydrate auf der Spermienoberfläche jedoch eine Auswirkung auf die Spermien-Eileiter-Interaktion haben, bleibt auch mit dieser Methodik ungeklärt, genauso, wie die unterschiedliche Exprimierung dieser Strukturen bei verschiedenen Patientengruppen.

Abbildung 24 stellt verschiedene Proteine dar, die im Tiermodell auf der Spermien- und Eileiteroberfläche nachgewiesen wurden. Ihnen können Beteiligungen an der Bildung eines Spermienreservoirs sowie teilweise an Kapazitation und Akrosomreaktion zugeschrieben werden. Bindung an PDC-109 scheint außerdem Konformationsänderungen der Plasmamembran hervorzurufen und die Motilität zu verbessern [177].

Abbildung 24: Schematische Darstellung einiger Moleküle auf der Eileiter- bzw. Spermienoberfläche, die in der Spermien-Eileiter-Interaktion involviert sind. Zusammenfassung von Studien bei unterschiedlichen Tierspezies.



Eileiter	Spermium
<b>ANXA1,2,4,5 (Rind):</b> Annexine 1,2,4,5 [173]	<b>BSP30K und BSPA3 (Rind):</b> bovine seminal plasma protein 30K und A3 [179]
<b>FU (Rind):</b> Fucose [Ignatz et al., 2007, Lefebvre et al., 1997, Suarez et al., 1998]	<b>AQN-1 (Schwein):</b> Spermienadhäsin [174]
<b>SBG (Schwein):</b> sperm binding glycoprotein [178]	<b>DQH (Schwein):</b> Spermienoberflächenprotein [180]
<b>Galβ1-3GalNAc (Schwein):</b> Galactose-beta 1-3 N-Acetylgalactosamin [178]	<b>PDC-109 (Rind):</b> Protein mit N-terminus aspartic acid and carboxy terminus cystine, mit 109 Aminosäuren [177, 181]
<b>MA (Schwein):</b> Mannose [97, 98, 174]	<b>SL-15 (Lama):</b> seminal lectin 15, Lektin aus dem Seminalplasma [182]
<b>GA (Schwein, Pferd):</b> Galactose [96, 172]	<b>VIP36 (human):</b> siehe Kapitel 4.4, 4.9 und 5.7
<b>Fetuin mit N-Acetylneuraminsäure/Sialinsäure (Schwein)</b> [93]	
<b>Lew-a (Rind):</b> Lewis-a, Fucoseα1-4 N-Acetylglucosamin [95]	
<b>Lew-X (Schwein):</b> Lewis X, Fucoseα1- 3 N-Acetylglucosamin [175]	

Folgende acht Monosaccharide können typischerweise in eukaryotischen Glykoproteinen gefunden werden:

*Tabelle 22: Monosaccharide, die in eukaryotischen Glykoproteinen gefunden werden können [183].*

Monosaccharide	Typ	Abkürzung
$\beta$ -D-Glucose	Hexose	Glc
$\beta$ -D-Galactose	Hexose	Gal
$\beta$ -D-Mannose	Hexose	Man
$\alpha$ -L-Fucose	Deoxyhexose	Fuc
$\beta$ -D-Xylose	Pentose	Xyl
$\beta$ -D-N-Acetylgalactosamin	Aminohexose	GalNAc
$\beta$ -D-N-Acetylglucosamin	Aminohexose	GlcNAc
$\alpha$ -N-Acetylneuraminisäure	Sialinsäure	NeuNAc

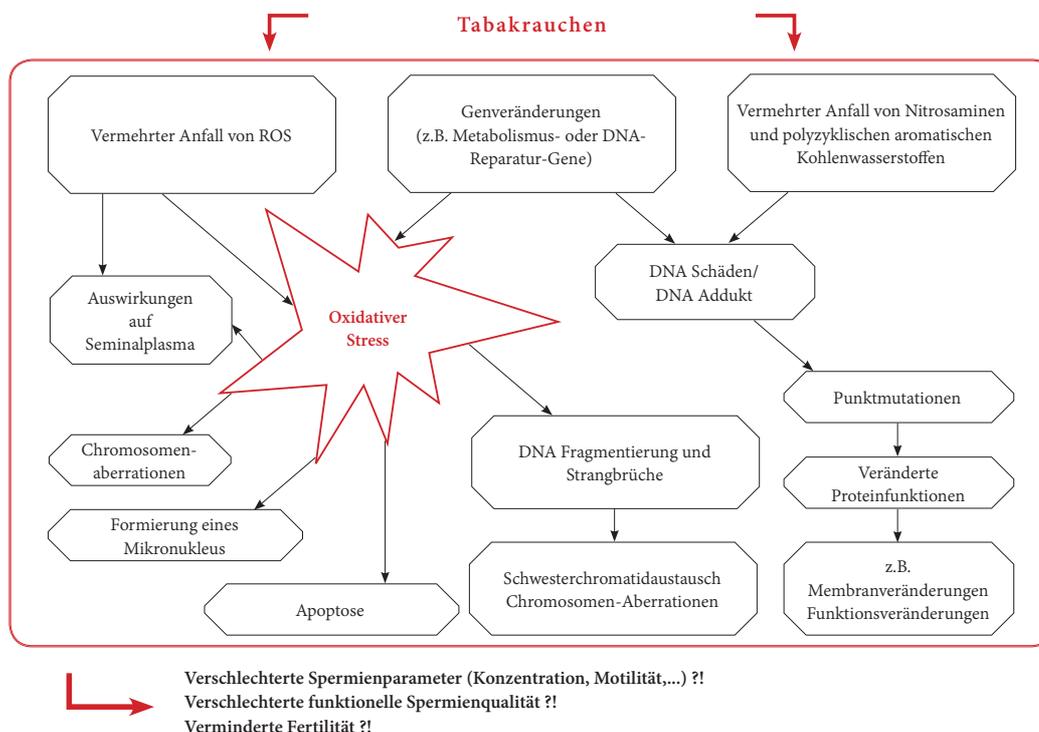
Aufgrund der oben erwähnten Literatur aus Tierversuchen trafen wir eine Auswahl der zu untersuchenden Kohlenhydrate. In der Konjugation mit FITC und Biotin waren letztendlich die vier Kohlenhydratreste Sialinsäure, Mannose, Fucose und Galactose verfügbar.

Über die Auswirkungen einer verminderten Bindungsfähigkeit im weiblichen Reproduktionstrakt ist jedoch bisher wenig bekannt. Anhand der physiologischen Grundlagen könnte eine gestörte Spermien-Eileiter Interaktion zu einer verkürzten Überlebensfähigkeit, schlechterer Fortbewegung und gestörter Funktion von Spermien im weiblichen Reproduktionstrakt führen. All dies könnte gravierende Auswirkungen auf die Fertilität haben und sich letztendlich sogar in einer Infertilität bei normalen Spermienparametern äußern.

### 5.4 Tabakkonsum als Risikofaktor für herabgesetzte Fertilität

Rauchen wird im medizinischen Aspekt als schädlich für viele Körperfunktionen angesehen. Die negativen Auswirkungen auf die Reproduktion, insbesondere auf die Spermienqualität sind in einer Vielzahl von Studien untersucht und allgemein akzeptiert. Die einzelnen Schädigungsmuster sind im Detail bis dato noch nicht verstanden, werden aber viel thematisiert und diskutiert [116, 119, 125]. Abbildung 25 gibt einen Überblick über mögliche Mechanismen, die zur Schädigung von Spermienzellen führen könnten. Die einzelnen Punkte werden in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet.

Abbildung 25: Zusammenfassung einiger Mechanismen, die zu Schädigungen der Spermien-DNA führen können. Aus diesen Schädigungen können verschlechterte Spermienparameter resultieren und auch die funktionelle Spermienqualität betroffen sein. Da Schaden am Erbgut auch mit veränderter Proteinsynthese und Funktion einhergehen kann, wird ebenfalls ein veränderter Membranaufbau angenommen und damit deren Funktion eingeschränkt oder verändert. All dies kann zu verminderter männlicher Fertilität führen. ROS: reactive oxygen species. Abbildung verändert nach [119].



#### 5.4.1 Einfluss des Tabakkonsums auf die Spermioigrammparameter

In unserer Studie konnten wir keinen Einfluss eines Tabakkonsums auf die routinemäßig erhobenen Spermioigrammparameter feststellen. Im Gegenteil fanden sich bei Spermienkonzentration und -motilität sogar nicht-signifikant höhere Werte bei Rauchern. Die Raucher zeigten weiterhin eine etwas höhere Normozoospermierate und eine geringere Anzahl an pathologischen

Diagnosen im Spermogramm (siehe Kapitel 4.5, ab Seite 53). Eine Erklärung sind sicherlich die niedrigen Fallzahlen, insbesondere in der Rauchergruppe (n = 16), und einige Patienten mit hoch-normalen Spermienqualitäten. Der genaue Einfluss des Tabakkonsums auf das Spermogramm wird weiterhin in der Wissenschaft kontrovers diskutiert:

Eine Studie mit großen Fallzahlen (n = 2542) konnte bei starken Rauchern (> 20 Zigaretten/Tag) eine um 19% verminderte Spermienkonzentration, eine um 29% verminderte Spermienanzahl und um 13% verschlechterte Motilität nachweisen [120]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Auswertungen von Kunzle et al. mit 1786 Männern: Rauchen ging hier mit einer niedrigeren Spermienanzahl (17,5%), -konzentration (15,3%) und -motilität (6,6%) einher. Verschlechterte Morphologie und vermindertes Volumen konnten auf einem nicht signifikanten Niveau gezeigt werden [121]. Eine Meta-Analysen von Harlev et al. zeigte auf der Datenlage von 33 Studien eine Reduktion der Spermienmotilität und -konzentration bei 36,4% der Studien. In 41,4% konnte eine signifikant verschlechterte Morphologie gezeigt werden. Die Daten wurden dabei sowohl von gesunden, als auch von infertilen Männern erhoben [119]. Eine weitere Meta-Analyse von Vine et al., 1994 zeigte eine verringerte Spermienkonzentration zwischen 13% und 17% bei Rauchern im Vergleich zur Kontrollgruppe [126]. Diese Auswertung beinhaltet jedoch 25 von 27 Studien mit jeweils weniger als 200 Patienten, was von Trummer et al. genauso kritisiert wird, wie die ungenaue Angabe der Zigaretten dosis [184].

Ähnliche Trends wie in den vorangegangenen genannten Studien setzen sich auf signifikantem Niveau in anderen Publikationen fort [121-124]. Bestätigt wird dies von neueren, zusammenfassenden Arbeiten, auch unter Anwendung der neuen WHO-Richtlinien von 2010 [125]. In den meisten Studien blieben die Spermogrammparameter der Raucher jedoch, trotz der beschriebenen Verschlechterungen, in dem von der WHO definierten Normalbereich. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Rauchen und dem Auftreten von Oligozoospermie oder Azoospermie konnte auch in großen Studien nicht hergestellt werden [120]. Die Autoren der Meta-Analyse von Harlev et al. weisen jedoch berechtigterweise darauf hin, dass die Fertilität auch bei normalen Spermogrammparametern eingeschränkt sein kann [119].

Obwohl viele Studien in Bezug auf Spermienanzahl und -qualität einen negativen Einfluss von Tabakrauchen zeigen, ist die Studienlage nicht immer eindeutig: In einer große Studie mit über 2000 Männern stellte sich das Zigarettenrauchen nicht als Risikofaktor für eine verringerte Konzentration motiler Spermien heraus [185]. Andere Spermogrammparameter wurden jedoch nicht untersucht. Bei Hassa et al. zeigte sich zwar eine Korrelation zwischen Rauchen und einer verringerten Spermienmotilität, die anderen Parameter blieben jedoch ohne Einfluss [186]. Eine Dosisabhängigkeit war ebenfalls nicht zu beobachten. Dikshit et al. untersuchten 626 Männer, die sich in einer Infertilitäts-Abteilung vorstellten. Es zeigte sich, dass weder der Konsum von Zigaretten noch von Kautabak einen Risikofaktor für ein verschlechtertes Spermogramm darstellte. Ein gegensätzliches Patientenkollektiv präsentiert eine weitere Studie, die 889 Männer untersuchte, die sich zur Vasektomie vorstellten. Auch hier zeigten sich keine Reduktion der

Spermienkonzentration oder -motilität bei Rauchern im Vergleich zur Kontrollgruppe [187]. Im Unterschied zu den vorher genannten Studien können die untersuchten Männer jedoch als fertil gelten. Die Autoren fanden jedoch ein signifikant verringertes Ejakulatvolumen in Abhängigkeit vom Zigarettenkonsum und werteten dies als Frühzeichen einer Beeinträchtigung der Spermienqualität. An dieser Stelle soll außerdem die Wichtigkeit der Patientenselektion für diese Art von Studien hervorgehoben werden. Dies wird ebenfalls von Trummer et al. betont, die zu bedenken geben, dass für vergleichbare Studien ein Patientenkollektiv gewählt werden muss, das aus einer Infertilitäts-Klinik stammt [184].

Die genauen Mechanismen der Auswirkungen des Rauchens auf die Spermienparameter und -funktion sind bisher jedoch nicht verstanden. Mögliche Gründe könnten die direkte Schädigung durch toxische Inhaltsstoffe des Tabaks auf das Epithel der Keimdrüsen [118], die chemische Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse [127] oder die Änderung der Mikrozirkulation im Hoden [128, 129] sein. Es wird außerdem angenommen, dass verschiedene Inhaltsstoffe im Tabakrauch Schäden der Spermien-DNA auslösen können [157, 188-190] (siehe auch Abbildung 25). Schäden der Motilität können zum Beispiel durch Pathologien der Mikrotubuli-Strukturen entstehen. Bei Rauchern konnten qualitative und quantitative Veränderungen der Mikrotubuli [130] sowie morphologische Unterschiede des Spermischwanzes gezeigt werden [191]. Solche Pathologien könnten Auswirkungen auf die Bewegung des Flagellums haben und damit die beschriebene verschlechterte Motilität bei Raucherspermien erklären.

Trotz umstrittener Datenlage sollten die beschriebenen SpermioGrammpathologien bei Rauchern den Kliniker dazu bewegen, Patienten zu einer Tabakkarenz zu raten.

Um die SpermioGrammparameter zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu vergleichen, scheint es notwendig, höhere Fallzahlen als in unseren Untersuchungen zu analysieren. Verzerrungen treten außerdem durch die unterschiedlichen Gruppengrößen auf: Beispielsweise finden sich in der Rauchergruppe nur zwei von 16 Patienten mit Oligozoospermie (12,5%) und einer von 15 Patienten mit einem OAT-Syndrom (6,7%). Im Vergleich dazu weisen unter den Nichtrauchern 18 von 86 Probanden eine Oligozoospermie (20,9%) und sechs von 82 Probanden ein OAT-Syndrom (7,3%) auf.

#### 5.4.2 Einfluss des Tabakkonsums auf das Seminalplasma

Eine Ursache für die von uns beobachtete verringerte Bindungskapazität der Spermien bei Rauchern scheint eine Schädigung der Spermienmembran zu sein. Der Pathomechanismus der Schädigung könnte auch in Veränderungen des Seminalplasmas zu finden sein:

Wichtige schädigende Stoffe sind neben Nikotin selbst vor allem die Nikotin-Abbauprodukte Cotinin und trans-3'-hydroxycotinin. Diese konnten bei Tabakkonsum im Serum und im Seminalplasma nachgewiesen werden und korrelieren mit der Dosis des Rauchens [131, 132]. Damit

zusammenhängend wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen diesen Produkten und der Spermien-Konzentration, Motilität und Morphologie nachgewiesen [132, 192, 193].

Ähnliches konnte für Schwermetalle wie Kadmium und Blei gezeigt werden. Beide Stoffe sind für ihre schädlichen Effekte auf die Spermienparameter bekannt [133, 194, 195]. Erhöhte Kadmium Werte im Seminalplasma wurden bei Rauchern mit mehr als 20 Zigaretten pro Tag nachgewiesen [134].

Der schädliche Effekt des Seminalplasmas von Rauchern auf die Spermienfunktion wird in zwei weiteren Studien deutlich: Spermienqualität, Überlebensfähigkeit und Motilität von Nichtraucherpermien verschlechterten sich bei Inkubation im Seminalplasma von Nichtrauchern. Umgekehrt verbessern sich die genannten Parameter bei Raucherspermien, wenn man das Seminalplasma entfernt und durch PBS oder Seminalplasma von Nichtrauchern ersetzt [196, 197].

Bekanntermaßen werden durch Tabakrauchen vermehrt reaktive Oxidantien frei. Dies erhöht den oxidativen Stress im gesamten Organismus und damit auch den Schaden an den Spermien [119]. Oxidativer Stress entsteht durch eine Imbalance zwischen reaktiven Radikalen und natürlichen Antioxidantien. Bei Rauchern konnten sowohl erhöhte Spiegel reaktiver Radikale [135] als auch eine verminderte Konzentration von Antioxidantien gezeigt werden [198-200]. Vermehrte reaktive Radikale können dabei von externen und internen Quellen kommen. Externe Ursachen sind vor allem Rauchen [135], Alkohol [201] und Schadstoffe aus der Luft [202]. Ein Grund für interne Ursachen vermehrter Radikale sind hauptsächlich eine erhöhte Anzahl an Leukozyten [203]. Der Zusammenhang zwischen Leukozytospermie und Tabakrauchen konnte in mehreren Studien hergestellt werden [200, 204]. Auch Trummer et al. konnten in ihren Untersuchungen von 1104 infertilen Männern zwar keinen Effekt von Rauchen auf die SpermioGrammparameter jedoch signifikant mehr Leukozyten im Ejakulat von Rauchern feststellen [184]. Auch im peripheren Blut von Rauchern konnten erhöhte Leukozytenzahlen festgestellt werden [205]. Ein möglicher Mechanismus wird von van Eeden und Hogg beschrieben: Durch das Zigarettenrauchen findet eine vermehrte Ausschüttung von Leukozyten aus dem Knochenmark statt, was auch zu einer chronischen Inflammation der Lunge führt [206]. Wie es zur beschriebenen Leukozytospermie kommt ist jedoch im Detail unklar.

Die erhöhten Leukozyten-Level führen zu vermehrtem oxidativem Stress im Seminalplasma und damit auch zu Schädigungen der direkt exponierten Spermien [207]. Konkret kann dieser Stress zu DNA und Membranschäden führen [189, 208]. Leukozytospermie wird auch mit Spermien deformitäten und Akrosomschädigungen in Verbindung gebracht [209]. Damit einhergehend sind negative Folgen für die Überlebensfähigkeit, Morphologie und letztendlich Spermienfunktion. All dies kann zu einer pathologisch verminderten Fertilität, auch bei normalen SpermioGrammparametern, führen.

Interessanterweise ist die Spermienplasmamembran besonders anfällig für Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies. Der hohe Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die in der

Membran eingelagert sind, sind Substrate für die Radikale [210, 211]. Ihre Schädigung scheint daher ein wichtiger Faktor im Zusammenhang zwischen freien Sauerstoffradikalen und Fertilitätsstörungen zu sein.

Wir vermuten daher, dass die beschriebenen pathologischen Veränderungen des Seminalplasmas zu Membranschäden führen, die eine verminderten Bindungsfähigkeit für Kohlenhydrate zur Folge haben kann. Die Pathologien im Seminalplasma spielen bei der Erklärung dieser Ergebnisse sicherlich eine Rolle. Um jedoch einen kausalen Zusammenhang mit schädlichen Produkten des Tabaks herstellen zu können, wäre es notwendig, wie beispielsweise von Pacifici et al. beschrieben, die entsprechenden Metaboliten direkt im Seminalplasma nachzuweisen und mit den Ergebnissen der Kohlenhydratbindung in Relation zu setzen [132].

### 5.4.3 Einfluss des Tabakkonsums auf die Fertilität

Einen direkten Zusammenhang zwischen Kohlenhydratbindungskapazität und Fertilität konnte in der vorliegenden Studie nicht beschrieben werden. Fertilität kann als multifaktoriell angesehen werden, was eine Korrelation mit solitären Parametern schwierig gestaltet.

Besser als die Fertilität bei Reproduktion auf natürlichem Weg lassen sich die Auswirkungen auf die assistierte Reproduktion untersuchen. Neben den schon seit langer Zeit gut erforschten Prognosefaktoren für Verfahren wie In-vitro-Fertilisation (IVF), Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) oder Intratubarer Gametentransfer (GIFT), nehmen die Studien für die Auswirkungen der Art und Weise der Lebensführung ("lifestyle-Faktoren") bei Frau und Mann zu. Neben Ernährung, Alkoholkonsum und Umweltfaktoren spielt hier das Rauchen eine entscheidende Rolle [212].

Zitzman et al. zeigten bei der alleinigen Betrachtung der Männer sowohl bei ICSI (n = 153) als auch bei IVF (n = 148) signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Eine Frau mit einem rauchenden Partner hat bei ICSI geringere Erfolgchancen auf eine Schwangerschaft als mit einem Nichtraucher (22% vs. 38%) [213]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der IVF: Raucher hatten in dieser Studie eine Erfolgchance von 18%, Nichtraucher von 32%. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in diversen anderen Studien finden [114, 214, 215]. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch das Rauchen der Partnerin zu ebenso großen Einschränkungen der Paarfertilität führen kann. Untersuchungen zeigen, dass signifikant mehr Raucher eine Partnerin haben, die ebenfalls raucht [184].

Prognosefaktoren für eine natürliche Befruchtung sind schwierig zu untersuchen. Daher gibt es zwar bei Rauchern bisher keinen Beweis für eine herabgesetzte Fertilität, eine negative Auswirkung kann jedoch, ähnlich wie bei der assistierten Reproduktion, angenommen werden.

Diese auf eine assistierte Reproduktion einwirkenden Faktoren sollten Arzt und Patienten bekannt sein, um eine zufriedenstellende, zeit- und kostensparende Durchführung zu

gewährleisten. Wie schnell eine Verbesserung der Fertilität eines Rauchers nach Beenden des Tabakkonsums eintritt, ist jedoch nicht ausreichend untersucht. In einem Fallreport von Prentki Santos et al. konnte bei einem infertilen Mann nach dreimonatiger Tabakkarenz unter anderem eine deutliche Verbesserung der Spermienkonzentration, Vitalität und der schnellen Spermatozoen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich Morphologie, DNA Fragmentierung und Anzahl der Keimzellen im Ejakulat nicht verändert. Die Autoren schlussfolgern, dass hierfür eine längere Tabakkarenz notwendig ist oder bereits eine irreversible Schädigung einiger Stammzellen vorliegt [161]. In diesem Sinne sollte allen Paaren mit Kinderwunsch geraten werden das Rauchen zu beenden oder wenigstens zu unterbrechen.

#### 5.4.4 Mögliche Störung der Spermien-Eileiter-Interaktion durch Tabakkonsum

Ob ein Tabakkonsum von Mann oder Frau Auswirkungen auf die Spermien-Eileiter-Interaktion hat, wurde bisher nicht untersucht. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass durch den Einfluss von Tabakkonsum eine Reduktion verschiedener Kohlenhydrat-bindender-Strukturen auf der Spermienoberfläche stattfindet. Dies könnte über eine verminderte Bindungsfähigkeit im weiblichen Reproduktionstrakt negative Auswirkungen auf die Fertilität haben. Signifikant konnten wir eine Reduktion bei Mannose und Fucose zeigen (siehe Abbildung 15, Seite 54). Nicht-signifikant zeigt sich dieses Ergebnis bei Sialinsäure. Bei Galactose ist kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern erkennbar. Ähnliche Ergebnisse finden sich im Vergleich zwischen Rauchern und Patienten, die niemals in ihrem Leben geraucht haben. Anhand unserer Daten lässt sich aufgrund zu kleiner Patientenzahlen, keine Aussage über eine Dosisabhängigkeit des Tabakkonsums machen.

In den weiteren Ergebnissen zeigte sich, dass eine verringerte Spermioqrammqualität mit einer erhöhten Kohlenhydratbindungskapazität einhergeht (siehe Kapitel 5.5, Seite 86). Zur Überprüfung der eigentlichen Fragestellung dieser Arbeit nach der Beeinflussung der Kohlenhydratbindungskapazität durch Tabakkonsum wurden statistisch Nichtraucher und Raucher ausschließlich mit Normozoospermie verglichen (siehe Tabelle 17, Seite 56). Hier zeigte sich weiterhin eine signifikant verminderte Kohlenhydratbindungskapazität für MA und FU der Raucherspermien. Eine Beeinflussung dieser Ergebnisse durch die Spermioqrammparameter erscheint daher unwahrscheinlich.

Weiterhin ließen sich in der Nichtrauchergruppe niedrigere Spermienkonzentrationen feststellen als bei den Nichtrauchern (siehe Tabelle 16, Seite 55). In unserer Studie korrelieren, wie vorangegangen beschrieben, herabgesetzte Spermioqrammparameter jedoch mit einer erhöhten Bindungskapazität. Bei der Nichtraucherpopulation zeigte sich jedoch trotz schlechterer Spermienqualitäten eine höhere Bindungskapazität als bei den Rauchern.

Beide Fakten unterstreichen das Ergebnis, dass bei Raucherspermien eine verminderte Kohlenhydratbindungsfähigkeit vorliegt.

Der genaue Mechanismus dieser Schädigung lässt sich durch unsere Untersuchungen nicht erklären. Die vorangehend beschriebenen Pathomechanismen (Übersicht in Abbildung 25) geben jedoch Vorlage für verschiedene Hypothesen: Wie bereits dargestellt, kann der durch Tabakrauchen entstehende oxidative Stress die Integrität der einzelnen Plasmamembranbausteine besonders leicht schädigen [119]. Davon betroffen könnten auch für die Spermien-Eileiter-Interaktion wichtige Bestandteile wie Lektine oder Integrine sein.

Auf der Ebene der DNA-Schädigung finden sich ebenfalls diversere Pathologien bei Rauchern. Da auch das Erbgut der Spermien betroffen oder die Spermiogenese gestört sein kann [119], könnte eine verminderte Synthese verschiedener Membranbestandteile die Folge sein.

Die Auswirkungen des Tabakkonsums auf das Seminalplasma konnten in diversen Studien dargestellt werden (siehe 5.4.2, Seite 81). Es ist daher ebenfalls denkbar, dass Membranstrukturen der Spermien nach der Zusammensetzung des Ejakulats in Struktur und Funktion beeinträchtigt werden.

Der Ort und Zeitpunkt der Synthese der Kohlenhydrat-bindenden-Strukturen ist jedoch nicht bekannt. Die vollständige Entwicklung der Fähigkeit der Spermien zur Bindung an die Zona pellucida findet jedoch im Nebenhoden statt [216]. Bei Proteinen, die an der Spermien-Eileiter-Interaktion beteiligt sind, kann daher ebenfalls eine Abhängigkeit vom Nebenhoden vermutet werden. Denkbar ist auf der einen Seite eine Synthese mit anschließender Modifikation im Nebenhoden oder durch das Seminalplasma, auf der anderen Seite eine Aufnahme vom Nebenhodenepithel sezernierter Proteine (siehe hierzu auch Kapitel 5.5, Seite 86). Ein ähnlicher Mechanismus wurde beispielsweise für ein vom Nebenhoden sezerniertes menschliches Glykoprotein (P34H) beschrieben [217]. Ein Mangel des Proteins auf der Spermienoberfläche führt zu einer weniger starken Bindung an die Oozyte und letztendlich zu Infertilität [218].

Eine genaue Kenntnis dieser Vorgänge könnte Rückschlüsse auf den Mechanismus der Schädigung, insbesondere durch Tabakkonsum, geben. Welche Stoffe des Tabaks jedoch welchen Abschnitt der Spermienentwicklung erreichen ist jedoch ebenfalls nicht bekannt.

#### **5.4.5 Reversibilität der Effekte des Tabakkonsums**

Unsere Ergebnisse legen weiterhin nahe, dass bei Beenden des Tabakkonsums ein reversibler Effekt eintritt: Die Kapazität der Kohlenhydratbindung hebt sich bei den ehemaligen Rauchern wieder auf das Niveau der Patienten, die niemals geraucht haben (siehe Abbildung 16, Seite 57). Diese Resultate stellen einen weiteren Grund dar, warum jedem Patienten mit Kinderwunsch frühzeitig zum Beenden des Tabakkonsums geraten werden sollte. Wie schnell dieser reversible Effekt eintritt lässt sich mit unseren Daten nicht zeigen. Wir konnten jedoch fünf Patienten untersuchen, die innerhalb des letzten Jahres mit dem Rauchen aufgehört haben: Im Vergleich mit den Nichtraucherern ergab sich in Bezug auf die Kohlenhydratbindung kein Unterschied. Im Vergleich mit den Rauchern zeigte sich eine nicht-signifikant höhere Bindungskapazität (Abbildung

17, Seite 59). Bei den Patienten, die den Konsum innerhalb der letzten zwei Jahre eingestellt hatten ( $n = 8$ ) stellten sich ähnliche Resultate dar. Die vorliegenden Daten könnten auf einen schnellen reversiblen Effekt hinweisen, was sicherlich mit der stetigen Spermiogenese zu begründen ist. Die sechs Stadien des humanen Spermatogenesezyklus werden in 16 Tage durchlaufen. Für die komplette Spermatogenese müssen mindestens vier Zelllagen durchlaufen werden, so dass von einer Gesamtdauer der Spermatogenese von 64 [2, Seite 22] bis 74 Tagen [162] ausgegangen werden kann. Eine Tabakkarenz von mindestens drei Monaten erscheint daher sinnvoll, um die im Rahmen des Tabakkonsums verschlechterte funktionelle Spermienqualität zu verbessern. Dies ist auch, gefolgt von einer Kontrolle des SpermioGRAMMS, bei infertilen Rauchern eine gängige Praxis [161].

Diese Fakten unterstützen bei Kinderwunschberatungen und sind neben den weiteren negativen Auswirkungen ein Grund, Männer zu ermutigen mit dem Rauchen aufzuhören.

### 5.5 Zusammenhang zwischen SpermioGRAMM und Kohlenhydratbindung

In unserer Studie wurde eine herabgesetzte Spermienqualität als nicht-normozoospermes SpermioGRAMM definiert. Da die Spermiovitalität nicht in der WHO-Definition der Normozoospermie enthalten ist, korrelierten diese beiden Diagnosen signifikant miteinander (siehe Tabelle 20, Seite 62).

Auffällig ist, dass nicht-normozoosperme Ejakulate mit einer signifikant höheren Kohlenhydratbindungskapazität einhergehen (siehe Abbildung 18, Seite 61). Dies widerspricht der Annahme, dass eine quantitativ herabgesetzte Spermienqualität auch mit einer Einschränkung der qualitativen Funktion einhergeht.

Drei statistische, methodische und pathophysiologische Erklärungen können vermutet werden:

Zum einen befanden sich in der Gruppe der Patienten mit Normozoospermie nicht-signifikant mehr Raucher (19,1% vs. 6,9%). Rauchen korrelierte in unseren Untersuchungen mit einer verringerten Kohlenhydratbindungskapazität. Dies könnte das Ergebnis modifizieren und ebenfalls zu einer verminderten Kapazität bei der Patientengruppe mit Normozoospermie führen.

Ein anderer Einflussfaktor könnte die Methodik des manuellen Auszählens der Spermien sein. Bei geringeren Spermienanzahlen ist es leichter die fluoreszenzmarkierten Zellen zu detektieren und zu zählen, woraufhin eine höherer Prozentzahl markierter Spermien resultieren könnte. Da eine herabgesetzte Spermienanzahl auch mit den anderen pathologischen SpermioGRAMMdiagnosen korreliert, könnte dies ein modellierender Faktor gewesen sein. Um dieses Problem zu reduzieren, wurde versucht, über Verdünnungsreihen die Ejakulate auf eine ähnliche Spermienkonzentration zu bringen. Möglich wäre außerdem eine maschinelle Auszählung, die uns jedoch nicht zur Verfügung stand. Auch aus den in Kapitel 5.2.4 bereits dargestellten Gründen entschieden wir uns, trotz der bekannten Probleme, für das händische Auszählverfahren. Mit der

Durchflusszytometrie stellen wir außerdem ein alternatives Verfahren dar, mit dem die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Spermien möglich wäre. Die methodischen Probleme, die sich hier jedoch ergeben, sind in Kapitel 5.2.6 näher beleuchtet.

Eine Erklärung für eine Erhöhung der Kohlenhydrat-bindenden Strukturen bei eingeschränkten Spermioqrammparametern könnte weiterhin in der Physiologie der Spermienreifung zu finden sein. Hierzu ist es wichtig einen Überblick über funktionelle Entwicklung der Spermienzellen zu haben: Die fertigen Spermatozoen erreichen im immotilen Zustand die Ausführungsgänge des Hodens und werden in den Nebenhoden (Epididymis) gespült [216]. Die Passagezeit durch den langen Nebenhodengang beträgt etwas 2-7 Tage und geht mit einer starken Durchmischung der Spermien einher [219]. Die Sekretionsprodukte im Nebenhoden sowie die zeitliche Verweildauer der Spermien bewirken wichtige Veränderungen: Es findet eine Entwicklung der Spermienmorphologie, der (koordinierten) Spermienmotilität sowie weitere funktionelle Änderungen statt [216]. In Tierversuchen waren Spermien aus dem distalen Teil des Epididymidis fähig, mehr Eizellen zu befruchten als aus den weiter proximal gelegenen Anteilen [220]. Im Speziellen konnte gezeigt werden, dass während der Reifungszeit humane Spermien außerdem die Fähigkeit zur Bindung der Zona pellucida erhalten [221]. Die Moleküle, die an der Spermien-Oozyten-Interaktion beteiligt sind, können zum Teil schon an testikulären Spermien nachgewiesen werden und werden im Nebenhoden modifiziert oder sind Sekretionsprodukte des Nebenhodens selbst [216]. Studien zeigen beispielsweise, dass ein an die Bindung der Zona pellucida beteiligtes Glykoprotein (P34H) vom Nebenhoden sezerniert wird [217] und, dass ein Mangel dieses Proteins zu Infertilität führt [218]. Die an einer Spermien-Eileiter-Interaktion beteiligten Moleküle sind bisher nicht genauer identifiziert. Es scheint jedoch naheliegend, dass diese Moleküle ebenfalls vom Nebenhoden sezerniert oder zumindest dort modifiziert werden.

Bei einer Einschränkung der Spermatogenese kommen nun weniger Spermatozoen in den Nebenhoden, die Sekretion entsprechender Faktoren dort ist potenziell jedoch nicht gestört. Für eine geringere Anzahl an Spermien steht nun während der endgültigen Reifung eine höhere Anzahl von spezifischen Substanzen zur Verfügung, die letztendlich einen Einbau von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen in die Plasmamembran der Spermien ermöglicht.

Ebenso denkbar ist die Kompensation einer Störung der Spermiogenese durch Überexpression der entsprechenden Proteine auf der Spermienplasmamembran als Versuch eines Ausgleichs.

## **5.6 Die Durchflusszytometrie als alternatives Verfahren zur funktionellen Spermienanalyse**

Exemplarisch wurden Ejakulate von einem Nichtraucher und einem Raucher mittels Durchflusszytometrie verglichen (siehe 4.10, Seite 65)

Es zeigte sich beim Nichtraucher ein vergleichbar hoher Anteil an PI gefärbten Spermien (nicht vitale Zellen), jedoch ein höherer Prozentsatz rot fluoreszierender Spermien mittels JC1 (intaktes Mitochondrienmembranpotenzial). Weiterhin binden die Nichtraucherspermien mehr Kohlenhydratreste als die Raucherspermien.

Verschiedene Studien zeigten, dass der Kombinationsfarbstoff SYBR<sup>®</sup>14/PI gut zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen eingesetzt werden kann: Garner, 1994 und Gravance, 2001 fanden bei Bullen- und Rattenspermien eine gute Korrelation zwischen der Kernfärbung mit SYBR<sup>®</sup>14 und der Vitalität der Spermatozoen [222, 223]. Der prozentuale Anteil SYBR<sup>®</sup>14 gefärbter Zellen korreliert in Studien weiterhin mit dem Anteil vorwärts beweglicher Spermien nach dem Auftauen [224]. Dies ließ sich in unseren Untersuchungen der zwei Patienten nicht beobachten: Trotz einer höheren progressiven Motilität der Nichtraucherspermien fand sich ein ähnlicher Anteil an SYBR<sup>®</sup>14/PI gefärbter Spermien im Vergleich zum Raucherejakulat. Die Vitalität der Spermien wurde in unserer Studie nicht untersucht. Aufgrund der Fallzahl von zwei Patienten lässt sich hier jedoch keine Verallgemeinerung ableiten. Im Gegensatz zu den Studien von Garner und Gravance arbeiteten wir außerdem mit frischen Ejakulaten. Eine weitere Differenz ist daher in der unterschiedlichen Standzeit der Ejakulate zu finden.

Mit dem Einsatz von JC-1 beschäftigten sich ebenfalls Gravance et al., 2000 [144]. Sie stellten verschiedene Mischungsverhältnisse von vitalen und kryokonservierten Hengst spermien her. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation zwischen den mittels JC-1 durchflusszytometrisch ermittelten Anteilen gefärbter Zellen und den theoretisch zu erwartenden Werten. Bei den zu 100% kryokonservierten Spermatozoen zeigte sich jedoch immer noch ein orange fluoreszierender Anteil (hohes mitochondriales Membranpotenzial) von 7,3%. Die Autoren führten dies auf die nicht ausreichende Abtötung der Spermien zurück und passten die Gruppen entsprechend an. Eine Alternative zu JC-1 zur Evaluation des Mitochondrienmembranpotenzials wäre der vor allem früher häufig eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 [225]. Bei unserem Experiment fand sich ein höherer Anteil JC1-bindender-Spermien beim Nichtraucher. Dies korreliert mit der höheren progressiven Spermienmotilität bei Selbigem. Eine Untersuchung der Vitalität der Ejakulate wäre wünschenswert, eine Messung dieses Parameters im Labor war jedoch aus technischen Gründen nicht möglich.

Für die vorliegende Arbeit wurde die FACS Analyse mit nur zwei Ejakulaten durchgeführt. Ziel war hierbei nicht die statistische Auswertbarkeit der Versuche, sondern die Darstellung einer alternativen Methode zur Untersuchung FITC-markierter Spermienzellen. Die methodische Durchführung und Auswertung geht hierbei deutlich schneller als die Fluoreszenzmikroskopie, ist jedoch, vor allem bei nicht sauber aufgereinigten Ejakulaten, auch mit einigen Fehlerquellen belastet. Bei der händischen Auszählung ist außerdem die Identifizierung der Spermienzellen deutlich genauer.

Für die klinische Untersuchung der funktionellen Spermienqualität würde sich die Durchflusszytometrie jedoch gut eignen. Gleichzeitig könnte man außerdem weitere Informationen wie die Unversehrtheit der Plasmamembran, das Mitochondrienmembranpotenzial, die Integrität der Chromatinstruktur oder den akrosomalen Status sowie unterschiedliche FITC-gekoppelte-Marker untersuchen.

### 5.7 VIP36 - ein mögliches Lektin für die Spermien-Eileiter-Interaktion

Laut Gendatenbanken ist VIP36 (36 kDa vesicular integral protein) ein ubiquitär vorkommendes Transmembranlektin, das bisher in 27 verschiedenen Geweben, darunter vor allem im Hoden und der Schilddrüse, nachgewiesen wurde und vom Gen LMAN2 kodiert wird [226]. VIP36 ist in der Literatur auch unter den Namen LMAN2 (mannose binding lectin 2) und GP36B bekannt.

VIP36 wurde schon 1994 von Fiedler et al. in Zellkulturversuchen mit Epithelzellen als Typ-I-Transmembranprotein am Golgi-Apparat, an endosomalen und vesikulären Strukturen und auf der Plasmamembran nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass VIP36 an Kohlenhydratreste von Glycosphingolipiden und/oder Glycosylphosphatidyl-Inositol-Ankern bindet. Die Autoren vermuteten, dass durch dieses Protein eine Verbindung zwischen der extrazellulären Seite der Lipidflöße ("glycolipid rafts") und des intrazellulären Protein-Segregations-Mechanismus hergestellt werden könnte [227]. Die weitere Spezifizierung der Funktion im "secretory pathway" wurde von der selben Arbeitsgruppe in späteren Publikationen dargestellt [228]. Das Lektin konnte später auch in weiteren, nicht-epithelialen Zellen nachgewiesen werden [229]. Die genauen Bindungspartner von VIP36 konnten jedoch nicht genauer definiert werden. Erst spätere Veröffentlichungen zeigten dann die Spezifität des Lektins zu alpha1,2-Mannosyl ohne terminale Glykosylierung [230, 231].

Die exaktere Identifikation der Proteinzusammensetzung von Spermatozoen wurde durch verbesserte Methodik erst in den letzten Jahren möglich. Speziell beschäftigen sich hier einige Veröffentlichungen mit Spermien-Oozyten-Interaktion und der Akrosomreaktion. Mit Hilfe eleganter methodischer Separierung identifizierten Stein et al, 2006 über 100 Proteine, die bei Mauspermien an einer Spermien-Oozyten-Interaktion beteiligt sein könnten [232]. Als Membran-assoziiertes-Protein wurde auch das Lektin VIP36 (LMAN2) aufgeführt. In der Literatur existieren jedoch, auch im Tiermodell, bisher keine weiteren Daten zur Auswirkungen auf die Fertilität.

Wir möchten hier VIP36 (LMAN2) und ähnliche Lektine als mögliche Bindungspartner für die untersuchten Kohlenhydratreste und damit als Pendant zu den Kohlenhydratresten auf dem Eileiter darstellen [51, 92, 138, 139]. Weiterhin existiert bisher zwar eine Vorstellung der Abläufe bei der Spermien-Oozyten-Interaktion, über die Spermien-Eileiter-Interaktion ist der Kenntnisstand jedoch unzureichend. Die Bindung an den Eileiter könnte, wie bereits in den vorangehenden Kapiteln dargestellt, ein bisher unterschätzter Schlüsselfaktor für eine erfolgreiche

Befruchtung sein. Eine Einschränkung der Fertilität ist daher denkbar, wenn entsprechende beteiligte Proteine nur unzureichend auf der Spermienmembran exprimiert werden. Das folgende Kapitel wirft einen Blick auf die möglichen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten.

Neben den Funktionen auf der Plasmamembran spielt VIP36 auch intrazellulär eine wichtige Rolle: Das Membranprotein zirkuliert zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat und fungiert als Rezeptor beim Transport und Sortieren von Glykoproteinen. Auch hierdurch könnten Modifikationen auf Gen- oder posttranslationaler Ebene einen verminderten Transport von Membranproteinen bewirken, was wiederum zu einer herabgesetzten Spermienbindung an den Eileiter führen könnte. Neuere Daten zeigen interessanterweise bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Multisystematrophie (MSA), eine signifikant veränderte DNA-Methylierung in verschiedenen Genen, darunter auch bei VIP36 [233]. Eine Dysregulation dieses Proteins könnte zu einer beeinträchtigten Kontrolle der Proteinqualität, auch in anderen Organsystemen führen. In der Entwicklung der Spermien findet eine Methylierung von Genen beispielsweise im Nebenhoden statt [234].

## 5.8 Ausblick

### 5.8.1 "Sperm Proteomics": Diagnostik und Therapie der männlichen Infertilität?

Spermienzellen gelten als transkriptional und translational inaktiv und sind daher unfähig zur Proteinsynthese. Im Vergleich mit anderen Zellen enthalten sie jedoch einen hohen Anteil an Membranproteinen. Die Wichtigkeit der posttranslationalen Modifikation, vor allem im Nebenhoden und im Seminalplasma, liegt damit auf der Hand und wurde bereits in dieser Arbeit dargestellt und diskutiert (siehe Kapitel 1.2.3 und Kapitel 5.5). Mit verschiedenen methodischen Ansätzen wurde in den letzten Jahren das Proteom der Spermien näher charakterisiert und die Funktion und Auswirkungen auf die Fertilität der einzelnen Proteine untersucht. Bereits 1997 wurden in einer Studie mit humanen Spermatozoen 1400 Proteine detektiert [235]. Auch wenn die Frage nach den genauen Funktionen der Proteine oft weiterhin unklar ist, scheint eine Vielzahl von ihnen eine erfolgreiche Fertilität zu gewährleisten. Die traditionellen diagnostischen Methoden zur Überprüfung der männlichen Fertilität (Spermienzahl, Morphologie, Motilität, Mukus-Penetration, etc.) werden zwar weiterhin in der klinischen Praxis angewendet, ihr Nutzen ist jedoch stark diskutiert [236]. Es erscheint sinnvoll, ein stärkeres Augenmerk auf Markerproteine für Fertilität zu legen [237]. Proteine wie VDAC wurden bereits mit idiopathischer Asthenozoospermie und damit einer möglichen Infertilität in Verbindung gebracht [238]. Auch Mutationen mit Auswirkungen auf die Plasmamembran, beispielsweise DEFB126, könnten als potenzielle Biomarker für Subfertilität verwendet werden [54, 57]. Das vom Nebenhoden sezernierte Glykoprotein P34H ist für eine erfolgreiche Spermien-Oozyten-Interaktion essenziell [217, 218]. Trotzdem erscheinen die Daten zum Proteom der Spermien noch unzureichend: Viele

Erkenntnisse aus Tiermodellen konnten bisher nicht auf menschliche Spermatozoen übertragen werden. Weiterhin werden in Studien und zusammenfassenden Arbeiten zwar nach Proteinen gesucht, die für die generelle Spermienfunktion, die Spermien-Oozyten-Interaktion und die Akrosomreaktion notwendig sind, die Spermien-Eileiter-Interaktion wird jedoch bisher nur unzureichend thematisiert.

### **5.8.2 Weitere Forschung auf dem Gebiet der Spermien-Eileiter-Interaktion**

Wie bereits dargestellt scheinen neben den Monosacchariden auch Oligosaccharide eine wichtige Rolle bei der Spermien-Eileiter-Interaktion zu spielen (siehe 5.3). Im humanen Modell wird ebenfalls vermutet, dass Integrine einen Stellenwert in der Reproduktion haben [100]. Weiterführende Studien, die ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit die Bindungskapazität verschiedener Patientengruppen untersuchen, könnten weiteren Aufschluss über Zusammenhänge geben.

Offen bleibt jedoch die genaue molekulare Zusammensetzung der Bindung von männlicher und weiblicher Seite. Anzustreben wären *in vitro* Versuche mit humanem Eileiterepithel und humanen Spermatozoen. Dabei könnten die vermuteten Bestandteile der Interaktion inhibiert und anschließend die Bindungskapazität ausgewertet werden. In Frage dafür kommen Bioassays, wie in verschiedenen Studien bisher erfolgreich eingesetzt [99, 239, 240]. Mit Hilfe solcher Assays wurde beispielsweise die Bindungsfähigkeit von Spermien im Eileiter von Endometriose-Patientinnen untersucht [239].

### **5.8.3 Lernen aus dem Wissen der Veterinärmedizin**

Die Forschungen und Ideen aus Tierversuchen und der Tierzucht haben die Voraussetzungen geschaffen, das Wissen über die Spermien-Eileiter-Interaktion nun auch auf das humane Modell übertragen zu können. Im Tiermodell wird der Interaktion eine hohe Relevanz für eine erfolgreiche Befruchtung zugeschrieben [241]. Aus verschiedenen Gründen ist die Umsetzung beim Menschen jedoch kompliziert: Während *in vivo* Studien im humanen Bereich aus ethischen Gründen oft problematisch sind, scheitert es *ex vivo* oft an notwendigen Materialien, wie Gewebeproben, Eizellen und Spermien. Weiterhin bereitet auf andrologischer Seite die Handhabung humaner Spermien Probleme: Durch deren vergleichsweise geringe Qualität lassen sich nur schwierig Ergebnisse in großer Zahl produzieren. Die Forschung an Tierspermien bietet die Vorteile der teils deutlich höheren Spermienkonzentration und besseren Qualität. Für die Forschung oft verwendete Bullenejakulate haben eine durchschnittliche Spermienkonzentration von 150 Mio./ml [242] und Ejakulate von Hunden um 450 Mio./ml [243]. Auch die Morphologie unterscheidet sich, wie beispielsweise bei Schlangen, deutlich von humanen Spermien [244].

Weiterhin wird interessanterweise diskutiert, dass diese Interaktion und das Halten der Spermien im Reservoir, einen wichtigen Selektionsmechanismus auf dem Weg zur Eizelle darstellt: Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass für eine Bindung an den Eileiter beispielsweise ein

intaktes Akrosom, Plasmamembran und Chromatinstruktur [245], gute Morphologie [246] und geringes intrazelluläres Calcium vorliegen muss [247]. Ferner binden hauptsächlich Spermien, die bisher keine Kapazitation durchlaufen haben [84, 248].

Mit Kenntnis dieser Resultate, werden verschiedene Assays eingesetzt, um subfertile männliche Tiere zu entdecken [241]. Die Erforschung von Ursachen und Therapie einer Infertilität spielt jedoch generell in Tierversuchen keine große Rolle. Zur Züchtung von Tieren werden ausschließlich Tiere mit überdurchschnittlich guter Spermienqualität verwendet. In der Forschung findet daher nur Grundlagenforschung statt, ein Vergleich zwischen der Fertilität verschiedener Gruppen wird jedoch nicht praktiziert.

In der Dauer der SpermienSpeicherung im weiblichen Reproduktionstrakt bestehen ebenfalls große Unterschiede zwischen den Tieren und auch zum Menschen. Während im humanen Modell eine Überlebensfähigkeit der Spermatozoen von ungefähr fünf Tagen angegeben wird, können Bullenspermien lediglich drei Tage überleben. Bei Vögeln sind mehrere Monate beschrieben, bei manchen Haien ein bis zwei Jahre, in einigen Reptilien werden sogar beeindruckende Werte von bis zu sieben Jahren erreicht [249].

Insgesamt gilt es in der Reproduktionsforschung sich am Tiermodell zu orientieren, eine Übertragung des Wissensstandes ist jedoch nicht immer problemlos möglich.

#### **5.8.4 Klinische Bedeutung und Umsetzung in die Praxis**

Die Forschung an Problemen mit reproduktionsmedizinischer Thematik ist heutzutage relevanter denn je. In dem noch sehr jungen, an Bedeutung zunehmenden Fachgebiet wird versucht ein besseres Verständnis von grundlegenden Prozessen der Reproduktion zu schaffen. Betrachtet man die Zahlen der steigenden Infertilitätsraten in den Industrienationen, gewinnt die Thematik an noch größerer Bedeutung: Jedes sechste Paar in Europa ist ungewollt kinderlos und eine steigende Anzahl von Paaren nehmen Methoden der assistierten Reproduktion in Anspruch [8]. Wie bereits dargestellt, kann bei einer großen Anzahl von fertilitätsgestörten Männern keine eindeutige Ursache gefunden werden (siehe 1.1.3).

Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Spermienanatomie, -physiologie und -interaktion könnten dazu beitragen, Fehlfunktionen besser zu verstehen und an Diagnose- und Therapie-Ansätzen bei männlicher Infertilität zu arbeiten. Durch neue diagnostische Ansätze könnte beispielsweise mithilfe eines Bindungs-Essays in der erweiterten Spermigramm-Diagnostik die Fähigkeit der Spermien untersucht werden, im weiblichen Geschlechtstrakt zu binden. Probleme bei dieser Bindung könnten zu verkürztem Überleben und schlechterer Fortbewegung der Spermien führen, damit die Fertilität vermindern oder sogar Infertilität zu Folge haben. Betroffene Patienten könnten besonders angehalten werden Risikofaktoren wie Tabakkonsum zu meiden. Weiterhin könnten frühzeitiger als sonst assistierte Reproduktionstechniken eingesetzt und so Zeit gewonnen werden. Durch die schlechtere Bindungsfähigkeit von Spermien betroffener Männer im

Eileiter sollte eine Insemination wohl umgangen und direkt weitere Methoden wie IVF oder ICSI in Betracht gezogen werden.

Neben der Identifizierung von Dysfunktionen der Spermien und der Auswahl der nächsten Behandlungsschritte, ist die Beeinflussungen der Bindungsfähigkeit denkbar: Die Insemination der entsprechenden kohlenhydratbindenden Proteine in Form von Vaginalgels vor dem Geschlechtsverkehr könnte den Spermien die Passage in den Uterus ermöglichen oder erleichtern. Durch eine Kopplung der Proteine an Bestandteile der Spermienplasmamembran könnten sich die Proteine aufnehmen lassen, was auch im weiteren Geschlechtstrakt eine Bindung ermöglichen würde. Über die Verbesserung der funktionellen Spermienqualität könnte die männliche Fertilität positiv beeinflusst werden.

Das Wissen über die Bausteine der männlichen Fertilität könnte auch zum Zweck einer Kontrazeption eingesetzt werden. Trotz vielfältiger Verhütungsmöglichkeiten waren 1998 in den USA immernoch die Hälfte aller Schwangerschaften ungeplant oder ungewollt [250]. Dies rückt den Aspekt der Kontrazeption für den Mann weiter in den Fokus [237, 251]. Ansätze sind hier sowohl auf hormoneller als auch auf nicht-hormoneller Seite zu finden: Interessanterweise veränderte die Gabe von Testosteron + Levonorgestrel die Proteinstruktur der Spermien. Weiterhin wurde die Spermiogenese erfolgreich über die Veränderung von Proteinexpressionen in Signalwegen unterdrückt [252]. Die identifizierten Proteine könnten daher neben einem Ziel für männliche Kontrazeption auch eine Möglichkeit zur Behandlung einer Infertilität darstellen. Spezifischer und mit weniger Nebenwirkungen belastet erscheinen die Überlegungen zur nicht-hormonellen Kontrazeption: Durch Veränderung und Blockieren von essenziellen Proteinen könnte die Spermienfunktion bis zur vorübergehenden Infertilität beeinträchtigt werden. Bereits erwähnt wurde das Proteine VDAC, dessen Blockade in Studien zu einer signifikant herabgesetzten Zahl vitaler Spermien, verminderter Spermienmotilität, Akrosomreaktion, Kapazitation, Tyrosinphosphorylierung, Befruchtung und Embryonalentwicklung führte [253]. Auch diese Studien sind jedoch bisher ausschließlich an Tiermodellen durchgeführt.

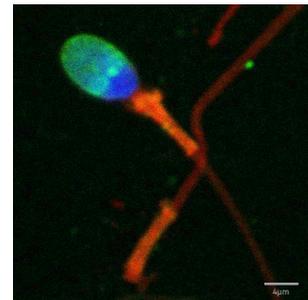
Die Inhibition der bindenden-Strukturen auf der Spermienplasmamembran scheint daher ebenfalls eine Möglichkeit zur Kontrazeption zu sein. Sollten Spermien nicht die uterotubale Junction passieren können, nicht an den Eileiter und nicht an die Oozyte binden können erscheint eine Befruchtung durch die herabgesetzte Fortbewegung und Lebensdauer unmöglich. Langfristig wäre über diese Mechanismen eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger, nicht-hormoneller Verhütungsmethoden denkbar.

## 6 Zusammenfassung

Nach Daten der WHO ist jede sechste Partnerschaft in Europa ungewollt kinderlos. In der Hälfte der Fälle liegt eine Fertilitätsstörung beim Mann zugrunde, bei über einem Drittel der Patienten kann keine eindeutige Ursache für die Infertilität gefunden werden (idiopathische Infertilität). In diesem Zusammenhang ist Zigarettenrauchen ein häufig diskutierter Faktor mit umstrittenen Auswirkungen auf die Fertilität.

Während der Passage des weiblichen Reproduktionstrakts muss es zu einer Speicherung der Spermien im sogenannten Spermienreservoir kommen, die es ermöglicht, die Fähigkeit zur Fertilisierung aufrecht zu erhalten. Aus Tierversuchen gibt es Belege, dass Kohlenhydratreste auf dem Eileiterepithel und Lektine auf der Spermienmembran eine Bindung eingehen können.

In dieser Arbeit wurde die Bindungsfähigkeit verschiedener Kohlenhydratreste an Spermatozoen evaluiert und insbesondere zwischen Rauchern und Nichtrauchern verglichen sowie mögliche Bindungspartner analysiert und dargestellt.



CLSM humaner Spermatozoen.  
rot = Mitochondrien, blau = Zellkerne,  
grün = FITC-konjugierter  
Kohlenhydratrest (Fucose)

Untersucht wurden frische humane Ejakulate von 102 Patienten, die zur Ejakulatabgabe in der Andrologischen Ambulanz der LMU München vorstellig wurden. Die Ejakulatproben wurden aufbereitet, mit FITC-konjugierten Kohlenhydratresten Sialinsäure (SA), Mannose (MA), Fucose (FU) und Galactose (GA) markiert, anschließend konfokalmikroskopisch ausgewertet und der Anteil der Spermien mit Kohlenhydratbindung ausgezählt. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (FACS). Western- und Immunoblots wurden zur Identifizierung Kohlenhydrat-bindender Proteine durchgeführt.

Insgesamt konnten 86 Nichtraucher und 16 Raucher eingeschlossen werden. Ein Großteil der Patienten war kinderlos (80,4%) und hatte einen aktuellen Kinderwunsch (83,9%). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass auf der Spermienplasmamembran Strukturen existieren, die die untersuchten Kohlenhydratreste erkennen und binden. Die Auswertung zeigte zwischen Nichtrauchern und Rauchern für MA ( $p = 0,007$ ) und FU ( $p < 0,001$ ) eine signifikante, für SA ( $p = 0,120$ ) und GA ( $p = 0,426$ ) eine nicht-signifikante Verringerung der Kohlenhydratbindungskapazität. Zwischen den Nie-Rauchern und den Ex-Rauchern war kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Eine verringerte Expression Kohlenhydrat-bindender Strukturen auf der Plasmamembran könnte trotz normaler Spermioigrammparameter zu einer verminderten Fertilität führen. Unsere Studie legt nahe, dass Rauchen hierfür ein wesentlicher Risikofaktor sein könnte, wobei eine Reversibilität dieses Effekts ein Jahr nach Beenden des Tabakkonsums gezeigt werden konnte und mit der stetigen Spermatogenese zu erklären ist. Bei der händischen Auszählung der Spermien

können Fehlen auftreten. Als Alternativmethode wurde in der Arbeit daher die Durchflusszytometrie vorgestellt, die auch für eine Diagnostik im klinischen Alltag praktikabel sein könnte. Wir konnten erstmals auf humanen Spermatozoen das Lektin VIP36 (36 kDa vesicular integral protein) nachweisen, das fähig wäre Mannosereste zu erkennen und an sie zu binden.

Das Bilden eines Spermienreservoirs scheint ein wichtiger Baustein für die Paarfertilität zu sein. Ein Fehlen von Faktoren, die das Binden und Halten der Spermatozoen in diesem Reservoir ermöglichen, könnte zu einer, bisher als idiopathisch eingeordneten, Reproduktionsstörung führen. Tabakrauchen kann daher die funktionelle Spermienqualität herabsetzen. Die vorliegenden Daten unterstützen bei der Kinderwunschberatung und sind neben den weiteren negativen Auswirkungen ein Grund, Männer zu ermutigen mit dem Rauchen aufzuhören. Marker zur funktionellen Spermienqualität sind im Fokus aktuellster reproduktionsmedizinischer Forschung und werden in der Diagnostik Schritt um Schritt die klassischen SpermioGrammparameter ergänzen.

## 7 Referenzen

1. World Health Organization. *Infertility definitions and terminology*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en>
2. Nieschlag E, Behre H, Nieschlag S (Hrsg.). *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Vol. 3. Auflage. 2009, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
3. Krausz C. *Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(2): p. 271-285.
4. Juul S, Karmaus W and Olsen J. *Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden*. The European Infertility and Subfecundity Study Group. Hum Reprod, 1999. **14**(5): p. 1250-1254.
5. Bruckert E. *How frequent is unintentional childlessness in Germany?* Andrologia, 1991. **23**(3): p. 245-250.
6. Thonneau P, et al. *Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989)*. Hum Reprod, 1991. **6**(6): p. 811-816.
7. Mascarenhas M N, et al. *National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys*. PLOS Medicine, 2012. **9**(12): p. e1001356.
8. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung. *Ungewollt kinderlos - Was kann die moderne Medizin gegen Kindermangel in Deutschland tun?* 2007. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0168-ssoar-323764>
9. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale Versorgungs Leitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung*. 2014. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/diabetes-mellitus/archiv/therapie/dm-therapie-1aufl-vers4-lang.pdf>
10. Crosignani P G, et al. *Recommendations of the ESHRE workshop on 'Unexplained Infertility'*. Anacapri, August 28-9, 1992. Hum Reprod, 1993. **8**(6): p. 977-980.
11. Jungwirth A, et al. *Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology, 2018.
12. Johnson S L, et al. *Consistent age-dependent declines in human semen quality: A systematic review and meta-analysis*. Ageing Research Reviews, 2015. **19**: p. 22-33.
13. Eisenberg M L and Meldrum D. *Effects of age on fertility and sexual function*. Fertility and Sterility, 2017. **107**(2): p. 301-304.
14. Pompe S. *Der Einfluss von Arzneimitteln auf die männliche Fertilität*. 2016, Ludwig-Maximilians-Universität München, Urologischen Klinik und Poliklinik
15. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, fifth edition*. 2010. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf)
16. Wolf F. *Die Natur als Arzt und Helfer. Das Neue Naturärztliche Hausbuch*. 1928, Halle (Saale): Mitteldeutscher Verlag.

17. Sutovsky P and Manandhar G. *Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis*. in *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, C Barratt and C J De Jonge, Editors. 2006, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-30.
18. Suarez S S and Pacey A A. *Sperm transport in the female reproductive tract*. Human Reproduction Update, 2006. **12**(1): p. 23-37.
19. Zitranski N, et al. *The “acrosomal synapse”: Subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa*. Communicative & Integrative Biology, 2010. **3**(6): p. 513-521.
20. Bedu-Addo K, et al. *Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm--a mechanism for regulation of flagellar activity*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 615-626.
21. Escalier D, et al. *Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis*. Development, 1991. **113**(3): p. 779-788.
22. Georgadaki K, et al. *The molecular basis of fertilization (Review)*. Int J Mol Med, 2016. **38**(4): p. 979-986.
23. Roldan E R, Murase T and Shi Q X. *Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1578-1581.
24. Bleil J D and Wassarman P M. *Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein*. Dev Biol, 1983. **95**(2): p. 317-324.
25. Florman H M, Jungnickel M K and Sutton K A. *Regulating the acrosome reaction*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 503-510.
26. Inaba K. *Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling*. Zoolog Sci, 2003. **20**(9): p. 1043-1056.
27. Lefievre L, et al. *Communication between female tract and sperm: Saying NO\* when you mean yes*. Commun Integr Biol, 2009. **2**(2): p. 82-85.
28. Singh A P and Rajender S. *CatSper channel, sperm function and male fertility*. Reprod Biomed Online, 2015. **30**(1): p. 28-38.
29. Jouannet P and Serres C. *[The movement of the human spermatozoon]*. Bull Acad Natl Med, 1998. **182**(5): p. 1025-1034; discussion 1034-1026.
30. Teclé E and Gagneux P. *Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx*. Molecular Reproduction and Development, 2015. **82**(9): p. 635-650.
31. Varki A, Esko J D and Colley K J. *Cellular Organization of Glycosylation*. in *Essentials of Glycobiology*, A Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.: Cold Spring Harbor (NY).
32. Sullivan R, Frenette G and Girouard J. *Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit*. Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 483-491.
33. Kirchhoff C and Hale G. *Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(3): p. 177-184.

34. Sullivan R, et al. *Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(1): p. 1-10.
35. Tulsiani D R. *Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **250**(1-2): p. 58-65.
36. Koistinen H, et al. *Glycodelin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodelin-A*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(10): p. 759-765.
37. Yeung W S, et al. *Glycodelin: a molecule with multi-functions on spermatozoa*. Soc Reprod Fertil Suppl, 2007. **63**: p. 143-151.
38. Yeung W S, et al. *Roles of glycodelin in modulating sperm function*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **250**(1-2): p. 149-156.
39. Rabionet M, et al. *Male germ cells require polyenoic sphingolipids with complex glycosylation for completion of meiosis: a link to ceramide synthase-3*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13357-13369.
40. Tollner T L, et al. *Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus*. Hum Reprod, 2008. **23**(11): p. 2523-2534.
41. Pandya I J and Cohen J. *The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa*. Fertil Steril, 1985. **43**(3): p. 417-421.
42. Pang P C, et al. *Expression of bisecting type and Lewisx/Lewisy terminated N-glycans on human sperm*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36593-36602.
43. Hardiyanto L, Hasegawa A and Komori S. *The N-linked carbohydrate moiety of male reproductive tract CD52 (mrt-CD52) interferes with the complement system via binding to C1q*. J Reprod Immunol, 2012. **94**(2): p. 142-150.
44. Koyama K, Ito K and Hasegawa A. *Role of male reproductive tract CD52 (mrt-CD52) in reproduction*. Soc Reprod Fertil Suppl, 2007. **63**: p. 103-110.
45. Nakanishi T, et al. *Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice*. Biol Reprod, 2004. **71**(3): p. 959-965.
46. Visconti P E, et al. *Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity*. J Reprod Immunol, 2002. **53**(1-2): p. 133-150.
47. Diekman A B. *Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg?* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(2): p. 298-308.
48. Ma F, et al. *Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 38073-38079.
49. Focarelli R, Rosati F and Terrana B. *Sialyglycoconjugates release during in vitro capacitation of human spermatozoa*. J Androl, 1990. **11**(2): p. 97-104.
50. Suarez S S. *Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct*. The International Journal of Developmental Biology, 2008. **52**(5-6): p. 455-462.
51. Suarez S S. *Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract*. Cell Tissue Res, 2016. **363**(1): p. 185-194.

52. Suarez S S. *Formation of a reservoir of sperm in the oviduct*. Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene, 2002. **37**(3): p. 140-143.
53. Topfer-Petersen E and Calvete J J. *Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins*. J Reprod Fertil Suppl, 1996. **50**: p. 55-61.
54. Xin A, et al. *Lectin binding of human sperm associates with DEFB126 mutation and serves as a potential biomarker for subfertility*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 20249.
55. Schroter S, et al. *The glycocalyx of the sperm surface*. Hum Reprod Update, 1999. **5**(4): p. 302-313.
56. Sun Y, et al. *A Human Lectin Microarray for Sperm Surface Glycosylation Analysis*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(9): p. 2839-2851.
57. Tollner T L, et al. *A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility*. Sci Transl Med, 2011. **3**(92): p. 92ra65.
58. Goldstein I J and Hayes C E. *The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1978. **35**: p. 127-340.
59. Lilja H and Lundwall A. *Molecular cloning of epididymal and seminal vesicular transcripts encoding a semenogelin-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4559-4563.
60. Watt K W, et al. *Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3166-3170.
61. Neill J D. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2005: Elsevier Science.
62. Fox C A, Meldrum S J and Watson B W. *Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus*. J Reprod Fertil, 1973. **33**(1): p. 69-75.
63. Acott T S and Carr D W. *Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid. II. Interaction of pH and a quiescence factor*. Biol Reprod, 1984. **30**(4): p. 926-935.
64. Suarez S S and Oliphant G. *Interaction of rabbit spermatozoa and serum complement components*. Biol Reprod, 1982. **27**(2): p. 473-483.
65. Troedsson M H, et al. *Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination*. Anim Reprod Sci, 2005. **89**(1-4): p. 171-186.
66. Tyler K R. *Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus*. J Reprod Fertil, 1977. **49**(2): p. 341-345.
67. Thompson L A, et al. *The leukocytic reaction of the human uterine cervix*. Am J Reprod Immunol, 1992. **28**(2): p. 85-89.
68. Hanson F W and Overstreet J W. *The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo*. Am J Obstet Gynecol, 1981. **140**(2): p. 173-178.
69. Freundl G, Grimm H J and Hofmann N. *Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus*. Hum Reprod, 1988. **3**(3): p. 277-280.
70. Katz D F, et al. *Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus*. Fertil Steril, 1990. **54**(3): p. 513-516.
71. Gould J E, Overstreet J W and Hanson F W. *Assessment of human sperm function after recovery from the female reproductive tract*. Biol Reprod, 1984. **31**(5): p. 888-894.

72. Cho C, et al. *Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta*. *Science*, 1998. **281**(5384): p. 1857-1859.
73. Ikawa M, et al. *Calmegein is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility*. *Dev Biol*, 2001. **240**(1): p. 254-261.
74. Kölle S. *Transport, Distribution and Elimination of Mammalian Sperm Following Natural Mating and Insemination*. *Reprod Domest Anim*, 2015. **50 Suppl 3**: p. 2-6.
75. Yanagimachi R and Chang M C. *Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation*. *J Reprod Fertil*, 1963. **6**: p. 413-420.
76. Suarez S S. *Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ*. *Biol Reprod*, 1987. **36**(1): p. 203-210.
77. Harper M J. *Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct*. *Biol Reprod*, 1973. **8**(4): p. 441-450.
78. Overstreet J W and Cooper G W. *Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport*. *Biol Reprod*, 1978. **19**(1): p. 115-132.
79. Hunter R H and Nichol R. *Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus*. *J Exp Zool*, 1983. **228**(1): p. 121-128.
80. Hunter R H and Wilmot I. *Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct*. *Reprod Nutr Dev*, 1984. **24**(5a): p. 597-608.
81. Hunter R H. *Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation*. *J Reprod Fertil*, 1981. **63**(1): p. 109-117.
82. Kervancioglu M E, Djahanbakhch O and Aitken R J. *Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation*. *Fertil Steril*, 1994. **61**(6): p. 1103-1108.
83. Murray S C and Smith T T. *Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation*. *Fertil Steril*, 1997. **68**(2): p. 351-357.
84. Fazeli A, et al. *Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species*. *Biol Reprod*, 1999. **60**(4): p. 879-886.
85. Dobrinski I, et al. *Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro*. *Biol Reprod*, 1997. **56**(4): p. 861-869.
86. Hunter R H. *Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa*. *J Exp Zool*, 1973. **183**(1): p. 57-63.
87. Polge C, Salamon S and Wilmot I. *Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination*. *Vet Rec*, 1970. **87**(15): p. 424-429.
88. Day B N and Polge C. *Effects of progesterone on fertilization and egg transport in the pig*. *J Reprod Fertil*, 1968. **17**(1): p. 227-230.
89. Hunter R H. *Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs*. *J Reprod Fertil*, 1972. **31**(3): p. 433-444.
90. Flechon J E and Hunter R H. *Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study*. *Tissue Cell*, 1981. **13**(1): p. 127-139.

91. Hunter R H, Flechon B and Flechon J E. *Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study*. Tissue Cell, 1991. **23**(5): p. 641-656.
92. Bour S. *unpublished Master-Thesis*. LMU
93. Demott R P, Lefebvre R and Suarez S S. *Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium*. Biol Reprod, 1995. **52**(6): p. 1395-1403.
94. Lefebvre R, Lo M C and Suarez S S. *Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1198-1204.
95. Suarez S S, et al. *Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide*. Biol Reprod, 1998. **59**(1): p. 39-44.
96. Dobrinski I, et al. *Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro*. Am J Vet Res, 1996. **57**(11): p. 1635-1639.
97. Green C E, et al. *Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro*. Reproduction, 2001. **122**(2): p. 305-315.
98. Wagner A, et al. *Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig*. Mol Reprod Dev, 2002. **61**(2): p. 249-257.
99. Reeve L, Ledger W L and Pacey A A. *Does the Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion sequence play a role in mediating sperm interaction with the human endosalpinx ?* Hum Reprod, 2003. **18**(7): p. 1461-1468.
100. Klentzeris L D. *Adhesion molecules in reproduction*. Br J Obstet Gynaecol, 1997. **104**(4): p. 401-409.
101. Hung P H and Suarez S S. *Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct*. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 2010. **67**: p. 257-266.
102. Demott R P and Suarez S S. *Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct*. Biol Reprod, 1992. **46**(5): p. 779-785.
103. Pacey A A, et al. *The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube*. Hum Reprod, 1995. **10**(2): p. 360-366.
104. Suarez S S, et al. *Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm*. Biol Reprod, 1991. **44**(2): p. 375-381.
105. Suarez S S and Dai X. *Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media*. Biol Reprod, 1992. **46**(4): p. 686-691.
106. Speckmann E J, Hescheler J and Köhling R. *Physiologie*. 2015: Elsevier Health Sciences Germany.
107. World Health Organization. *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic*. 2015. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [https://www.who.int/tobacco/global\\_report/2015/en](https://www.who.int/tobacco/global_report/2015/en)
108. Atzendorf J, et al. *The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines*. Dtsch Arztebl Int, 2019. **116**(35-36): p. 577-584.
109. Adena M A and Gallagher H G. *Cigarette smoking and the age at menopause*. Ann Hum Biol, 1982. **9**(2): p. 121-130.

110. Midgette A S and Baron J A. *Cigarette smoking and the risk of natural menopause*. *Epidemiology*, 1990. **1**(6): p. 474-480.
111. Kaufman D W, et al. *Cigarette smoking and age at natural menopause*. *Am J Public Health*, 1980. **70**(4): p. 420-422.
112. Ness R B, et al. *Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(5): p. 333-339.
113. Augood C, Duckitt K and Templeton A A. *Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(6): p. 1532-1539.
114. Klonoff-Cohen H, et al. *Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer*. *Hum Reprod*, 2001. **16**(7): p. 1382-1390.
115. Feichtinger W, et al. *Smoking and in vitro fertilization: a meta-analysis*. *J Assist Reprod Genet*, 1997. **14**(10): p. 596-599.
116. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. *Smoking and infertility: a committee opinion*. *Fertil Steril*, 2012. **98**(6): p. 1400-1406.
117. Hammond D, et al. *Cigarette yields and human exposure: a comparison of alternative testing regimens*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(8): p. 1495-1501.
118. Zenzes M T. *Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos*. *Hum Reprod Update*, 2000. **6**(2): p. 122-131.
119. Harlev A, et al. *Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review*. *The World Journal of Men's Health*, 2015. **33**(3): p. 143-160.
120. Ramlau-Hansen C H, et al. *Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(1): p. 188-196.
121. Kunzle R, et al. *Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples*. *Fertil Steril*, 2003. **79**(2): p. 287-291.
122. Richthoff J, et al. *Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males*. *International Journal of Andrology*, 2008. **31**(1): p. 31-39.
123. Zhang J P, et al. *[Study of correlation and effect of smoking on semen quality of men]*. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2002. **8**(1): p. 35-37.
124. Saaranen M, et al. *Cigarette smoking and semen quality in men of reproductive age*. *Andrologia*, 1987. **19**(6): p. 670-676.
125. Sharma R, et al. *Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen*. *Eur Urol*, 2016.
126. Vine M F, et al. *Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis*. *Fertil Steril*, 1994. **61**(1): p. 35-43.
127. Vermeulen A. *Environment, human reproduction, menopause, and andropause*. *Environ Health Perspect*, 1993. **101 Suppl 2**: p. 91-100.
128. Collin O, Kilter S and Bergh A. *Tobacco smoke disrupts testicular microcirculation in the rat*. *Int J Androl*, 1995. **18**(3): p. 141-145.
129. Koskinen L O, Collin O and Bergh A. *Cigarette smoke and hypoxia induce acute changes in the testicular and cerebral microcirculation*. *Ups J Med Sci*, 2000. **105**(3): p. 215-226.

130. Zavos P M, et al. *An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers*. Fertil Steril, 1998. **69**(3): p. 430-434.
131. Cinar O, et al. *Does cigarette smoking really have detrimental effects on outcomes of IVF?* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2014. **174**: p. 106-110.
132. Pacifici R, et al. *Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters*. Ther Drug Monit, 1993. **15**(5): p. 358-363.
133. Pant N, et al. *Correlation between lead and cadmium concentration and semen quality*. Andrologia, 2015. **47**(8): p. 887-891.
134. Oldereid N B, Thomassen Y and Purvis K. *Seminal plasma lead, cadmium and zinc in relation to tobacco consumption*. Int J Androl, 1994. **17**(1): p. 24-28.
135. La Maestra S, De Flora S and Micale R T. *Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa*. Int J Hyg Environ Health, 2015. **218**(1): p. 117-122.
136. Fullston T, et al. *The most common vices of men can damage fertility and the health of the next generation*. J Endocrinol, 2017. **234**(2): p. F1-f6.
137. Zavos P M. *[Cigarette smoking: male and female infertility]*. Fertil Contracept Sex, 1989. **17**(2): p. 133-138.
138. Bour S, et al. *Formation of the human sperm reservoir and its major players*. European Urology Supplements, 2017. **16**(3): p. e1005-e1006.
139. Bour S, et al. *The role of Glycoconjugates in formation of the human sperm reservoir*. The Journal of Urology, 2017. **197**(4): p. e188.
140. Bour S. Deutsches Ärzteblatt GmbH. „*Ein funktionstüchtiges Spermienreservoir ist unerlässlich für die Befruchtung*.“. 2016. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/71202/Ein-funktionstuechtiges-Spermienreservoir-ist-unerlaesslich-fuer-die-Befruchtung>
141. Organization W H. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, fourth edition*. 1999.
142. Cortés P P, et al. *Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface*. Biology of Reproduction, 2004. **71**(4): p. 1262-1269.
143. Gallagher S, et al. *Immunoblotting and Immunodetection*. Current Protocols in Molecular Biology, 2004. **66**(1): p. 10.18.11-10.18.24.
144. Gravance C G, et al. *Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1*. Theriogenology, 2000. **53**(9): p. 1691-1703.
145. Garner D L and Thomas C A. *Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm*. Molecular reproduction and development, 1999. **53**(2): p. 222-229.
146. World Health Organization. *Body mass index - BMI*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi](http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi)

147. Buttarazzi D, Pandolfo G and Porzio G C. *A boxplot for circular data*. Biometrics, 2018. 74(4): p. 1492-1501.
148. Kovac J R, Khanna A and Lipshultz L I. *The effects of cigarette smoking on male fertility*. Postgrad Med, 2015. 127(3): p. 338-341.
149. Voet D, et al. *Lehrbuch der Biochemie*. 2019: Wiley.
150. Bundesamt für Statistik in der Schweiz. *Lebendgeburten nach Alter des Vaters und der Mutter*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://www.bfs.admin.ch/bfs/de/home/statistiken/bevoelkerung/geburten-todesfaelle/geburten.html>
151. Lampert T, von der Lippe, E, Müters, S. *Verbreitung des Rauchens in der Erwachsenenbevölkerung in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt 2013, 2013.
152. Deutsches Krebsforschungszentrum. *Tabakatlas Deutschland 2015*. 2015. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/sonstVeroeffentlichungen/Tabakatlas-2015-final-web-dp-small.pdf>
153. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. *Gesundheitsreport Bayern - Rauchen und Nichtrauchen in Bayern – Update 2015*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [https://www.lgl.bayern.de/publikationen/doc/gesundheitsreport\\_2015\\_01.pdf](https://www.lgl.bayern.de/publikationen/doc/gesundheitsreport_2015_01.pdf)
154. RIM Marktforschung GmbH. *Bevölkerungsrepräsentativen Winterumfrage 2017/2018 in der Region München*. 2018. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [https://rim-marktforschung.de/wp-content/uploads/2018/03/RIM\\_PR\\_M118-Raucher.pdf](https://rim-marktforschung.de/wp-content/uploads/2018/03/RIM_PR_M118-Raucher.pdf)
155. Robert Koch-Institut / Statistisches Bundesamtes. *Verteilung der Bevölkerung auf Body-Mass-Index-Gruppen in Prozent*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg\\_isgbe5.prc\\_menu\\_olap?p\\_uid=gast&p\\_aid=17058302&p\\_sprache=D&p\\_help=0&p\\_indnr=434&p\\_indsp=16947904&p\\_ityp=H&p\\_fid=](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gast&p_aid=17058302&p_sprache=D&p_help=0&p_indnr=434&p_indsp=16947904&p_ityp=H&p_fid=)
156. *Bayern in Zahlen*, in *Fachzeitschrift für Statistik*. 2018, Bayerisches Landesamt für Statistik. p. 773-775.
157. Sepaniak S, et al. *The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation*. Toxicology, 2006. 223(1-2): p. 54-60.
158. Zhang Y, et al. *Self-reported smoking, serum cotinine, and blood DNA methylation*. Environ Res, 2016. 146: p. 395-403.
159. Chiu Y L, et al. *Validation of Self-reported Smoking with Urinary Cotinine Levels and Influence of Second-hand Smoke among Conscripts*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 15462.
160. Mattsson K, et al. *Cotinine Validation of Self-Reported Smoking During Pregnancy in the Swedish Medical Birth Register*. Nicotine Tob Res, 2016. 18(1): p. 79-83.
161. Prentki Santos E, et al. *Impact of spontaneous smoking cessation on sperm quality: case report*. Andrologia, 2011. 43(6): p. 431-435.
162. Amann R P. *The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?* J Androl, 2008. 29(5): p. 469-487.
163. American Association for Clinical Chemistry. *Nicotine/Cotinine Lab Test*. 2019. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/nicotine/tab/test/>

164. Fowler P A, et al. *Maternal smoking during pregnancy specifically reduces human fetal desert hedgehog gene expression during testis development*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 619-626.
165. Jungwirth A, et al. *European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update*. European Urology, 2012. **62**(2): p. 324-332.
166. Cooper T G, et al. *Internal quality control of semen analysis*. Fertil Steril, 1992. **58**(1): p. 172-178.
167. Bundesärztekammer. *Neufassung der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK“ – Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen*. Dtsch Arztebl International, 2014. **111**(38): p. s1583-.
168. Qualitätskontrolle der Deutschen Gesellschaft für Andrologie (QuaDeGa). *Ringversuche*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: [www.quadega.de/deutsch/ringversuche](http://www.quadega.de/deutsch/ringversuche)
169. Cohen J, Fehilly C B and Walters D E. *Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator*. Fertil Steril, 1985. **44**(2): p. 254-262.
170. Kervancioglu M E, et al. *Importance of sperm-to-epithelial cell contact for the capacitation of human spermatozoa in fallopian tube epithelial cell cocultures*. Fertil Steril, 2000. **74**(4): p. 780-784.
171. Wilcox A J, Weinberg C R and Baird D D. *Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby*. N Engl J Med, 1995. **333**(23): p. 1517-1521.
172. Carrasco L C, et al. *Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle*. Reproduction, 2008. **136**(6): p. 833-842.
173. Ignatz G G, Cho M Y and Suarez S S. *Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir*. Biol Reprod, 2007. **77**(6): p. 906-913.
174. Ekhlasi-Hundrieser M, et al. *Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig*. Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 536-545.
175. Machado S A, et al. *LewisX-containing glycans on the porcine oviductal epithelium contribute to formation of the sperm reservoir*. Biol Reprod, 2014. **91**(6): p. 140.
176. Ruoslahti E and Pierschbacher M D. *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-497.
177. Srivastava N, et al. *Bovine seminal PDC-109 protein: an overview of biochemical and functional properties*. Anim Reprod Sci, 2013. **138**(1-2): p. 1-13.
178. Marini P E and Cabada M O. *One step purification and biochemical characterization of a spermatozoa-binding protein from porcine oviductal epithelial cells*. Mol Reprod Dev, 2003. **66**(4): p. 383-390.
179. Gwathmey T M, et al. *Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct*. Biol Reprod, 2006. **75**(4): p. 501-507.

180. Manaskova P, et al. *Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies.* J Reprod Immunol, 2007. 74(1-2): p. 103-113.
181. Gwathmey T M, Ignatz G G and Suarez S S. *PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir.* Biol Reprod, 2003. 69(3): p. 809-815.
182. Zampini R, et al. *SL15: A seminal plasma-derived lectin from the sperm of llama (Lama glama).* Mol Reprod Dev, 2017. 84(7): p. 576-584.
183. Murray R K, et al. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 2003: Mcgraw-hill.
184. Trummer H, et al. *The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones.* Human reproduction (Oxford, England), 2002. 17(6): p. 1554-1559.
185. Povey A C, et al. *Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study.* Human reproduction (Oxford, England), 2012. 27(9): p. 2799-2806.
186. Hassa H, et al. *Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic.* Clinical and experimental obstetrics & gynecology, 2006. 33(1): p. 19-22.
187. Pasqualotto F F, et al. *Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men.* BJU international, 2006. 97(2): p. 324-326.
188. Zenzes M T, Bielecki R and Reed T E. *Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke.* Fertil Steril, 1999. 72(2): p. 330-335.
189. Shen H M, et al. *Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking.* Reprod Toxicol, 1997. 11(5): p. 675-680.
190. Potts R J, et al. *Sperm chromatin damage associated with male smoking.* Mutat Res, 1999. 423(1-2): p. 103-111.
191. Yeung C H, et al. *Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication.* Hum Reprod, 2009. 24(6): p. 1288-1295.
192. Sofikitis N, et al. *Effects of cotinine on sperm motility, membrane function, and fertilizing capacity in vitro.* Urol Res, 2000. 28(6): p. 370-375.
193. Wong W Y, et al. *Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology.* Fertil Steril, 2000. 74(5): p. 930-935.
194. Oliveira H, et al. *Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm.* Reprod Toxicol, 2009. 28(4): p. 550-555.
195. Kiziler A R, et al. *High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects.* Biol Trace Elem Res, 2007. 120(1-3): p. 82-91.
196. Arabi M and Moshtaghi H. *Influence of cigarette smoking on spermatozoa via seminal plasma.* Andrologia, 2005. 37(4): p. 119-124.
197. Zavos P M, et al. *Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity.* Fertil Steril, 1998. 69(3): p. 425-429.

198. Sharma R K, et al. *The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility*. Hum Reprod, 1999. **14**(11): p. 2801-2807.
199. Liu R Z, et al. *Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters*. J Int Med Res, 2010. **38**(3): p. 923-928.
200. Pasqualotto F F, et al. *Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study*. Fertil Steril, 2008. **90**(2): p. 278-283.
201. Logan-Garbisch T, et al. *Developmental ethanol exposure leads to dysregulation of lipid metabolism and oxidative stress in Drosophila*. G3 (Bethesda), 2014. **5**(1): p. 49-59.
202. Cho D Y, et al. *Air pollutants cause release of hydrogen peroxide and interleukin-8 in a human primary nasal tissue culture model*. Int Forum Allergy Rhinol, 2014. **4**(12): p. 966-971.
203. Garrido N, et al. *Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility*. Asian J Androl, 2004. **6**(1): p. 59-65.
204. Close C E, Roberts P L and Berger R E. *Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men*. J Urol, 1990. **144**(4): p. 900-903.
205. Riley L K and Rupert J. *Evaluation of Patients with Leukocytosis*. American family physician, 2015. **92**(11): p. 1004-1011.
206. Van Eeden S F and Hogg J C. *The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking*. The European respiratory journal, 2000. **15**(5): p. 915-921.
207. Jung J H, et al. *Treatment of Leukocytospermia in Male Infertility: A Systematic Review*. World J Mens Health, 2016. **34**(3): p. 165-172.
208. Shen H M, Chia S E and Ong C N. *Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility*. J Androl, 1999. **20**(6): p. 718-723.
209. Aziz N, et al. *Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia*. Fertil Steril, 2004. **82**(3): p. 621-627.
210. Alvarez J G and Storey B T. *Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**(3): p. 334-346.
211. Kim J G and Parthasarathy S. *Oxidation and the spermatozoa*. Semin Reprod Endocrinol, 1998. **16**(4): p. 235-239.
212. Hornstein M D. *Lifestyle and IVF Outcomes*. Reprod Sci, 2016. **23**(12): p. 1626-1629.
213. Zitzmann M, et al. *Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 2003. **79** Suppl 3: p. 1550-1554.
214. Joesbury K A, et al. *Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score*. Hum Reprod, 1998. **13**(6): p. 1506-1513.
215. Fuentes A, et al. *Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome*. Fertil Steril, 2010. **93**(1): p. 89-95.

216. T. G. Cooper C H Y. *Physiologie der Spermienreifung und Fertilisierung*. in *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 2009, Springer Medizin Verlag: Heidelberg. p. 63-82.
217. Légaré C, et al. *P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis*. *Endocrinology*, 1999. **140**(7): p. 3318-3327.
218. Moskovtsev S I, et al. *Epididymal P34H protein deficiency in men evaluated for infertility*. *Fertil Steril*, 2007. **88**(5): p. 1455-1457.
219. Johnson L and Varner D D. *Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis*. *Biol Reprod*, 1988. **39**(4): p. 812-817.
220. Cooper T G. *Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem*. *Asian J Androl*, 2007. **9**(4): p. 533-539.
221. Moore H D, et al. *The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa*. *Fertil Steril*, 1992. **58**(4): p. 776-783.
222. Garner D L, et al. *Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide*. *J Androl*, 1994. **15**(6): p. 620-629.
223. Gravance C G, et al. *Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function*. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 2001. **15**(1): p. 5-10.
224. Garner D L, et al. *Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa*. *Biol Reprod*, 1997. **57**(6): p. 1401-1406.
225. Papaioannou K Z, et al. *Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry*. *Theriogenology*, 1997. **48**(2): p. 299-312.
226. Genecards®. *LMAN2 Gene*. letzter Zugriff: 03/2021; URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LMAN2>
227. Fiedler K, et al. *VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells*. *Embo j*, 1994. **13**(7): p. 1729-1740.
228. Füllekrug J, Scheiffele P and Simons K. *VIP36 localisation to the early secretory pathway*. *J Cell Sci*, 1999. **112 ( Pt 17)**: p. 2813-2821.
229. Fiedler K and Simons K. *Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins*. *J Cell Sci*, 1996. **109 ( Pt 1)**: p. 271-276.
230. Kamiya Y, et al. *Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(44): p. 37178-37182.
231. Satoh T, et al. *Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e87963.
232. Stein K K, et al. *Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions*. *Proteomics*, 2006. **6**(12): p. 3533-3543.
233. Bettencourt C, et al. *White matter DNA methylation profiling reveals deregulation of HIP1, LMAN2, MOBP, and other loci in multiple system atrophy*. *Acta Neuropathol*, 2020. **139**(1): p. 135-156.

- 
234. Ariel M, Cedar H and Mccarrey J. *Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis*. Nat Genet, 1994. 7(1): p. 59-63.
235. Naaby-Hansen S, Flickinger C J and Herr J C. *Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa*. Biol Reprod, 1997. 56(3): p. 771-787.
236. Lewis S E. *Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?* Reproduction, 2007. 134(1): p. 31-40.
237. Rahman M S, et al. *Sperm proteomics: road to male fertility and contraception*. Int J Endocrinol, 2013. 2013: p. 360986.
238. Liu B, et al. *Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia*. J Assist Reprod Genet, 2010. 27(12): p. 719-724.
239. Reeve L, Lashen H and Pacey A A. *Endometriosis affects sperm-endosalpingeal interactions*. Hum Reprod, 2005. 20(2): p. 448-451.
240. Baillie H S, et al. *Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla*. Hum Reprod, 1997. 12(9): p. 1985-1992.
241. Waberski D, et al. *Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa*. Theriogenology, 2005. 63(2): p. 470-484.
242. Murphy E M, et al. *Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre*. Journal of animal science, 2018. 96(6): p. 2408-2418.
243. Robert A, et al. *Collection and Evaluation of canine semen - a review*. 2018.
244. Tourmente M, Giojalas L and Chiaraviglio M. *Sperm Parameters Associated with Reproductive Ecology in Two Snake Species*. Herpetologica, 2011. 67: p. 58-70.
245. Ellington J E, et al. *Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro*. Fertil Steril, 1999. 71(5): p. 924-929.
246. Thomas P G, et al. *A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers*. Biol Reprod, 1994. 51(2): p. 303-309.
247. Petrunkina A M, et al. *Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells*. Reproduction, 2001. 122(3): p. 469-480.
248. Lefebvre R and Suarez S S. *Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium*. Biol Reprod, 1996. 54(3): p. 575-582.
249. Holt W V and Fazeli A. *Sperm Storage in the Female Reproductive Tract*. Annu Rev Anim Biosci, 2016. 4: p. 291-310.
250. Henshaw S K. *Unintended pregnancy in the United States*. Fam Plann Perspect, 1998. 30(1): p. 24-29, 46.

251. Page S T, Amory J K and Bremner W J. *Advances in Male Contraception*. Endocrine Reviews, 2008. **29**(4): p. 465-493.
252. Cui Y, et al. *Proteomic analysis of testis biopsies in men treated with injectable testosterone undecanoate alone or in combination with oral levonorgestrel as potential male contraceptive*. J Proteome Res, 2008. **7**(9): p. 3984-3993.
253. Kwon W S, et al. *Voltage-dependent anion channels are a key factor of male fertility*. Fertil Steril, 2013. **99**(2): p. 354-361.

## 8 Anhang

### 8.1 Patientenfragebogen und Aufklärung

	<b>KLINIKUM</b> DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN	CAMPUS GROß HADERN UROLOGISCHE KLINIK UND POLIKLINIK PROF. DR. MED. CHRISTIAN STIEF	
---	--	---	---

Klinikum der Universität München Urologische Klinik und Poliklinik  
Prof. Dr. med. Christian Stief · Marchioninstraße 15 · 81377 München

Dr. med. Matthias Trottmann (Prüferzt)  
matthias.trottmann@med.uni-muenchen.de

Susanne Bour (M.Sc.)  
susanne.bour@med.uni-muenchen.de

www.klinikum-muenchen.de  
Marchioninstr. 15  
81377 München

Telefon: +49 (0)89 4400-74896  
Telefax: +49 (0)89 7095-7884

---

**Patienteninformation und Einverständniserklärung**

Sehr geehrter Patient,  
hiermit möchten wir Sie zur Teilnahme an unserer Studie  
**„Untersuchung von molekularen Markern auf der Oberfläche der  
Spermienplasmamembran für die andrologische Diagnostik“**  
einladen.

**1. Ziel der Studie**

In Mitteleuropa ist jedes 6. Paar im fortpflanzungsfähigen Alter ungewollt kinderlos. Gründe dafür sind männliche oder weibliche Unfähigkeit zur Zeugung bzw. zur Empfängnis. Oft sind beim Mann nach Untersuchung des Spermas Spermien vorhanden, diese weisen jedoch eine deutlich verminderte Beweglichkeit und Lebensfähigkeit auf. Wenn die Standarduntersuchungen keine auffallenden Abweichungen erkennen lassen, können Ursachen einer eingeschränkten Zeugungsfähigkeit nicht benannt werden. Bisher werden vor allem das Aussehen und die Beweglichkeit der Spermien zur Spermienbeurteilung herangezogen. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Aussehen der Spermien nur unzureichende Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit der Spermien ermöglicht. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine vorherige Bindung der Spermien mit dem Eileitergewebe für die Befruchtung der Eizelle von Bedeutung ist. Eine **funktionelle Qualitätsbeurteilung** von Spermien beim Menschen in diesem Zusammenhang ist bisher nicht bekannt und könnte bei der Beurteilung einer eingeschränkten Zeugungsfähigkeit sowohl diagnostisch als auch therapeutisch von Interesse sein. **Ziel dieser Studie ist es daher, erstmals die Grundlagen der Eileiter-Spermien-Interaktion beim Menschen zu untersuchen und einen neuen Test zur funktionellen Spermienbeurteilung zu etablieren.**

---

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik: Prof. Dr. med. Christian Stief  
öffentl. Verkehr: U6, 56, 266, 269 oder N41 bis Haltestelle Klinikum Großhadern

## **2. Vorgehensweise**

Ihre Samenprobe wird ausschließlich im Rahmen dieser Studie verwendet, um mikroskopische, histochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen. Es werden Moleküle mit speziellen Zuckerresten auf der Oberfläche der Spermien untersucht, sichtbar gemacht und mit Proben verschiedener Patientengruppen (Kontrollgruppe, zeugungsunfähige Personen und Raucher) verglichen. Die Beurteilung Ihrer Probe durch das Laborpersonal erfolgt unabhängig von dieser Untersuchung und wird die bei Ihnen geplante Standarduntersuchung nicht beeinträchtigen.

## **3. Nutzen und Risiko**

Als Studienteilnehmer genießen Sie eine besonders intensive Betreuung durch den Prüfarzt (Dr. med. Trottmann) und haben immer dieselben, erfahrenen Ansprechpersonen. Sie erhalten – ohne dass Ihnen Kosten entstehen - zusätzliche wertvolle Informationen. Diese können Aufschluss über eine mögliche eingeschränkte Fruchtbarkeit über die normale Spermogramm-Untersuchung hinaus geben und sind für die Entwicklung neuer erfolgreiche Therapiekonzepte wichtig. Zudem leisten Sie einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden.

## **4. Datenschutz**

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über den Datenschutz und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben; diese werden Ihnen auf Wunsch zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchungen mitgeteilt. Anschließend werden sowohl Ihre Samenprobe als auch Ihre Daten (einschließlich des angehängten Fragebogens) durch Zuteilung einer Studiennummer verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder Ihr Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Die Unterlagen werden 30 Jahre aufbewahrt und nach Studienende irreversibel anonymisiert. Durch die Pseudonymisierung entsteht für Sie der Vorteil, dass neue Erkenntnisse in Zusammenhang mit Ihrer Samenprobe Ihnen umgehend mitgeteilt werden können. Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Die Studie umfasst 200 Studienteilnehmer.

Wir wären Ihnen für Ihre Beteiligung an dieser Untersuchung sehr dankbar, selbstverständlich können Sie Ihre Teilnahme jederzeit widerrufen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet. Der Zugang zu den Originaldaten und zum

Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Dr. med. M. Trottmann, Susanne Bour (M.Sc.) und Rick Paschold (Doktorand der Urologischen Klinik). Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen dies für Ihre Behandlung notwendig ist.

Es wird keine verschuldensunabhängige Versicherung abgeschlossen.

Bei Rückfragen zu der Studie erreichen Sie den Studienleiter unter der folgenden Telefonnummer:

Susanne Bour (M.Sc.), Klinik und Poliklinik für Urologie, Feodor-Lynen-Str. 19, 81377 München, Tel: 089-4400-74896

Dr. med. Matthias Trottmann, Klinik und Poliklinik für Urologie, Marchioninstr. 15, 81377 München, Tel: 089-4400-0

Rick Paschold, Klinik und Poliklinik für Urologie, Feodor-Lynen-Str. 19, 81377 München, Tel: 089-4400-74896

Ich erkläre hiermit, dass ich von ..... (befugte Person) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

**Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.**

x

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift

**Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der genannten Studie teilzunehmen.**

x

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Aufklärende Person, Ort, Datum, Unterschrift



**Fragebogen zur Studie „Molekulare Marker auf der Oberfläche der Spermienplasmamembran“**

Alter: \_\_\_\_\_

Größe (cm) \_\_\_\_\_ Gewicht (kg): \_\_\_\_\_

- Relevante Vorerkrankung:
- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> erfolgte Chemotherapie                 | <input type="checkbox"/> bösartige Erkrankung    |
| <input type="checkbox"/> Hodenhochstand (beidseitig/einseitig?) | <input type="checkbox"/> Urogenitale Infektionen |
| <input type="checkbox"/> Urogenitale Vor-OP                     | <input type="checkbox"/> Mumps – Infektionen     |
| <input type="checkbox"/> Bekannte genetische Auffälligkeiten    |  |
| <input type="checkbox"/> Sonstige: _____                        |  |

Nehmen Sie aktuell Medikamente? \_\_\_\_\_

Haben Sie Kinder?  Nein  Ja (wenn Ja, wie viele? Alter?)  
\_\_\_\_\_

Unerfüllter Kinderwunsch?  Nein  
 Ja, seit \_\_\_\_\_

Rauchen Sie?  Nein  
 Ja, seit \_\_\_\_\_  
 Weniger als 15 Zigaretten/Tag  
 Mehr als 15 Zigaretten/Tag  
 Mehr als 30 Zigaretten/Tag  
 Ich habe vor \_\_\_\_\_ aufgehört. Davor waren es  
(siehe Kästchen oben)

Besondere Bemerkungen: \_\_\_\_\_



## 8.2 Veröffentlichungen zur Dissertation

Paschold R, Bour S, Becker AJ, Stief CG, Trottmann M.

Impacts of smoking on the glycocalix of human spermatozoa; MP07-18.

112. Jahrestagung der American Urological Assosiation (AUA), Boston 12.-16. Mai 2017

The Journal of Urology. 197(4): p. e88-e89

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2017.02.284>

Bour S, Paschold R, Alba-Alejandre I, Becker AJ, Stief CG, Koelle S, Trottmann M

The role of glycoconjugates in formation of the human sperm reservoir; PD08-01.

112. Jahrestagung der American Urological Assosiation (AUA), Boston 12.-16. Mai 2017

The Journal of Urology. 197(4): p. e188.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2017.02.528>

Paschold R, Bour S, Becker AJ, Stief CG, Trottmann M.

Auswirkungen von Rauchen auf die Glykokalix humaner Spermatozoen.

43. Gemeinsame Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie und der Bayerischen Urologenvereinigung, Wien, 18.-20. Mai 2017

DOI: 10.3205/17oegu06

Bour S, Koelle S, Paschold R, Alba-Alejandre I, Becker AJ, Stief CG, Trottmann M

Die Welt der Zucker: Neue Ansätze bei humaner Infertilität.

43. Gemeinsame Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie und der Bayerischen Urologenvereinigung, Wien, 18.-20. Mai 2017

DOI: 10.3205/17oegu061

Paschold R, Bour S, Becker AJ, Stief CG, Trottmann M.

Effects of smoking on the glycocalix of human spermatozoa.

32. Jahrestagung der European Association of Urology (EAU), London 24.-28. März 2017

European Urology Supplements. 16(3): p. e1009-e1010.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-9056\(17\)30637-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-9056(17)30637-1)

Bour S, Paschold R, Alba-Alejandre I, Becker AJ, Stief CG, Koelle S, Trottmann M.

Formation of the human sperm reservoir and its major players.

32. Jahrestagung der European Association of Urology (EAU), London 24.-28. März 2017

European Urology Supplements. **16**(3): p. e1005-e1006.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-9056\(17\)30635-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-9056(17)30635-8)

Bour S, Paschold R, Becker AJ, Stief CG, Trottmann M.

Untersuchung der Spermien-Glykokalyx bei normalen und pathologischen Ejakulatqualitäten.

28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie, Saarbrücken 8.–10. September 2016

## **Eidesstattliche Versicherung**

Paschold, Rick Alexander

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Auswirkungen von Tabakkonsum auf die Spermien-Eileiter-Interaktion und die männliche Fertilität**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.10.2021

Rick Alexander Paschold

## Danksagung

Nach all den Jahren Labor- und Schreibtischarbeit, ist es mir an dieser Stelle wichtig, allen Menschen zu danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet haben:

An erster Stelle steht hier unsere kleine Arbeitsgruppe rund um Prof. Armin Becker, PD Matthias Trottmann und Susanne Bour. Liebe Susanne, vielen Dank für die jahrelange Unterstützung in besonderer Konstellation als Betreuerin, Kollegin und Mit-Promovierende. Die Laborarbeit wäre ohne Dich, Deine Erfahrung und Ausbildung nicht möglich gewesen. Deine Freude am Forschungsthema und der persönliche Austausch haben die Jahre im Labor und die gemeinsamen Kongresse geprägt. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Matthias Trottmann, für die Überlassung des Themas, seine persönliche Förderung und Motivation. Matthias, während zahlreicher Stunden an diesem Projekt konnte ich immer auf Deine Unterstützung sowohl fachlich als auch persönlich zählen. Ich danke Dir ganz besonders für Deine Geduld, den konstruktiven Austausch und die gemeinsame Ent- und Weiterentwicklung dieser Arbeit. Ein weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Armin Becker für das entgegengebrachte Vertrauen, die besondere Förderung des Projekts und den endgültigen Feinschliff der Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Christian Stief für die exzellenten Rahmenbedingungen in seiner Abteilung und die finanziellen Mittel.

Unsere Forschungslabore waren im LIFE-Zentrum (Laser- und Immunologie-Forschungs-Einrichtungen am Klinikum der Universität München) beheimatet. Dort arbeiteten wir direkt mit und neben dem Team des Laser-Forschungslabor (LFL). Ich möchte mich ganz herzlichem beim gesamten Team rund um Prof. Ronald Sroka bedanken. Die tolle Integration ins fachfremde Team, der gemeinsame Austausch und Aktivitäten und die Arbeitsatmosphäre im LFL waren wirklich einzigartig.

Ein besonderer Dank geht auch an Petra Bährig, zur damaliger Zeit MFA im Andrologischen Labor der LMU. Petra, Dein Beitrag zu diesem Projekt war essentiell und nicht selbstverständlich. Ich danke Dir für die tolle Unterstützung!

Ebenso möchte ich mich bei meinem gesamten Münchner Freundeskreis bedanken. Es ist schön, solche tollen Freunde an seiner Seite zu wissen, mit denen man zusammen durch Höhen- und Tiefen des Studiums und der Promotion gegangen ist. Ich danke Euch für Eure Begleitung durch diese unvergessliche Zeit, Eure Geduld und Ratschläge.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie und vor allem meinen Eltern! Mama und Papa, ihr habt mir in meiner Ausbildung alle Freiheiten ermöglicht und berätet mich jederzeit und in allen Lebenslagen damals wie heute. Ich danke Euch dafür! Ein großer Dank gebührt auch meinem Opa, den ich bei allen Höhen und Tiefen mit seiner Lebenserfahrung immer an meiner Seite wissen durfte und meinem Bruder Lukas.