

Silvia Berning  
Dr. med.

## **Erprobung von Gelatine-Medien als in vitro Penetrationsmedium zur Prüfung der funktionalen Spermienkapazität im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik**

Geboren am 31.05.1966 in Ahaus (NRW)  
Reifeprüfung am 28.05.1985 in Ahaus (NRW)  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1985-SS 1993  
Physikum am 07.09.1987 an der Semmelweis Universität Budapest (Ungarn)  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Sinsheim  
Staatsexamen am 03.12.1993 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde  
Doktormutter: Priv. Doz. Dr. med. W. Eggert-Kruse

In der Fertilitätsdiagnostik spielt die Beurteilung der Spermienfunktion zur Bewertung des andrologischen Faktors eine erhebliche Rolle. Die Prüfung der Spermienmigration im Cervicalmucus (CM) der Partnerinnen stellt einen klinisch relevanten globalen Spermienfunktionstest dar. Ihm wird eine Bedeutung für die Fertilitätsprognose zugeschrieben. Die Qualität des CM unterliegt jedoch ausgeprägten zyklischen Schwankungen und CM ist nicht überall (z.B. nicht in der andrologischen Praxis) verfügbar. Deshalb wird seit langer Zeit nach brauchbaren Ersatzmedien (z.B. boviner CM, Polyacrylamid, Healonid oder Hühnereiweiß) für den in vitro Spermienpenetrationstest gesucht. In der vorliegenden Pilotstudie wurden zum ersten Mal Gelatine-Gele (Gel.-Gel.) unterschiedlicher Konzentration (hergestellt mit Phosphate-buffered saline) mit und ohne Zusätze (Glucose und Mucin) als mögliches Penetrationsmedium getestet. Der Vorteil von Gel.-Gel. liegt in seiner kostengünstigen, einfachen und raschen Herstellungsmöglichkeit und langen Haltbarkeit der Grundstoffe.

In die vorliegende Untersuchung wurden im Rahmen einer paarbezogenen Sterilitätsdiagnostik 237 Männer (Altersmedian 33 Jahre) und Frauen (Altersmedian 31 Jahre) mit langjährigem, unerfüllten Kinderwunsch (Dauer 1-19, Median 3 Jahre) einbezogen. Die Spermienkapazität wurde hierbei mit Hilfe des standardisierten Spermien-Cervicalmucus-Penetrationstest (SCMPT) beurteilt. Beim SCMPT werden die Eindringtiefe, Anzahl, Motilität und Überlebensdauer der Spermien bei Penetration in mit CM gefüllten Kapillaren mit Hilfe eines Spermienpenetrationsmeter untersucht. Der CM wurde in der Zyklusmitte nach hormoneller Vorbehandlung entnommen, gleichzeitig wurde das Ejakulat in der andrologischen Klinik nach einer Karenz von mindestens fünf Tagen gewonnen. Dabei erfolgte auch ein mikrobielles Screening von CM und Ejakulat zur Beurteilung eines möglichen bakteriellen Einflusses auf die Spermienmigration. Die Ejakulate wurden für die Penetrationstests in CM und in Gel.-Gel., sowie für die Erstellung von Spermioogrammen nach WHO-Kriterien durch die andrologische Ambulanz verwendet. In einem Subkollektiv wurden zusätzlich lokale Anti-Spermatozoen Antikörper (ASA) mit Hilfe des Mixed-Antiglobulin-Reaktion-Test (MAR-Test) bestimmt. Der SCMPT fand mit CM der Partnerin und Ejakulat des Patienten und in gekreuzten Ansätzen mit Ejakulat des Mannes und Donor-CM, sowie mit CM der Frau und Donor-Sperma statt (n = 713 Ansätze). Die Gel.-Gel. wurden in den Konzentrationen 0,25-50% (intensivierte Versuche mit den Konzentrationen 0,5 % und 1 %) und mit verschiedenen Zusatzstoffen (Muramicacid, Mucin Typ I, Mucin Typ II und Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen) hergestellt (n = 494 experimentelle Ansätze mit den Medien). Alle Gelatine-

Versuche liefen parallel mit Migrationstests in humanem CM (hCM). Die Resultate der Migrationstests in unterschiedliche Gel.-Gel. wurden mit SCMPT in CM der Partnerin und Donor-CM in ausführlichen Analysen in Beziehung gesetzt. Alle in vitro Penetrationstests wurden außerdem im Hinblick auf das Ergebnis des Postcoitaltests (PCT) mit und ohne hormonelle Vorbehandlung analysiert. Der Einfluß des Cervicalfaktors auf die Migrationstests (in vivo und in vitro) wurde differenziert. Alle Migrationstests wurden in Relation zu den Spermioigrammparametern, auch unter Berücksichtigung der Keimbesiedlung sowie der lokalen ASA gesetzt. In prospektiven Untersuchungen wurde auch die spätere Fertilität (Beobachtungszeitraum von sechs Monaten) unter Berücksichtigung einer Vielzahl fertilitätsmindernder Faktoren zur Bewertung der Gel.-Migrationstests herangezogen. Für die umfangreichen statistischen Analysen kamen die Spearman-Rank-Korrelation, Wilcoxon-Tests sowie der Chi-Quadrat-Test und der Fischer's-Exact-Test zur Anwendung.

Obwohl die Gel.-Gel. eine größere Filterwirkung für Spermien zeigten als hCM, korrelierte die Spermienpenetration in diese Medien, besonders für die Spermienanzahl und die Spermienmotilität, signifikant mit hCM. Dies zeigte sich vor allen Dingen für Gelatine (Gel.) 0,5 % ( $r_s = 0,67$ ,  $p < 0,0001$  für die Spermienanzahl;  $p < 0,005$  für die Motilität). Auch der Gesamtscore des Penetrationstests (Summe aus Eindringtiefe, Spermienanzahl und Motilitätsindex) zeigte signifikante Zusammenhänge wenn Gel. bzw. hCM als Medium verwendet wurde, besonders wenn Glucose (Gluc.) zugesetzt wurde ( $p = 0,004$  bei 3 %iger Gluc.-Gel.;  $p < 0,01$  bei 1 %iger Gluc.-Gel.). Die Versuche in Gel.-Gel. mit Mucin (als rheologische Grundsubstanz in hCM bedeutsam) bzw. Muramicacid als Gel.-Zusatz zeigten eine besonders starke Filterwirkung dieser Medien, weshalb diese nicht geeignet erscheinen. Bei schlechten Spermioigrammen ist keine ausreichende Penetration in diese Medien zu erwarten.

Auch der Ausfall des PCT zeigte mit der Spermienpenetration in die Ersatz-Medien signifikante Zusammenhänge, z.B. mit dem Gesamtscore in Gluc.-Gel. 3 % ( $p=0,007$ ) bzw. mit Gesamtscore in Gelatine 0,5 % ( $p=0,02$ ). Die Penetration in Gel.-Medien sowie in hCM korrelierte mit verschiedenen Spermioigrammparametern, besonders mit der Spermienanzahl, aber auch mit der Progressivmotilität und der Spermienmorphologie. Auch wenn die Spermioigrammvariablen im pathologischen Bereich lagen (z.B. Spermienanzahl  $< 20$  Mio/ml) erlaubte der Gel.-Gel. Penetrationstest meistens eine differenzierte Beurteilung der Spermienfunktion. Die Spermienpenetration in hCM wie in die Ersatzmedien (Gel.-Gel.) war unbeeinflusst von dem Vorhandensein von potentiell pathogenen Keimen im Sperma. Lokale ASA übten einen signifikanten Einfluß auf die Spermienpenetration in hCM aus, während sich dieser Effekt in Gel.-Gel. nicht deutlich zeigte. Dies betraf auch Gel.-Gel. mit Zusätzen wie z.B. Gluc.. Es fiel jedoch auf, daß Spermaproben mit einem MAR-IgG  $\geq 20$  % bzw. MAR-IgA  $\geq 10$  % nie ein gutes Ergebnis (Gesamtscore) bei der Penetration in diese Ersatzmedien erreichten.

Sowohl für die Migrationsergebnisse in Gel.-Gel. als auch in Gel.-Medien mit Gluc.-Zusatz fand sich ein bedeutsamer Zusammenhang mit der Fertilitätskapazität der Spermien, wenn die Einzelparameter (z.B. Spermiedichte, Eindringtiefe) in diesen Ersatzmedien bzw. der Gesamtscore des Migrationstests in Betracht gezogen wurden.

Die Resultate dieser Pilotstudie deuten darauf hin, daß Gel. 0,5 %, insbesondere mit Gluc.-Zusatz, als Penetrationsmedium sehr gut geeignet ist. In Gluc.-Gel. zeigten sich etwas bessere Penetrationsergebnisse als in Gel. 0,5 %. Welche dieser Medien im Routineeinsatz eine bessere, differenziertere Aussage über die Spermienfunktion zulassen, sollte in Folgestudien mit größeren Fallzahlen insbesondere an Spermaproben mit eingeschränkter Spermienfunktion geprüft werden. Im Gegensatz zu hCM sind die untersuchten Medien jederzeit verfügbar. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber anderen Ersatz-Penetrationsmedien liegt in der kostengünstigen und einfachen Herstellbarkeit und der Möglichkeit der Anwendung in einer

andrologischen Praxis. Die Anwendung von Gel.-Gel. bzw. Gluc.-Gel.-Medien als Penetrationsmedium für Spermien liefert wertvolle Zusatzinformationen über die Spermienkapazität, besonders wenn qualitativ guter hCM nicht verfügbar ist.