Funktionelle und immunologische Untersuchungsmethoden in der Andrologie*

W.-B. Schill

Dermatologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. O. Braun-Falco)

Zusammenfassung:

Neben klassischen Spermaparametern stehen der andrologischen Diagnostik eine Reihe von Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die eine funktionelle Charakterisierung der Spermatozoen ermöglichen. Für die Beurteilung der Vitalität und Befruchtungsfähigkeit einer Spermatozoenpopulation können folgende funktionelle Parameter herangezogen werden: Das Motilitätsverhalten der Spermatozoen in vitro bzw. die Fähigkeit der Samenzellen, in den Zervixmukos einzudringen, der Schwelltest und die Bestimmung der Aktivität des Penetrationsenzym Akrosin. Aufwendigere Verfahren sind die Messung der Kinetik der akrosomalen Reaktion, die LDH-X- und ATP-Bestimmung, die Bindung der Spermatozoen an die Zona pellucida der Eizelle und die Penetration Zona pellucida-freier Hamstereizellen (HOP-Test) bzw. die in vitro-Fertilisation. Weitere Untersuchungsmethoden betreffen die Frage der Qualitätsverbesserung von Humansperma für Inseminationszwecke, wobei die Splitjakulat-Technik und andere Spermatozoen-Anreicherungsverfahren von Interesse sind. In speziellen Fällen kann der Spermatozoen-Stimulationstest zu therapeutischen Empfehlungen für die Insemination führen. Auch die Überprüfung der Gefrierempfindlichkeit der Spermatozoen zum Zwecke des Anlegens von Spermakonserven gehört zu den Untersuchungsmethoden, die eine funktionelle Beurteilung der Spermaqualität erlauben.

Besteht der Verdacht auf das Vorliegen von Spermatozoen-Antikörpern, so ist die Anwendung immunologischer Untersuchungstechniken erforderlich, wobei Screening-Verfahren von spezifischen Testmethoden zu unterscheiden sind. Zirkulierende Spermatozoen-Antikörper können im Serum, Spermaplasma und Zervixmukos mit Hilfe des Agglutinationstests nach Kibrick und des Immobilisationstests nach Isojima untersucht werden. Neuerdings stehen als sehr empfindliche und reproduzierbare Untersuchungsverfahren Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) zur Verfügung, die unabhängig von qualitativ hochwertigen Testejakulaten sind und sich als Screening-Methoden für zahlreiche Blutproben (Genitalsekrete) eignen.

Schlüsselwörter:

Spermatozoenvitalität – Überlebensfähigkeit – Zervixmukos-Penetration – Stimulationstest – Splitjakulat – Gefrierfähigkeit – Akrosin – akrosomale Reaktion – LDH-X – ATP – HOP-Test – in vitro-Fertilisation – immunologische Testverfahren – ELISA-Technik zum Spermatozoen-Antikörpernachweis

Summary:

Apart from classical semen parameters the andrological laboratory check-up comprises several methods which allow a functional characterization of the spermatozoa. For the judgement of sperm vitality and fertilization capacity of a sperm population the following functional parameters may be used: assessment of the motility and long livety of spermatozoa in vitro, the ability of sperm cells to penetrate into cervical mucus, the swelling test and the assessment of the activity of the penetration enzyme acrosin. More sophisticated methods are procedures which determine the kinetic of the acrosomal reaction, the LDH-X and ATP measurement, the binding of spermatozoa to the zona pellucida of the egg, the penetration of zona free hamster eggs (heterologous ovum penetration test = HOP) and the in vitro fertilization. Additional methods concern the improvement of the quality of human semen for the purpose of insemination, for example by the split ejaculate technique and other sperm concentration procedures. In some cases a sperm stimulation test may lead to therapeutical recommendations for insemination. Lastly, the examination of freezability of sperm for the purpose of semen storage in liquid nitrogen is a method to allow the functional judgement of semen quality.

If the occurrence of antisperm antibodies has to be confirmed immunological techniques are necessary which will include screening methods and specific assays. Circulating antisperm antibodies may be detected in serum, seminal plasma and cervical mucus by the agglutination test according to Kibrick and the immobilization test according to Isojima. More recently as a very sensitive and reproducible immunological method enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are available which are independent of test ejaculates of high quality and are suitable as screening methods for series of serum samples or genital tract secretions.

Keywords:

Sperm vitality – sperm long livety – cervical mucus penetration – stimulation test – split ejaculate – freezability – acrosin – acrosomal reaction – LDH-X – ATP – HOP test – immunological assays – ELISA technique for the detection of antisperm antibodies

* Vortrag auf der Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Labormedizin und des Berufsverbandes für Labormedizin, Bad Nauheim, Nov. 1984.

Einleitung

Die konventionelle Spermaanlyse (1) erlaubt keine eindeutige Aussage zur individuellen Fertilitätsprognose eines Mannes. Auch die meisten biochemischen Parameter des Spermas tragen nicht zur Unterscheidung fertiler und infertiler Ejakulate bei. Dies gilt insbesondere für Männer aus Ehen mit idiopathischer Sterilität, bei denen bislang keine faßbaren morphologisch-biochemischen Veränderungen nachgewiesen werden können, die auf die Ursache der Kinderlosigkeit hinweisen. Aus diesem Grunde besteht die Notwendigkeit der Einführung bzw. Entwicklung funktioneller Untersuchungsverfahren, die über die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen Auskunft erteilen und insbesondere die Interaktion der männlichen Samenzellen mit den Eizellen erfassen.

Zur Untersuchung von Spermatozoenfunktionen stehen derzeit folgende Untersuchungsmethoden zur Verfügung:

1. Messung der Spermatozoenvitalität und Überlebensfähigkeit
2. Zervixmukus-Penetrationstests
3. Spermatozoen-Stimulationstest
4. Untersuchung des Splittejakulates
5. Untersuchung der Gefrierfähigkeit der Spermatozoen
6. Beurteilung der akrosomalen Funktionen und der Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen durch Messung der Akrosinaktivität bzw. Durchführung der akrosomalen Reaktion, des Schwelltests, der LDH-X- bzw. ATP-Bestimmung, des HOP-Tests und der in vitro-Fertilisation.

Die genannten Testverfahren sind geeignet, funktionelle Störungen der männlichen Keimzellen zu erkennen. Sie werden daher zur diagnostischen Abklärung von Sterilitätsfaktoren im Rahmen der interdisziplinären Kooperation zwischen Andrologie und Gynäkologie von beiden reproduktionsmedizinischen Fächern wahrgenommen, wobei in Abhängigkeit von den örtlichen Gegebenheiten und den unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen an den einzelnen Kliniken und Instituten unterschiedliche Schwerpunkte bestehen.

Im folgenden soll das Prinzip und die Bedeutung der genannten Untersuchungsverfahren besprochen und de-

ren klinische Wertigkeit diskutiert werden. Im letzten Teil der Übersicht werden der aktuelle Stand und die gegenwärtig zur Verfügung stehenden immunologischen Untersuchungsmethoden zusammengefaßt, die zur Abklärung eines immunologischen Sterilitätsfaktors erforderlich sind.

Bestimmung der Spermatozoenvitalität und Überlebensfähigkeit

Der wichtigste Spermaparameter für die Erfassung der Samenqualität ist die Motilität der Spermatozoen, da sie am besten mit der Fertilität korreliert, wie zahlreiche Untersuchungen gezeigt haben (2). Für die routinemäßige Bestimmung reichen im allgemeinen Schätzverfahren mit Hilfe des Phasenkontrast-Mikroskops aus, wenn sie von einer erfahrenen medizinisch-technischen Kraft durchgeführt werden, wobei zwischen Globalmotilität und Progressivmotilität differenziert wird (1). Für wissenschaftliche Zwecke stehen inzwischen Meßverfahren zur Verfügung, die objektiv sind und eine ausreichende Genauigkeit der Motilitätsbestimmung garantieren. Es handelt sich dabei um mikrophotographische Verfahren, die sogenannte „Multiple exposure photography“, bei der mittels einer standardisierten Zählkammer in definierten Zeiteinheiten (1 Sekunde) zurückgelegte Progressionsstrecken der Spermatozoen erfaßt werden und sich außer der Globalmotilität die mittlere Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{sec}$) der Spermatozoen berechnen läßt (3, 4). Leider bedarf dieses Verfahren gegenwärtig noch einer zeitaufwendigen manuellen Auswertung. Computerisierte Ableseverfahren sind jedoch in Entwicklung (5). Bei Verwendung eines Dunkelfeldes in Kombination mit einer Polaroid-Kamera eignet sich das Verfahren ganz besonders zur Dokumentation der Spermatozoenmotilität vor in vitro-Fertilisation, aber auch vor Insemination oder im Rahmen von Zervixmukus-Penetrationstests (6).

Die Bestimmung der Spermatozoenvitalität erfolgt mit Hilfe des Eosin-Tests, einem Supravital-Färbeverfahren, bei dem nach Zugabe von einem Tropfen 0,5% gelbliches Eosin gelöst in Aqua dest, zu einem Tropfen Sperma nach 1 bis 2 Minuten tote (Eosin-positive) von vitalen (Eosin-negative) Spermatozoen unterschieden werden können (1).

Abb.1 zeigt anhand eines theoretischen Beispiels die Messung des Motilitätsverhaltens der Spermatozoen in Abhängigkeit von der Zeit, wobei es in der Praxis genügt, Motilität und Vitalität (Eosin-Test) der Spermatozoen 30 Minuten und 4 Stunden post ejaculationem zu messen. Der Motilitätsabfall nach 4 Stunden darf nicht größer als 15% sein. Kommt es innerhalb des Zeitraums von 4 Stunden zu einem erheblichen Motilitätsabfall, weist dies auf einen männlichen Sterilitätsfaktor hin, der eine deutliche Einschränkung der Fertilität bedingt.

Zervixmukus-Penetrationstests

Die Zervixmukus-Penetrationstests geben wichtige Basisinformationen über das Penetrationsverhalten der Spermatozoen in den weiblichen Genitalsekreten (7). Bei Durchführung von gekreuzten Penetrationstests in vitro unter zusätzlicher Verwendung fertiler Spenderejakulate und eines fertilen Spendermukus (Tab. 1) erlaubt die Untersuchung die Differenzierung eines männlichen bzw. weiblichen Sterilitätsfaktors (8).

Der am häufigsten praktizierte Test ist der Postkoitaltest nach Sims-Huhner, der das Penetrationsverhalten der Sa-

Abb. 1: Motilität der Spermatozoen während einer Beobachtungszeit von 4 Stunden. Die verschiedenen Möglichkeiten des Motilitätsverhaltens sind wiedergegeben. Ein Motilitätsverlust von mehr als 15% nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden weist auf einen männlichen Sterilitätsfaktor hin

menzellen zum Konzeptionsoptimum in vivo untersucht (9). Dabei ist auf das Einhalten von Standard-Bedingungen nach den WHO-Richtlinien zu achten (10). Der Test wird als positiv bewertet, wenn 6 bis 10 Stunden nach dem Geschlechtsverkehr mehr als 10 gut bewegliche Spermatozoen pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung im ovulatorischen Zervixmukus beobachtet werden können. Lassen sich nur wenig unbewegliche oder keine Spermatozoen nachweisen, so ist der Test negativ. Spätestens dann ist eine weiterführende andrologische Diagnostik angezeigt einschließlich der Durchführung von in vitro Zervixmukus-Penetrationstests nach Kurzrok-Miller (10) bzw. nach Kremer (11) (Abb. 2) und des Ausschlusses immunologischer Sterilitätsfaktoren.

Spermatozoen-Stimulationstest

Dieser Funktionstest erlaubt die Überprüfung der Frage, ob bei reduzierter Motilität eine Verbesserung der Spermatozoenbeweglichkeit durch Zusatz motilitätsstimulierender Faktoren möglich ist, z.B. 5 Einheiten Kallikrein pro ml Ejakulat bzw. 5 mmol/l Coffein (12). Bei einem positiven Effekt könnte die Stimulation der Spermatozoenmotilität mit Kallikrein therapeutisch für Inseminationzwecke genutzt werden (13).

Split ejakulat-Untersuchung

Durch die Gewinnung von mindestens zwei Fraktionen (z.B. Auffangen der ersten drei Ejakulatstöße in einem Gefäß und Sammeln der restlichen Ejakulatfraktionen in einem zweiten Gefäß) erfolgt bei 95% der Patienten eine Konzentrierung der Spermatozoen in der ersten Splitfraktion (14). Bei einem Teil der Patienten ist auch die Motilität in der ersten Fraktion besser als im Gesamtejakulat. Ist eine Qualitätsverbesserung des Spermas durch die Split-ejakulattechnik möglich, so kann bei entsprechender Indikation eine Inseminationstherapie unter Verwendung der spermatozoenreichen Fraktion des Split ejakulates durchgeführt werden (15). Bei intrauteriner Insemination darf allerdings nicht mehr als 0,3 ml Ejakulat intrakavitär

wegen des hohen Prostaglandingehaltes appliziert werden. Andere Verfahren der Spermaanreicherung (z.B. Zentrifugation, Konzentrierung, Albumingradient, Ficoll, Percoll, Millipore-Filter, Sephadexsäule, Glassäulen-Filtration) zur Verbesserung der Ejakulatqualität sind meist aufwendig und haben sich – nicht zuletzt oft mangels Effektivität – bisher in der Praxis nicht durchgesetzt (16).

Gefrierfähigkeitsuntersuchung

Die Beurteilung der Gefrierfähigkeit von Spermatozoen ist ein weiterer Funktionstest, der verwendet wird, um die Resistenz der Spermatozoen gegenüber dem Kälteschock (Tab. 2) zu überprüfen (17). Von praktischer Bedeutung ist dabei die Frage, ob das Anlegen von Kryospermakonserven sinnvoll ist, wenn die Langzeitlagerung von Sperma bei Tumor- und Risikopatienten erwogen wird. Der durchschnittliche Motilitätsverlust nach dem Einfrieren und Auftauen beträgt 40%.

Akrosomale Funktionstests

Ein funktionell intaktes Spermatozoenakrosom ist Voraussetzung für die Penetration der Eizellhüllen durch die Spermatozoen. Dafür enthält das Akrosom, das ein modifiziertes Lysozym darstellt, drei Penetrationsenzyme, die wie der Schlüssel zum Schloß für jeweils eines der drei Eihüllen notwendig sind (Abb. 3). Es handelt sich um die Hyaluronidase, das Corona-penetrating-enzyme und die trypsinähnliche Proteinase Akrosin. Letztere ist das Schlüsselenzym für das Durchdringen der Zona pellucida, die die größte Barriere darstellt. Akrosin wird aus einer inaktiven Vorstufe, dem Proakrosin, durch Autoaktivierung gebildet. Die Proenzymaktivierung findet während der Spermatozoenkapazitation statt, die intrauterin abläuft und die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen erst ermöglicht.

Akrosinbestimmung

Die Messung der Akrosinaktivität erfolgt nach Extraktion der Spermatozoen bei pH 2,4–2,7 unter Verwendung des

Abb. 2: Spermatozoen-Penetrationsmeter nach Kremer. Auf einem Objektträger befindet sich ein Spermarieservoir, in das eine horizontal liegende Kapillare eintaucht, die ovulatorischen Zervixmukus enthält und auf der gegenüberliegenden Seite mit Platin verschlossen ist. Die experimentelle Anordnung erlaubt doppel- und dreifache Ansätze. Messung der Penetrationsstrecke (in cm) des schnellsten Spermatozoons nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 22°C (lineare Penetration) und Bestimmung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld (Penetrationsdichte) bei 2, 3, 4, 5 und 6 cm Wanderungsstrecke nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 Minuten bei 320facher Vergrößerung

Tab. 1: Gekreuzter Spermatozoen-Zervixmukus-Penetrationstest

A. Erforderliches Material:

- präovulatorischer Zervixmukus (Ehefrau, fertile Spenderin)
- Sperma (Ehemann, fertiler Spender)

B. Testansatz in vitro:

1. Zervixmukus (Ehefrau) gegen Sperma (Ehemann)
2. Zervixmukus (Ehefrau) gegen Spendersperma
3. Spendermukus gegen Sperma (Ehemann)
4. Spendermukus gegen Spendersperma

Tab. 2: Prüfung der Gefrierfähigkeit von Humansperma

synthetischen niedermolekularen Substrates BAEE (18). Durch Aktivierung des Proenzyms läßt sich die Gesamtakrosinaktivität bestimmen (19, 20).

Der Akrosin- bzw. Proakrosingehalt der Spermatozoen fertiler bzw. infertiler Männer weist signifikante Unterschiede auf (21). Da jedoch die Streubreite der einzelnen Patientengruppen sehr groß ist, sind diagnostisch verwertbare Rückschlüsse der Akrosinaktivität einzelner Spermaproben mit Vorsicht zu stellen.

Klinisch relevant ist die Bestimmung der Akrosinaktivität zur Sicherung der Diagnose Globozoospermie, einem Krankheitsbild, bei dem ausschließlich akrosomenlose Rundkopfspermatozoen vorhanden sind. Aber auch bei Patienten mit einem erhöhten Anteil (> 20%) von Rundkopfspermatozoen konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß bei einem Teil der Patienten in den morphologisch intakten Spermatozoen kein Akrosin nachgewiesen werden kann, was insbesondere im Hinblick auf die in vitro-Fertilisation von Bedeutung ist (22). Auch bei anderen Malformationen im Bereich des Spermatozoenkopfes bestätigt die Akrosinmessung den Verlust der Penetrationsenzyme (23). Untersuchungen bei der Polyzoospermie, einem bisher nicht einzuordnenden Krankheitsbild, haben ergeben, daß bei einem großen Teil dieser Männer ein erheblicher Verlust der Akrosinaktivität beobachtet wird, der möglicherweise die Infertilität erklärt und auf ein funktionell defektes Akrosom hinweist (24).

Obwohl sicherlich viele Zusammenhänge noch nicht ausreichend abgeklärt sind, müssen wir aufgrund der Befunde bei der Polyzoospermie fordern, daß die Akrosinbestimmung in allen Fällen durchgeführt wird, in denen eine in vitro-Fertilisation geplant ist, insbesondere bei idiopathischer Sterilität bzw. beim Vorliegen eines andrologischen Sterilitätsfaktors.

Akrosomreaktion

Ein noch im Entwicklungsstadium befindlicher Test stellt die Untersuchung der Fähigkeit der Spermatozoen zur Ausbildung der akrosomalen Reaktion dar. Bei dieser handelt es sich um eine essentielle funktionelle Veränderung im Bereich des akrosomalen Membranapparates, die die Spermatozoen im Anschluß an die Kapazitation durchlaufen müssen, um die Eizellhüllen penetrieren zu können. Es kommt dabei zu einer Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran. Durch diese Vesikulationsreaktion können die Penetrationsenzyme freigesetzt werden und ermöglichen dadurch das Eindringen der männlichen Keimzelle in die weibliche Gamete (Abb. 4).

Eine gute Beurteilung des Spermatozoenakrosoms erlaubt eine von Talbot und Chacon (25) entwickelte Differentialfärbemethode, die sogenannte Triple-Stain-Technik. Mit Hilfe dieser Methode kann durch Trypan-Blaufärbung zwischen toten und vitalen Spermatozoen unterschieden werden. Die Nachfärbung der fixierten Samenzellen mit Bismark-Braun und Rose-Bengal erlaubt die Identifizierung von Spermatozoen mit intakten Akrosomenkappen (Rosafärbung), während akrosomenreagiert Spermatozoen, also solche Samenzellen, bei denen die akrosomale Reaktion bereits abgelaufen ist, im Akrosombereich den Farbstoff nicht mehr aufnehmen (Abb. 5). Mit dieser Differential-Färbetechnik läßt sich die Kinetik der akrosomalen Reaktion studieren.

Erste Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, daß bei einigen Patienten mit normalen Ejakulaten möglicherweise eine funktionelle Sterilität dadurch existiert, daß

die akrosomale Reaktion in einem Zeitraum von 6 Stunden nicht abläuft (26). Theoretisch ist auch eine zu frühzeitig ablaufende akrosomale Reaktion dafür verantwortlich, daß die Spermatozoen nicht mehr zeitgerecht für die Fertilisation vorbereitet sind. Untersuchungen der nächsten Jahre werden sicherlich unsere Kenntnisse über die funktionelle Sterilität beträchtlich erweitern, wobei auch der Einsatz monoklonaler Antikörper diagnostisch neue Perspektiven eröffnen wird.

Abb. 3: Schematische Darstellung der drei intraakrosomal gelegenen Penetrationsenzyme und ihre Angriffspunkte an den verschiedenen Eihüllen

Abb. 4: Schematische Darstellung der akrosomalen Reaktion. A. Intaktes Akrosom mit dem enzymreichen akrosomalen Inhalt. B. Durch Verschmelzen der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran („Vesikulation“) kommt es zum Austritt des akrosomalen Inhaltes (Penetrationsenzyme). C. Für die Penetration der Zona pellucida bleibt die innere akrosomale Membran erhalten, an der ein Teil des Akrosins gebunden ist

Abb. 5: Triple-Stain-Technik nach Talbot und Chacon zur Beurteilung der akrosomalen Reaktion

Beurteilung der funktionellen Integrität des Mittelstücks

Ein empfindlicher Indikator für die funktionelle Integrität des Mittelstücks der Spermatozoen ist die Bestimmung der Spermatozoen-spezifischen Laktatdehydrogenase LDH-X im Seminalplasma. Steigt deren Konzentration im Seminalplasma an, so weist dies auf Störungen im Bereich des Mittelstücks (Mitochondrien) hin (27). Hochsignifikante Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Männern soll auch die Bestimmung des ATP-Gehaltes von Spermaproben mit Hilfe der Biolumineszenz erlauben (28). Es wird daher die Bestimmung des ATP-Spiegels eines Ejakulates als mögliche biochemische Methode zur Quantifizierung des aktuellen Fertilitätspotentials eines Ejakulates vorgeschlagen, da die Konzentration von ATP pro ml Ejakulat mit der Spermatozoendichte, der Zahl der beweglichen Spermatozoen pro ml, dem Migrationsverhalten der Spermatozoen und dem in vitro-Potential der Spermatozoen zur Penetration Zona pellucida-freier Hamstereizellen korreliert (28).

Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit

Technisch aufwendige Verfahren zur Erfassung der Befruchtungsfähigkeit von Spermatozoen sind Tests zur Überprüfung des Eindringverhaltens von kapazitierten Spermatozoen in Zona pellucida-freie Hamstereizellen (=heterologer Ovumpenetrationstest [HOP]) bzw. bei der in vitro-Fertilisation (29). Abb. 6 illustriert das Prinzip des HOP-Tests unter Verwendung Zona pellucida-freier Hamstereizellen (30). Die Aussagefähigkeit dieses Tests ist jedoch begrenzt, da künstliche Verhältnisse vorliegen und nur Teilaspekte der Gameteninteraktion Berücksichtigung finden. Neuerdings wird der Schwelltest für die Charakterisierung der Fertilisationsfähigkeit der Spermatozoen empfohlen (31). Dabei werden die Spermatozoen in einem hypoosmotischen Medium inkubiert, was zu Schwellungen und Auftreibung im Schwanzbereich führt. Der Test stellt ein Maß für die funktionelle Integrität der Plasmamembran dar und korreliert nach den bisher vorliegenden Untersuchungen gut mit dem Fertilisationsverhalten der Spermatozoen im HOP-Test und bei der in vitro-Fertilisation. Der Schwelltest ist einfach und ohne großen Aufwand durchzuführen und eignet sich daher besonders für die andrologische Routinediagnostik.

Weitere Testverfahren zur Erfassung von Dysfunktionen der Gameteninteraktion sind in Entwicklung und betreffen die Kapazitation, die Zona pellucida-Bindung und die Zona pellucida-Penetration.

Die funktionellen Untersuchungsverfahren mit Hilfe morphologischer, biochemischer und biologischer in vitro-Testsysteme stellen eine wichtige Ergänzung der klassischen Spermaanalyse dar. Sie werden in Zukunft von zunehmender Bedeutung für die andrologische Diagnostik sein, da sie fehlblaufende molekularbiologische Schritte im Reproduktionsgeschehen helfen zu erfassen, die zum Verlust der Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen führen und damit überhaupt erstmals einer Untersuchung zugänglich werden. Dadurch verspricht man sich eine genaue Differenzierung und bessere Klassifikation des männlichen Sterilitätsfaktors, nicht zuletzt, um eine gezieltere Therapie ausgewählter Patienten durchführen zu können.

Im folgenden soll jetzt auf immunologische Untersuchungsmethoden eingegangen werden, die bei Verdacht auf das Vorliegen von Spermatozoen-Antikörpern (mehrfach negativer Sims-Huhner-Test) erforderlich sind.

Abb. 6: Prinzip des heterologen Ovumpenetrationstests (HOP)

Immunologische Untersuchungen

Spermatozoen weisen zahlreiche antigene Komponenten auf. Durch den Kontakt des Immunsystems mit den Spermatozoen, die extravasal durch Traumata, Verschlüsse im Bereich der ableitenden Samenwege oder entzündliche Adnexprozesse gelangen, kommt es beim Mann zur Ausbildung von Spermatozoen-Autoantikörpern bzw. bei der Frau zur Bildung von Isoantikörpern gegen männliche Samenzellen. Diese haben agglutinierende und immobilisierende Eigenschaften. Sie spielen als Infertilitätsursache eine Rolle, wenn sie in hohen Titern vorkommen und mit der Zervixmukos-Penetration der Spermatozoen interferieren (32).

Neuere Ergebnisse sprechen dafür, daß der direkte Nachweis der im Genitaltrakt wirksamen Antikörper im Hinblick auf ihre biologische Relevanz von ausschlaggebender Bedeutung ist. Aus diesem Grunde sollte nicht nur im Serum, sondern insbesondere im Seminalplasma und im ovulatorischen Zervixmukos nach Antikörpern gefahndet werden.

Zum Nachweis von Spermatozoen-Antikörpern können die in Tab. 3 zusammengestellten Methoden verwendet werden, wobei Screening-Methoden von spezifischen Testverfahren unterschieden werden müssen.

Tab. 3: Methoden zum Nachweis von Spermatozoen-Antikörpern

- Sims-Huhner-Test
 - Kurzrok-Miller-Test
 - Spermatozoen-Zervixmukos-Kontakt-Test (SCMC)
 - Mixed-Antiglobulin-Reaktion (MAR)-Test
 - Agglutinationstest (Kibrick)
 - Tray-Agglutination-Test (Friberg)
 - Immobilisations-Test (Isojima)
 - Radio-Labeled-Antiglobulin-Test (RLAT)
 - Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA)
- Testmaterial: Serum, Spermaplasma, Zervixmukos

Zu den Screening-Verfahren zählt die mikroskopische Beobachtung des Nativspermas, da gelegentlich als Folge von Antigen-Antikörperreaktionen Agglutinationen vitaler Spermatozoen beobachtet werden (Kopf zu Kopf, Schwanz zu Schwanz und gemischte Agglutinationen). Relevante Screening-Methoden sind der Sims-Hühner-Test (9), der Kurzrok-Miller-Test (10) und der von Kremer und Jager (33) beschriebene Spermatozoen-Zervixmuskus-Kontakttest (SCMC-Test), bei dem das „Shaking“-Phänomen auf das Vorliegen von Spermatozoen-Antikörpern hinweist. Als weiterer Schnelltest zum Nachweis von Spermatozoen-Antikörpern eignet sich der Mixed-Antiglobulin-Reaction-Test (MAR) (34) (Abb. 7).

Ist der Antikörpernachweis positiv, so stehen spezifische Testverfahren [Agglutinationstest nach Kibrick (Abb. 8) und Immobilisationstest nach Isojima] zur Verfügung, um den Antikörper-Typ und -Titer festzustellen (35). Da die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der genannten Methoden von der Qualität der verwendeten Testejakulate abhängt, werden Methoden benötigt, die einen hohen Grad an Standardisierung und Reproduzierbarkeit aufweisen und von frischen Testejakulaten unabhängig sind. Radioimmunologische und enzymimmunologische Testverfahren stehen hierfür neuerdings zur Verfügung. Besonders praktikabel sind ELISA-Techniken für den Antikörpernachweis aus Serum- und Genitalsekreten

Abb. 7: Prinzip des Mixed-Antiglobulin-Reaction (MAR)-Tests zur Verwendung als Spermatozoen-Antikörper-Suchtest

Abb. 8: Makroskopischer Spermatozoenagglutinationstest nach Kibrick unter Verwendung von Kapillarröhrchen. Von links nach rechts: Unverdünntes Serum eines vasktomierten Mannes, an das sich Serumverdünnungen bis zu 1:512 sowie eine Kontrolle anschließen. Der Agglutinationstiter beträgt 1:256

(Abb. 9). Es handelt sich dabei um sehr empfindliche und reproduzierbare Methoden, für die entsprechende Ausrüstungen im Handel angeboten werden (36). Im folgenden wird ein von uns modifizierter ELISA beschrieben (Schill und Wolff, in Vorbereitung), bei dem im Gegensatz zu den meist verwendeten Polystyrolmikrotiterplatten mit einer positiven elektrischen Ladung beschichtete Polyvinylchloridplatten (Flow Laboratories, Meckenheim) verwendet werden, die eine ausgezeichnete Bindung der negativ geladenen Spermatozoen ermöglichen, so daß auf die übliche Glutaraldehydfixierung der Samenzellen verzichtet werden kann. Die eingesetzte Spermatozoenmenge pro Napf beträgt 1×10^6 . Die Testnapfchen werden mit Referenz- und Testseren beschickt, 90 Minuten bei 37°C inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen, das Tween 20 in einer Konzentration von 0,5% enthält. Danach Zugabe von Antihuman-IgG/IgM/IgA gekoppelt mit alkalischer Phosphatase und Inkubation für 90 Minuten bei 37°C . Anschließend dreimaliges Waschen mit PBS, Zugabe von p-Nitrophenol mit 45minütiger Inkubation bei 37°C , Stoppen der Reaktion durch 2N NaOH und photometrische Messung der 96 Nöpfe enthaltenden Mikrotiterplatten mit einem automatisierten Mikrophotometer (Titertek Multiscan MC).

Abb. 10 zeigt eine typische Titrationskurve, die mit Hilfe der ELISA-Technik gewonnen werden konnte (positives

Abb. 9: Prinzip des indirekten ELISA zum Nachweis von Spermatozoen-Antikörpern

Abb. 10: Mit Hilfe der ELISA-Technik gewonnene Titrationskurven von Kontroll-, Test- und Referenz-Seren

Referenzserum der WHO, Serum eines fertilen Mannes, Serum eines infertilen Patienten mit zirkulierenden Spermatozoenantikörpern). Als positive Reaktion wird ein Titer von 1:64 angesehen, dessen Extinktion über dem doppelten negativen Kontrollserumwert liegt, was einem außerordentlichen strengen Bewertungsmaßstab entspricht.

Die Empfindlichkeit des ELISA ist größer als die des herkömmlichen Kibrick- bzw. Isojima-Tests. Die Durchführung der ELISA-Technik ist einfach, schnell und exakt und eignet sich auch als Screening-Methode (100 Tests/5 Stunden). Ein Vorteil des Verfahrens ist die Verwendung von Nativ- und Kryosperma unterschiedlicher Qualität und das Entfallen der Glutaraldehydfixierung. Nachteile der ELISA-Technik können falsch-positive Reaktionen durch zirkulierende Immunkomplexe infolge Vorhandenseins von Fc-Rezeptoren an der Spermatozoenoberfläche sein. Beim Verdacht auf das Vorliegen von Immunkomplexen ist eine Trypsinierung der Spermatozoen bzw. eine Polyäthylenglykolfällung der verwendeten biologischen Materialien durchzuführen.

In vorläufigen Untersuchungen wurde mit Hilfe der beschriebenen ELISA-Technik das Vorkommen von Spermatozoen-Antikörpern im Serum und Seminalplasma von 190 unausgewählten Männern der andrologischen Sprechstunde untersucht. Bei 19 der 190 Männer (=10%) konnten im Serum Spermatozoenantikörper nachgewiesen werden (entweder der IgM bzw. der IgG-Klasse). Im Seminalplasma ließen sich bei 15 von 190 Männern (=7,5%) Spermatozoenantikörper der IgA bzw. gleichzeitig der IgA- und IgG-Klasse nachweisen. Auffällig war, daß nur bei vier von 190 Männern gleichzeitig Spermatozoenantikörper im Serum und Seminalplasma gefunden werden konnten. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der Bestimmung von Spermatozoen-Antikörpern in den Genitalsekreten.

Die Korrelation zwischen dem ELISA und den herkömmlichen immunologischen Testverfahren ist gut, wobei zwischen ELISA und Kibrick-Test eine Übereinstimmung von etwa 85% besteht. Zur Klärung der klinischen Relevanz der mit dem ELISA nachgewiesenen Spermatozoen-Antikörper wird empfohlen, einen Spermatozoen-Zervixmukus-Kontakttest durchzuführen, da der Nachweis des „Shaking“-Phänomens auf das Vorliegen klinisch relevanter Spermatozoen-Antikörper hinweist (33).

Schrifttum:

- SCHIRREN, C.: Praktische Andrologie, 2. überarbeitete Auflage. S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney 1982.
- STEINBERGER, E., RODRIGUEZ-RIGAU, L. J., SMITH, K. D.: The interaction between the fertility potentials of the two members of an infertile couple. In: *Oligozoospermia: Recent Progress in Andrology* (FRAJESE, G., HAFEZ, E. S. E., CONTI, C., FABBRINI, K., eds.) pp. 9-19. Raven Press, New York 1981.
- MAKLER, A.: A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil. Steril.* 30, 192-199 (1978).
- OVERSTREET, J. W., KATZ, D. F., HANSON, F. W., FONSECA, J. R.: A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.* 31, 162-172 (1979).
- MAKLER, A., MACLUSKY, N. J., CHODOS, A., HASELTINE, F., DE CHERNEY, A.: Rapid microcomputer-based analysis of semen characteristics from photographs taken by the MEP method. *Arch. Androl.* 12, 91-95 (1984).
- BOLLMANN, W., SCHILL, W.-B.: Einfache Methode zur objektiven Messung der quantitativen und qualitativen Motilität menschlicher Spermatozoen. In: *Fortschritte der Fertilitätsforschung*, Band 12 (SCHIRREN, C., SEMM, K., Hrg.) S. 665-668. Grosse-Verlag, Berlin 1984.
- SCHILL, W.-B.: Der Cervixmukus und seine Bedeutung für die Andrologie. *Hautarzt* 24, 417-423; 469-474 (1973).
- INSLER, V., BERNSTEIN, D., GLEZEMAN, M.: Diagnosis and classification of the cervical factor of infertility. In: *The Uterine Cervix in Reproduction* (INSLER, V., BETTENDORF, G., eds.) pp. 253-270. Georg Thieme Publishers, Stuttgart 1977.
- MOGHISSI, K. S.: Significance and prognostic value of postcoital test. In: *The Uterine Cervix in Reproduction* (INSLER, V., BETTENDORF, G., eds.) pp. 231-238. Georg Thieme Publishers, Stuttgart 1977.

- BELSEY, M. A., ELIASSON, E., GALLEGOS, A. J., MOGHISSI, K. S., PAULSEN, C. A., PRASAD, M. R. N.: Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction: based on consultations held within the WHO Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Press Concern, Singapore 1980.
- KREMER, J.: A simple sperm penetration test. *Int. J. Fertil.* 10, 209-215 (1965).
- SCHILL, W.-B.: Caffeine- und kallikrein-induzierte Stimulation der humanen Spermienmotilität: eine comparative study. *Andrologia* 7, 229-236 (1975).
- SCHILL, W.-B., LITTECH, M.: Split ejaculate insemination with and without the addition of kallikrein. *Andrologia* 13, 121-126 (1981).
- COHEN, J., FARI, A., FINEGOLD, W. J., PROPPING, S., TAYMOR, M. L.: The split ejaculate. In: *Homologous Artificial Insemination (AJH)* (EMPERAIRE, J. C., AUDEBERT, A., HAFEZ, E. S. E., eds.) pp. 112-119. Martinus Nijhoff, The Hague-Boston-London 1980.
- STEENO, O.: Cervical cap technique of insemination. In: *Proc. First Intern. Symposium Artificial Insemination (EMPERAIRE, J. C., AUDEBERT, A., eds.)* pp. 38-41. Institut Aquitain de Recherches sur la Reproduction Humaine, Bordeaux 1978.
- KRAUSE, W.: Die Möglichkeiten der Separation von Spermatozoen. *Hautarzt* 35, 354-358 (1984).
- SCHILL, W.-B., TÖPFER-PETERSEN, E., HOFFMANN, R., MICHALOPOULOS, M., RÜBEKEIL, A.: Untersuchungen zur Schädigung von Kryosperma. In: *Spermakonservierung, Insemination, in vitro-Fertilisation* (SCHILL, W.-B., BOLLMANN, W., Hrg.) Urban u. Schwarzenberg-Verlag, München-Wien-Baltimore, 1985, im Druck.
- SCHILL, W.-B.: Acrosin activity in human spermatozoa: methodological investigations. *Arch. Dermatol. Res.* 248, 257-273 (1973).
- GOODPASTURE, J. C., POLAKOSKI, K. L., ZANEVELD, L. J. D.: Acrosin, pro-acrosin, and acrosin inhibitor of human spermatozoa: extraction, quantitation, and stability. *J. Andrology* 1, 16-27 (1980).
- SCHILL, W.-B., FEIFEL, M., FRITZ, H.: Acid extraction of acrosin from human spermatozoa pretreated by different physicochemical methods. *Arch. Dermatol. Res.* 273, 273-285 (1982).
- GOODPASTURE, J. C., ZAVOS, P. M., COHEN, M. R., ZANEVELD, L. J. D.: Relationship of the human acrosin system to fertility and infertility. *J. Andrology* 1, 72 (1980).
- FLÖRKE-GERLOFF, S., TÖPFER-PETERSEN, E., MÜLLER-ESTERL, W., MANSOURI, A., SCHATZ, R., SCHIRREN, C., SCHILL, W.-B., ENGEL, W.: Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia* 16, 187-202 (1984).
- SCHILL, W.-B.: Acrosin and proteinase inhibitors. In: *Andrology in Perspective* (ADIMOLJA, F. X. A., KARUNDENG, E., eds.) pp. 194-202. P. T. Kenrose Indonesia, Denpasar, Bali 1983.
- SCHILL, W.-B., FEIFEL, M.: Low acrosin activity in polyzoospermia. *Andrologia* 16, 589-591 (1984).
- TALBOT, P., CHACON, R. S.: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. exp. Zoology* 215, 201-208 (1981).
- TÖPFER-PETERSEN, E., HEISSLER, E., SCHILL, W.-B.: The kinetic of acrosome reaction - an additional sperm parameter? *Andrologia* (1985), im Druck.
- ELIASSON, R., ELIASSON, L., VIRJI, N.: LDH-X in human seminal plasma as an indicator of the functional integrity of spermatozoa. *J. Andrology* 1, 76 (1980).
- COMHAIRE, F., VERMEULEN, L., GHEDIRA, K., MAS, J., IRVINE, S., CALLIPOLITIS, G.: Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil. Steril.* 40, 500-504 (1983).
- MAHADEVAN, M. M., TROUSON, A. D., LEETON, J. F.: Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 40, 340-343 (1983).
- WICKINGS, E. J., FREISCHM, C.-W., LANGER, K., NIESCHLAG, E.: Heterologous ovum penetration test and seminal parameters in fertile and infertile men. *J. Andrology* 4, 261-271 (1983).
- JEYENDRAN, I. R. S., VAN DER VEN, H. H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B. G., ZANEVELD, L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219-228 (1984).
- ALEXANDER, N. J.: Antibodies to human spermatozoa impede sperm penetration of cervical mucus or hamster egg. *Fertil. Steril.* 41, 433-439 (1984).
- KREMER, J., JAGER, S.: The sperm cervical mucus contact test: a preliminary report. *Fertil. Steril.* 27, 335-340 (1976).
- HENDRY, W. F., STEDRONSKA, J., LAKE, R. A.: Mixed erythrocyte-spermatozoa antiglobulin reaction (MAR test) for IgA antisperm antibodies in subfertile males. *Fertil. Steril.* 37, 108-112 (1982).
- SCHILL, W.-B., PETZOLD, D., KAMMERL, M.: Untersuchungen über das Vorkommen autologer Spermatozoenantikörper in einem unausgewählten andrologischen Patientengut. *Hautarzt* 27, 382-390 (1976).
- ACKERMANN, S., WORTHAM, J. W. E., SWANSON, R. J.: An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantitation of antisperm antibodies. *Am. J. Reprod. Immunology* 1, 199-205 (1981).

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. med. Wolf-Bernhard Schill
Dermatologische Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität
Frauenlobstraße 9-11
8000 München 2