

**Aus der Universitätsfrauenklinik**  
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Drs. h. c. W. Schmidt

---

**Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität,  
Membranintegrität, Morphologie, Akrosomenstruktur und  
Chromatinkondensation von menschlichen Spermatozoen unter  
Verwendung von Stickstoffdampf und einer programmierten  
biologischen Friermaschine**

*Dissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin*

der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von Diana Wagner  
geb. am 10. Mai 1973 in Vacha/Rhön

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</b>	<b>1-1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2-1</b>
2.1	Historische Entwicklung der Kryokonservierung von Spermien	2-2
2.2	Bedeutung der Kryokonservierung von Spermien	2-4
2.3.1	Effekt der Kryokonservierung auf menschliche Spermien	2-5
2.3.2	Einflussfaktoren beim Einfrier- und Auftauprozess auf menschliche Spermien	2-6
2.4.1	Kryoprotektiva	2-6
2.4.2	Temperaturänderung	2-7
2.4.3	Kryomethode	2-9
2.4.3.1	Manuelle Friergeräte	2-9
2.4.3.2	Halbautomatische Friergeräte	2-10
2.4.3.3	Programmierbare automatische Friergeräte	2-11
2.4.4	Einfluss der Lagerungsdauer	2-13
2.5	Einfluss des Einfrier- und Auftauprozess auf die Spermien	2-14
2.5.1	Einfluss auf die Spermienmembran	2-14
2.5.2	Einfluss auf das Akrosom	2-15
2.5.3	Einfluss auf die DNA im Spermienkopf	2-18
2.6	Ziel der Arbeit	2-21

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>3-1</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>3-1</b>
<b>3.2</b>	<b>Aufbereitung für die Kryokonservierung</b>	<b>3-2</b>
3.2.1	Reagenzien	3-2
3.2.2	Durchführung	3-4
<b>3.3</b>	<b>Kryokonservierungsmethoden</b>	<b>3-5</b>
3.3.1	Kryokonservierung mit Stickstoffdampf	3-5
3.3.2	Programmierte Biologische Friermaschine	3-6
<b>3.4</b>	<b>Eosin-Test (Vitalität)</b>	<b>3-9</b>
3.4.1	Reagenzien	3-9
3.4.2	Durchführung	3-9
3.4.3	Beurteilung	3-9
3.4.4	Beispiel	3-10
<b>3.5</b>	<b>Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test, Membranintegrität)</b>	<b>3-10</b>
3.5.1	Reagenzien	3-11
3.5.2	Durchführung	3-11
3.5.3	Beurteilung	3-11
<b>3.6</b>	<b>Färbung nach Papanicolaou (Morphologie)</b>	<b>3-12</b>
3.6.1	Reagenzien	3-13
3.6.2	Durchführung	3-16
3.6.3	Beurteilung	3-17
3.6.4	Beispiele	3-19
<b>3.7</b>	<b>Triple-stain (Vitalität, Akosomenstruktur)</b>	<b>3-23</b>
3.7.1	Reagenzien	3-24
3.7.2	Durchführung	3-24
3.7.3	Beurteilung	3-25
3.7.4	Beispiele	3-26

<b>3.8</b>	<b>Concanavalin A lectin (Akosomenstruktur)</b>	<b>3-27</b>
3.8.1	Reagenzien	3-27
3.8.2	Durchführung	3-27
3.8.3	Beurteilung	3-28
3.8.4	Beispiel	3-28
<b>3.9</b>	<b>FITC-Peanut-(PNA)-lectin (Akosomenstruktur)</b>	<b>3-29</b>
3.9.1	Reagenzien	3-29
3.9.2	Durchführung	3-29
3.9.3	Beurteilung	3-30
3.9.4	Beispiele	3-30
<b>3.10</b>	<b>Acridin-Orange (Chromatinkondensation)</b>	<b>3-31</b>
3.10.1	Reagenzien	3-31
3.10.2	Durchführung	3-32
3.10.3	Beurteilung	3-32
3.10.4	Beispiele	3-33
<b>3.11</b>	<b>Anilin-Blau (Chromatinkondensation)</b>	<b>3-33</b>
3.11.1	Reagenzien	3-34
3.11.2	Durchführung	3-34
3.11.3	Beurteilung	3-35
3.11.4	Beispiele	3-36
<b>3.12</b>	<b>Einteilung der Proben</b>	<b>3-37</b>
<b>3.13</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>3-37</b>

<b>4.1 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (Hos-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen, auch unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien)</b>	<b>4-1</b>
4.1.1 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität	4-1
4.1.2 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender	4-9
4.1.3 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender	4-16
<b>4.2 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin A-lectin und Triple stain) menschlicher Spermatozoen, auch unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien)</b>	<b>4-23</b>
4.2.1 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen, ohne Berücksichtigung der Fertilität	4-23
4.2.2 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender	4-29
4.2.3 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen subfertiler Spender	4-35

<b>4.3</b>	<b>Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen ohne und unter Berücksichtigung der Fertilität</b>	<b>4-42</b>
4.3.1	Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität	4-42
4.3.2	Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender	4-44
4.3.3	Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen subfertiler Spender	4-47
<b>4.4</b>	<b>Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der fertilen und subfertilen Proben der Gruppen I - III und die Signifikanzen der Differenzen</b>	<b>4-51</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>5-1</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbg. nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität</b>	<b>5-1</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität</b>	<b>5-4</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität</b>	<b>5-6</b>
<b>5.4</b>	<b>Signifikanzen der Differenzen der erhobenen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Nativejakulat-, Stickstoffdampf- und Maschinengruppe</b>	<b>5-8</b>

5.4.1	Signifikanzen der Differenzen der einzelnen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Nativejakulatgruppe	5-8
5.4.2	Signifikanzen der Differenzen der einzelnen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Stickstoffdampf- und der Maschinengruppe	5-9
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>5-10</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>6-1</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>7-1</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>8-1</b>
	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>VIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AO	Acridin-Orange
Con-A lectin	Concanavalin-A lectin
DMSO	Dimethylsulfoxid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSH	follicle stimulating hormone
GIFT	gamete intra-fallopian transfer
GnRH	gonadotropine releasing hormone
HCG	human chorionic gonadotropin
hMG	human menopausal gonadotropine
HOS	hypoosmotischer Schwelltest
HSPM	human sperm preservation medium
ICSI	intra cytoplasmatic sperm injektion
IUI	intra-uterine insemination
IVF	in-vitro Fertilisation
LH	luteinizing hormone
MESA	microsurgical epididymal sperm aspiration
Pap-Färbung	Färbung nach Papanicolaou
PBF	programmierte biologische Friermaschine
PBS	phosphate buffered saline
PNA	peanut agglutinin
TESE	testicular sperm extraction
ZIFT	zygote intra-fallopian transfer



# 1 Zusammenfassung

---

Steigende Zahlen kinderloser Paare haben auf dem Gebiet der künstlichen Befruchtung die Forschung in den letzten Jahrzehnten deutlich vorangetrieben. So wurden auch verschiedene Methoden zur Kryokonservierung entwickelt und immer weiter verfeinert, sodass entsprechende Institutionen, die auf diesem Gebiet tätig sind, unterschiedlichen technisch apparativen Möglichkeiten gegenüberstehen.

Ziel dieser Studie war es zwei etablierte Kryomethoden (schnelle Kryokonservierung in Flüssigstickstoffdampf oder langsame Kryokonservierung durch eine programmierte biologische Friermaschine) bezüglich ihres Einflusses auf die wichtigsten Spermienparameter miteinander zu vergleichen, und entsprechende Rückschlüsse für die Praxis daraus zu ziehen. Untersucht wurden Proben von insgesamt 75 Patienten. Die Proben wurden in die jeweiligen Gruppen eingeteilt (I: Nativejakulat, II: Stickstoffdampf, III: biologische Friermaschine) und entsprechend verarbeitet. Dabei wurden die Vitalität, Membranintegrität, Morphologie, Akrosomenstruktur und Chromatinkondensation mittels 8 Methoden beurteilt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Parameter fielen nach durchgeführter Kryokonservierung signifikant ( $p=0.001$ ) ab. Vitalität, Membranintegrität und Morphologie der Spermien zeigten unabhängig vom Fertilitätspotential, dass die Werte im Gruppenvergleich II vs. III keinen signifikanten Unterschied erbrachten. Auch bezüglich des Akrosomenstatus kann im Rahmen dieser Studie bei Verwendung von 3 Färbemethoden keine der beiden Kryomethoden favorisiert werden. Bei der Untersuchung der Chromatinkondensation ergaben die statistischen Berechnungen einen signifikanten Vorteil ( $p=0.001$ ) für die biologische Friermaschine. Definitiv ließ sich in dieser Arbeit herleiten, dass die Kryokonservierung mit Hilfe der biologischen Friermaschine signifikant weniger Schädigung auf die Chromatinkondensation nach sich zog, sowohl bei fertilen als auch bei subfertilen Proben. Im Vergleich der Differenzen profitierten die subfertilen Proben signifikant mehr von der Kryokonservierung mit der biologischen Friermaschine.

Aufgrund der Bedeutung intakten Chromatins bei der Befruchtung lässt sich also schlussfolgernd sagen, dass der Einsatz einer biologischen Friermaschine zur Kryokonservierung bei der Sterilitätsbehandlung, insbesondere bei subfertilen Patienten und zur Verwendung bei der ICSI, für ein gutes Ergebnis von entscheidender Bedeutung ist.

# 1 Summary

---

Increasing numbers of childless couples have advanced considerably the research in the field of assisted reproduction technology within the last decades. So various technique have been developed with many modification in the field of gamete cryopreservation in order to increase the survival rate of oocytes, embryos, ovarian tissues and spermatozoa after freeze-thawing procedure.

The aim of this study was to determine the negative effect (cryodamage) on human spermatozoa, from fertile and subfertile men, after freeze-thawing either with programmed biological freezer or with liquid nitrogen vapour with regard to spermatozoa vitality, chromatin condensation, morphology, acrosome and membrane integrity.

Seventy five semen sample from fertile and subfertile patients undergoing assisted reproduction technology were included in this study. Each semen sample was divided into two portion after semen evaluation according to WHO guidelines. One aliquots was frozen using static liquid nitrogen vapour II and the second portion was frozen by computerized biological freezer III. The vitality, membrane integrity, morphology, acrosom integrity and chromatin condensation were analysed before and after freeze-thawing procedure with various immune histochemical staining technique and the results were compared with the initial value in the native semen sample. All parameters investigated in this study decrease after freeze-thawing. The mean percentage of normally condensed chromatin in the native semen sample (G. I) decreased significantly ( $p=0.001$ ) after freeze-thawing by using either liquid nitrogen vapour (G.II) or after biological freezer (G.III), which was significantly higher ( $p=0.001$ ) after freezing with liquid nitrogen vapour than after freezing with programmed biological freezer. Morphologically normal spermatozoa decreased significantly ( $p=0.001$ ) in both freezing methods in comparison to the native semen samples. In addition, membrane integrity of spermatozoa (HOS-test positive) was significantly lower ( $p=0.001$ ) after freeze-thawing procedure in G.II and G.III compared to G.I. The mean percentage of live spermatozoa decreased significantly ( $p=0.001$ ) in both freezing techniques in relation to the mean value in the neat semen samples. However, the acrosome structure deterioration was at the same level in both freezing techniques in comparison to the native semen sample as evaluated by three staining methods.

# 1 Summary

---

**Conclusions:** Freeze–thawing procedure has a detrimental effect on chromatin, morphology, acrosome structure, membrane integrity and vitality of human spermatozoa not only by freezing above static liquid nitrogen vapour but also by employing a computerized biological freezer. However, the chromatin deterioration rates are significantly higher by freezing above static liquid nitrogen vapour in comparison to freezing with a programmed biological freezer. Therefore, the programmed biological freezer should be recommended for semen freezing especially from subfertile men and when intracytoplasmic sperm injection is considered as the mean therapeutic procedure.

## 2 Einleitung

---

Seit Ende des vorigen Jahrhunderts steigt der Anteil kinderloser Ehen in fast allen Industriestaaten kontinuierlich an. 1989 blieben in der Bundesrepublik Deutschland 8,4 % der Ehen kinderlos, heute sind es ca. 18 %. Nach Modellrechnungen wird für die nach 1970 geschlossenen Ehen in Deutschland sogar mit einem Anteil von 20 % endgültig kinderlos bleibender Ehen gerechnet.

Die ansteigende Kinderlosigkeit lässt sich noch deutlicher bei kohortenspezifischen Betrachtungen erkennen: Während von den Frauen des Geburtsjahrganges 1935 in Deutschland nur 9 % kinderlos blieben, gilt dieser Sachverhalt für 20,5 % der 1955 geborenen und für ca. 25 % der Geburtskohorte 1961 mit weiterhin steigender Tendenz. Berücksichtigt man, dass die Zahl der tatsächlichen Behandlungen in den letzten Jahrzehnten angestiegen ist, muss betont werden, dass ohne die medizinischen Reproduktionstechniken der Anteil kinderloser Ehen noch höher wäre [*Onnen-Isemann*].

Die Ursachen dieser Entwicklung werden verschieden diskutiert. Ein Grund wird in der Tatsache gesehen, dass heute die Familiengründung häufig erst in späteren Lebensabschnitten erfolgt. So stieg von 1970 bis 1995 das Durchschnittsalter der Frauen bei der ersten Geburt von 24,3 auf 28,2 Jahre. Im Jahre 1970 lag der Anteil der erstgebärenden Frauen über 30 Jahren noch bei 10 %, im Jahre 1990 hingegen bereits bei 25 %. Heute werden ca. 10 % aller Kinder von einer Frau geboren, die älter als 35 Jahre ist. Aber Ursachen der Unfruchtbarkeit sind natürlich nicht nur beim Alter der Frau zu suchen. Die Gründe für die Sterilität eines Paares verteilen sich mit jeweils 30 - 40 % gleichermaßen auf Mann und Frau. Bei 15 - 30 % der betroffenen Paare liegt die ungewollte Kinderlosigkeit an beiden Partnern, und in 5 - 10 % lässt sich keine verifizierbare Ursache finden. Aufgrund dieser Entwicklung ist die assistierte Reproduktion immer weiter in den Vordergrund getreten, mit ihr auch die Kryokonservierung von menschlichen Eizellen, Spermazellen und Embryonen.

Im Folgenden soll zunächst ein grober Überblick über die historische Entwicklung auf dem Gebiet der Kryokonservierung von Spermien gegeben werden.

## 2.1 Historische Entwicklung der Kryokonservierung von Spermien

Der älteste wissenschaftliche Bericht ist wohl der von *Antonie Van Leeuwenhoek*. Er berichtete im Jahre 1677 erstmals von motilen Zellen in der Samenflüssigkeit. Der älteste Bericht über eine künstliche Befruchtung stammt aus dem Jahre 1765. *Jacobi* beschrieb die Manipulation und externe Befruchtung einer Fischeizelle. Aus dem Jahre 1776 datiert der Bericht eines italienischen Priesters namens *Abbe Lazzaro Spallanzani*, welcher beobachtete, dass die Spermatozoen von Menschen, Hengsten und Fröschen, welche für 30 Minuten im Schnee abgekühlt waren, nach dem Auftauen noch Motilität besaßen. Seine Studien umfassten sozusagen die beiden Fundamente Samenkryopreservation und artifizielle Insemination.

1866 vermutete *Mantegazza*, ebenfalls italienischer Nationalität, dass Spermien durch Temperaturniedrigung über einige Tage konserviert werden können. Er schrieb damals folgendes: "Wenn Samenflüssigkeiten für mehr als vier Tage ohne sichtbare Veränderung bei Eisschmelztemperaturen konserviert werden können, mutmaße ich, dass es in der Zukunft Wissenschaftlern gelingen wird, die Rassen von Pferden, vollblütigen Hengsten, Bullen und anderem Vieh zu verbessern. Es wird möglich sein, eine künstliche Befruchtung mit gefrorener Samenflüssigkeit durchzuführen. Es könnte zur Wirklichkeit werden, dass Ehemänner, die in den Krieg ziehen und dort sterben, durch Hinterlegung von Samenflüssigkeit ihre Frauen auch nach ihrem Tod befruchten und so rechtmäßige Söhne haben." Diese Voraussagen haben sich zum größten Teil erfüllt und bilden auch heute noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

Da die Entwicklung der Kryokonservierung und der artifiziellen Insemination parallel zueinander verlaufen, hat der kommerzielle Nutzen der artifiziellen Insemination die Entwicklung und Erforschung der Kryokonservierung, der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Samens vorangetrieben. *Chang* und *Walton* konstatierten, dass durch die Reduzierung der Stoffwechselaktivität von Spermien deren Vitalität verlängert wird. Das Phänomen des Kälteschocks wurde 1934 durch *Milovanov* erstmals beschrieben.

1939 berichtete *Phillips*, dass Eigelb eine Art Schutzsubstanz darstellt, welche die Spermatozoen gegen die Wirkungen des Kälteschocks bewahren kann, wobei der Schutzmechanismus des Eigelbs bislang noch nicht vollends geklärt ist. Seit vielen Jahren ist Eigelb Bestandteil der Kryoprotektionslösungen, die im Rahmen der Kryokonservierung, unter anderem von Spermien, Verwendung finden.

Durch die Entdeckung des Kälteschocks und dem Zusatz von Eigelb als ein möglicher Schutzfaktor wurde der Transport von Bullensamen für mehrere Tage ohne Verlust der Fruchtbarkeit bei Temperaturen, die knapp über dem Gefrierpunkt liegen (6 - 10 °C), möglich. Die vielseitigen kommerziellen Möglichkeiten, die sich aufzeigten, trieben die Forschung um ein noch längeres Überleben bei deutlich tieferen Lagerungstemperaturen weiter voran. So gelangen die ersten Versuche im Jahre 1940, Spermien bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt zu lagern. Durch die Eiskristallbildung bei einfacher Abkühlung des Spermas unter den Gefrierpunkt, waren allerdings nach dem Wiederauftauen nur noch wenige Samen motil. Daher wurde die Entwicklung eines spermienprotektiven Gefrierschutzmittels immer notwendiger.

Die Entwicklung der Vitrifikation, einer schnellen Einfrier-Auftau-Methode, ermöglichte es, den Gefrierpunkt schneller als die Kristallbildung zu erreichen. Diese Methode setzt sehr hohe Konzentrationen von Gefrierschutzmitteln voraus. Diese Gefrierschutzlösungen treten ohne Eiskristallbildung in eine amorphe Phase über. Die Vitrifikationsversuche mit den Samenflüssigkeiten von Frosch, Vogel und Mensch waren nur teilweise erfolgreich [*Luyet et al.*, *Shaffner et al.*].

Mit der Entdeckung des Glyzerols durch *Polge et al.* 1949 kam es zu einem Durchbruch auf dem Gebiet der Kryokonservierung von Spermien. Von nun an wurden weltweit Forschungen auf dem Gebiet der Kryokonservierung vorangetrieben.

Das erste Kind nach Verwendung von kryokonservierten Spermatozoen wurde 1953 in England geboren [*Bunge et al.*].

Heute ist die Verwendung von Kryospermien weltweit gebräuchlich. Die Gesetzgebung bei der Verwendung von Kryospermien ist dabei in den einzelnen Ländern sehr verschieden. So ist in Deutschland zum Beispiel die heterologe Insemination, also die Verwendung von Spermien von einem fremden Spender, z. B. bei Azoospermie des Mannes, nur nach Zustimmung einer bei der Ärztekammer eingerichteten Kommission zulässig. Die Anwendung der entsprechenden Methoden bei alleinstehenden Frauen oder in gleichgeschlechtlichen Beziehungen ist nicht statthaft [84].

## 2.2 Bedeutung der Kryokonservierung von Spermien

Viele verschiedene Ursachen können dazu führen, dass beim Mann ein schlechtes Spermogramm vorliegt. So zum Beispiel Mumpserkrankung im Kindesalter, unbehandelter Hodenhochstand, Chemo- und Radiotherapien bei Tumorerkrankungen (z. B. Hodgkinkerkrankungen). Durch die Früherkennung und die verbesserten Therapiemöglichkeiten haben sich die Überlebenschancen von Tumorpatienten im reproduktionsfähigen Alter deutlich gesteigert. Die oft notwendigen chirurgischen, radiologischen und chemotherapeutischen Maßnahmen ziehen jedoch häufig eine verminderte Fortpflanzungsfähigkeit nach sich, sodass für diese Patienten bei noch nicht abgeschlossener Familienplanung die Anlage eines Kryospermadepts zu empfehlen ist [Köhn, Schill, Weißbach *et al.*]. Da viele Tumorpatienten bereits vor Therapiebeginn Einschränkungen der Ejakulatqualität aufweisen, wären Methoden zur Verbesserung der Mobilität und Vitalität der Spermatozoen nach dem Auftauen vorteilhaft [Höppner *et al.*, Köhn, Kuber, Schill]. Eine weitere neue Indikation für die Kryokonservierung betrifft Patienten mit Wechsel von Kryptozoospermie, hochgradiger Oligozoospermie und Azoospermie. Bei Patienten mit hochgradig eingeschränkter Spermaqualität sind ebenso wie bei gesunden Männern intra- und interindividuelle Schwankungen von Spermatozoenkonzentration und Motilität bekannt [Lahav-Baratz *et al.*, Ossebuhn].

Insbesondere für Patienten mit hochgradiger Oligozoospermie kann eine weitere Verschlechterung der Spermienqualität das Scheitern einer ICSI-Behandlung bedeuten, falls am Tag der geplanten ICSI eine temporäre Azoospermie auftritt [Lahav-Baratz *et al.*, Tournaye]. Die vorherige Anlage eines entsprechenden Depots könnte zumindest dieses Problem minimieren.

Bei neurogenen Ejakulationsstörungen werden die Spermienproben, die der Kryokonservierung zugeführt werden sollen, durch Elektroejakulation gewonnen, welche in Narkose durchgeführt wird [Denil *et al.*]. Auch in diesem Fall ist die Anlage eines Kryodepts auf Grund der aufwändigen und zugleich kostspieligen Prozedur sinnvoll.

Die Verwendung von Spermien Verstorbener ist in Deutschland durch das ESchG („... Eine eigenmächtige Befruchtung einer Eizelle oder Übertragung eines Embryos auf eine Frau, ohne deren Einwilligung, und die Befruchtung mit dem Samen eines Verstorbenen untersagt...“) [§ 4 Abs. 1 Nr. 1,2,4 ESchG]) verboten.

### 2.3 Effekt der Kryokonservierung auf menschliche Spermien

Prinzipiell ist das Ejakulat leicht zu gewinnen und leicht zu verarbeiten. Kryokonservierung gelingt umso besser, je kleiner die zu frierenden Zellen sind [Ludwig *et al.*].

Die historische Entwicklung der Kryokonservierung von nicht befruchteten Eizellen, Eizellen im Vorkernstadium und Embryonen vollzog sich viel zögerlicher als dies bei den Spermien der Fall war. Insbesondere bei unbefruchteten Eizellen zeigte sich eine sehr mangelhafte Toleranz gegenüber der Kryokonservierung. Man sah die Gründe dafür in dem noch nicht abgeschlossenen meiotischen Prozess. Bei der Kryokonservierung der Spermatozoen liegen ausdifferenzierte Zellen mit abgeschlossener Meiose vor, was einen weiteren positiven Effekt auf die Ergebnisse der Kryokonservierung zu haben scheint.

Des Weiteren haben Spermien offenbar andere physikalische Eigenschaften, die sie gegenüber der Kälteeinwirkung weniger empfindlich machen [Morris *et al.*].

Im Rahmen der Kryokonservierung sind die Vorgänge während und nach dem so genannten Kristallisationsprozess von entscheidender Bedeutung. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die derzeit bestehenden Auffassungen zu diesen Vorgängen.

Zu Beginn des Kryoprozesses liegt die Zelle in einem chemischen Gleichgewicht vor. Durch die Abkühlung kommt es zu einem stetigen Wärmeentzug. Dadurch wird der Gefrierpunkt irgendwann unterschritten, ohne dass die Kristallisation vorerst einsetzt. Im weiteren Verlauf kommt es nun schließlich extrazellulär zur spontanen Eiskristallbildung, wodurch infolge der frei werdenden Kristallisationswärme die Temperatur wieder sprunghaft bis auf Gefrierpunktniveau ansteigt. Nun folgt eine Phase des Gleichgewichts, bei der sich abgegebene Kristallisationswärme und Wärmeentzug aufgrund der erniedrigten Umgebungstemperatur in etwa die Waage halten. Bei fortgeführter Abkühlung verschiebt sich das Gleichgewicht, woraufhin das Medium wieder rasch auf tiefere Umgebungstemperaturen absinkt [Leibo und Mazur].

Im extrazellulären Medium wird meist ab  $-3^{\circ}\text{C}$  bis  $-5^{\circ}\text{C}$  die Kristallbildung ausgelöst, intrazellulär ist dies erst ab  $-10^{\circ}\text{C}$  der Fall [Leibo und Mazur]. Wegen dieser Diskrepanz zwischen "extrazellulärem" und "intrazellulärem" Gefrierpunkt wird zunächst nur extrazellulär immer mehr Wasser aus der Lösung in Form von Eiskristallen abgesondert [Meryman 71]. Dadurch steigen gleichzeitig die Konzentrationen der extrazellulären Elektrolyte, wodurch ein osmotischer Gradient zwischen extra- und intrazellulärem Raum



besteht. Somit kommt es zum Austritt von intrazellulärem Wasser über die Zellmembran, was im weiteren Verlauf der Abkühlung zu einer Entwässerung der Zelle und damit zu ihrem Überleben führt [*Mazur 63*].

## **2.4 Einflussfaktoren beim Einfrier- und Auftauprozess auf menschliche Spermien**

Die Überlebensrate der Spermien bei und nach der Kryokonservierung hängt u. a. von folgenden Faktoren ab:

- das Kryomedium
- Temperaturänderung (schnelles Auftauen, langsames Auftauen)
- Kryomethode
- Lagerungsdauer

Im Folgenden soll auf die oben genannten Faktoren näher eingegangen werden.

### **2.4.1 Kryoprotektiva**

Durch Zugabe eines Kryoprotektivums soll die Abnahme von Motilität und Vitalität nach Kryokonservierung so gering wie möglich gehalten werden [*Kaden et al. 40*].

Die Kälteschocksensibilität der Zellen korreliert mit dem Verhältnis von mehrfach ungesättigten zu gesättigten Phospholipiden [*Poulus et al.*] und dem Verhältnis von Cholesterin in der Zellmembran [*Darin-Bennett et al. 18,19*]. Die Kausalität dieses Phänomens scheint nach *Watson* und *Morris* mit den Änderungen der Membranfunktionen assoziiert zu sein. Insbesondere der Phospholipidbestandteil der LDL-Fraktion erweist sich als schützend gegen den Kälteschock [*Blackshaw, Quinn et al., Watson 107*]. Eigelb scheint die Oberfläche der Plasmamembran ohne Änderung der Membranzusammensetzung zu beeinflussen [*Watson 108, Quinn et al.*]. Dies bestätigte 1984 ebenfalls *Holt* und *North* sowie 1988 *De Leeuw*. Das eingesetzte Eigelbzitratmedium musste allerdings jeweils frisch zubereitet werden [*Behrmann und Sawada, Kaden et al., 42*]. Der Bestandteil Eigelb galt nicht nur als instabiler und schlecht standardisierbarer Faktor des Kryoprotektivums, sondern wurde auch als Antigen, Infektionsquelle für Viren oder potentieller Auslöser allergischer Reaktionen beim Vorgang der Insemination gesehen [*Kaden et al., 42*].

Die inzwischen üblichen Fertikryoprotektiva bieten als Vorteile einfache Handhabung und

lange Stabilität und bestehen im Wesentlichen aus einer Zellkulturlösung unter Zugabe von Humanalbumin, Glycerin und Kallikrein [*Kaden et al., 41*].

Nach der Entdeckung der kryoprotektiven Wirkung des Glycerols folgten als weitere Kryoprotektiva beispielsweise verschiedene Zucker, Stärken, Proteine und Polymere wie das PVP (Polyvinylpyrolidon). Letzteres findet allerdings aufgrund seiner Toxizität keine Verwendung mehr.

Die Kryoprotektiva können prinzipiell in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum einen in die nicht penetrierenden, hierzu zählt unter anderem das PVP. Diese Stoffe bewirken, dass durch osmotische Vorgänge der Zelle Wasser entzogen wird, wodurch die Konzentration der Elektrolyte verändert wird [*McGann*]. Weitere Substanzen dieser Gruppe, die den Kryoprotektiva hinzugefügt werden können, sind Glyzine und Saccharosen. Sie bleiben extrazellulär und führen dadurch zu einer hohen Überlebensrate der Spermatozoen.

Größere Bedeutung hingegen erlangten die Substanzen, die der Gruppe der penetrierenden Kryoprotektiva zugeordnet werden können. Vorrangig zu nennen sind hier vor allem das Glycerin und das DMSO. Es handelt sich hierbei um hydrophile Nicht-Elektrolyte, die eine stark dehydrierende Wirkung besitzen [*Farrant*]. All diesen Substanzen gemein ist die Eigenschaft, den Gefrierpunkt zu erniedrigen. Der genaue Wirkungsmechanismus ist allerdings bislang nicht vollends geklärt. Die spontane intrazelluläre Kristallbildung, die normalerweise bei ca.  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu erwarten wäre, tritt bei Anwesenheit von z. B. 1,0 M DMSO, unabhängig von der Kühlrate, erst zwischen  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf [*Leibo, Leibo und Mazur, Mazur 65*]. Dadurch erhält die Zelle mehr Zeit für die Dehydrierung beim Einfrieren, insbesondere wenn dies langsam vonstatten geht.

#### **2.4.2 Temperaturänderung**

Im Vordergrund der Überlegungen bezüglich der Einflussfaktoren der Kryokonservierung auf die Spermien stand von Beginn an die Geschwindigkeit beim Kryoprozess. *Mazur* [66] führte die Begriffe der sub- und supraoptimalen Kühlrate auf dem Gebiet der Kryobiologie ein. Hierbei handelt es sich um Kühlraten, die niedriger beziehungsweise höher sind als die rechnerisch oder experimentell optimalen Gefriereschwindigkeiten.

*Mazur* ging davon aus, dass bei supraoptimalen Kühlraten die intrazelluläre Eisbildung sowie die während des Auftauens auftretende Rekristallisation sich zellschädigend auswirken. Er

schloss die intrazelluläre Kristallisation hingegen aus, wenn die Zelle die Möglichkeit hat, etwa 90 % ihres Zellwassers abzugeben. Die restlichen 10 % liegen in an Proteine oder Salze gebundener Form vor. Voraussetzung dafür, dass die entsprechende Menge an Zellwasser abgegeben werden kann, ist dass der Zelle dazu genügend Zeit zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall, kristallisiert das verbleibende freie Wasser im Innenraum der Zelle. Bei Temperaturen, die unter  $-90\text{ °C}$  liegen, befinden sich diese Kristalle in einem glasartigen, nicht strukturierten Zustand. Kommt es nun zur Wiedererwärmung, so kann es zwischen  $-90\text{ °C}$  und  $-40\text{ °C}$  zu einer Rekrystallisation kommen. Je kleiner die Kristalle sind, umso größer ist die Oberflächenenergie, die sie besitzen, und umso größer ist das Bestreben, die Energie durch Verkleinerung der Oberfläche zu reduzieren. Dies erreichen sie durch Agglomeration und Wachstum [Mazur, 64]. Diese Umbauvorgänge und Kristalle wiederum können das Zerreißen von intrazellulären Membranen und somit den Tod der Zellen bewirken. Da der Vorgang der Rekrystallisation jedoch eine gewisse Zeit erfordert [Bank], also eine langsame Auftaugeschwindigkeit, kann durch sehr schnelles Auftauen der kritische Temperaturbereich so schnell durchschritten werden, dass es nicht zu den besagten Strukturveränderungen der Kristalle kommt [Mazur, 65].

Durch suboptimale Kühlraten erklärt Mazur [64] Schädigungen, die durch zu langen Aufenthalt der Zelle bei exzessiven hypertonen Bedingungen nach der Kristallisation entstehen. Die sich daraus ergebende osmotische Dehydrierung und Schrumpfung der Zelle, die Konzentrierung von intrazellulären Salzen nach der Dehydrierung, welche in der Zelle ausfallen, die Zusammenlagerung von Makromolekülen, die pH-Wert-Änderung sowie der osmotische Schock während des Auftauens, begründen seiner Meinung nach den Untergang von Zellen.

Allerdings gibt es zu den auftretenden Schäden bei zu langsamem Kryokonservieren weitere Hypothesen.

So ist Lovelock der Ansicht, dass durch die extra- und intrazellulär erhöhte Elektrolytkonzentration die Lipide und Lipoproteine der Zellmembran geschädigt werden. Dadurch entstehen Membranlücken, durch welche Kationen in die Zelle einströmen können. Während des Auftauens strömt dadurch freies Wasser in die nun hypertone Zelle. Dadurch schwillt dieselbe an und platzt.

Meryman [72] hingegen vertritt den Standpunkt, dass es beim Schrumpfen der Zelle ab einem gewissen Minimalvolumen zu Brüchen in der Zellmembran kommt. Auch er beschreibt nun das Eindringen von Kationen in die Zelle, wodurch es zur osmotischen Auflösung derselben

während des Auftauens kommt.

Im Rahmen der möglichen Zellschädigungsmechanismen ist noch das so genannte "Supercooling" zu erwähnen. Dieses liegt vor, wenn der Gefrierpunkt, der bei den meisten Medien zwischen  $-3\text{ °C}$  und  $-6\text{ °C}$  liegt, unterschritten wird, ohne dass eine Kristallisation einsetzt. Kommt es dann bei noch tieferen Temperaturen (ca.  $-12\text{ °C}$ ) doch zur Eiskristallbildung, steigt die Temperatur durch die freiwerdende Kristallisationswärme rapide an (bis zur Nähe des Gefrierpunktes) und fällt nach Einstellen des thermischen Gleichgewichts mit deutlich höherer Geschwindigkeit auf die inzwischen weiter abgesunkene Umgebungstemperatur ab.

*Maurer [61]* und *Whittingham* untersuchten die Auswirkungen dieses Phänomens und kamen zu dem Schluss, dass dieser schnelle Temperaturwechsel für eine verminderte Überlebensrate der Zellen verantwortlich sein kann.

Um dieses „Supercooling“ zu vermeiden, löst man die Kristallisation bei Temperaturen zwischen  $-3\text{ °C}$  und  $-6\text{ °C}$  aus.

*Maurer [62]* definiert die optimalen Gefriergeschwindigkeit als diejenige, welche langsam genug ist, um die Bildung von intrazellulärem Eis zu vermeiden, aber noch schnell genug, um die Zellen nur möglichst kurzzeitig den Lösungseffekten auszusetzen.

### **2.4.3 Kryomethode**

Es gibt verschiedene Kryomethoden, welche sich im Laufe der Entwicklung der Kryobiologie etabliert haben. Diese lassen sich in folgende 3 Gruppen einteilen:

1. manuelle Friergeräte
2. halbautomatische Friergeräte
3. programmierbare automatische Friergeräte

#### **2.4.3.1 Manuelle Friergeräte**

Bei der ältesten und modifiziert auch heute noch angewandten Methode werden die Behälter mit den zu frierenden Proben in so genannte DEWAR-Gefäße (siehe Abb.2.1) gebracht, in welchen durch verschiedene Kühlmedien, wie zum Beispiel Alkohollösungen, Trockeneis

oder flüssiger Stickstoff sowohl einzeln als auch in Kombination, heruntergekühlt werden. Durch die Verwendung von verschiedenen Isolatoren und Modifikation der Größen der Behälter lassen sich die Kühlraten beeinflussen. Durch eine vorgekühlte Pinzette lässt sich die Eiskristallbildung auslösen (“Seeding“).

Die offensichtlichen Vorteile dieses Systems sind der geringe Preis aufwand sowie die Unempfindlichkeit gegenüber technischen Störungen. Gerade durch die Einfachheit dieser Methode sind die Nachteile bedingt. So verlangt sie ein großes Maß an Erfahrung, ist sehr zeitaufwändig und erlaubt auf Grund des Aufbaus keine linearen Temperaturverläufe. Des Weiteren ist sie nicht automatisierbar [Al-Hasani et al., Dittrich et al., Trotnow et al.].



Bildquelle: Internet

**Abb 2.1** manuelles Einfriergerät NICOOL LM10

### 2.4.3.2 Halbautomatische Friergeräte

Diese Anlagen stellen im Vergleich zu den manuellen Friergeräten einen deutlichen Fortschritt dar. Eine Vielzahl von ihnen wurde entwickelt, um die Nachteile der Kryokonservierung mit den manuellen Geräten auszugleichen. Das Prinzip nach welchem sie arbeiten ist allerdings mehr oder weniger immer dasselbe.

Ein Mikroprozessor regelt die Temperatur in der Gefiergutkammer. Durch Zufuhr von Stickstoffdampf wird die Kammer heruntergekühlt, eine integrierte Heizung hingegen ermöglicht eine entsprechende Gegenregulation. Durch die Steuerung über einen Computer ist es möglich, die gewünschten Temperaturverläufe im Vorfeld festzulegen. Die Auslösung des Seedings muss allerdings weiterhin manuell vorgenommen werden.

Ein deutlicher Fortschritt gegenüber dem manuellen System ist natürlich die Möglichkeit automatisiert kryokonservieren zu können. Allerdings gibt es auch hier Nachteile:

- erhebliche Temperaturschwankungen durch das manuelle Seeding [*Siebzehnriübel et al.*]
- hoher Stickstoffverbrauch [*Hahn*]
- höhere Anschaffungskosten
- hohes Gewicht, daher nur bedingt transportfähig.

In der folgenden Abb.2.2 ist ein solches halboffenes Friergerät dargestellt.



Bildquelle: Internet

**Abb 2.2** Halbautomatisches Einfriergerät NICOOL BAG MS21

### **2.4.3.3 Programmierbare automatische Friergeräte**

Diese Geräte sind mit einem Computer verbunden, so können Veränderungen, die durch Temperatursonden aufgenommen werden, direkt erkannt und entsprechend gegenreguliert werden. Im Gegensatz zum vorher beschriebenen System ist es möglich, durch das Setzen

einer Sonde in einer Referenzprobe den genauen Temperaturverlauf innerhalb des Gefriergrundes zu verfolgen und zu regulieren. Des Weiteren kann das Seeding ebenfalls automatisch ausgelöst werden. Trotz der offensichtlichen Vorteile (computergestützte Steuerung, bestmögliche Ausschaltung von Temperaturschwankungen) sind als Nachteile natürlich auch hier der hohe Kostenfaktor sowie das hohe Gewicht und somit die eingeschränkte Transportfähigkeit zu nennen.

In Abb. 2.3 ist ein Beispiel für die programmierbaren automatischen Friergeräte dargestellt.



Bildquelle: Internet

**Abb 2.3** PC-gesteuerte Einfriergeräte MINICOOL 40 PC und NICCOOL PLUS PC

#### 2.4.4 Einfluss der Lagerungsdauer

Zweifellos liegt das Hauptproblem der Kryokonservierung beim Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen. Allerdings muss diskutiert werden, ob nicht auch während der Lagerung trotz der sehr niedrigen Temperaturen im flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  Schädigungen auftreten können. Zwar sind bei diesen Temperaturen kaum noch chemische Reaktionen im Bereich der Zelle zu erwarten [Lyon *et al.*], jedoch könnten physikalische Prozesse wie zum Beispiel ionisierende Strahlung in Frage kommen. Solche hochenergetische Strahlung kann zur Bildung von freien Radikalen führen, welche toxisch für die Zellen sind, oder es könnten Brüche von Makromolekülen (z. B. DNA) auftreten. Diese können bei den extrem niedrigen Umgebungstemperaturen nicht durch die Zelle selbst repariert werden. Irreversible Zellschädigungen wären die Folge. Eine Arbeitsgruppe um Lyon untersuchte tiefgefrorene Mäuseembryonen, die bis zu einer Dauer von zwei Jahren normaler Hintergrundstrahlung, bzw. einer 10- bis 100-fach höheren Strahlendosis ausgesetzt waren. Es zeigte sich signifikant, dass die normale Hintergrundstrahlung keinen schädigenden Einfluss auf die Embryonen hatte [Lyon *et al.*].

Ähnliche Untersuchungen ergaben, dass die kryokonservierten Zellen erst nach 3.000 bis 10.000 Jahren genügend natürliche Strahlung aufgenommen haben können, um die Hälfte der bestrahlten Zellen absterben zu lassen.

Des Weiteren fanden sich keine Hinweise darauf, dass der Gefrierprozess zu Veränderungen am Genmaterial, zu chromosomalen Schäden oder zu einer Selektion in der Zellpopulation führt [Ashwood-Smith und Friedmann].

Die Lagerungsdauer scheint also bei sachgerechter Lagerung keinen negativen Einfluss auf die konservierten Zellen zu haben [Ludwig *et al.*].



## **2.5 Einfluss des Einfrier- und Auftauprozesses auf die Spermien**

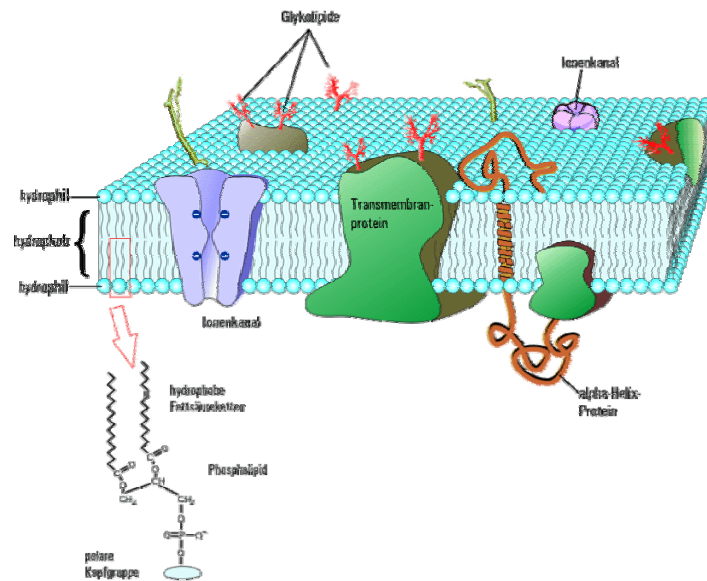
Im Folgenden soll der Einfluss der Temperaturänderungen auf die Spermien, wie sie beim Kryokonservieren und Wiederauftauen auftreten, näher beleuchtet werden. Dabei wird vor allem Augenmerk auf die Spermienmembranen, das Akrosom und die DNA im Spermienkopf gelegt.

### **2.5.1 Einfluss auf die Spermienmembran**

Die Spermienmembran besteht vorwiegend aus Lipiden und Proteinen. Phosphoglycerolipide, Glykoglycerolipide und Cholesterol sind die meist beteiligten Lipide am Aufbau der Membran. Die meisten Lipide besitzen einen polaren Kopfteil, der hydrophil („wasserliebend“) und somit fettabstoßend ist, der Schwanzteil ist apolar und somit hydrophob (wasserabweisend) und lipophil („fettliebend“).

Zusätzlich gibt es viele unterschiedliche Proteine. Man unterscheidet periphere und integrale Proteine. Periphere Proteine sind elektrostatisch an den polaren Kopfteil der Lipide gebunden. Die integralen Proteine reichen mit einem hydrophoben Molekülabschnitt in das hydrophobe Zentrum der Membran hinein.

Des Weiteren gibt es so genannte Transmembranproteine. Das sind große Proteine, die auf der Innen- und Außenseite der Membran sichtbar werden. Tunnelproteine sind Proteine, die im Inneren einen feinen Kanal bilden, der Ein- bzw. Austritt kleiner Moleküle und von Wasser ermöglicht. Alle Bestandteile der Zellmembran sind frei beweglich, können sich also gegeneinander verschieben. *Singer und Nicholson* stellten diesen Sachverhalt 1972 im "Fluid-Mosaic Modell" dar (Abb. 2.4).



Bildquelle: Internet

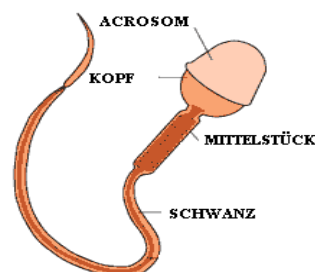
### Abb 2.4 Graphische Darstellung der Mosaikstruktur der Zellmembran

Die Beweglichkeit nimmt mit der Temperatur zu. Bei niedrigen Temperaturen ist die Membran dünner und gelartig, bei hohen Temperaturen dicker und solartig.

Da die Membranfunktion durch die Wechselwirkungen der verschiedenen Bestandteile innerhalb der Membran bestimmt ist, kann es bei Störungen der Membranmorphologie, z. B. durch den Kryoprozess, zu Funktionsstörungen kommen [Aloia et al.].

### 2.5.2 Einfluss auf das Akrosom

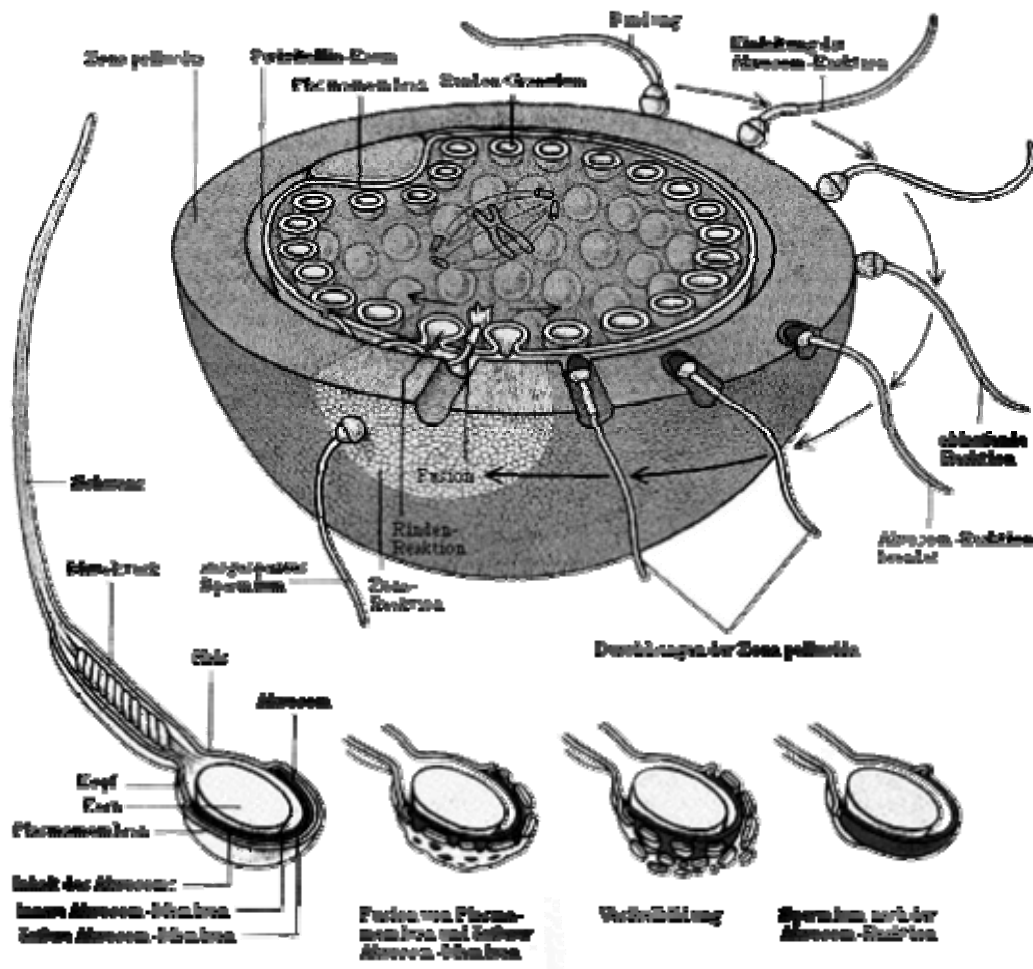
Das Akrosom ist ein kappenförmiges Gebilde, welches den Apikalkörper des Spermienkerns überzieht [85] (Abb. 2.5).



Bildquelle: Internet

### Abb 2.5 Darstellung des Akrosoms als kappenförmiges Gebilde auf dem Spermienkopf

Das Akrosom enthält ca. 60 Enzyme wie Akrosin, Esterasen, Hyaluronidasen und saure Proteinasen, die zur Proteolyse der Zona pellucida der weiblichen Eizellen führen und somit die Penetration des Spermiums (Akrosomreaktion) ermöglichen. Die Akrosomenreaktion (Abb. 2.6) ist ein irreversibler Vorgang, ähnlich der Exozytose somatischer Zellen.



Bildquelle: Internet

**Abb 2.6** Darstellung des Ablaufs der Befruchtung einer Eizelle durch stattfindende Akrosomreaktion (Kontakt zwischen Akrosom und Zona pellucida)

Der "erste Kontakt" einer Samenzelle mit der Zona pellucida wird als *primäre* oder *initiale Bindung* zwischen Ei- und Samenzelle bezeichnet. In Kontakt treten dabei Proteine an der Oberfläche der Samenzelle und das Protein *ZP3* der Eizelle, wodurch die Akrosomreaktion ausgelöst wird.

Die *sekundäre Bindung* der Samenzelle erfolgt nun am Protein *ZP2* der *Zona pellucida*, was in der Folge deren Eindringen in die Eizelle und damit die eigentliche Befruchtung ermöglicht.

Eine Akrosomreaktion ist allerdings nur bei vollständig kapazitierten Samenzellen möglich [*Sailing und Leyton*].

Dabei versteht man unter der Kapazitation Vorgänge, die die Spermien im weiblichen Genitaltrakt erfahren. Eine eindeutige Definition dieser Vorgänge existiert bislang noch nicht, allerdings lassen sich während der Kapazitation eine Reihe von Veränderungen beobachten [*Tulsiani et al.*]. So kommt es zum einen zu Veränderungen, Umverteilungen oder Entfernung von Proteinen auf der Oberfläche der Spermien. Sie erlangen eine aktive Beweglichkeit und der Metabolismus wird oxidativ.

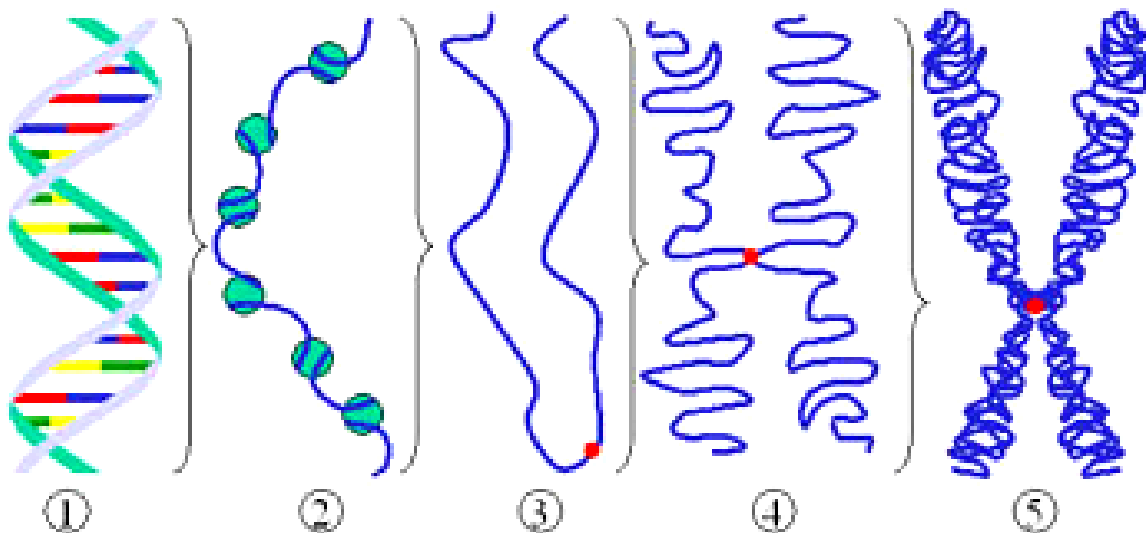
Diese Studien belegen, dass die Kapazitation von Faktoren ausgelöst wird, die im weiblichen Reproduktionstrakt angesiedelt sind. Studien wie die von *Tulsiani et al.* machten deutlich, welche Bedeutung die Kapazitation für die Fertilität der Spermien hat. Die erste *in vitro* Fertilisation von Hamster-Oozyten beispielsweise gelang nur, nachdem Spermatozoen entweder vor der Imprägnation dem weiblichen Reproduktionstrakt entnommen oder aber epididymale Spermatozoen mit Eileitersekreten vorinkubiert wurden.

Nach Betrachtung der aufgeführten physiologischen Abläufe wird klar deutlich, dass jegliche Veränderungen in diesem komplexen Zusammenspiel die Beeinträchtigung bzw. den Verlust der Fertilität nach sich ziehen können. Wenn also die akrosomale Matrix durch physikalische oder chemische Einflüsse geschädigt wird, führt dies unweigerlich zu Fertilitätsstörungen. Infolgedessen ist die Akrosomreaktion als wichtiger Parameter für die männliche Fertilität zu bewerten.

### **2.5.3 Einfluss auf die DNA im Spermienkopf**

Die DNA liegt in kondensierter und stabilisierter Form im Inneren des Spermienkopfes vor. So ist der sichere Transport des männlichen Genoms auf dem Weg bis zur Befruchtung gewährleistet (Abb. 2.7). Erst unmittelbar nach dem Eindringen in die Eizelle kommt es zur Dekondensation der DNA. Da der Kondensationsprozess die Chromatinmasse und damit ihre Oberfläche deutlich reduziert, ist sie enzymatischen chemischen oder physikalischen Einflüssen gegenüber geschützt.

Der Prozess der Verpackung des Chromatins in seiner endgültigen Form im Spermienkern ist sehr komplex. Dieser Vorgang beginnt in den frühen Phasen der Spermatogenese wobei die Histone (Abb.2.7) durch Übergangs-Proteine, und diese wiederum durch Protamine ausgetauscht werden [Banerjee et al., Kramer und Krawetz, Meistrich]. Die Protamine sind kleine argininreiche Proteine, die sich enger an die DNA binden als die Histone. Daraus ergibt sich ein noch stabileres Chromatin im Sammennucleus als in den anderen somatischen Zellen. Dieser Prozess wird als Spermienchromatinkondensation bezeichnet.



Bildquelle: Internet

**Abb 2.7** Abschnitte der DNA-Kondensation: (1) DNA-Doppelstranghelix, (2) Chromatinstrang (DNA mit Histonen), (3) kondensiertes Chromatin mit Zentromer während der Interphase, (4) kondensiertes Chromatin während der Prophase (2 Kopien des DNA-Moleküls sind am Zentromer miteinander verbunden), (5) kondensiertes Chromosom.

Die Stabilität des Chromatins wird durch 3 entscheidende Faktoren bestimmt:

1. elektrostatische Kräfte zwischen den essentiellen Aminosäuren und Nukleinsäuren,
2. Wasserstoff und hydrophobe Substanzen,
3. kovalente Disulfidbindungen zwischen benachbarten freien Thiolbrücken der Cysteine, die während der Spermatogenese und der Epididymalpassage gebildet und gefestigt werden. Dadurch entstehen inter- und intrachromosomale Bindungen, die schließlich zur Stabilisierung des Chromatins beitragen [Balhorn].

Studien von *Monaco* und *Foresta* zeigen, dass Spermatozoen mit abnormem Kernchromatin häufiger bei unfruchtbaren Männern vorkommen als bei fruchtbaren.

Da abnormes Chromatin der Spermatozoen zum Misserfolg der Befruchtung führen kann [*Ibrahim et al.*], ist dies also auch ein wichtiges Kriterium, welches bei der Beurteilung der Schädigung durch das Kryokonservieren eine Rolle spielt. *Sakkas et al.* vermuten, dass fehlerhafte Chromatinverpackung und/oder beschädigte DNA zum Misserfolg bei der Spermienkondensation nach ICSI und somit auch zum Misserfolg bei der Befruchtung beitragen können. Zahlreiche Gruppen haben über Anomalien in der Zusammenstellung der Spermienkernkondensation unfertiler Patienten, z. B. lose unverpackte Chromatinschleifen und beschädigte DNA berichtet [*Evensen et al. 26, Foresta et al., Sailer et al.*]. Viele Chromatintests zeigen, dass subfertile Männer eine hohe Anzahl an qualitativ minderwertigem Chromatin haben [*Evensen et al. 27, Liu und Backer, Tejada et al.*].

Andererseits haben ICSI-Verfahren mit Testikular- und Epididymalspermien ohne Rücksicht auf vorliegende Chromatindefekte zu einer überraschend hohen Erfolgsrate in der Befruchtung und Schwangerschaft geführt [*Hammadeh et al., Nagy et al., Silber et al., Van Steirteghem et al.*].

Fakt ist, dass Spermatozoen subfertiler Männer, welche schon vor dem Kryokonservieren Abnormalitäten im Bereich der Chromatinkondensation bzw. des Chromatins selbst zeigen, sicherlich durch die physikalischen Vorgänge während des Kühlprozesses deutlich anfälliger für Schädigungen während des Einfrierens und Auftauens sind. Zum einen könnten intrazelluläre Eiskristallbildung als auch die osmotischen Schwankungen negative Einflüsse auf das Chromatin haben.

Mehrere Methoden sind entwickelt worden, um den Zustand des Spermienchromatins zu beurteilen. So z. B. die Färbung mit Acridinorange, welche die Beurteilung der Chromatinreife und -kondensation ermöglicht [*Kosower et al.*].

Der Grad der Chromatinkondensation kann auch durch die Blaufärbung mit Toluidine oder Anilin beurteilt werden [*Krzanowska*]. Dabei bindet die saure Anilin-Blau-Färbung selektiv an den lysinreichen Histonen. Somit kann eine Aussage über mangelhafte Chromatinkondensation gemacht werden.

## 2.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Kryokonservierung unter Verwendung zweier etablierter Kryomethoden auf die menschlichen Spermatozoen zu eruieren. Insbesondere sollte dabei Augenmerk auf die Parameter Vitalität, Membranintegrität, Morphologie, Akrosomenstruktur und Chromatinkondensation gelegt werden, da dies entscheidende Einflussfaktoren für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle sind. Des Weiteren war von Interesse, ob die Fertilitätsparameter (fertil vs. subfertil) einen Einfluss auf die Ergebnisse nach dem Kryoprozess haben, also ob Spermatozoen welche schon primär als subfertil einzustufen sind, auch nach dem Kryokonservieren und Wiederauftauen signifikant schlechtere Ergebnisse der untersuchten Parameter aufweisen.

Die untersuchten Methoden (Kryokonservierung in Stickstoffdampf vs. programmierte biologische Friermaschine) unterscheiden sich in den jeweiligen Anschaffungskosten eklatant, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit die Entscheidungsfindung bei der Frage der Wahl der Kryomethode an einem Institut oder einer IVF-Praxis gegebenenfalls unterstützen könnten.

# 3 Material und Methodik

---

## 3.1 Allgemeines

Für die Untersuchungen wurden Spermaproben von 70 Patienten verwendet, die aufgrund ungewollter Kinderlosigkeit zur Erstellung eines Spermogrammes in die Klinik kamen.

Um nach gültigen Standards zu arbeiten, sollten die Klienten eine sexuelle Karenzzeit von mindestens 3 - 5 Tagen einhalten. Die Proben wurden durch Masturbation gewonnen.

Zur Beurteilung der entsprechenden Parameter wurden die in der Tab. 3.1 aufgeführten Methoden verwendet.

**Tab 3.1** Verwendete Methoden und damit beurteilte Parameter

<b>Methode</b>	<b>Parameter</b>
Eosin-Test	Vitalität
Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)	Membranintegrität
Färbung nach Papanicolaou	Morphologie
Triple-Stain-Färbung	Akrosom, Vitalität
Concanavalin-A-lectin	Akrosom
FITC-peanut (PNA)-lectin	Akrosom
Acridin-Orange-Färbung	Chromatinkondensation
Anilin-Blau-Färbung	Chromatinkondensation

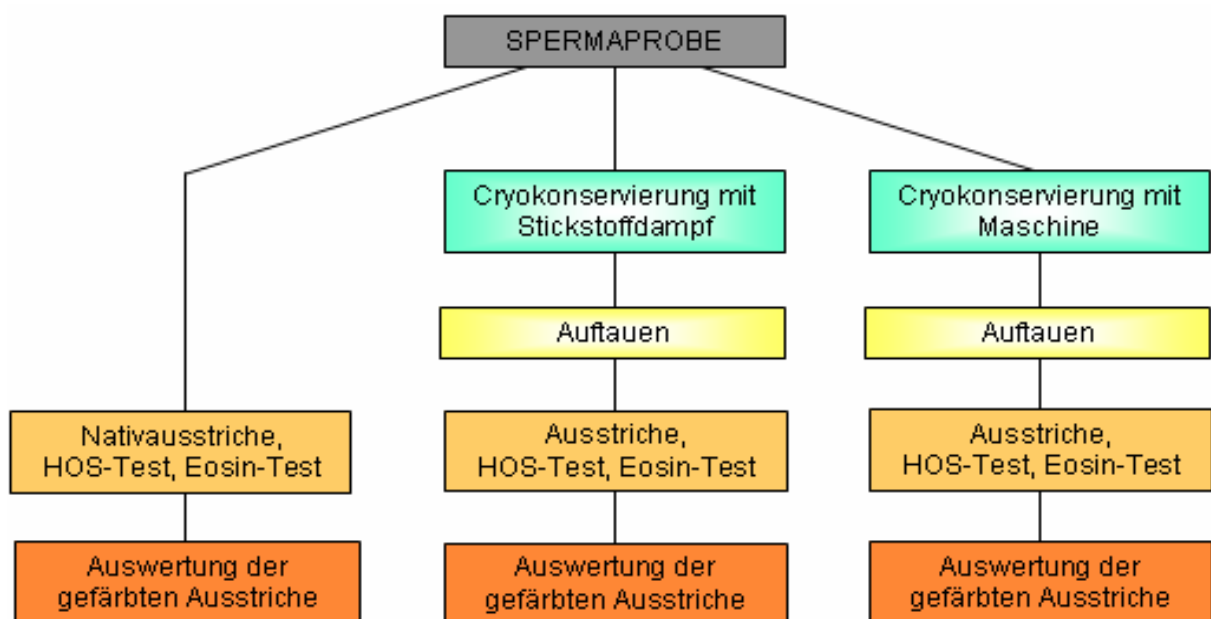


Von jeder Probe wurden nach Verflüssigung Nativausstriche für die einzelnen Färbungen hergestellt sowie entsprechende Mengen für HOS-Test und Eosin-Test entnommen, die sofort durchgeführt wurden. Ebenso wurde eine definierte Menge (100µl) zur weiteren Verwendung für die Triple-Stain Färbung zurückbehalten.

Die restliche Menge wurde für die Kryokonservierung wie in Abschnitt 3.2 beschrieben weiterverarbeitet und kryokonserviert.

Nach einer Lagerungsdauer von mindestens 4 Wochen wurden die Proben wieder aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen wurde der HOS- und der Eosin-Test durchgeführt sowie wiederum 100µl für die Triple-Stain-Färbung entnommen. Die Restmenge der aufgetauten Proben verblieb nun für Ausstriche, die später für die einzelnen Färbungen benutzt wurden.

Der Weg der Probenverwertung ist nochmals schematisch in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb 3.1** Schematische Darstellung der Probenverwertung

### 3.2 Aufbereitung für die Kryokonservierung

Als Schutz für die Spermatozoen vor den negativen Auswirkungen der Kryokonservierung wurde dem Ejakulat in dieser Studie das Friermedium HSPM (human sperm preservation medium) zugeführt [Mahadevan und Trounson]. Es besteht aus den im folgenden Abschnitt aufgeführten Reagenzien.

#### 3.2.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden zur Herstellung des HSPM benutzt:

- NaCl
- KCl
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- Natriumlactat (50 %ig)
- Natriumdihydrogenphosphat
- Natriumhydrogencarbonat
- Hepes-puffer
- Saccharose
- Glucose
- Glycerin
- Kanamycin sulf.
- Human serum albumin
- Kallikrein
- Aqua bidest.

### 3.2.2 Durchführung

Das Sperma wurde im Verhältnis 1:1 mit dem HSPM gemischt und danach in straws zu je 0.25 µl injiziert. Diese wurden mit entsprechenden Kügelchen verschlossen und auf zwei Frier- und Lagerungskassetten verteilt, und nach ihrer Zuteilung zum entsprechenden Kryoverfahren (Stickstoffdampf oder biologische Friermaschine) beschriftet und wie in Abschnitt 3.3 beschrieben dem jeweiligen Verfahren zugeführt.

Die verwendeten Materialien sind in Abb. 3.2 noch einmal übersichtlich dargestellt.



**Abb 3.2** Materialien zur Kryokonservierung von Spermatozoen; links oben: "straws" zur Aufnahme des zu frierenden Spermas; rechts oben: Kügelchen zum Verschließen der straws; unten: Kassette zur Aufnahme der straws während des Kryoverfahrens und der späteren Lagerung (Materialen der Fa. MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland)

### 3.3 Kryokonservierungsmethoden

Zur Kryokonservierung der Spermatozoen wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

#### 3.3.1 Kryokonservierung mit Stickstoffdampf

Die Kryokonservierung mit Stickstoffdampf (Gr. II) wurde in dem in Abb. 3.2 links dargestellten Stickstoffbehälter durchgeführt.

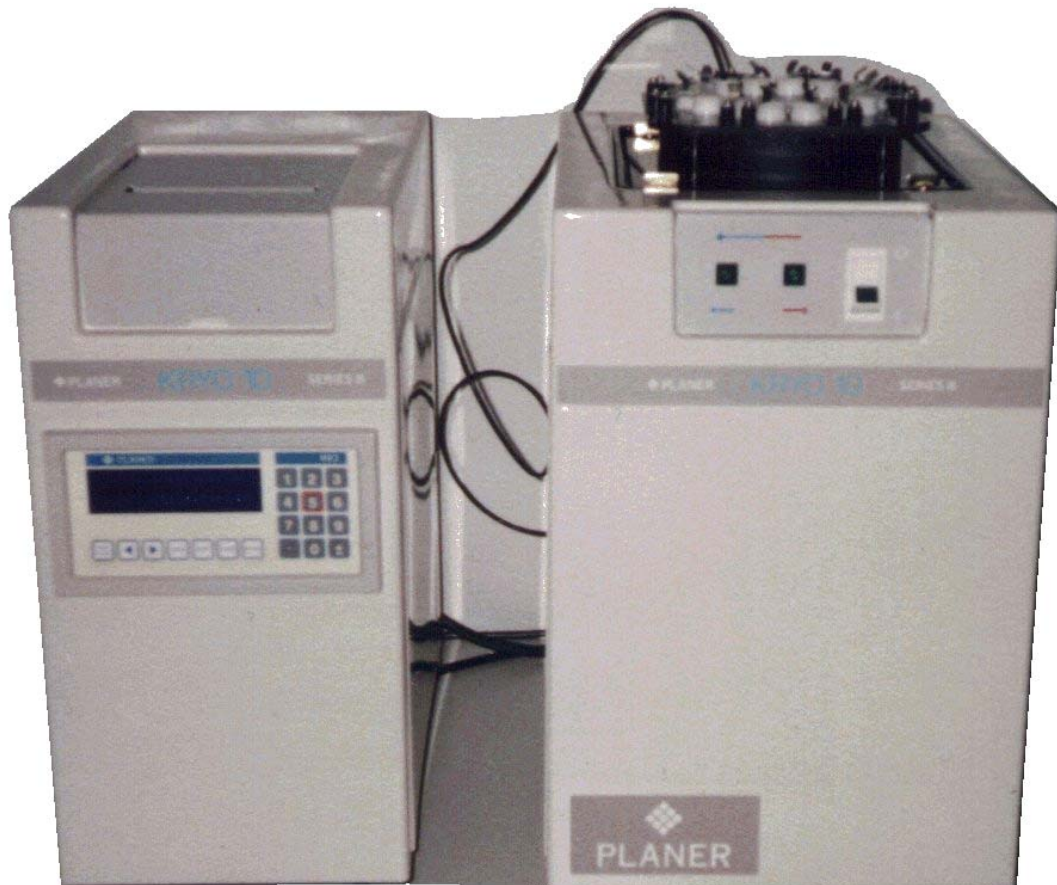
Dazu wurde die Kassette mit den vorbereiteten Proben in einen Metallkorb gelegt, welcher 20 cm über dem Flüssigkeitsspiegel des Stickstoffs befestigt wurde. Somit war gesichert, dass die Probe von allen Seiten dem Stickstoffdampf ausgesetzt war. Bei geschlossener Abdeckung verblieb die Kassette für 20 min im Behälter, um danach in den endgültigen Lagerungsbehälter (Abb. 3.2, rechts) umgesetzt zu werden.



**Abb 3.2** Verwendete Kryobehälter. Links: Behälter zur Kryokonservierung der Proben der Stickstoffdampfgruppe (G.II); rechts: Behälter zur Lagerung der kryokonservierten Proben

### 3.3.2 Programmierbare biologische Friermaschine (PBF)

Die Kryokonservierung der dritten Gruppe erfolgte in einer programmierbaren biologischen Friermaschine der Serie "Planer" der Firma Messer Griesheim GmbH. Sie ist in der Abb. 3.3 mit dem Programmgeber/Temperaturregler sowie der Gefrierkammer dargestellt.



**Abb 3.3** Gefriergerät der Serie „Planer“, Kryo 10-3.3/III der Firma Messer Griesheim GmbH. Links: Programmgeber/Temperaturregler; rechts: Gefrierkammer

Das Gefriergerät besteht aus einer Kammereinheit zur Aufnahme der Proben (Abb. 3.3, rechts) und einem Steuergerät mit programmierbarem Temperaturregler, einer Textanzeige und einem Drucker (Abb. 3.3, links). Um Flüssigstickstoff in die Kammer zu sprühen, wird ein Stickstoffbehälter mit Eigendruckaufbau verwendet.

Die innerhalb der Kammereinheit befindliche Gefrierkammer besteht aus einem vakuumisolierten Glasbehälter mit offenem Ende. An der Unterseite der Kammer sind die Betriebselemente angebracht, bestehend aus einem Gebläse, einer Verteilerdüse für Flüssigstickstoff, einem Kontrolltemperaturfühler und einem Heizelement. Das obere Ende der Kammer wird von einem abnehmbaren Deckel verschlossen, an dem 15 Probenhalter befestigt sind, jeweils mit separaten Zugangsöffnungen im Deckel der Kammer. Ein 16. Halter ist mit einer Bohrung versehen durch die ein Probenfühler eingeführt wird, der zur unabhängigen Messung der Kammer- oder Proben temperatur erforderlich ist. Ein Rohr, welches mit dem Stickstoffbehälter verbunden ist, ist am Kammerdeckel befestigt. Bei geschlossenem Deckel befindet sich das untere Ende des Rohres nahe am Ventilator am Kammerboden, um eine gleichmäßige Umwälzung des Kühlmittels um die Proben herum und eine gleichbleibende Temperatur in der gesamten Kammer zu gewährleisten.

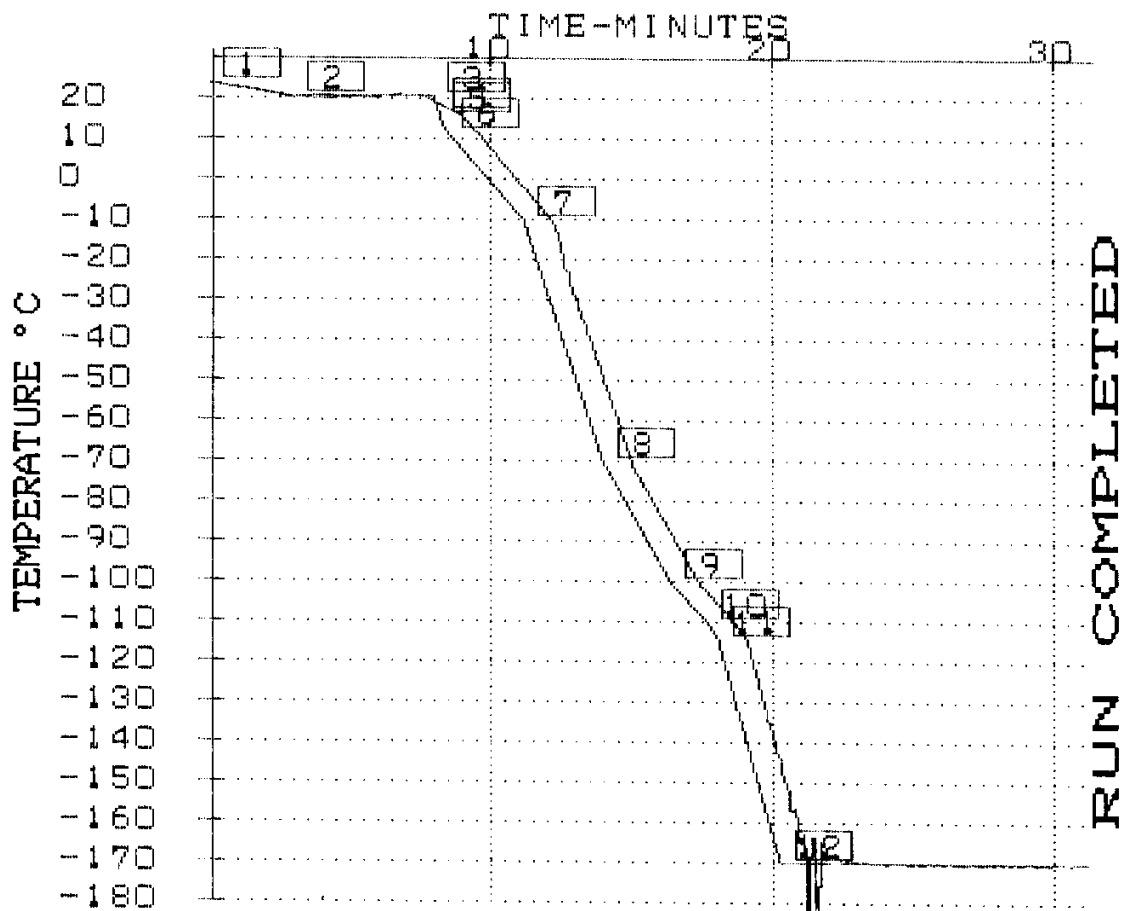
Der Gefriervorgang beruht auf der kontrollierten Eindüsung von zerstäubtem Flüssigstickstoff in die Gefrierkammer und dem kurzfristigen Gegenheizen durch das Heizelement. Der gesamte Prozess wird durch ein Steuerelement mit Microprozessor geregelt. Die Doppelfunktion von Kühlen und Heizen ermöglicht präzise lineare Abkühlungsraten in der Kammer. Das Platin-Widerstandsthermometer am Boden der Kammer gibt ein Signal an den Temperaturregler und die Textanzeige.

Das Programm, das zur Konservierung von Spermatozoen genutzt wird, startet mit einer Temperatur von 24.0°C. Nachdem das gewählte Programm gestartet wird, beginnt die Maschine als ersten Schritt mit der Einstellung der Starttemperatur, indem sie die Frierkammer je nach Ausgangswert entweder erwärmt oder abkühlt. So ist gewährleistet, dass jede Probe von Anfang an unter denselben standardisierten Bedingungen weiterverarbeitet wird.

Nun beginnt der eigentliche Kühlvorgang. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte mit den entsprechenden Kühlraten aufgeführt:

- Schritt 1: Kühlrate von  $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $24.0^{\circ}\text{C}$  bis  $21.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 2: Halten der Temperatur von  $21.0^{\circ}\text{C}$  über 5 min
- Schritt 3: Kühlrate von  $-20.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $21.0^{\circ}\text{C}$  bis  $17.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 4: Kühlrate von  $-15.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $17.0^{\circ}\text{C}$  bis  $16.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 5: Kühlrate von  $-11.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $16.0^{\circ}\text{C}$  bis  $12.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 6: Kühlrate von  $-8.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $12.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-10.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 7: Kühlrate von  $-21.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $-10.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-70.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 8: Kühlrate von  $-12.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $-70.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-100.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 9: Kühlrate von  $-7.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $-100.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-110.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 10: Kühlrate von  $-10.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $-110.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-114.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 11: Kühlrate von  $-25.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $-114.0^{\circ}\text{C}$  bis  $-170.0^{\circ}\text{C}$
- Schritt 12: Halten der Temperatur von  $-170.0^{\circ}\text{C}$  über 10 min.

Der in der Abb. 3.4 dargestellte Ausdruck gibt den Programmablauf noch einmal wieder.



**Abb 3.4** Abkühlprotokoll des Spermienkryoprogrammes der biologischen Friermaschine

Nach Ablauf des Kryokonservierungsprozesses wurden die Proben der Gruppe III ebenfalls in den Lagerungsbehälter (Abb 3.2) umgesetzt.

### 3.4 Eosin-Test (Vitalität)

Der Eosin-Test ist eine Färbemethode zur Ermittlung der Vitalität. Die Tatsache, dass tote Spermatozoen mit geschädigten Plasmamembranen bestimmte Farbstoffe, wie zum Beispiel den Eosinfarbstoff, aufnehmen und somit selektiv anfärbbar sind, macht diese Vitalitätsprüfung möglich. Tote Spermatozoen erscheinen somit im Mikroskop rot. Die Membran der vitalen Spermatozoen stellen eine chemische Barriere für den Farbstoff dar. Diese erscheinen im Mikroskop somit ungefärbt (Eosin negativ), unabhängig davon wie motil sie sind [Esteves et al.].



### 3.4.1 Reagenzien

Verwendet wurde eine 2 %ige gebrauchsfertige Lösung in Ampullen (2 %ige Lösung aus Eosin und Aqua dest.).

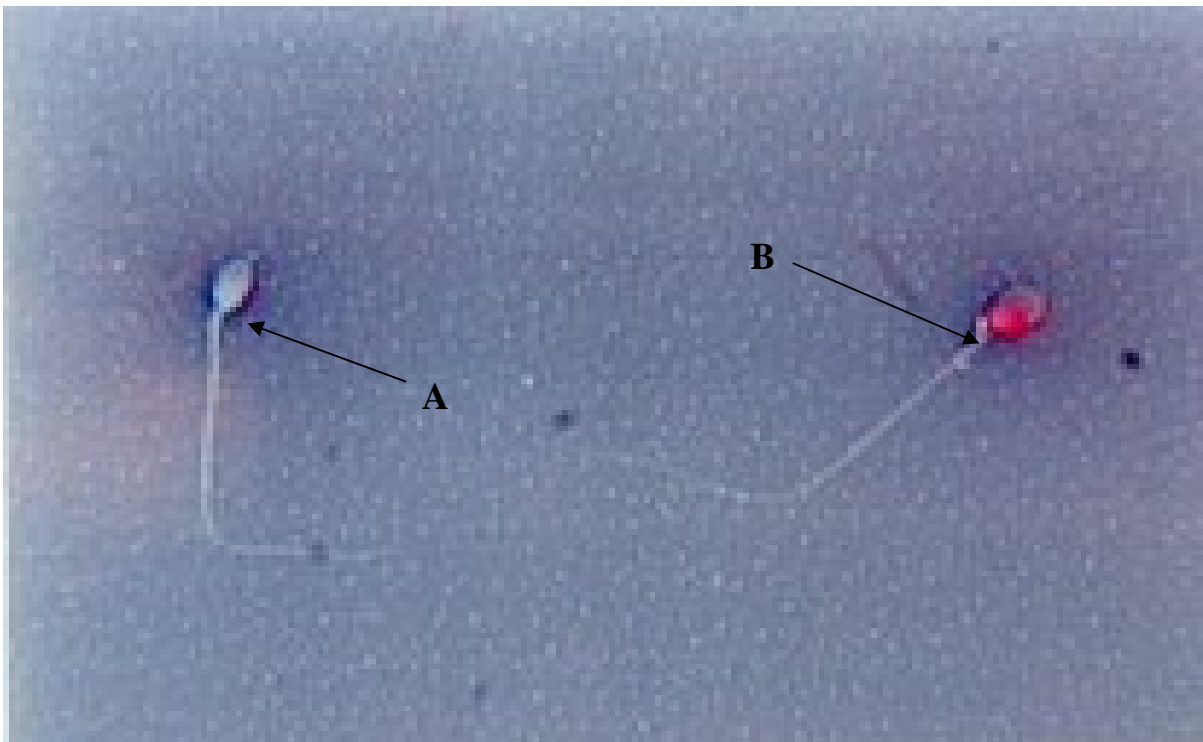
### 3.4.2 Durchführung

Für den Test wurde 1µl Ejakulat mit 1µl 2 %iger Eosinlösung auf einem Objektträger gemischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

### 3.4.3 Beurteilung

Nach 1 bis 2 min wurde der Objektträger unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit Phasenkontrast ausgewertet. Es wurden 100 Spermatozoen ausgezählt und dabei jeweils der Gruppe „gefärbt“ oder „nicht gefärbt“ zugeordnet.

### 3.4.4 Beispiel



**Abb 3.5** Eosinfärbung zur Vitalitätsbestimmung; A: vitales Spermium, B: avitales Spermium

### 3.5 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test, Membranintegrität)

Dieser Test basiert auf der Semipermeabilität der intakten Zellmembran des Spermium. Er dient somit zur Bestimmung der Integrität und „Dehnbarkeit“ der Plasmamembran im Bereich des Spermatozoenschwanzes. Durch die hypoosmotischen Bedingungen um das Spermium herum kommt es aufgrund des Konzentrationsungleichgewichtes zu einem Wassereinstrom. Dadurch nimmt das Zellvolumen zu, das Spermium schwillt an (HOS-positiv). Ist die Membranintegrität durch Schädigung verloren gegangen, kommt es auch zu keiner Schwellung (HOS-negativ) [Jeyendran *et al.*].

#### 3.5.1 Reagenzien

- 0.735 g Natriumzitat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 1.351 g Fruktose
- 100 ml destilliertes Wasser

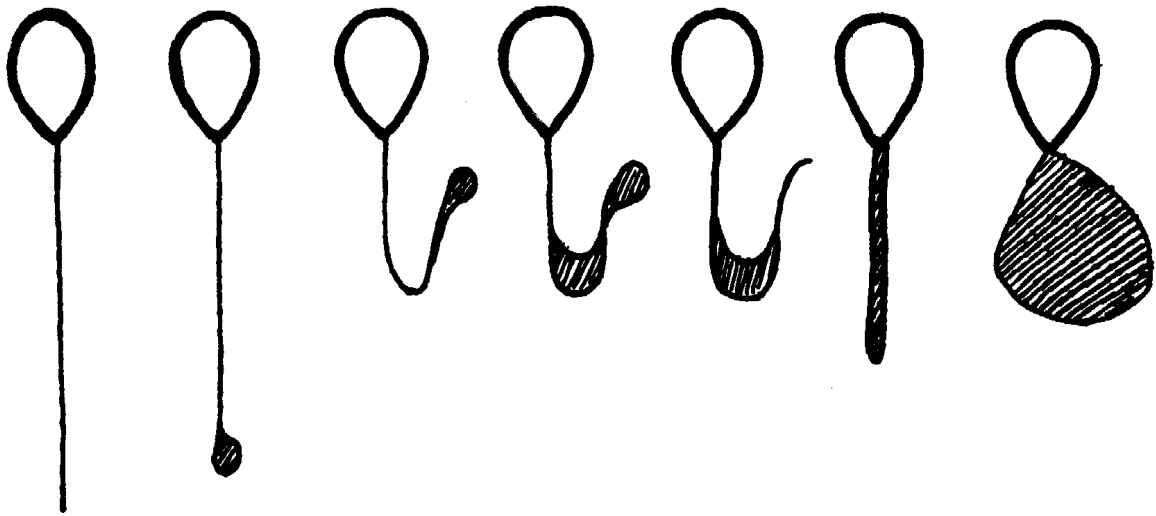
#### 3.5.2 Durchführung

1 ml Schwelllösung wurde mit 0.1 ml liquifiziertem Ejakulat in einem Eppendorf-Hütchen gemischt und für mindestens 30 min, aber nicht länger als 120 min bei 37°C inkubiert.

#### 3.5.3 Beurteilung

Es wurden nun 10µl der Mixtur auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Mit 400 -facher Vergrößerung und Phasenkontrast wurden 100 Spermatozoen unter dem Mikroskop beurteilt und jeweils in die Gruppe geschwollen oder nicht geschwollen eingeteilt.

Eine schematische Darstellung möglicher morphologischer Veränderungen zeigt Abb. 3.6.



**Abb 3.6** Mögliche morphologische Veränderungen, die durch den Einfluss der HOS-Lösung auftreten können. Die schraffierten Bereiche zeigen „Schwellungen“ am Spermatozoenschwanz an. Das links dargestellte Spermium zeigt keine Schwellung, es ist somit vom Verlust der Membranintegrität auszugehen.

### 3.6 Färbung nach Papanicolaou (PAP)

Zur Beurteilung der Morphologie wurde die Papanicolaou-Färbung angewandt. Diese in der Gynäkologie normalerweise für die Vaginalzytologie benutzte Methode wurde speziell für die Färbung von Spermatozoen modifiziert [WHO], da es bei der Standardfärbung nur zu einem mangelhaften Ergebnis kommt. Die PAP-Färbung unterscheidet deutlich zwischen basophilen und azidophilen Zellbestandteilen.

Zur Durchführung wurde die in der Abb. 3.7 dargestellte Maschine verwendet, die die einzelnen Färbeschritte automatisch nach einem programmierten Schema durchführt, welches Abb. 3.8 wiedergibt. Die Automatisierung der Färbung sorgt für gleichmäßige Färbeargebnisse. Variationen der Färbung, wie sie bei von Hand gefärbten Präparaten vorkommen können, sind ausgeschlossen.



**Abb 3.7** Programmierbarer Färbeautomat „Varistain“ 24-4 der Firma Shandon zur Papanicolaou-Färbung der Spermatozoen

### 3.6.1 Reagenzien

- Äthanol (99.5 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 % und 50 %)
- Destilliertes Wasser
- EA-50 <sup>(b)</sup>
- Fließendes Wasser
- Harris oder Mayers Hämatoxilin <sup>(b)</sup>
- Orange G6 <sup>(b)</sup>
- Saurer Alkohol
- Scotts Lösung <sup>(a,b)</sup>
- Xylol

- (a) Diese Lösung wird verwendet, wenn das Leitungswasser sehr "hart", also kalkhaltig ist.
- (b) Diese fertigen PAP-Reagenzien sind von Firmen zu beziehen und bestehen aus folgenden Chemikalien:

*Orange G6:*

- Orange G-Kristalle (C.I. 16230)
- Destilliertes Wasser
- 95 %iger Äthanol
- Phosphorwolframsäure

*Scotts Lösung:*

- $\text{NaHCO}_3$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- Destilliertes Wasser

*EA-50:*

- Eosin Y (C.I.45380)
- Bismarckbraun Y (C.I.21000)
- Lichtgrün SF, gelblich (C.I.42095)
- Destilliertes Wasser
- 95% iger Äthanol
- Phosphorwolframsäure
- Gesättigte Lithiumkarbonat-Lösung (in destilliertem Wasser)

*Hämatoxin nach Harris:*

- Hämatoxin (dunkle Kristalle; C.I. 75290)
- 95 %iger Äthanol
- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- Destilliertes Wasser
- $\text{HgO}$

*Saurer Alkohol:*

- Äthanol 99.5 %ig
- Konzentrierte  $\text{HCl}$
- destilliertes Wasser

### 3.6.2 Durchführung

Nach Herstellung des Ausstriches wurde der Objektträger mit Cytofix fixiert und luftgetrocknet. Nun erfolgte die Färbung in den in Abb. 3.8 aufgeführten 25 Schritten.

Färbeschritt		Einwirkdauer
1	Äthanol 80 %	10 Sekunden
2	Äthanol 70 %	10 Sekunden
3	Äthanol 50 %	10 Sekunden
4	Destilliertes Wasser	10 Sekunden
5	Harris oder Mayers Hämatoxilin	3 Minuten
6	Fließendes Wasser	3 - 5 Minuten
7	Saurer Alkohol	2 Sekunden
8	Fließendes Wasser	3 - 5 Minuten
9	Scotts Lösung	4 Minuten
10	Destilliertes Wasser	1 Sekunde
11 - 14	Äthanol 50 %	jeweils 10 Sekunden
15	Orange G6	2 Minuten
16 - 17	Äthanol 50 %	jeweils 10 Sekunden
18	EA-50	5 Minuten
19 - 21	Äthanol 50 %	jeweils 5 Sekunden
22	Äthanol 50 %	2 Minuten
23 - 25	Xylol	jeweils 1 Minute

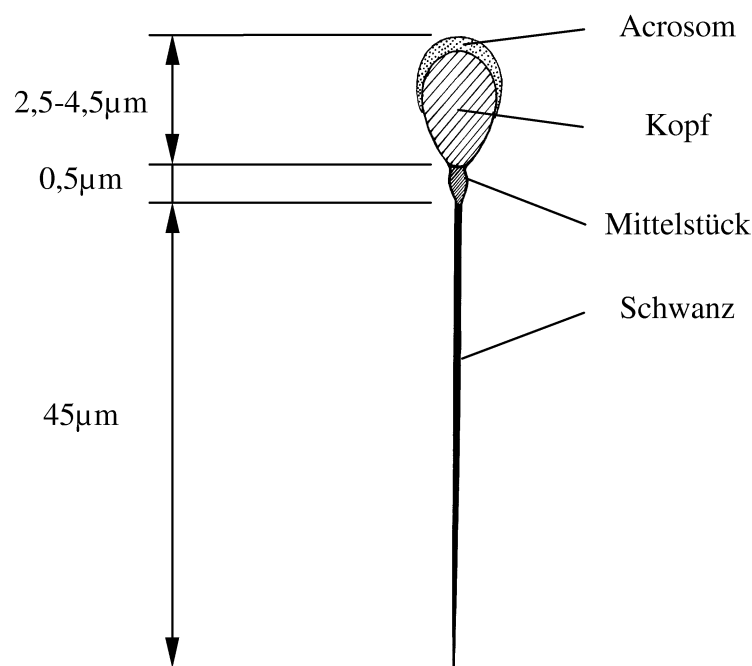
**Abb 3.8** Programmablauf der einzelnen Schritte, wie sie in dem Färbeautomaten „Varistain“ 24-4 zur Papanicolaou-Färbung der Spermatozoen programmiert sind.

Nach dem letzten Xylolbad wurden die Objektträger mit Entellan, einem speziellen Klebstoff, eingedeckt.

### 3.6.3 Beurteilung

Die nach der PAP-Methode gefärbten Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv mit 100 -facher Vergrößerung beurteilt. Es wurden 100 Spermatozoen pro Objektträger nach ihrer Morphologie beurteilt und in entsprechende Gruppen eingeteilt [Kruger *et al.*]. Das Akrosom erscheint bei dieser Färbemethode hellblau, die postakrosomale Region hingegen dunkelblau. Das Mittelstück kann eventuell eine gewisse Rotfärbung aufweisen, was allerdings nur dann als abnormal zu werten ist, wenn der Bereich gleichzeitig deutlich aufgetrieben oder unregelmäßig geformt erscheint. Der Spermatozoenschwanz ist violett bis dunkelblau gefärbt. Vorhandene Zytoplasmotropfen stellen sich grün dar. Die Umrisse aller Bestandteile des Spermiums sollten gut erkennbar sein.

In der folgenden Abb. 3.9 sind Aufbau und die wichtigsten Normmaße eines menschlichen Spermiums dargestellt [Kruger *et al.*].



**Abb 3.9** Aufbau eines Spermiums mit den dazugehörigen Normmaßen

Als abnormal wurden folgende Veränderungen gewertet:

### **Kopf**

Es ist zu beachten, dass es eine Diskrepanz zwischen lebendem und gefärbtem Spermium gibt. Vitale Spermatozoen im Nativpräparat haben danach einen etwas größeren Kopf als gefärbte Spermatozoen [Menkveld *et al.*, WHO]. Die Kopfform unterscheidet sich allerdings nicht. Sie sollte im Normalfall oval sein, wie es in Abb 3.9 skizziert ist.

Spermien mit abnormen Formen und/oder Größen des Kopfes einschließlich großer, kleiner, zigarrenförmiger, birnenförmiger, amorpher Köpfe, Doppelköpfe und fehlende Köpfe sowie solche mit nicht gefärbten Vakuolen, die > 20 % der Kopffläche einnahmen, wurden als pathologisch beurteilt.

Das Akrosom sollte circa 40 - 70 % der Kopfoberfläche einnehmen und gut abgrenzbar sein.

### **Nacken und Mittelstück**

Auch dieser Bereich muss, wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, klar abgrenzbar und regelmäßig geformt sein, um als morphologisch normal klassifiziert zu werden. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass keine Abweichung von der Körperachse des Spermiums, also keine Knicke oder Brüche in diesem Bereich auftreten. Der Übergang vom Kopf zum Halsbereich soll sich fließend darstellen. Der gesamte Bereich darf nicht aufgetrieben, abnorm dünn oder lang ausgezogen sein.

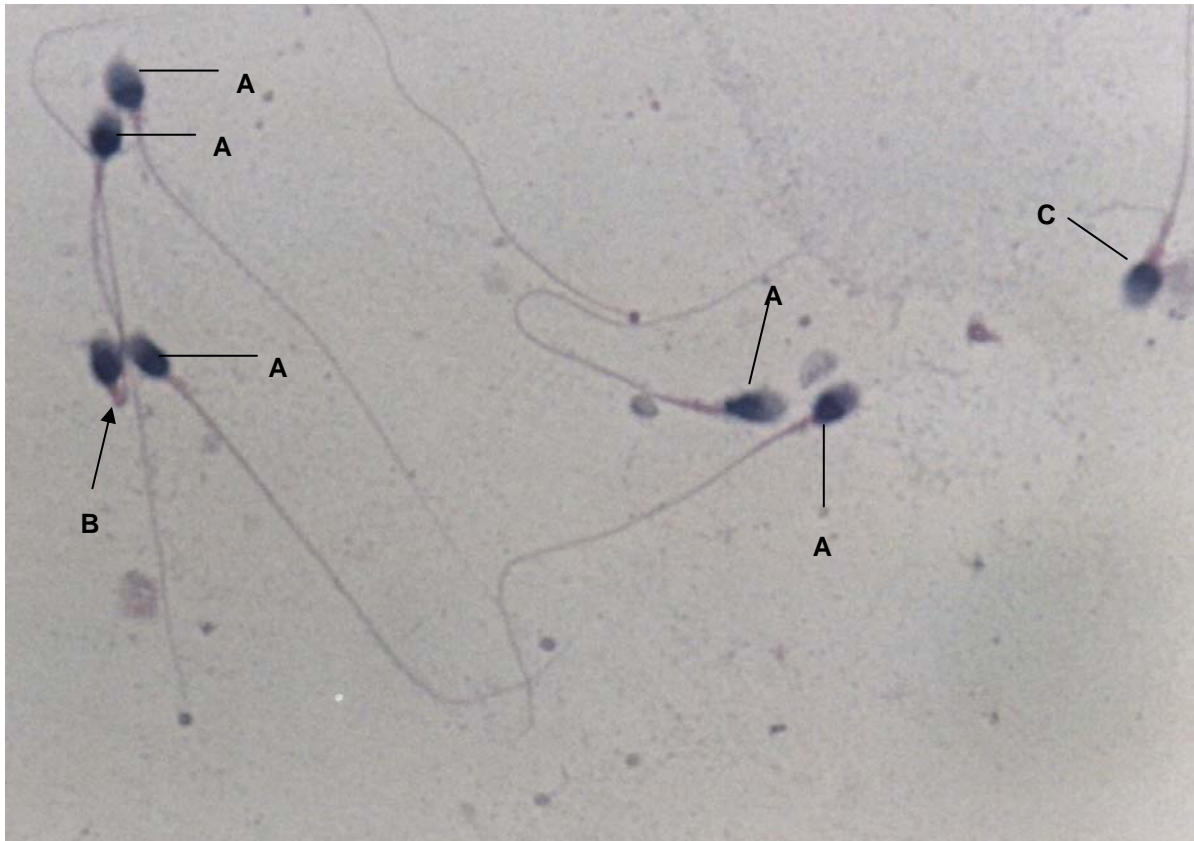
### **Schwanz**

Auch im Schwanzbereich kann es zu verschiedenartigen Defekten kommen, die eine Einteilung des betreffenden Spermiums als morphologisch normal nicht zulassen. Dazu zählen zum Beispiel zu kurze, haarnadelförmige sowie aufgerollte Schwänze. Doppel- und Mehrfachschwänze wie auch solche mit unregelmäßiger Breite oder gar Bruchstellen gelten als pathologisch. Aber auch endständige Zytoplasmotropfen lassen eine Beurteilung des Spermiums als normal nicht zu.



### 3.6.4 Beispiele

Die Abb. 3.10 bis 3.14 geben Beispiele für normale und abnormale Formvarianten, wie sie mit der PAP-Färbung zu unterscheiden sind.



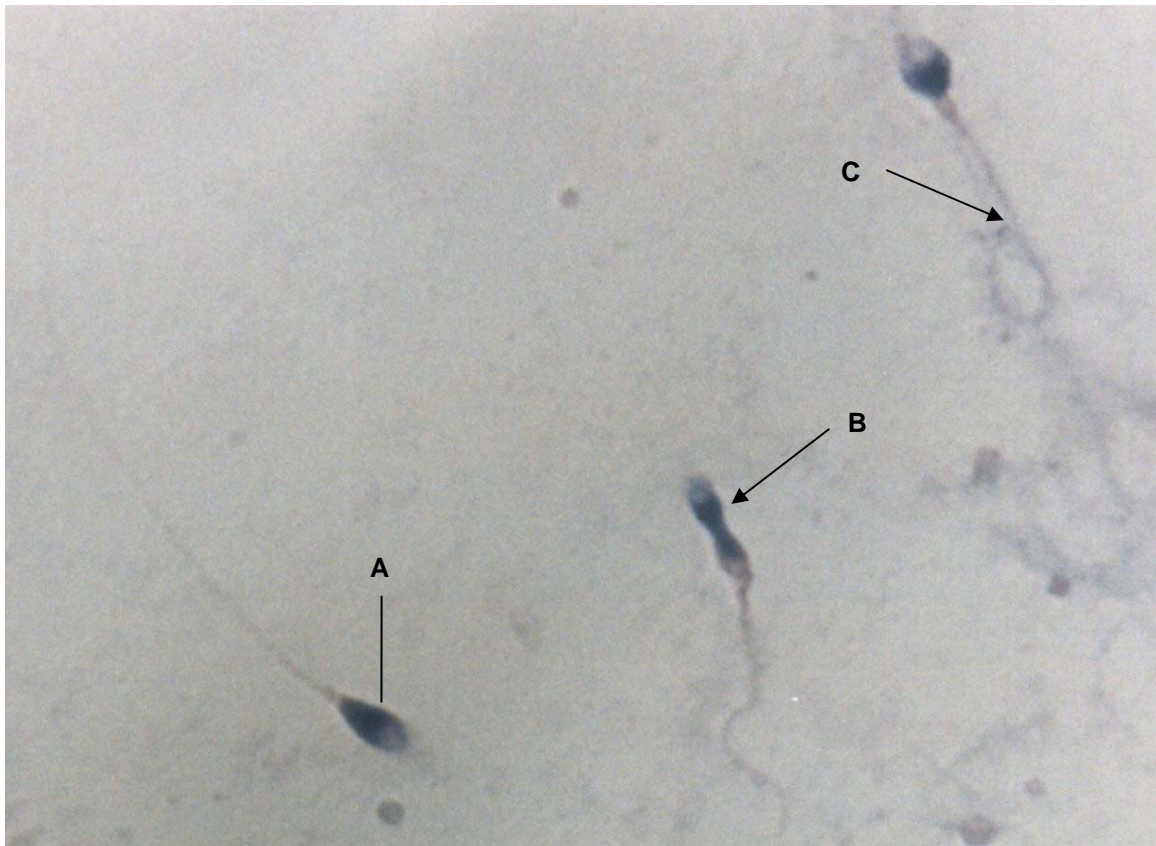
**Abb 3.10** Färbung von Spermatozoen mit der Papanicolaou-Technik zur Beurteilung der Morphologie. A: Spermium mit normaler Morphologie; B: Spermium mit Abnormalität im Bereich des Nackens und Mittelstückes; C: Spermium nicht komplett sichtbar und daher nicht beurteilbar.



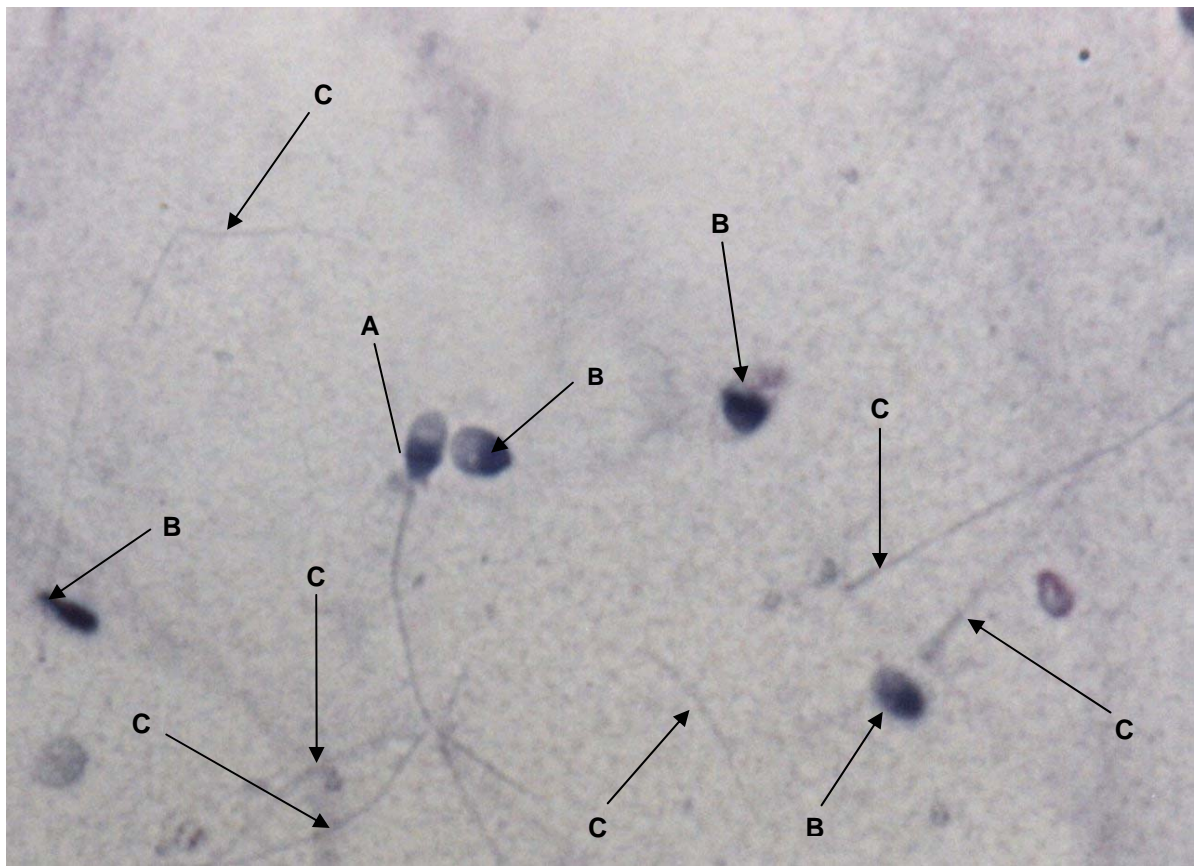
**Abb 3.11** Färbung von Spermatozoen mit der Papanicolaou-Technik zur Beurteilung der Morphologie. A: Spermium mit Abnormalität im Bereich des Nackens und Mittelstückes; B: Spermium mit doppelt angelegtem Kopf.



**Abb 3.12** Färbung von Spermatozoen mit der Papanicolaou-Technik zur Beurteilung der Morphologie. A: Spermium mit normaler Morphologie; B: Spermium mit Abnormalität im Bereich des Nackens und Mittelstückes; C: Spermium mit amorphem Kopf; D: Spermium mit normalem Kopf und aufgerolltem Schwanz; E: Spermium mit hypoplastischem Kopf.



**Abb 3.13** Färbung von Spermatozoen mit der Papanicolaou-Technik zur Beurteilung der Morphologie. A: Spermium mit normaler Morphologie; B: Spermium mit elongiertem Kopf; C: Spermium mit normalem Kopf und aufgerolltem Schwanz.



**Abb 3.14** Färbung von Spermatozoen mit der Papanicolaou-Technik zur Beurteilung der Morphologie. A: Spermium mit normaler Morphologie; B: Spermatozoenkopf ohne Schwanz; C: Spermatozoenschwanz ohne Kopf.

### 3.7 Triple-stain (Vitalität, Akrosomenstruktur)

Mit der Triple-stain-Färbung können sowohl die Vitalität als auch der Akrosomenstatus der Spermatozoen bestimmt werden. Die am frischen Sperma durchgeführte Inkubation mit Trypanblau erlaubt die spätere Beurteilung der Vitalität, da der Farbstoff nur in die Membran toter Spermatozoenköpfe eindringt, die lebenden nehmen den Farbstoff nicht an. Sie wurden mit dem Bismarck-Braun-Farbstoff gegengefärbt, um sie später unter dem Mikroskop differenzieren zu können. Mit dem dritten Farbstoff Rosa-Bengal wurden die in der Akrosomen-Matrix enthaltenen Enzyme gefärbt. Ist die Matrix nicht mehr vorhanden, so bleibt die akrosomale Region ungefärbt, sie erscheint im Mikroskop also weiß [Talbot und Chacon].

### 3.7.1 Reagenzien

*Fixierlösung:*

- 2.5%ige Glutaraldehydlösung in PBS-Pufferlösung (pH 7.4)

*Färbelösungen:*

- 2%ige Trypanblaulösung in PBS-Puffer
- 0.8%ige Bismarck-Braunlösung in Aqua dest. + HCl (pH 1.8)
- 0.8%ige Rosa-Bengal-Lösung in 0.1 mM PBS-Pufferlösung (pH 5.3)

*Weitere Reagenzien:*

- PBS-Puffer
- aufsteigende Alkoholreihe

### 3.7.2 Durchführung

Die von den Proben entnommenen 100µl wurden mit der 2%igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 für 15 min inkubiert und danach bei 600 bis 800 g in der Zentrifuge mit PBS-Puffer 3 mal gewaschen. Vom entstandenen Sediment wurden Ausstriche angefertigt und in der 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 35 min fixiert. Nun wurden die Objektträger in der Bismarck-Braun-Lösung bei 40° für 5 min und danach in Rosa-Bengal bei 20° für 30 min gefärbt. Nach Dehydratation in einer Alkoholreihe wurden die Objektträger mit Entellan eingedeckt [*Talbot und Chacon*].

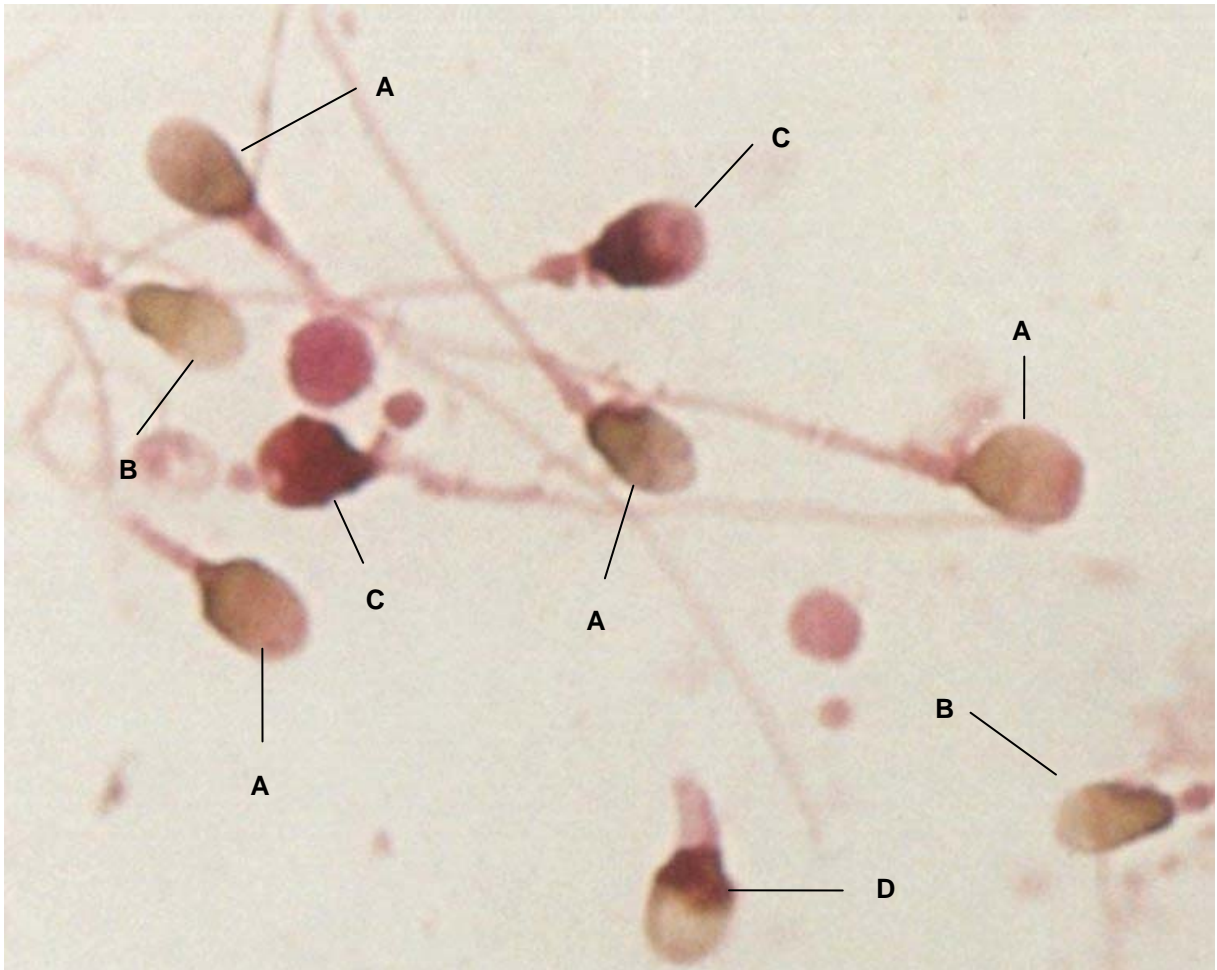
### 3.7.3 Beurteilung

Die gefärbten Präparate wurden unter einem Lichtmikroskop bei 100 facher Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt. Dabei können vier verschiedene Ergebnisse möglich sein:

1. hellbraune-braune Zelle, akrosomale Region rosa → lebende Spermatozoen mit intaktem Akrosom;
2. hellbraune-braune Zelle, akrosomale Region weiß → lebende Spermatozoen ohne intaktes Akrosom;
3. blauschwarze-schwarze Zelle, akrosomale Region rosa → tote Spermatozoen mit intaktem Akrosom;
4. blauschwarze-schwarze Zelle, akrosomale Region weiß → tote Spermatozoen ohne intaktes Akrosom.

### 3.7.4 Beispiele

In Abb. 3.15 sind die möglichen Ergebnisse der Triple-stain-Färbung dargestellt.



**Abb 3.15** Färbung von Spermatozoen mit der Triple-stain-Technik zur Beurteilung der Vitalität und des Akrosomenstatus. A: lebendes Spermium mit intaktem Akrosom; B: lebendes Spermium ohne Akrosom; C: totes Spermium mit intaktem Akrosom; D: totes Spermium ohne Akrosom.



### 3.8 Concanavalin-A-lectin (Akrosomenstruktur)

Diese Färbung wurde verwendet, um Aussagen über den Akrosomenstatus zu machen. Sie stellt eine Immunfluoreszenzfärbung dar, bei der Concanavalin-A-lectin an die innere Membran des Akrosoms bindet [Van Lis und Kalsbeek]. Bei den Bindungsstellen handelt es sich um die beiden Zucker  $\alpha$ -D-Mannose und  $\alpha$ -D-Glukose. Diese Bindung ist aber nur möglich, wenn die akrosomale Region vorhanden ist. Diese Methode reagiert also positiv, wenn das Akrosom intakt ist.

#### 3.8.1 Reagenzien

*Fixierlösung:*

- 4%ige Formaldehydlösung (Formaldehyd in 150 mM PBS-Puffer)

*Färbelösung:*

- FITC-markiertes Concanavalin-A-lectin (Sigma)

*Weitere Reagenzien:*

- PBS-Puffer (10mM)
- Glycerin

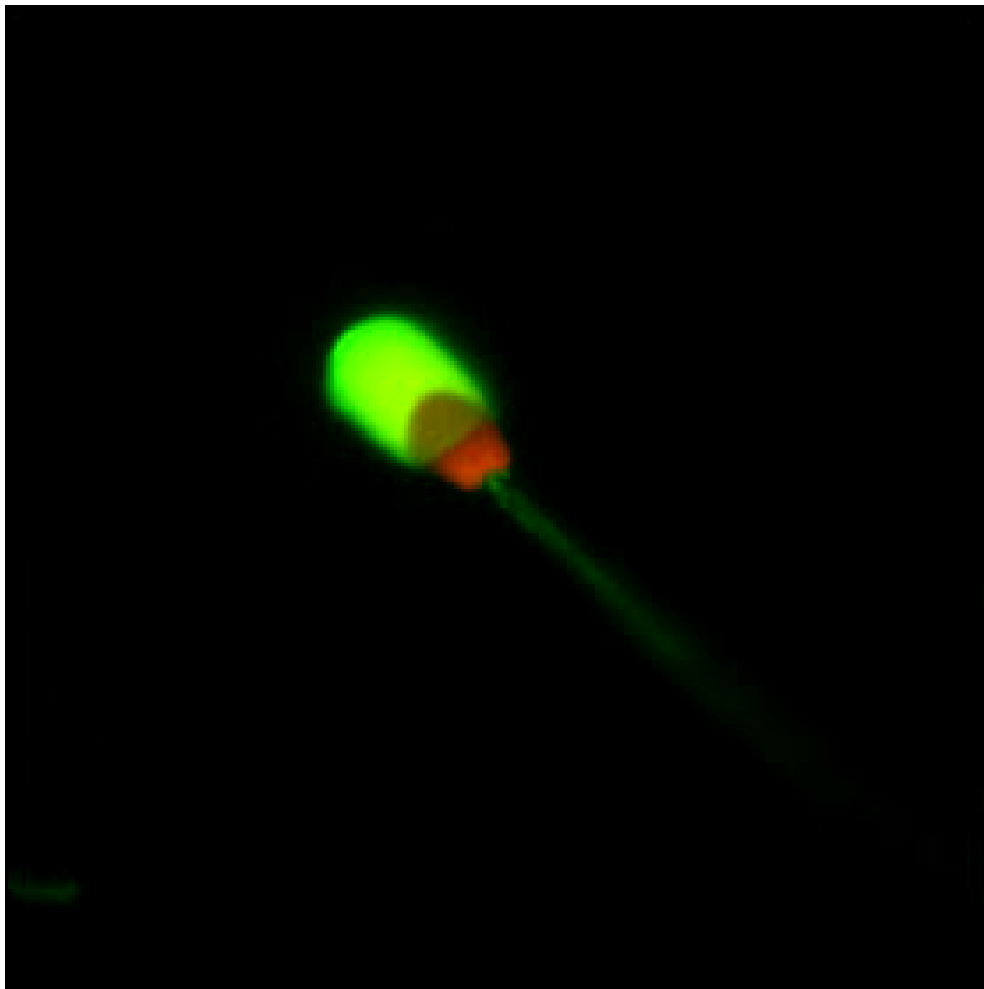
#### 3.8.2 Durchführung

Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in der 4%igen Formaldehydlösung für circa 15 min fixiert. Sie wurden dann 1- bis 2-mal vorsichtig in 10 mM PBS-Puffer gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten in einem abgedunkelten Raum, da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer gelegt und mit der zubereiteten Concanavalin-A-lectin-Gebrauchslösung überschichtet. Die Einwirkzeit für diesen Schritt betrug 25 min. Die Kammer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger wieder in 10 mM PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Tropfen Glycerin und einem Deckgläschen eingedeckt.

### 3.8.3 Beurteilung

Die so gefärbten Präparate wurden bei 100 facher Vergrößerung mit Immersionsöl unter einem Fluoreszenzmikroskop in einem abgedunkelten Raum ausgewertet. Es wurden 100 Spermatozoen pro Objektträger beurteilt. Spermatozoen, die im Bereich der inneren Akrosomen-Membran fluoreszierten, wurden als positives Ergebnis gewertet, die ohne nachweisbare Fluoreszenz als negatives Ergebnis (Abb. 3.16).

### 3.8.4 Beispiel



**Abb 3.16** Concanavalin-A-lectin-Färbung Spermatozoen mit intaktem fluoreszierenden Akrosom

### 3.9 FITC-Peanut-(PNA)-lectin (Akrosomenstruktur)

Mit der PNA-lectin-Färbung wurde ebenfalls die Akrosomenstruktur beurteilt. Hierbei handelt es sich auch um eine Fluoreszenzfärbung. Allerdings bindet der Farbstoff in diesem Fall nicht wie bei der Concanavalinfärbung an die innere Akrosomen-Membran, sondern an die äußere Membran [*Mortimer et al.*].

#### 3.9.1 Reagenzien

*Fixierlösung:*

- 3%ige Formaldehydlösung

*Entfettung:*

- 0.2%iges Triton X (Triton X in PBS-Puffer)

*Färbelösung:*

- 5%ige FITC-PNA-Lectinlösung (FITC-PNA-Lectin in PBS-Puffer)

*Weitere Reagenzien:*

- 10 mM PBS-Pufferlösung
- Glycerin

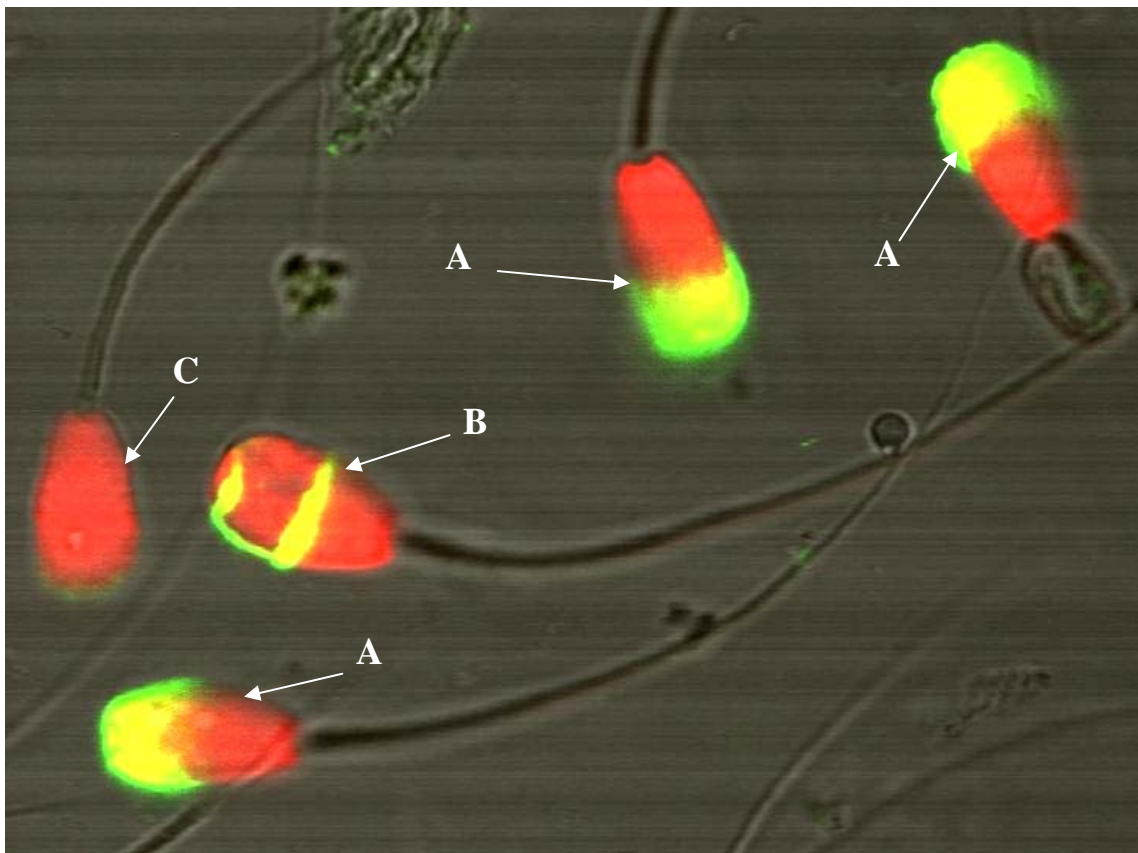
#### 3.9.2 Durchführung

Die für die Färbung vorbereiteten Objektträger wurden für mindestens 20 min in 3%iger Formaldehydlösung fixiert. Nun wurden die Ausstriche zweimal in PBS-Pufferlösung gewaschen. Nachdem nun eine Entfettung in 0.2%iger Triton-X-Lösung für 5 min erfolgte, wurde die eigentliche Färbung in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. So ist sichergestellt, dass der an das Lectin gebundene Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanit nicht zerstört wird. Die Objektträger wurden mit der 5%igen Lectinlösung beschichtet. Die Inkubationszeit betrug hier 30 min. Nach dem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Objektträger mit Glycerin und einem Deckgläschen eingedeckt.

### 3.9.3 Beurteilung

Die gefärbten Präparate wurden bei 100 facher Vergrößerung mit Immersionsöl unter einem Fluoreszenzmikroskop in einem abgedunkelten Raum ausgewertet. Es sind 100 Spermatozoen pro Objektträger beurteilt worden. Spermatozoen, die eine Fluoreszenz aufwiesen, wurden als positiv, die ohne nachweisbare Fluoreszenz als negativ gewertet (Abb. 3. 17).

### 3.9.4 Beispiele



**Abb 3.17** PNA-lectin-Färbung A: Spermatozoen mit intaktem fluoreszierenden Akrosom, B: Spermatozoen mit lediglich Akrosomresten, C: Spermatozoen ohne intaktes Akrosom

### 3.10 Acridinorange (Chromatinkondensation)

Die Acridinorange-Färbung wurde zur Beurteilung der Chromatinkondensation verwendet. Es handelt sich dabei um eine Fluoreszenzfärbung, bei der der Farbstoff umso besser an das Chromatin binden kann, je dekondensierter es im einzelnen Spermatozoenkopf vorliegt [Tejada *et al.*]. AO fluoresziert grün, wenn es auf doppelsträngige stark kondensierte DNA trifft, es fluoresziert rot, wenn es auf dekondensierte DNA trifft. Es können als Färbeergebnis die Farben grün, gelb, orange und rot beobachtet werden. Je dekondensierter das Chromatin vorhanden ist, desto mehr tendiert der Fluoreszenzton in Richtung der Rottöne. Eine Abnahme grüner Fluoreszenz ist somit ein Merkmal, welches auf Strangbrüche der DNA deuten kann.

#### 3.10.1 Reagenzien

*Fixierlösung:*

- Methanol (CH<sub>3</sub>OH)
- Essigsäure (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

*Färbelösung:*

- Stammlösung (30 mg Acridinorange in 30 ml destilliertem Wasser)
- 0.1 M Zitronensäurelösung (2.304 g Zitronensäure in 120 ml destilliertem Wasser)
- 0.3 M Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat-Lösung (0.318 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in 7.5 ml destilliertem Wasser)

*Weitere Reagenzien:*

- Destilliertes Wasser
- Glycerin

### **3.10.2 Durchführung**

Die Objektträger wurden für mindestens 2 Stunden in einer Lösung, bestehend aus 3 Teilen Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) und 1 Teil Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), fixiert.

Danach trockneten die Ausstriche einige Minuten.

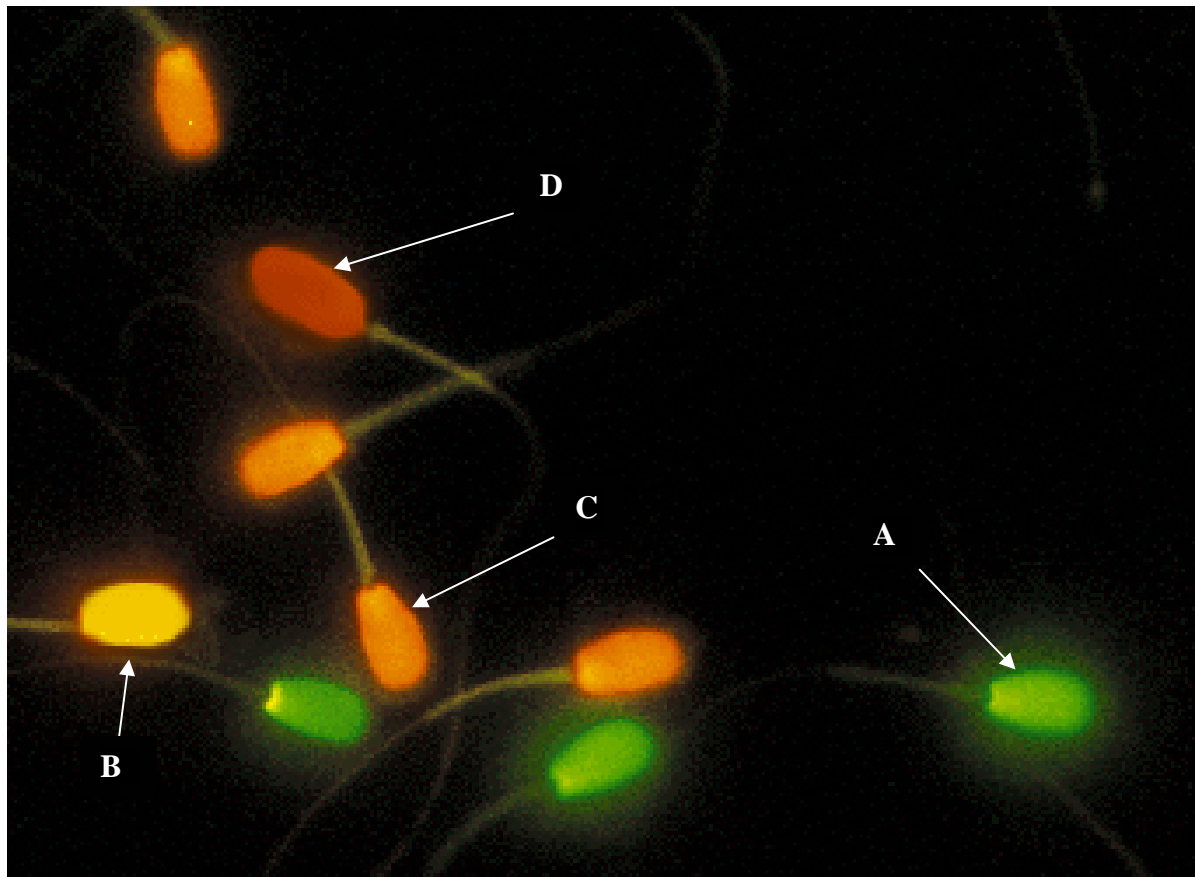
Nun erfolgte die Färbung mit der oben beschriebenen Färbelösung in einer abgedunkelten Kammer, da die Fluoreszenzbestandteile lichtempfindlich sind.

Nach ca. 5 min wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 1 Tropfen Glycerin und einem Deckgläschen eingedeckt. Auch diese Arbeitsschritte wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

### **3.10.3 Beurteilung**

Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 100 facher Vergrößerung. 100 Spermatozoen pro Objektträger wurden jeweils den Gruppen „Grün“, „Gelb“, „Orange“ und „Rot“ zugeordnet (Abb. 3.18). Spermien mit orangefarbener und roter Fluoreszenz wurden als dekondensiert/geschädigt gewertet und gingen in die Berechnungen ein.

### 3.10.4 Beispiele



**Abb 3.18** Färbung von Spermatozoen mit Acridin-Orange A: grünfluoreszierend bei starker Kondensation, B: gelbfluoreszierend bei dezenter Dekondensation, C: orangefluoreszierend bei stärkerer Dekondensation, D: rotfluoreszierend bei kompletter Dekondensation.

### 3.11 Anilin-Blau (Chromatinkondensation)

Die Anilin-Blau-Färbung wurde als zweite Methode zur Beurteilung der Chromatinkondensation im Spermatozonenkopf herangezogen. Auch hier kommt es zur Anlagerung des Farbstoffes an das Chromatin, das je nach Kondensationsgrad entweder dicht oder weniger dicht gepackt im Spermatozonenkopf vorliegt [Terquem und Dadoune].

### **3.11.1 Reagenzien**

*Fixierlösung:*

- 3%ige Glutaraldehydlösung (Glutaraldehyd in PBS)

*Färbelösung:*

- Anilinblau-Lösung (7.5 g in 150 ml PBS-Lösung)
- 10%ige Essigsäure

*Weitere Reagenzien:*

- 10 mM PBS-Lösung
- Entellan

### **3.11.2 Durchführung**

Zur Herstellung der Anilin-Blau-Lösung wurden die entsprechenden Mengen Anilinpulver und PBS-Puffer auf einer Kochplatte zum Sieden gebracht. Das Kochen ist nötig, um eine homogene Lösung zu erhalten und somit Kristallisationen auf den Objektträgern zu vermeiden. Nach dem Aufkochen wurde die Lösung abgekühlt und zum Schluss gefiltert, um eventuell vorhandene Restkristalle zu entfernen. Die Einstellung auf einen pH-Wert von 3.5 erfolgte mit der 10%igen Essigsäure.

Die vorbereiteten Objektträger wurden in einem ersten Arbeitsschritt für 30 min in der 3%igen Glutaraldehydlösung fixiert.

Nun folgte die Färbung der Ausstriche in der Anilinlösung für 7 bis 10 min. Anschließend wurden sie in PBS-Puffer 4-mal gewaschen, sodass überschüssiger Farbstoff entfernt wurde.

Die kurz angetrockneten Objektträger sind mit Entellan und einem Deckgläschen eingedeckt worden.

### **3.11.3 Beurteilung**

Die Beurteilung der gefärbten Ausstriche erfolgte unter dem Mikroskop mit 100 facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Dazu wurden pro Objektträger 100 Spermien den folgenden vier Gruppen zugeteilt:



Gruppe 1 → 0 – 25 % des Kopfes sind gefärbt

Gruppe 2 → 25 – 50 % des Kopfes sind gefärbt

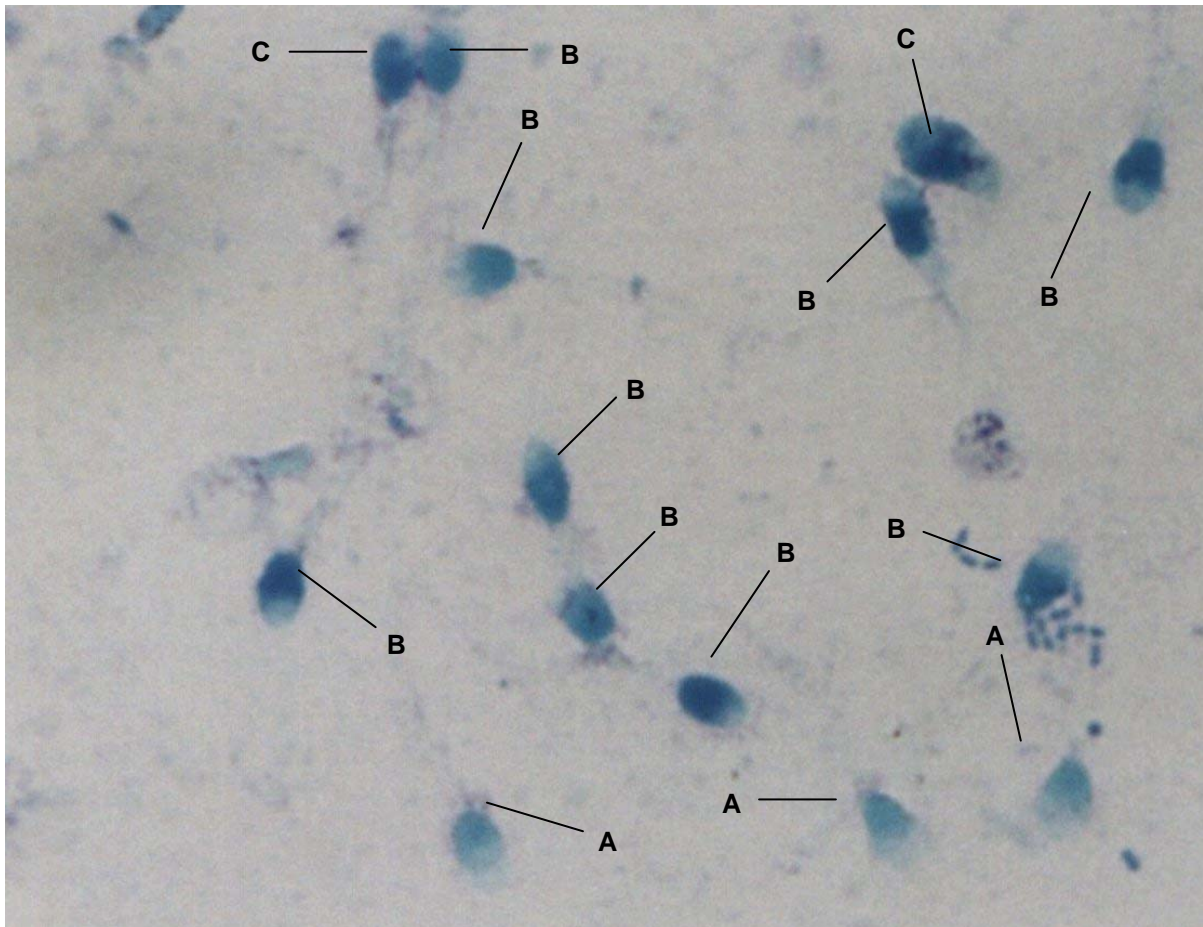
Gruppe 3 → 50 – 75 % des Kopfes sind gefärbt

Gruppe 4 → 75 – 100 % des Kopfes sind gefärbt.

Als dekondensiert wurden die Spermien mit 50 bis 100 % Färbung des Kopfes (Gruppen 3 und 4) gewertet und für die Berechnungen herangezogen.

Beispiele für die Ergebnisse der Anilin-Färbung sind in Abb. 3.19 dargestellt.

## 3.11.4 Beispiele



**Abb 3.19** Färbung von Spermatozoen mit Anilin-Blau zur Beurteilung der Chromatinkondensation. A: 50%ige Färbung des Spermatozoenkopfes; B: 75%ige Färbung des Spermatozoenkopfes; C: 100%ige Färbung des Spermatozoenkopfes; keine Anfärbung bzw. 25%ige Färbung des Spermatozoenkopfes sind in diesem Präparat nicht vorhanden.

### 3.12 Einteilung der Proben

Für die Einteilung der Proben in fertil und subfertil lagen folgende Parameter zugrunde gelegt:

#### Fertile Proben:

1.  $\geq 20$  Mio. Spermien/ml
2.  $\geq 14$  % normale Morphologie [*Kruger et al.*]
3.  $< 50$  % Eosin positiv
4.  $\geq 50$  % HOS positiv
5.  $< 25$  % grün bis gelb gefärbte Spermienköpfe bei Acridin-Orange-Färbung.

Alle Proben, deren Werte außerhalb der o. g. Bereiche lagen, wurden als subfertil eingestuft.

### 3.13 Statistische Auswertung

Die Variablen der Proben waren nicht symmetrisch verteilt. Daher wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test zum Vergleich der Parameter verwandt. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen ermittelt worden. Die Signifikanzen der Differenzen wurden als p-Werte (Signifikanzwerte) berechnet, wobei p-Werte  $\leq 0.05$  als signifikant einzustufen sind.

# 4 Ergebnisse

---

## **4.1 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen - ohne und unter Berücksichtigung der Fertilität**

Im folgenden Abschnitt 4.1 sind die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen mit und unter Berücksichtigung der Fertilität aufgeführt. In Unterabschnitt 4.1.1 wurden die Werte ohne Berücksichtigung der Fertilität bearbeitet. Unterabschnitt 4.1.2 zeigt die Auswertung ausschließlich der fertilen Proben und 4.1.3 ausschließlich der subfertilen Proben auf.

### **4.1.1 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität**

In Tab. 4.1 ist der Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen wiedergegeben. Es gingen hierbei alle Proben, ohne Berücksichtigung der Fertilität, in die Berechnungen ein.

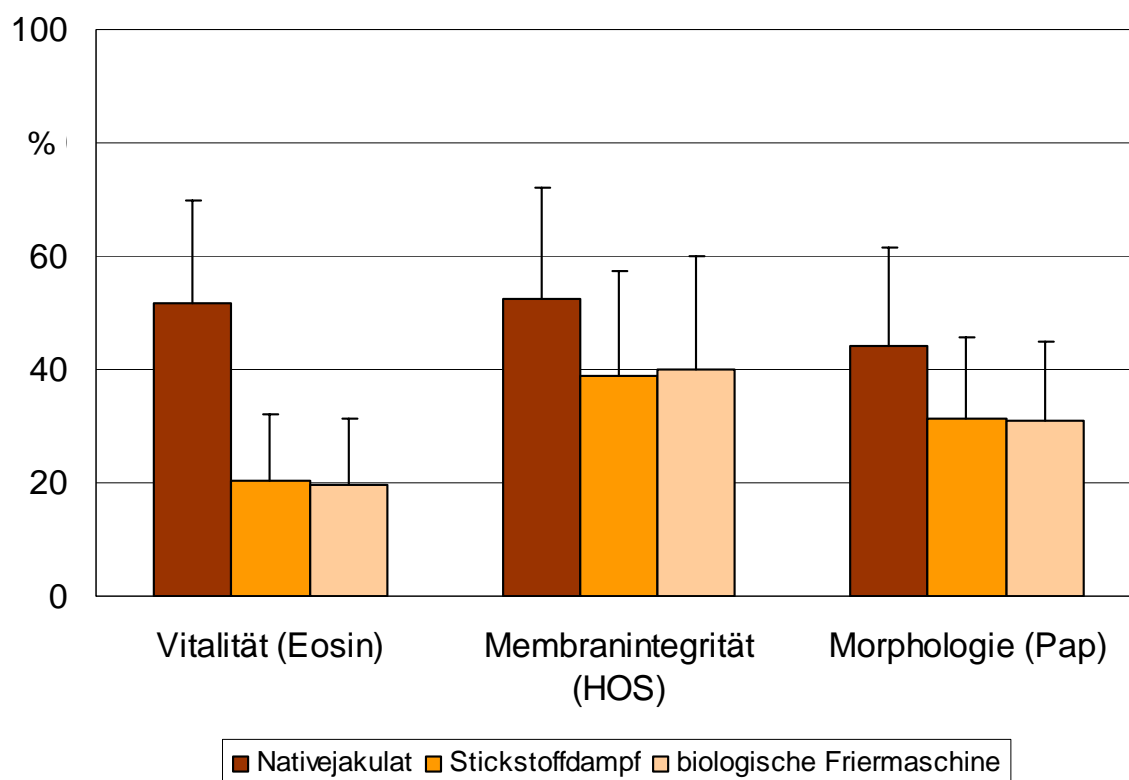
**Tab. 4.1** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 75)</b>	51.79 ± 17.94	20.39 ± 11.75	19.59 ± 11.85
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n=75)</b>	52.37 ± 19.63	38.72 ± 18.46	39.84 ± 20.06
<b>Morphologie (Pap; n = 75)</b>	44.0 ± 17.55	31.24 ± 14.43	30.8 ± 14.24

In Bezug auf die Vitalität (Eosin-Test) der Spermatozoen sanken die Werte von  $51.79 \pm 17.94$  % in der Nativejakulatgruppe um 31.40 Prozentpunkte auf  $20.39 \pm 11.75$  % nach Kryokonservierung mit Stickstoffdampf und um 32.20 Prozentpunkte auf  $19.59 \pm 11.85$  % in der mit der biologischen Friermaschine bearbeiteten Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Kryogruppen betrug nur 0.8 Prozentpunkte.

Die Beurteilung der Membranintegrität mit dem HOS-Test zeigte einen Abfall von  $52.37 \pm 19.63$  % in Gruppe I auf  $38.72 \pm 18.46$  % in der Gruppe II und  $39.84 \pm 20.06$  % in Gruppe III. Auch hier war der Unterschied zwischen Gruppe II und III mit 1.12 Prozentpunkten gering.

Im Rahmen der Papanicolaou-Färbung zur Bestimmung der Spermatozoen mit normaler Morphologie lag der Mittelwert  $\pm$  SD in der Nativejakulatgruppe bei  $44.0 \pm 17.55$  %. Er fiel auf  $31.24 \pm 14.43$  % in Gruppe II und auf  $30.8 \pm 14.24$  % in Gruppe III. Der Unterschied zwischen den Gruppen II und III lag hier bei nur 0.44 Prozentpunkten.



**Abb. 4.1** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen

In Abb. 4.1 ist der Rückgang der Werte bei Verwendung der drei genannten Methoden in Bezug auf die Vitalität, Membranintegrität und Morphologie zwischen der Gruppe I und den beiden Kryogruppen II und III deutlich erkennbar. Während beim HOS-Test die Maschine einen geringeren Abfall der Werte zeigte, fielen beim Vergleich der Gruppen II und III beim Eosin-Test und der PAP-Färbung niedrigere Werte für die Maschine auf.

**Tab. 4.2** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou)

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 75)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.358
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n = 75)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.167
<b>Morphologie (Pap; n = 75)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.700

In Tab. 4.2 errechneten sich für alle drei Methoden zwischen Gruppe I und Gruppe II sowie zwischen Gruppe I und Gruppe III mit  $p > 0.0001$  hoch signifikante Differenzen. Werte, die das Signifikanzniveau nicht erreichten, ergaben sich zwischen den beiden Kryogruppen (Gr. II - III) mit 0.358 im Eosin-Test mit 0.167 im HOS-Test und mit 0.700 in der PAP-Färbung.

Tab. 4.3 zeigt eine detaillierte Auflistung der einzelnen Untergruppen morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen in Bezug auf ihre Abweichungen zwischen den einzelnen Kryogruppen.

**Tab. 4.3** Einfluss der Kryotechnik auf die morphologischen Veränderungen von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 75; M±SD)

		<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Kopfabnormalitäten</b>	<b>normal</b>	44.0 ± 17.55	31.24 ± 14.43	30.8 ± 14.24
	<b>amorph</b>	13.91 ± 11.7	16.84 ± 11.27	16.28 ± 11.5
	<b>hyper</b>	1.99 ± 3.38	1.53 ± 2.61	1.44 ± 2.19
	<b>hypo</b>	4.93 ± 6.49	2.79 ± 4.04	3.27 ± 3.97
	<b>elongiert</b>	1.33 ± 2.35	0.77 ± 1.48	0.88 ± 1.59
	<b>doppelt</b>	0.41 ± 0.84	0.24 ± 0.65	0.17 ± 0.50
<b>Kopf normal, sonst abnormal</b>		3.90 ± 3.67	7.45 ± 4.45	6.56 ± 3.98
<b>Nacken und Mittelstück</b>		17.04 ± 9.90	25.47 ± 9.21	25.19 ± 9.79
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	3.04 ± 2.14	3.44 ± 2.11	4.47 ± 2.69
	<b>loose heads</b>	1.16 ± 1.43	1.16 ± 1.40	1.57 ± 1.45
	<b>cytoplasmat. Abnormalität</b>	8.29 ± 5.16	9.07 ± 5.39	9.37 ± 5.19

Wie bereits in Tab. 4.1 dargestellt, lag der Mittelwert der als morphologisch normal einzustufenden Spermatozoen bei 44.0 % und fiel in Gruppe II auf 31.24 % und in Gruppe III auf 30.8 %.

In der Gruppe der Kopfabnormalitäten stieg der Anteil der amorphen Spermatozoen von 13.91 ± 11.7 % auf 16.84 ± 11.27 % in Gruppe II und 16.28 ± 11.5 % in Gruppe III. Die Differenz zwischen Gruppe II und III lag somit bei 0.56 Prozentpunkten. Der Anteil der Spermatozoen mit vergrößerten Köpfen (hyper) lag in Gruppe I bei 1.99 ± 3.38 %. Er sank in Gruppe II um 0.46 Prozentpunkte auf 1.53 ± 2.61 % und in Gruppe III um 0.55 Prozentpunkte auf 1.44 ± 2.19 %. Die Spermien mit zu geringer Kopfgröße (hypo) verringerten ihren Mittelwert von Gruppe I mit 4.93 ± 6.49 % zu Gruppe II mit 2.79 ± 4.04 % um 2.14 Prozentpunkte und zu Gruppe III mit 3.27 ± 3.97 % um 1.66 Prozentpunkte. Die Spermien



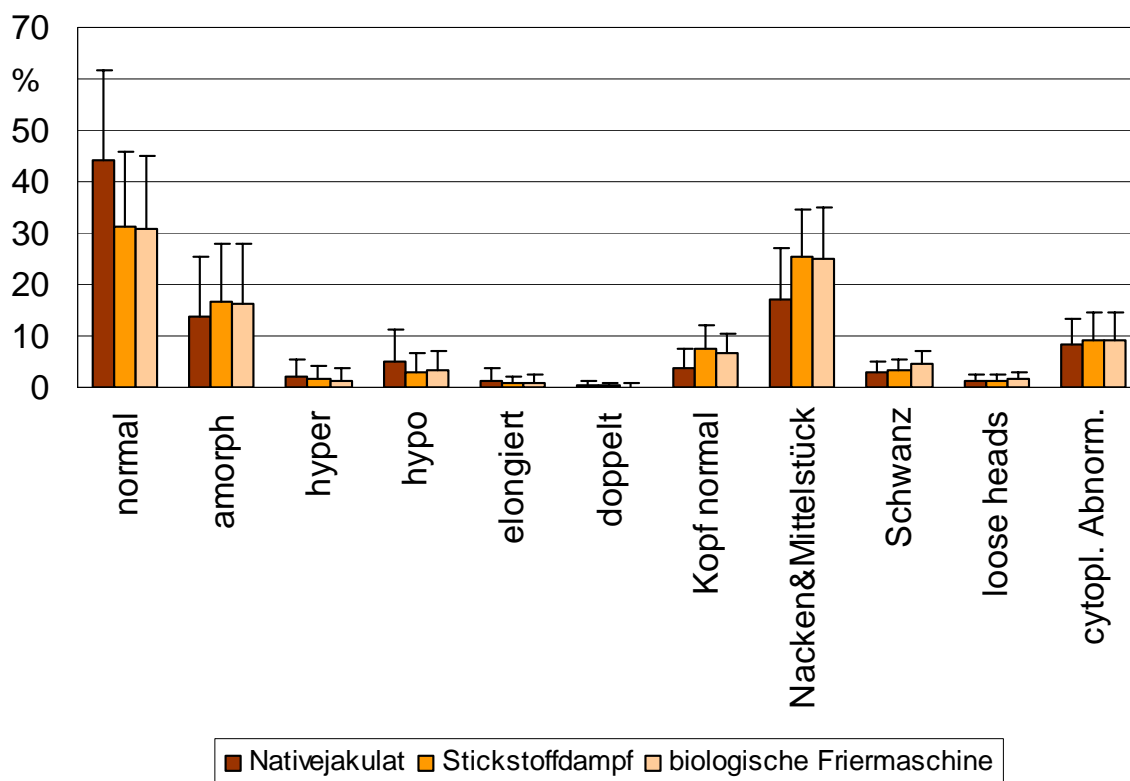
mit elongierten Köpfen hatten in Gruppe I einen Mittelwert von  $1.33 \pm 2.35$  %. Dieser Wert sank in Gruppe II auf  $0.77 \pm 1.48$  % und in Gruppe III auf  $0.88 \pm 1.59$  %. Der Mittelwert der Spermien mit doppelten Köpfen lag in Gruppe I bei  $0.41 \pm 0.84$  %. In Gruppe II sank er auf  $0.24 \pm 0.65$  % und in Gruppe III auf  $0.17 \pm 0.50$  %.

Der Anteil der Spermien, deren Kopf als normal gewertet werden konnte, aber deren sonstige Veränderungen keiner der weiteren Gruppen zugeordnet werden konnte, lag im Nativejakulat bei  $3.90 \pm 3.67$  %. Im Vergleich dazu lagen die Werte in Gruppe II ( $7.45 \pm 4.45$  %) und in Gruppe III ( $6.56 \pm 3.98$  %) deutlich höher.

Die größte Steigerung des Mittelwertes fand sich allerdings bei den Spermien, die Veränderungen im Bereich des Nackens und des Mittelstücks aufwiesen. Im Vergleich zu Gruppe I ( $17.04 \pm 9.90$  %) stieg der Wert um 8.43 Prozentpunkte auf  $25.47 \pm 9.21$  % in Gruppe II und um 8.15 Prozentpunkte auf  $25.19 \pm 9.79$  %. Zwischen Gruppe II und Gruppe III lag lediglich eine Differenz von 0.28 Prozentpunkten.

In die letzte Kategorie wurden Abnormalitäten im Bereich des Schwanzes, abgetrennte Köpfe (loose heads) und cytoplasmatische Veränderungen eingeteilt. In Gruppe I lag der Mittelwert der Spermien mit Deformationen im Bereich des Schwanzes bei  $3.04 \pm 2.14$  %. Dieser stieg nur minimal auf  $3.44 \pm 2.11$  % in Gruppe II und  $4.47 \pm 2.69$  % in Gruppe III. Für die Spermatozoen mit abgetrennten Köpfen ergab sich ein Mittelwert von  $1.16 \pm 1.43$  % in der Gruppe I. Der gleiche Wert errechnete sich für Gruppe II ( $1.16 \pm 1.40$  %). In Gruppe III stieg der Mittelwert auf  $1.57 \pm 1.45$  %. Die Spermatozoen mit cytoplasmatischen Veränderungen wiesen in Gruppe I einen Wert von  $8.29 \pm 5.16$  % auf und stiegen in Gruppe II nur minimal auf  $9.07 \pm 5.39$  %. Der Anstieg in Gruppe III war im Vergleich zu Gruppe II stärker. Der Mittelwert lag hier bei  $9.37 \pm 5.19$  %.

Abb. 4.2 zeigt die einzelnen morphologischen Veränderungen vor und nach der Kryokonservierung.



**Abb. 4.2** Einfluss der Kryotechnik auf die einzelnen morphologischen Veränderungen von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou ( $n = 75$ ;  $M \pm SD$ )

Man sieht in der grafischen Darstellung deutlich den Rückgang der Spermien mit normalen morphologischen Kriterien in den beiden Kryogruppen im Vergleich zur Nativgruppe. Zwischen den Gruppen II und III ist allerdings kein großer Unterschied zu erkennen. In Tabelle 4.4 ist dies auch anhand des nicht signifikanten p-Wertes von 0.7 zu sehen.

Stärkere Bewegungen zwischen den Gruppen I, II und III sind vor allem im Bereich der Spermien mit amorphen Veränderungen, Spermien mit normalen Köpfen aber sonstigen Abnormalitäten sowie Spermien mit Abweichungen von der Norm im Bereich von Nacken und Mittelstück ersichtlich.

In Tab. 4.4 sind die Signifikanzen der Differenzen der einzelnen morphologischen Veränderungen zwischen den Gruppen I, II und III aufgeführt.

**Tab. 4.4** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die morphologischen Veränderungen von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 75)

		<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>Kopfnormalitäten</b>	<b>normal</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.7
	<b>amorph</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.32
	<b>hyper</b>	0.08	<i>0.03</i>	0.93
	<b>hypo</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.087
	<b>elongiert</b>	<i>0.005</i>	<i>0.005</i>	0.3
	<b>doppelt</b>	<i>0.04</i>	<i>0.01</i>	0.51
<b>Kopf normal, sonst abnormal</b>		<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.03</i>
<b>Nacken und Mittelstück</b>		<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.47
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	<i>0.04</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.005</i>
	<b>loose heads</b>	0.79	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>
	<b>cytoplasmat. Abnormalität</b>	0.07	<i>0.001</i>	0.43

Man erkennt fast ausschließlich signifikante bis hoch signifikante p-Werte zwischen den Gruppen I - II und I - III in den einzelnen Sparten der morphologischen Veränderungen. Allerdings waren die Differenzen in den Sparten „hyper“, „loose heads“ und „cytoplasmatische Abnormalitäten“ der Gr. I - II nicht signifikant.

Der Vergleich der Gr. II - III zeigte hingegen in fast allen Sparten mit einem p-Wert >0.05 Ergebnisse im nicht signifikanten Bereich. Ausnahmen stellten hier die Änderung der Spermien mit normalen Köpfen aber sonstigen Abnormalitäten, mit Abnormalitäten im Bereich des Schwanzes sowie Spermien mit abgetrennten Köpfen dar. Hier lagen die Signifikanzwerte bei 0.03, 0.005 und 0.01.

#### 4.1.2 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender

In Tab. 4.5 ist der Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen wiedergegeben. Es gingen nur die Proben *fertiler* Spender in die Berechnungen ein.

**Tab. 4.5** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) auf menschliche Spermatozoen von *fertilen* Spendern

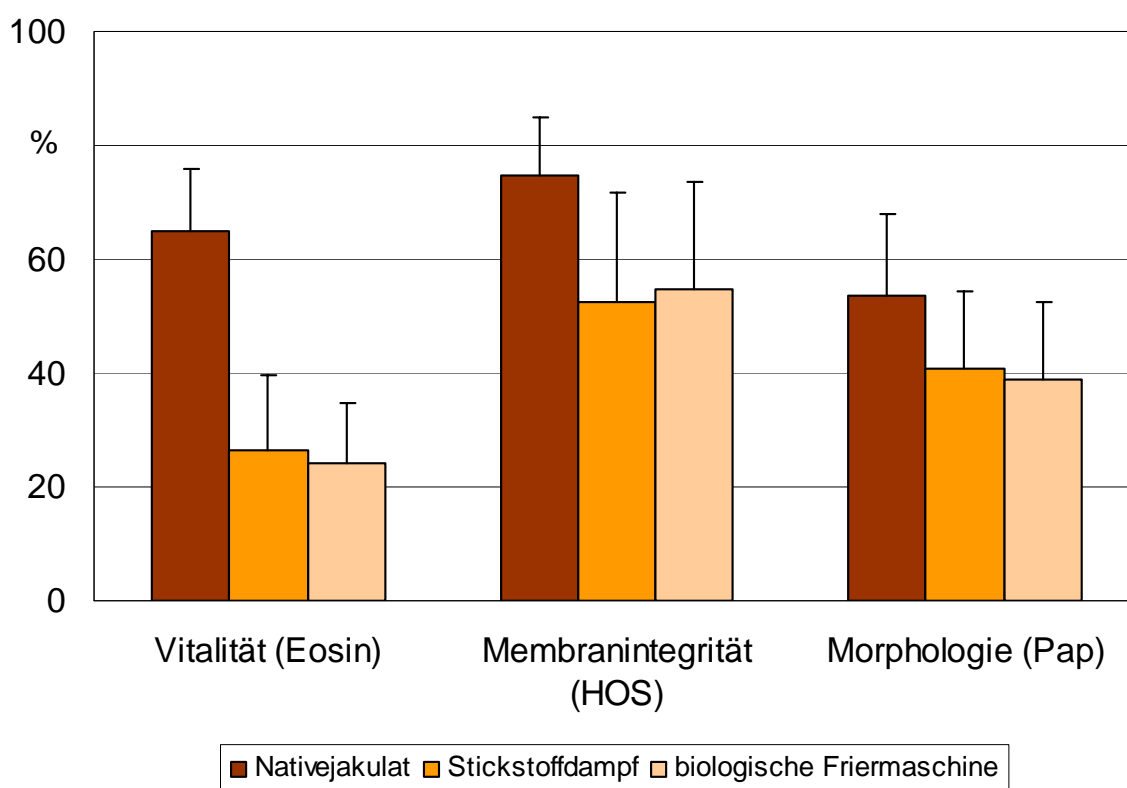
	Nativejakulat (Gr. I)	Stickstoffdampf (Gr. II)	biologische Friermaschine (Gr. III)
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 12)</b>	64.83 ± 10.97	26.50 ± 13.18	24.33 ± 10.49
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n=12)</b>	74.67 ± 10.07	52.58 ± 19.16	54.67 ± 18.87
<b>Morphologie (PAP; n = 12)</b>	53.75 ± 14.18	40.58 ± 13.75	38.75 ± 13.75

In Bezug auf die Vitalität (Eosin-Test) der Spermien sanken die Werte von  $64.83 \pm 10.97$  % in der Nativejakulatgruppe um 38.33 Prozentpunkte auf  $26.50 \pm 13.18$  % nach Kryokonservierung mit Stickstoffdampf und um 40.50 Prozentpunkte auf  $24.33 \pm 10.49$  % in der mit der biologischen Friermaschine bearbeiteten Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Kryogruppen betrug nur 2.17 Prozentpunkte.

Die Beurteilung der Membranintegrität mit dem HOS-Test zeigte einen Abfall von  $74.67 \pm 10.07$  % in Gruppe I auf  $52.58 \pm 19.16$  % in der Gruppe II und  $54.67 \pm 18.87$  % in Gruppe III. Hier betrug der Unterschied zwischen Gruppe II und Gruppe III 2.09 Prozentpunkte.

Im Rahmen der Papanicolaou-Färbung zur Bestimmung der Spermatozoen mit normaler Morphologie lag der Mittelwert  $\pm$  SD in der Nativejakulatgruppe bei  $53.75 \pm 14.18$  %. Er fiel auf  $40.58 \pm 13.75$  % in Gruppe II und  $38.75 \pm 13.75$  % in Gruppe III. Der Unterschied zwischen den Gruppen II und III lag hier bei 1.83 Prozentpunkten.

In Abb. 4.3 ist der Rückgang der Werte bei Verwendung der drei genannten Methoden in Bezug auf die Vitalität, Membranintegrität und Morphologie zwischen der Gruppe I und den beiden Kryogruppen II und III erkennbar.



**Abb. 4.3** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) auf menschliche Spermatozoen von *fertilen* Spendern

Während beim HOS-Test die Maschine einen geringeren Abfall der Werte zeigte, fielen beim Vergleich der Gruppen II und III beim Eosin-Test und der PAP-Färbung niedrigere Werte für die Maschine auf.

**Tab. 4.6** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) von *fertilen* Spendern

	Gr. I - Gr. II	Gr. I - Gr. III	Gr. II - Gr. III
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 12)</b>	0.002	0.002	0.35
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n = 12)</b>	0.002	0.002	0.18
<b>Morphologie (Pap; n = 12)</b>	0.02	0.007	0.47

In Tab. 4.6 errechneten sich für alle drei Methoden zwischen Gruppe I und Gruppe II sowie zwischen Gruppe I und Gruppe III signifikante Differenzen. Werte, die das Signifikanzniveau nicht erreichten, ergaben sich zwischen den beiden Kryogruppen (Gr. II - III) mit 0.35 im Eosin-Test, mit 0.18 im HOS-Test und mit 0.47 in der PAP-Färbung.

Tab. 4.7 zeigt eine detaillierte Auflistung der einzelnen Untergruppen morphologischer Veränderungen menschlicher Spermien *fertiler* Spender in Bezug auf ihre Abweichungen zwischen den einzelnen Kryogruppen.

**Tab. 4.7** Einfluss der Kryotechnik auf die Morphologie von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 12; M±SD)

		<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Kopfabnormalitäten</b>	<b>normal</b>	53.75 ± 14.18	40.58 ± 13.75	38.75 ± 13.75
	<b>amorph</b>	9.0 ± 5.49	11.33 ± 5.18	12.33 ± 6.77
	<b>hyper</b>	2.42 ± 3.32	2.08 ± 1.93	2.0 ± 2.13
	<b>hypo</b>	3.67 ± 5.25	1.25 ± 1.14	1.75 ± 2.14
	<b>elongiert</b>	0.83 ± 1.75	0.42 ± 0.79	0.75 ± 1.42
	<b>doppelt</b>	0 ± 0	0.17 ± 0.39	0.08 ± 0.29
<b>Kopf normal, sonst abnormal</b>		3.58 ± 2.31	8.67 ± 3.94	7.92 ± 4.89
<b>Nacken und Mittelstück</b>		14.5 ± 8.16	21.75 ± 5.07	21.17 ± 3.9
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	2.83 ± 2.52	3.75 ± 2.34	3.92 ± 3.23
	<b>loose heads</b>	1.42 ± 1.5	1.42 ± 1.68	1.67 ± 1.67
	<b>cytoplasmat. Abnormalität</b>	8.0 ± 4.95	8.58 ± 5.21	9.67 ± 5.74

Wie bereits in Tab. 4.5 dargestellt, lag der Mittelwert der als morphologisch normal einzustufenden Spermatozoen in der Gruppe der *fertilen* Spender bei 53.75 %, er fiel in Gruppe II auf 40.58 % und in Gruppe III auf 38.75 %.

In der Gruppe der Kopfabnormalitäten stieg der Anteil der amorphen Spermatozoen von 9.0 ± 5.49 % auf 11.33 ± 5.18 % in Gruppe II und 12.33 ± 6.77 % in Gruppe III. Die Differenz zwischen Gruppe II und Gruppe III lag somit bei 0.56 Prozentpunkten. Der Anteil der Spermatozoen mit vergrößerten Köpfen (hyper) lag in Gruppe I bei 2.42 ± 3.32 %. Er sank in Gruppe II um 0.34 Prozentpunkte auf 2.08 ± 1.93 % und in Gruppe III um 0.42 Prozentpunkte auf 2.0 ± 2.13 %. Die Spermien mit zu geringer Kopfgröße (hypo) verringerten ihren Mittelwert von Gruppe I mit 3.67 ± 3.32 % zu Gruppe II mit 1.25 ± 1.14 % um 2.42 Prozentpunkte und zu Gruppe III mit 1.75 ± 2.14 % um 1.92 Prozentpunkte. Die

Spermatozoen mit elongierten Köpfen hatten in Gruppe I einen Mittelwert von  $0.83 \pm 1.75$  %. Dieser Wert sank in Gruppe II auf  $0.42 \pm 0.79$  % und in Gruppe III auf  $0.75 \pm 1.42$  %. Der Mittelwert der Spermatozoen mit doppelten Köpfen lag in Gruppe I bei  $0 \pm 0$  %. In Gruppe II stieg er auf  $0.17 \pm 0.39$  % und in Gruppe III auf  $0.08 \pm 0.29$  %.

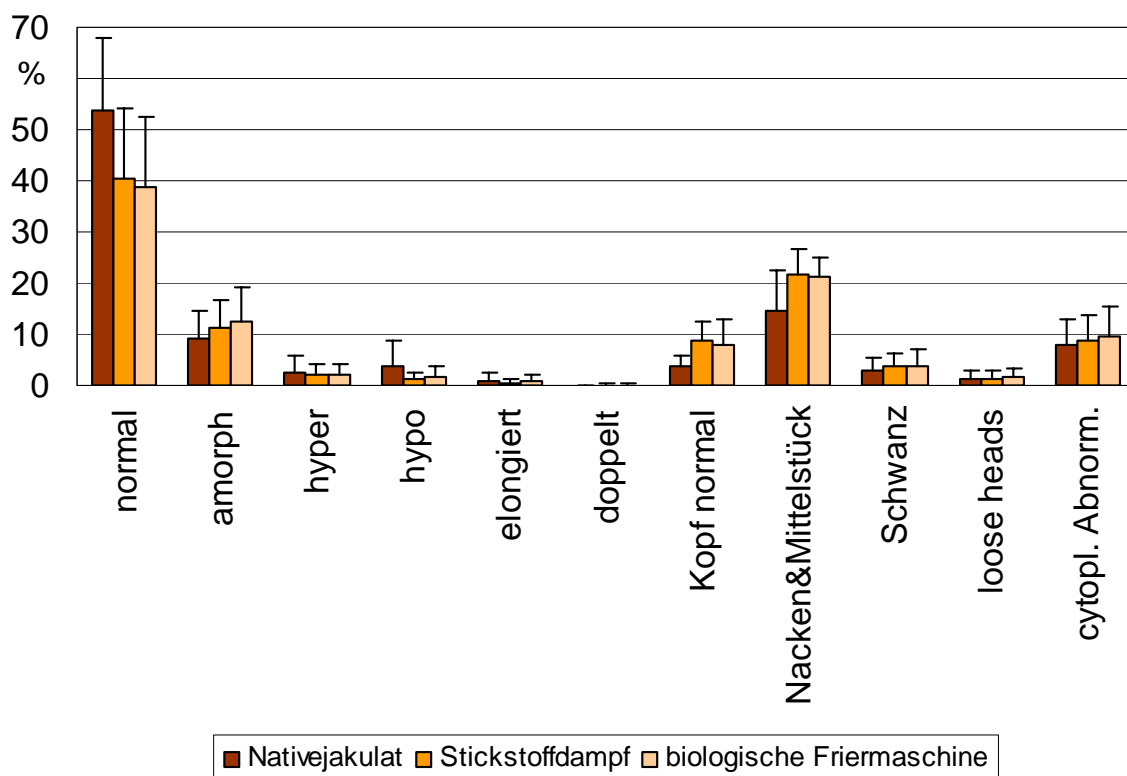
Der Anteil der Spermatozoen, deren Kopf als normal gewertet werden konnte, aber deren sonstige Veränderungen keiner der weiteren Gruppen zugeordnet werden konnte, lag im Nativejakulat bei  $3.58 \pm 2.31$  %. Im Vergleich dazu lagen die Werte in Gruppe II mit  $8.67 \pm 3.94$  % und in Gruppe III mit  $7.92 \pm 4.89$  % deutlich höher.

Die größte Steigerung des Mittelwertes fand sich allerdings bei den Spermien, welche Veränderungen im Bereich des Nackens und des Mittelstücks aufwiesen. Im Vergleich zu Gruppe I ( $14.5 \pm 8.16$  %) stieg der Wert um 7.25 Prozentpunkte auf  $21.75 \pm 5.07$  % in Gruppe II und um 6.67 Prozentpunkte auf  $21.17 \pm 3.9$  %. Zwischen Gruppe II und Gruppe III lag somit eine Differenz von 0.58 Prozentpunkten.

In die letzte Kategorie wurden Abnormalitäten im Bereich des Schwanzes, abgetrennte Köpfe (loose heads) und cytoplasmatische Veränderungen eingeteilt. In Gruppe I lag der Mittelwert der Spermatozoen mit Deformationen im Bereich des Schwanzes bei  $2.83 \pm 2.52$  %. Dieser stieg nur minimal auf  $3.75 \pm 2.34$  % in Gruppe II und auf  $3.92 \pm 3.23$  % in Gruppe III. Für die Spermatozoen mit abgetrennten Köpfen ergab sich ein Mittelwert von  $1.42 \pm 1.5$  % in der Gruppe I. Der gleiche Wert errechnete sich für Gruppe II ( $1.42 \pm 1.68$  %). In Gruppe III stieg der Mittelwert auf  $1.67 \pm 1.67$  %. Die Spermatozoen mit cytoplasmatischen Veränderungen wiesen in Gruppe I einen Wert von  $8.0 \pm 4.95$  % auf und stiegen in Gruppe II nur minimal auf  $8.58 \pm 5.21$  %. Der Anstieg in Gruppe III war im Vergleich zu Gruppe II stärker. Der Mittelwert lag hier bei  $9.67 \pm 5.74$  %.

Abb. 4.4 zeigt die einzelnen morphologischen Veränderungen vor und nach der Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern.





**Abb. 4.4** Einfluss der Kryotechnik auf die einzelnen morphologischen Veränderungen von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 12; M±SD)

Man sieht in der grafischen Darstellung deutlich den Rückgang der Spermatozoen mit normalen morphologischen Kriterien in den beiden Kryogruppen im Vergleich zur Nativgruppe. Zwischen den Gruppen II und III ist allerdings kein großer Unterschied zu erkennen. In Tab. 4.8 ist dies auch anhand des nicht signifikanten p-Wertes von 0.48 zu sehen.

Stärkere Bewegung zwischen den Gruppen I, II und III sind vor allem im Bereich der Spermien mit amorphen Veränderungen, Spermien mit normalen Köpfen aber sonstigen Abnormalitäten sowie Spermien mit Abweichungen von der Norm im Bereich von Nacken und Mittelstück ersichtlich.

In Tab. 4.8 sind die Signifikanzen der Differenzen der einzelnen morphologischen Veränderungen zwischen den Gruppen I, II und III aufgeführt.

**Tab. 4.8** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Morphologie von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 12)

		<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>Kopfabnormalitäten</b>	<b>normal</b>	<i>0.02</i>	<i>0.008</i>	0.48
	<b>amorph</b>	<i>0.04</i>	<i>0.03</i>	0.19
	<b>hyper</b>	0.79	0.40	0.89
	<b>hypo</b>	0.11	<i>0.03</i>	0.8
	<b>elongiert</b>	0.20	0.65	0.20
	<b>doppelt</b>	0.18	0.32	0.59
<b>Kopf normal, sonst abnormal</b>		<i>0.008</i>	<i>0.01</i>	0.31
<b>Nacken und Mittelstück</b>		<i>0.008</i>	<i>0.008</i>	0.78
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	0.14	0.13	0.53
	<b>loose heads</b>	0.83	0.55	0.35
	<b>cytoplasmat. Abnormalität</b>	0.51	<i>0.01</i>	0.51

Es errechneten sich signifikante bis hoch signifikante p-Werte zwischen den Gruppen I - II und I - III in den Sparten „normal“, „amorph“, „Kopf normal, sonst abnormal“ und „Nacken und Mittelstück“. In der Sparte der cytoplasmatischen Abnormalitäten ergab sich nur im Gruppenvergleich Gr. I - III mit  $p = 0.01$  eine signifikante Differenz. Die Differenzen zwischen den Gruppen II und III lagen alle mit p-Werten  $>0.05$  deutlich über dem Signifikanzniveau.

#### 4.1.3 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen subfertiler Spender

In Tab. 4.9 ist der Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen wiedergegeben. Es gingen nur die Proben subfertiler Spender in die Berechnungen ein.

**Tab. 4.9** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) auf menschliche Spermatozoen von subfertilen Spendern (n = 63; M±SD)

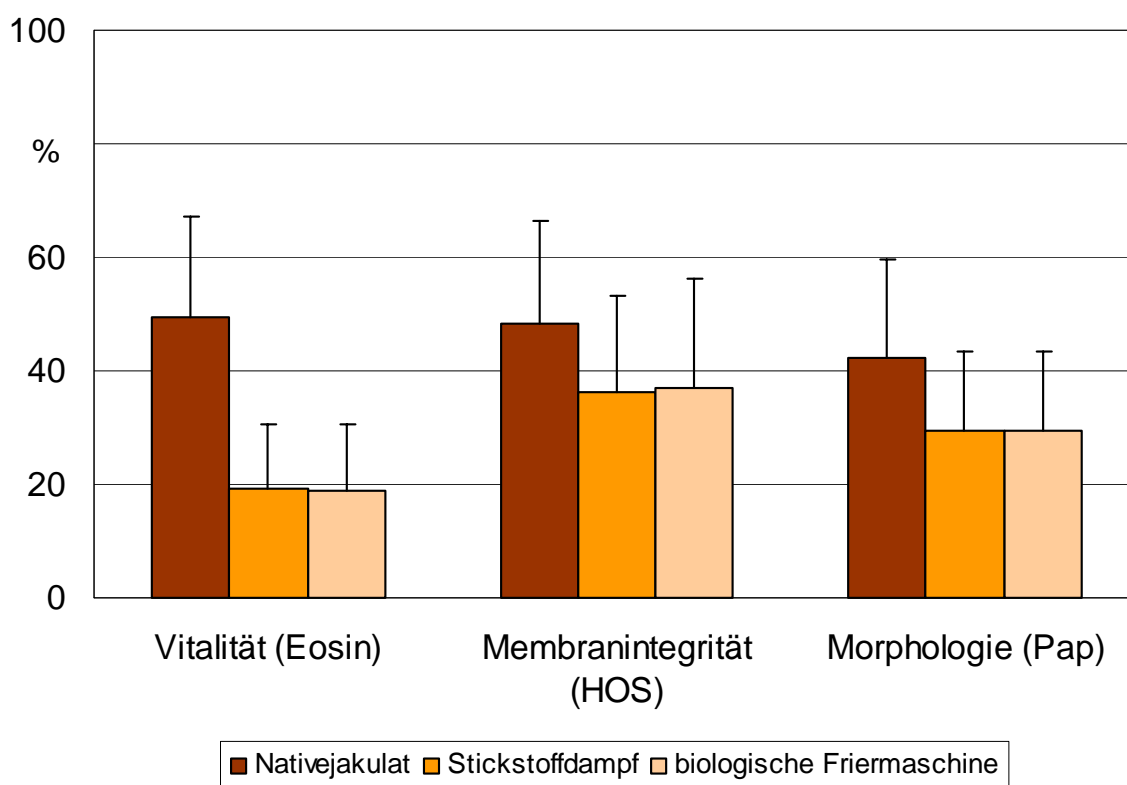
	Nativejakulat (Gr. I)	Stickstoffdampf (Gr. II)	biologische Friermaschine (Gr. III)
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 63)</b>	49.30 ± 17.99	19.22 ± 11.20	18.68 ± 11.96
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n = 63)</b>	48.13 ± 18.10	36.07 ± 17.25	37.02 ± 19.14
<b>Morphologie (PAP; n = 63)</b>	42.14 ± 17.61	29.46 ± 13.95	29.29 ± 13.93

In Bezug auf die Vitalität (Eosin-Test) der Spermatozoen sanken die Werte von  $49.30 \pm 17.99$  % in der Nativejakulatgruppe um 30.08 Prozentpunkte auf  $19.22 \pm 11.20$  % nach Kryokonservierung mit Stickstoffdampf und um 30.62 Prozentpunkte auf  $18.68 \pm 11.96$  % in der mit der biologischen Friermaschine bearbeiteten Gruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Kryogruppen betrug nur 0.54 Prozentpunkte.

Die Beurteilung der Membranintegrität mit dem HOS-Test zeigte einen Abfall von  $48.13 \pm 18.10$  % in Gruppe I, auf  $36.07 \pm 17.25$  % in Gruppe II und  $37.02 \pm 19.14$  % in Gruppe III. Hier war der Unterschied zwischen Gruppe II und Gruppe III 0.95 Prozentpunkte.

Im Rahmen der Papanicolaou-Färbung zur Bestimmung der Spermatozoen mit normaler Morphologie lag der Mittelwert  $\pm$  SD in der Nativejakulatgruppe bei  $42.14 \pm 17.61$  %. Er fiel auf  $29.46 \pm 13.95$  % in Gruppe II und  $29.29 \pm 13.93$  % in Gruppe III. Der Unterschied zwischen den Gruppen II und III lag hier bei nur 0.17 Prozentpunkten.

In Abb. 4.5 ist der Rückgang der Werte bei Verwendung der drei genannten Methoden in Bezug auf die Vitalität, Membranintegrität und Morphologie zwischen der Gruppe I und den beiden Kryogruppen II und III erkennbar.



**Abb. 4.5** Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) auf menschliche Spermatozoen von *subfertilen* Spendern

Während beim HOS-Test die Maschine einen geringeren Abfall der Werte zeigte, fielen beim Vergleich der Gruppen II und III beim Eosin-Test und der PAP-Färbung niedrigere Werte für die Maschine auf.

**Tab. 4.10** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) von *subfertilen* Spendern (n = 63; M±SD)

	Gr. I - Gr. II	Gr. I - Gr. III	Gr. II - Gr. III
<b>Vitalität (Eosin-Test; n = 63)</b>	<0.0001	<0.0001	0.53
<b>Membranintegrität (HOS-Test; n = 63)</b>	<0.0001	<0.0001	0.34
<b>Morphologie (PAP; n = 63)</b>	<0.0001	<0.0001	0.94

In Tab. 4.10 errechneten sich für alle drei Methoden zwischen Gruppe I und Gruppe II sowie zwischen Gruppe I und Gruppe III hoch signifikante Differenzen. Werte, die das Signifikanzniveau nicht erreichten, ergaben sich zwischen den beiden Kryogruppen (Gr. II - III) mit 0.53 im Eosin-Test, mit 0.34 im HOS-Test und mit 0.94 in der Pap-Färbung.

Tab. 4.11 zeigt eine detaillierte Auflistung der einzelnen Untergruppen morphologischer Veränderungen menschlicher Spermatozoen *subfertiler* Spender in Bezug auf ihre Abweichungen zwischen den einzelnen Kryogruppen.

**Tab. 4.11** Einfluss der Kryotechnik auf die Morphologie von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 63; M±SD)

		<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Kopfabnormalitäten</b>	<b>normal</b>	42.14 ± 17.61	29.46 ± 13.96	29.29 ± 13.93
	<b>amorph</b>	14.84 ± 12.35	17.89 ± 11.82	17.03 ± 12.09
	<b>hyper</b>	1.90 ± 3.41	1.43 ± 2.72	1.33 ± 2.2
	<b>hypo</b>	5.17 ± 6.71	3.08 ± 4.33	3.56 ± 4.18
	<b>elongiert</b>	1.43 ± 2.45	0.84 ± 1.58	0.90 ± 1.63
	<b>doppelt</b>	0.49 ± 0.9	0.25 ± 0.69	0.19 ± 0.53
<b>Kopf normal, sonst. abnormal</b>		3.95 ± 3.89	7.22 ± 4.53	6.3 ± 3.77
<b>Nacken und Mittelstück</b>		17.52 ± 10.18	26.17 ± 9.67	25.95 ± 10.39
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	3.08 ± 2.08	3.38 ± 2.07	4.57 ± 2.59
	<b>loose heads</b>	1.11 ± 1.43	1.11 ± 1.35	1.56 ± 1.42
	<b>Cytoplasm. Abnormalität</b>	8.35 ± 5.23	9.16 ± 5.45	9.32 ± 5.13

Wie bereits in Tab. 4.9 dargestellt, lag der Mittelwert der als morphologisch normal einzustufenden Spermatozoen in der Gruppe der *subfertilen* Spender bei  $42.14 \pm 17.61$  %, er fiel in Gruppe II auf  $29.46 \pm 13.96$  % und in Gruppe III auf  $29.29 \pm 13.93$  %.

In der Gruppe der Kopfabnormalitäten stieg der Anteil der amorphen Spermatozoen von  $14.84 \pm 12.35$  % auf  $17.89 \pm 11.82$  % in Gruppe II und  $17.03 \pm 12.09$  % in Gruppe III. Die Differenz zwischen Gruppe II und III lag somit bei 0.86 Prozentpunkten. Der Anteil der Spermatozoen mit vergrößerten Köpfen (hyper) lag in Gruppe I bei  $1.90 \pm 3.41$  %. Er sank in Gruppe II um 0.47 Prozentpunkte auf  $1.43 \pm 2.72$  % und in Gruppe III um 0.57 Prozentpunkte auf  $1.33 \pm 2.2$  %. Die Spermien mit zu geringer Kopfgröße (hypo) verringerten ihren Mittelwert von Gruppe I mit  $5.17 \pm 6.71$  % zu Gruppe II mit  $3.08 \pm 4.33$  % um 2.09 Prozentpunkte und zu Gruppe III mit  $3.56 \pm 4.18$  % um 1.61 Prozentpunkte. Die

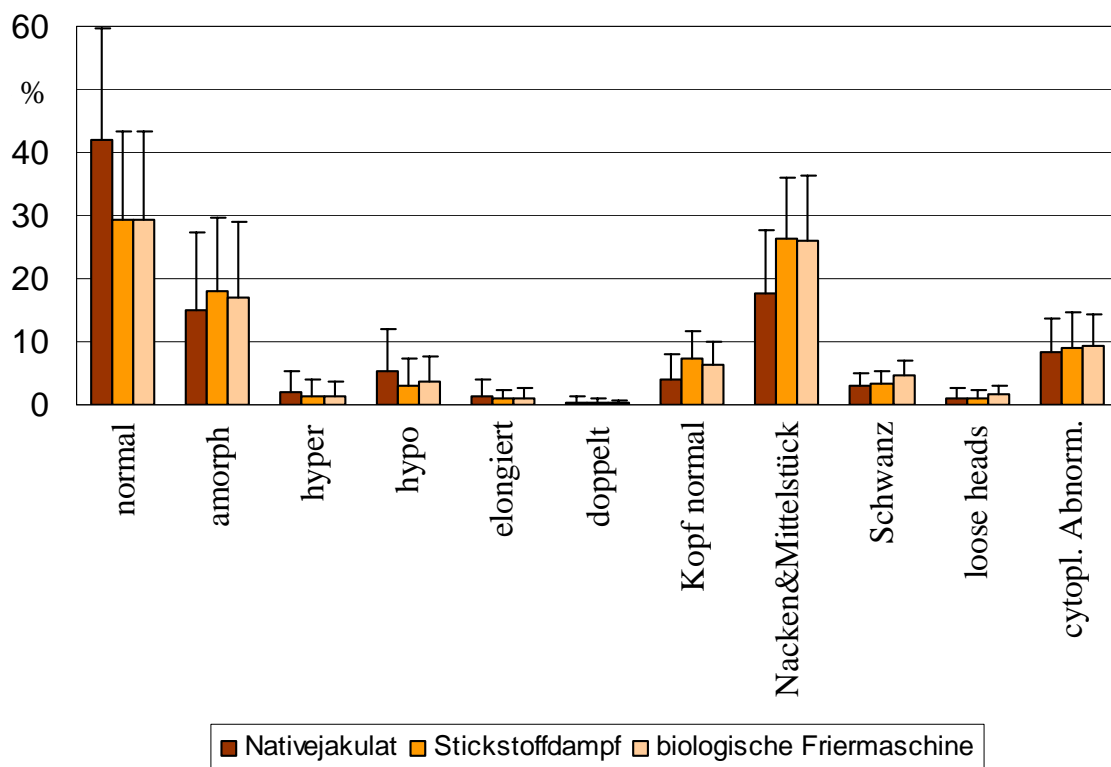
Spermatozoen mit elongierten Köpfen hatten in Gruppe I einen Mittelwert von  $1.43 \pm 2.45$  %. Dieser Wert sank in Gruppe II auf  $0.84 \pm 1.58$  % und in Gruppe III auf  $0.90 \pm 1.63$  %. Der Mittelwert der Spermatozoen mit doppelten Köpfen lag in Gruppe I bei  $0.49 \pm 0.9$  %. In Gruppe II fiel er auf  $0.25 \pm 0.69$  % und in Gruppe III auf  $0.19 \pm 0.53$  %.

Der Anteil der Spermatozoen, deren Kopf als normal gewertet werden konnte, aber deren sonstige Veränderungen keiner der weiteren Gruppen zugeordnet werden konnte, lag im Nativejakulat bei  $3.95 \pm 3.89$  %. Im Vergleich dazu lagen die Werte in Gruppe II mit  $7.22 \pm 4.53$  % und in Gruppe III mit  $6.3 \pm 3.77$  % deutlich höher.

Die größte Steigerung des Mittelwertes fand sich allerdings bei den Spermien, welche Veränderungen im Bereich des Nackens und des Mittelstücks aufwiesen. Im Vergleich zu Gruppe I ( $17.52 \pm 10.18$  %) stieg der Wert um 8.65 Prozentpunkte auf  $26.17 \pm 9.67$  % in Gruppe II und um 8.43 Prozentpunkte auf  $25.95 \pm 10.39$  %. Zwischen Gruppe II und III lag somit eine Differenz von 0.22 Prozentpunkten.

In die letzte Kategorie wurden Abnormalitäten im Bereich des Schwanzes, abgetrennte Köpfe (loose heads) und cytoplasmatische Veränderungen eingeteilt. In Gruppe I lag der Mittelwert der Spermatozoen mit Deformationen im Bereich des Schwanzes bei  $3.08 \pm 2.08$  %. Dieser stieg nur minimal auf  $3.38 \pm 2.07$  % in Gruppe II und  $4.57 \pm 2.59$  % in Gruppe III. Für die Spermatozoen mit abgetrennten Köpfen ergab sich ein Mittelwert von  $1.11 \pm 1.43$  % in der Gruppe I. Der gleiche Wert errechnete sich für Gruppe II ( $1.11 \pm 1.35$  %). In Gruppe III stieg der Mittelwert auf  $1.56 \pm 1.42$  %. Die Spermatozoen mit cytoplasmatischen Veränderungen wiesen in Gruppe I einen Wert von  $8.35 \pm 5.23$  % auf und stiegen in Gruppe II nur minimal auf  $9.16 \pm 5.45$  %. Der Anstieg in Gruppe III war im Vergleich zu Gruppe II stärker. Der Mittelwert lag hier bei  $9.32 \pm 5.13$  %.

Abb. 4.6 zeigt die einzelnen morphologischen Veränderungen vor und nach der Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern.



**Abb. 4.6** Einfluss der Kryotechnik auf die einzelnen morphologischen Veränderungen von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 63; M±SD)

Man sieht in der grafischen Darstellung deutlich den Rückgang der Spermatozoen mit normalen morphologischen Kriterien in den beiden Kryogruppen im Vergleich zur Nativgruppe. Zwischen den Gruppen II und III ist allerdings kein großer Unterschied zu erkennen. In Tab. 4.12 ist dies auch anhand des nicht signifikanten p-Wertes von 0.94 zu sehen.

Stärkere Bewegungen zwischen den Gruppen I, II und III sind vor allem im Bereich der Spermien mit amorphen Veränderungen, Spermien mit normalen Köpfen aber sonstigen Abnormalitäten sowie Spermien mit Abweichungen von der Norm im Bereich von Nacken und Mittelstück ersichtlich.

In Tab. 4.12 sind die Signifikanzen der Differenzen der einzelnen morphologischen Veränderungen zwischen den Gruppen I, II und III aufgeführt.



**Tab. 4.12** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Morphologie von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Färbung nach Papanicolaou (n = 63)

		<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>Kopfabnormalitäten</b>	<b>normal</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.94
	<b>amorph</b>	<i>0.0003</i>	<i>0.0003</i>	0.19
	<b>hyper</b>	0.07	<i>0.05</i>	0.93
	<b>hypo</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.0001</i>	0.09
	<b>elongiert</b>	<i>0.01</i>	<i>0.005</i>	0.57
	<b>doppelt</b>	<i>0.02</i>	<i>0.006</i>	0.61
<b>Kopf normal, sonst. abnormal</b>		<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.06
<b>Nacken und Mittelstück</b>		<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.56
<b>and. Abnormalitäten</b>	<b>Schwanz</b>	0.13	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.001</i>
	<b>loose heads</b>	0.84	<i>0.01</i>	<i>0.02</i>
	<b>Cytoplasmat. Abnormalität</b>	<i>0.07</i>	<i>0.009</i>	0.63

Man erkennt fast ausschließlich signifikante bis hoch signifikante p-Werte zwischen den Gruppen I - II und I - III in den einzelnen Sparten der morphologischen Veränderungen. Allerdings waren die Differenzen in den Sparten „hyper“, „Schwanz“ und „loose heads“ der Gr. I - II nicht signifikant.

Der Vergleich der Gr. II - III zeigte hingegen in fast allen Sparten mit einem p-Wert  $>0.05$  Ergebnisse im nicht signifikanten Bereich. Ausnahmen stellten hier die Spermatozoen mit Abnormalitäten in der Schwanzregion und Spermatozoen mit abgetrennten Köpfen dar. Hier lagen die Signifikanzwerte bei 0.001 und 0.02.

## **4.2 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen, ohne und unter Berücksichtigung der Fertilität**

Im Abschnitt 4.2 sind die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen mit und unter Berücksichtigung der Fertilität aufgeführt. In Unterabschnitt 4.2.1 wurden die Werte ohne Berücksichtigung der Fertilität bearbeitet. Unterabschnitt 4.2.2 zeigt die Auswertung ausschließlich fertiler Proben und 4.2.3 ausschließlich subfertiler Proben auf.

### **4.2.1 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen, ohne Berücksichtigung der Fertilität**

Tab. 4.13 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen wieder. Dabei wurden drei verschiedene Methoden zur Ermittlung des Akrosomenstatus verwendet. Jeweils 75 Proben wurden nach Färbung mit PNA-lectin und Concanavalin-A-lectin ausgewertet, bei 62 Proben erfolgte die Auswertung nach Färbung mit der Triple-stain Technik.

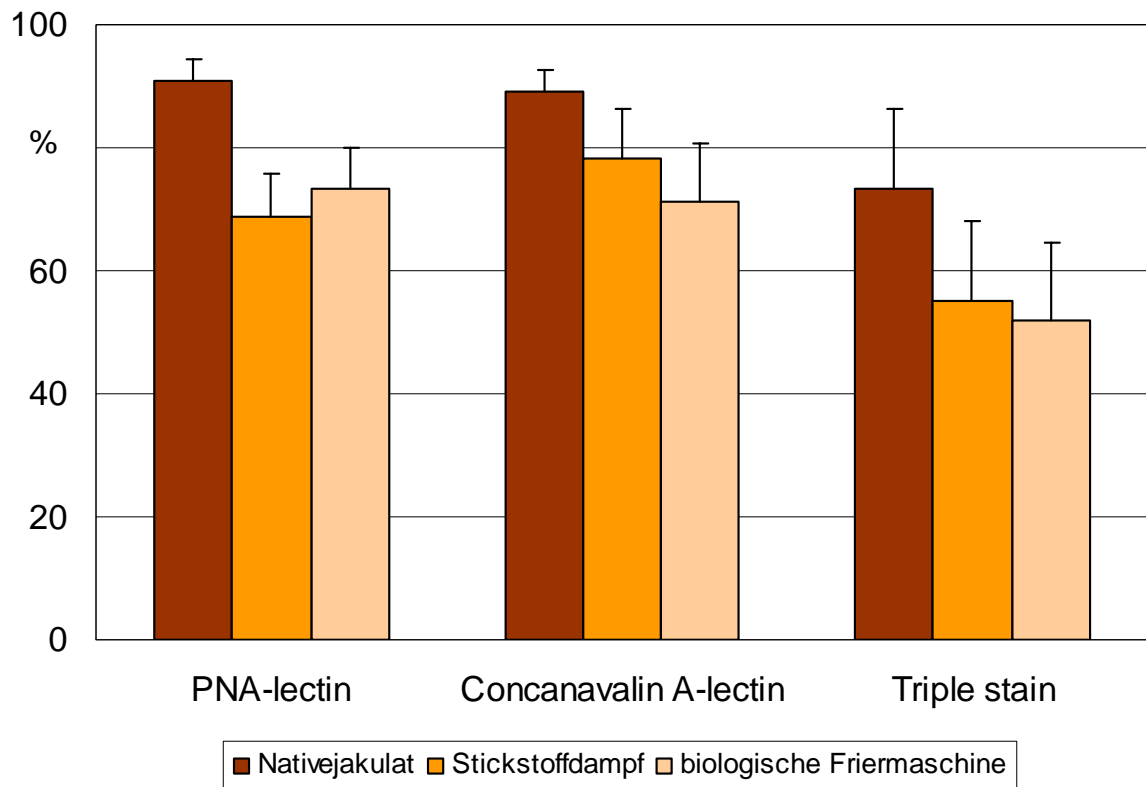
**Tab. 4.13** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain), ohne Berücksichtigung der Fertilität

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>Biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>PNA-lectin (n=75)</b>	90.72 ± 3.75	68.93 ± 7.03	73.39 ± 6.46
<b>Concanavalin-A-lectin (n=75)</b>	89.23 ± 3.5	78.41 ± 7.99	71.17 ± 9.65
<b>Triple-stain (n=62)</b>	73.42 ± 12.93	55.16 ± 12.76	51.97 ± 12.65

Die höchsten Mittelwerte im Nativejakulat ergaben sich bei der Färbung mit PNA-lectin. 90.72 ± 3.75 % der Spermatozoenköpfe zeigten eine Akrosomenreaktion. Mit 89.23 ± 3.5 % lag der Mittelwert bei Concanavalin-A-lectin nur geringfügig unter dem Wert von PNA-lectin. Deutlich unter 90 % errechnete sich mit 73.42 ± 12.93 % der Mittelwert für die akrosom-positiven Spermien, die mit der Triple-stain Technik gefärbt wurden.

Die Werte der Gruppen II und III lagen ausnahmslos unterhalb derer der Gruppe I. Der größte Abfall fand sich mit 21.79 Prozentpunkten im Rahmen der PNA-lectin-Färbung zwischen Gruppe I und II. Um 21.45 Prozentpunkte fiel die Zahl der Spermien mit intaktem Akrosom zwischen der Nativejakulatgruppe und der Gruppe nach Kryokonservierung mit der Maschine. Alle weiteren Differenzen lagen unter 20 Prozentpunkten.

Außer in der PNA-lectin-Gruppe zeigte sich bei den anderen beiden Färbetechniken ein stärkerer Verlust der Akrosomen nach der Kryokonservierung mit der biologischen Friermaschine.



**Abb. 4.7** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain)

Die Senkung der Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom nach Kryokonservierung ist in Abb. 4.12 gut zu erkennen. Bei Concanavalin-A-lectin und Triple-stain sieht man eine stärkere Akrosomenschädigung nach Kryokonservierung mit der Maschine. Bei PNA-lectin hingegen liegen die Werte der Gruppe II unter denen der Gruppe III.

**Tab. 4.14** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Akrosomenschädigung

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>PNA-lectin (n=75)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>
<b>Concanavalin-A-lectin (n=75)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>
<b>Triple-stain (n=62)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.04</i>

Tab. 4.14 zeigt, dass die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen signifikant sind. Wobei die Signifikanz der Differenz zwischen Gruppe II und Gruppe III mit  $p = 0.04$  bei der Triple-stain-Technik am geringsten ausfällt. Alle anderen Differenzen können mit  $p < 0.0001$  als hoch signifikant bezeichnet werden.

Tab. 4.15 gibt den Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität wieder. Die Werte wurden mit der Triple-stain-Technik erhoben.

**Tab. 4.15** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 62; M±SD)

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>lebend - mit Akrosom</b>	56.45 ± 17.86	28.97 ± 16.57	27.97 ± 14.56
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	18.48 ± 10.73	20.10 ± 10.82	24.44 ± 12.87
<b>tot - mit Akrosom</b>	16.97 ± 11.18	26.19 ± 13.81	24.0 ± 16.73
<b>tot - ohne Akrosom</b>	8.10 ± 7.30	24.74 ± 14.51	23.60 ± 13.24

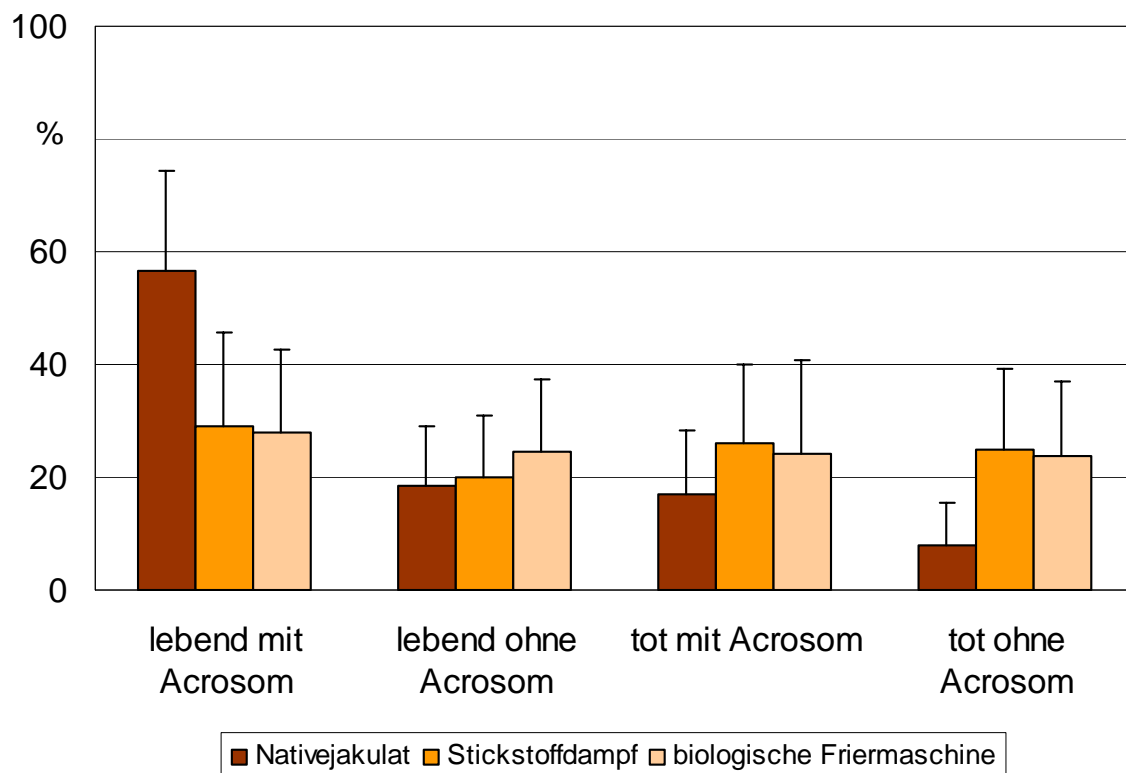
In der Gruppe der Spermatozoen, die aufgrund des Färbeergebnisses als lebend mit Akrosom eingestuft werden konnten, betrug der Mittelwert ± SD im Nativejakulat 56.45 ± 17.86 %. Er nahm in der Gruppe der mit Stickstoffdampf gefrorenen Spermatozoen um 27.48 Prozentpunkte auf 28.97 ± 16.57 % ab. In der Gruppe der mit Maschine gefrorenen Spermatozoen fiel der Mittelwert um 28.48 Prozentpunkte auf 27.97 ± 14.56 %. Die Differenz zwischen Gruppe II und Gruppe III lag hier bei 1.0 Prozentpunkt.

Der Mittelwert der lebenden Spermatozoen ohne Akrosom in der Nativejakulatgruppe lag bei 18.48 ± 10.73 %. Er stieg in Gruppe II um 1.53 Prozentpunkte auf 20.10 ± 10.82 % und in Gruppe III um 5.96 Prozentpunkte auf 24.44 ± 12.87 %. Die Differenz zwischen den beiden Kryogruppen betrug hier 4.43 Prozentpunkte.

In der Gruppe der toten Spermatozoen mit intaktem Akrosom ergab sich ein Mittelwert für die Gruppe I von 16.97 ± 11.18 %. Auch hier stiegen die Werte in den beiden Kryogruppen deutlich an, und zwar um 9.22 Prozentpunkte in Gruppe II auf 26.19 ± 13.81 % und um 7.03 Prozentpunkte auf 24.0 ± 16.73 % in Gruppe III. Hier war der Anstieg in Gruppe II also um 2.19 Prozentpunkte größer als in Gruppe III.

Auch in der Sparte der toten Spermatozoen ohne Akrosom stieg der Mittelwert von  $8.10 \pm 7.30 \%$  in Gruppe I auf  $24.74 \pm 14.51 \%$  in Gruppe II stärker an als in Gruppe III. Hier betrug der Mittelwert nur  $23.60 \pm 13.24 \%$ .

Abb. 4.13 zeigt die oben beschriebenen Werte.



**Abb. 4.13** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 62)

Man sieht deutlich den Rückgang der lebenden Spermatozoen mit Akrosom in den beiden Kryogruppen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist allerdings eher gering, was auch in einem nicht signifikanten p-Wert von 0.48 in Tab. 4.16 zum Ausdruck kommt. In dieser Tabelle sind auch die weiteren Signifikanzwerte der einzelnen Differenzen aufgeführt.

**Tab. 4.16** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 62)

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>lebend - mit Akrosom</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.48
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	0.37	<i>0.006</i>	<i>0.03</i>
<b>tot - mit Akrosom</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.0008</i>	0.18
<b>tot - ohne Akrosom</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	0.49

Die Differenzen zwischen den Gr. I - II sowie Gr. I - III zeigten fast ausschließlich signifikante bis hoch signifikante Werte. Die Ausnahme bildete die Differenz zwischen Gr. I – II im Einteilungskriterium lebend - ohne Akrosom. Hier erreichte der p-Wert mit 0.37 nicht das Signifikanzniveau. Beim Vergleich der Gr. II - III hingegen lag nur ein Wert im signifikanten Bereich. Beim Kriterium lebend - ohne Akrosom lag der Wert bei 0.03. Alle anderen Differenzen dieses Gruppenvergleichs erreichten p-Werte, die deutlich größer als das Signifikanzniveau von 0.05 waren.

#### **4.2.2 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender**

Tab. 4.17 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern wieder. Dabei wurden drei verschiedene Methoden zur Ermittlung des Akrosomenstatus verwendet. Jeweils 12 Proben wurden mittels PNA-lectin und Concanavalin-A-lectin ausgewertet, 11 Proben mit der Triple-stain-Technik.



**Tab. 4.17** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain)

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>PNA-lectin (n = 12)</b>	92.08 ± 3.20	69.75 ± 7.97	74.08 ± 7.48
<b>Concanavalin-A-lectin (n = 12)</b>	89.33 ± 2.50	75.58 ± 6.95	67.25 ± 10.35
<b>Triple-stain (n = 11)</b>	69.73 ± 16.82	55.09 ± 10.48	52.55 ± 12.26

Die höchsten Mittelwerte im Nativejakulat ergaben sich bei der Färbung mit PNA-lectin. 92.08 ± 3.20 % der Spermatozoenköpfe zeigten eine Akrosomenreaktion. Mit 89.33 ± 2.50 % lag der Mittelwert bei Concanavalin-A-lectin nur geringfügig unter dem Wert von PNA-lectin. Deutlich unter 90 % errechnete sich mit 69.73 ± 16.82 % der Mittelwert für die akrosompositiven Spermien, die mit der Triple-stain-Technik untersucht wurden.

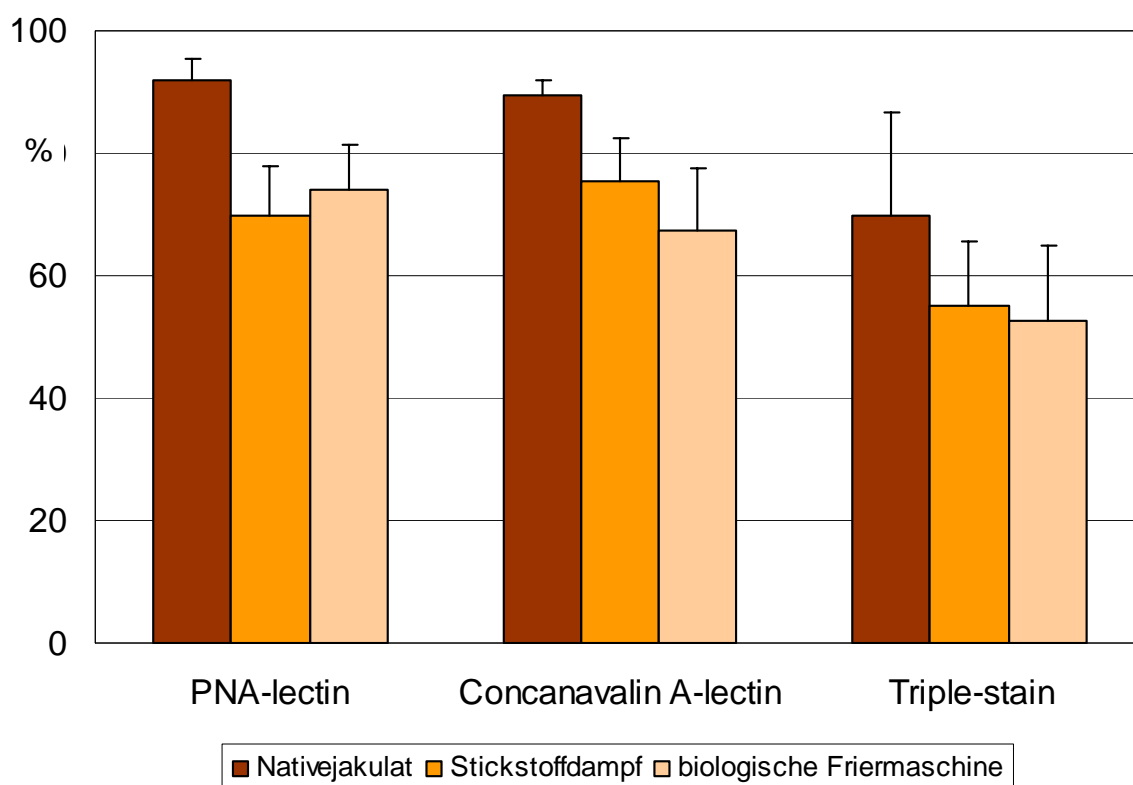
Die Werte der Gruppen II und III lagen ausnahmslos unterhalb derer der Gruppe I. Der größte Abfall fand sich mit 22.33 Prozentpunkten im Rahmen der PNA-lectin-Färbung zwischen Gruppe I und Gruppe II. Um 18.00 Prozentpunkte fiel die Zahl der Spermien mit intaktem Akrosom zwischen der Nativejakulatgruppe und der Gruppe nach Kryokonservierung mit der Maschine bei dieser Färbemethode.

Auch bei der Färbung mit Concanavalin-A-lectin sank die Zahl der Spermien mit intaktem Akrosom in den beiden Kryogruppen, und zwar um 13.75 Prozentpunkte in Gruppe II und um 22.08 Prozentpunkte in Gruppe III.

Ebenso verhielt es sich im Rahmen der Triple-stain-Färbung. Die Differenzen zur Nativejakulatgruppe waren allerdings mit 14.64 Prozentpunkten in Gruppe II sowie mit 17.18 Prozentpunkten in Gruppe III nicht so groß wie bei den beiden anderen Färbemethoden.

Außer in der PNA-lectin-Gruppe zeigte sich bei den beiden anderen Färbetechniken ein stärkerer Verlust der Akrosomen nach der Kryokonservierung mit der biologischen Friermaschine.

Die Senkung der Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom nach Kryokonservierung ist in Abb. 4.14 gut zu erkennen.



**Abb. 4.14** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain)

Bei Concanavalin-A-lectin und Triple-stain sieht man eine stärkere Akrosomenschädigung nach Kryokonservierung mit der Maschine. Bei PNA-lectin hingegen liegen die Werte der Gruppe II unter denen der Gruppe III.

**Tab. 4.18** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Akrosomenschädigung von *fertilen* Spendern

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I – Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>PNA-lectin (n = 12)</b>	<i>0.002</i>	<i>0.002</i>	<i>0.012</i>
<b>Concanavalin-A-lectin (n = 12)</b>	<i>0.002</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>
<b>Triple-stain (n = 11)</b>	<i>0.03</i>	<i>0.01</i>	<i>0.79</i>

Tab. 4.18 zeigt, dass die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen signifikant sind. Ausnahme bildet die Signifikanz der Differenz zwischen Gruppen II und III bei der Triple-stain-Technik mit  $p = 0.79$ . Alle anderen Differenzen können als signifikant bezeichnet werden.

Tab. 4.19 gibt den Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen von *fertilen* Spendern wieder. Die Werte wurden mit der Triple-stain-Technik erhoben.

**Tab. 4.19** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spendern, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 11; M±SD)

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>lebend - mit Akrosom</b>	58.91 ± 20.30	34.64 ± 17.73	34.45 ± 13.72
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	22.91 ± 14.67	24.73 ± 9.12	27.73 ± 12.25
<b>tot - mit Akrosom</b>	10.82 ± 6.54	20.45 ± 10.53	18.09 ± 11.72
<b>tot - ohne Akrosom</b>	7.36 ± 7.72	20.18 ± 11.97	19.73 ± 12.88

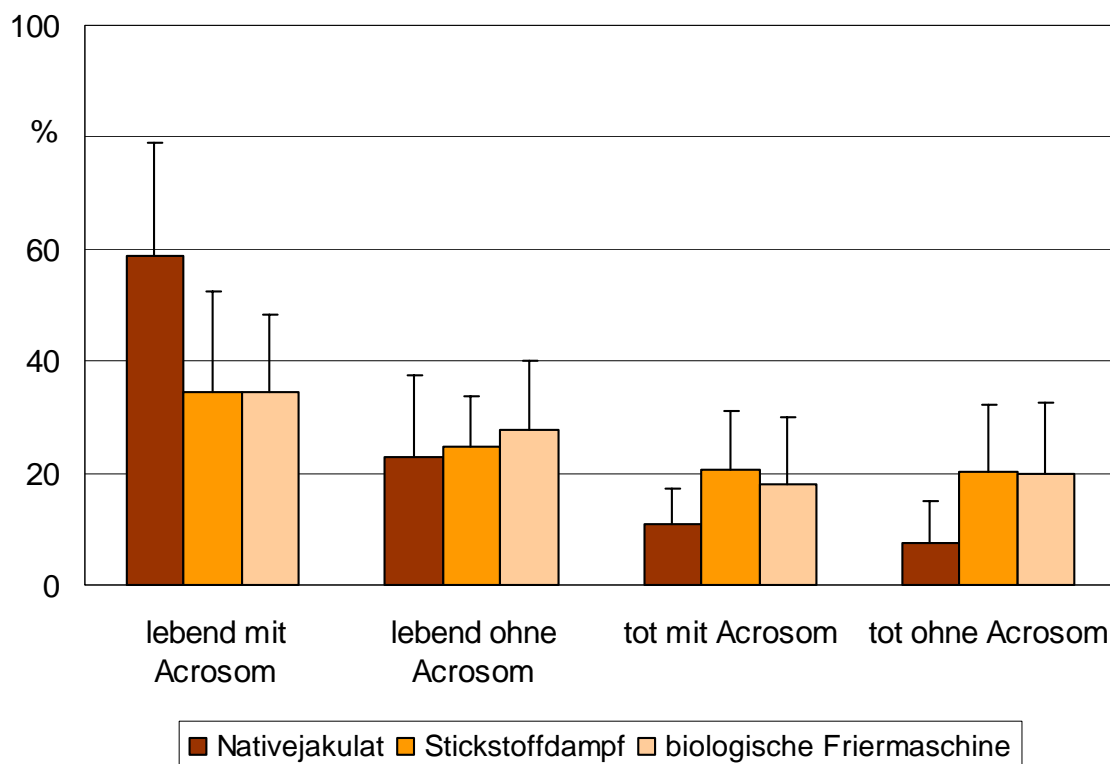
In der Gruppe der Spermatozoen, die aufgrund des Färbeergebnisses als lebend mit Akrosom eingestuft werden konnten, betrug der Mittelwert ± SD im Nativejakulat 58.91 ± 20.30 %. Er nahm in der Gruppe der mit Stickstoffdampf gefrorenen Spermatozoen um 24.27 Prozentpunkte auf 34.64 ± 17.73 % ab. In der Gruppe der mit Maschine gefrorenen Spermatozoen fiel der Mittelwert um 24.46 Prozentpunkte auf 34.45 ± 13.73 %. Die Differenz zwischen Gruppe II und Gruppe III lag hier bei nur 0.19 Prozentpunkten.

Der Mittelwert der lebenden Spermatozoen ohne Akrosom in der Nativejakulatgruppe lag bei 22.91 ± 14.67 %. Er stieg in Gruppe II um 1.82 Prozentpunkte auf 24.73 ± 9.12 % und in Gruppe III um 4.82 Prozentpunkte auf 27.73 ± 12.25 %. Die Differenz zwischen den beiden Kryogruppen lag bei 3.0 Prozentpunkten.

In der Gruppe der toten Spermatozoen mit intaktem Akrosom ergab sich ein Mittelwert für die Gruppe I von 10.82 ± 6.54 %. Auch hier stiegen die Werte in den beiden Kryogruppen deutlich an, und zwar um 9.63 Prozentpunkte in Gruppe II auf 20.45 ± 10.53 % und um 7.27 Prozentpunkte auf 18.09 ± 11.72 % in Gruppe III. Hier war der Anstieg in Gruppe II also um 2.36 Prozentpunkte größer als in Gruppe III.

Auch in der Sparte der toten Spermatozoen ohne Akrosom stieg der Mittelwert von  $7.36 \pm 7.72$  % in Gruppe I auf  $20.18 \pm 11.97$  % in Gruppe II stärker an als in Gruppe III. Hier betrug der Mittelwert nur  $19.73 \pm 12.88$  %.

Abb. 4.15 zeigt die oben beschriebenen Werte.



**Abb. 4.15** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spender, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 11)

Man sieht deutlich den Rückgang der lebenden Spermatozoen mit Akrosom in den beiden Kryogruppen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist allerdings eher gering, was auch in einem nicht signifikanten p-Wert von 0.96 in Tab. 4.20 zum Ausdruck kommt. In dieser Tabelle sind auch die weiteren Signifikanzwerte der einzelnen Differenzen aufgeführt.

**Tab. 4.20** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *fertiler* Spendern, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 11)

	Gr. I - Gr. II	Gr. I - Gr. III	Gr. II - Gr. III
<b>lebend - mit Akrosom</b>	0.01	0.006	0.96
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	0.65	0.27	0.54
<b>tot - mit Akrosom</b>	0.02	0.06	0.65
<b>tot - ohne Akrosom</b>	0.01	0.003	0.89

Die Differenzen zwischen den Gruppen I - II sowie Gruppen I - III zeigten in dem Fall zum Teil signifikante Werte und zum Teil nicht signifikante Werte. Zum Beispiel sind die p-Werte in der Kategorie „lebend - ohne Akrosom“ in allen drei Gruppenvergleichen nicht signifikant. In der Sparte „tot - mit Akrosom“ war nur im Vergleich Gr. I - II die Differenz mit  $p = 0.02$  als signifikant zu bewerten. Beim Vergleich der Gr. II - III hingegen lagen alle Werte außerhalb des signifikanten Bereiches.

#### **4.2.3 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen subfertiler Spender**

Tab. 4.21 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern wieder. Dabei wurden drei verschiedene Methoden zur Ermittlung des Akrosomenstatus verwendet. Jeweils 63 Proben wurden mittels PNA-lectin und Concanavalin-A-lectin ausgewertet, 51 Proben mit der Triple-stain-Technik.

**Tab. 4.21** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain)

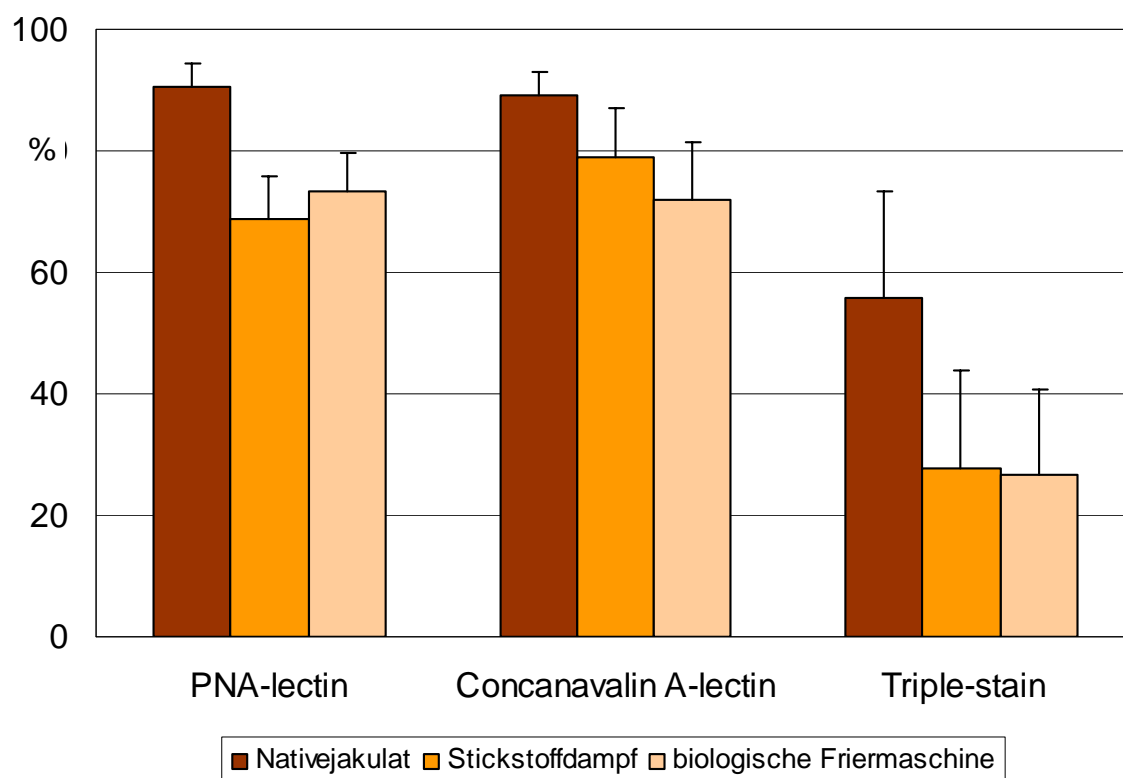
	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>PNA-lectin (n = 63)</b>	90.46 ± 3.81	68.78 ± 6.9	73.25 ± 6.30
<b>Concanavalin-A-lectin (n = 63)</b>	89.21 ± 3.68	78.95 ± 8.11	71.92 ± 9.42
<b>Triple-stain (n = 51)</b>	74.22 ± 11.99	55.18 ± 13.29	51.84 ± 12.85

Die höchsten Mittelwerte ± SD im Nativejakulat ergaben sich bei der Färbung mit PNA-lectin. 90.46 ± 3.81 % der Spermatozoenköpfe zeigten eine Akrosomenreaktion. Mit 89.21 ± 3.68 % lag der Mittelwert bei Concanavalin-A-lectin nur geringfügig unter dem Wert von PNA-lectin. Deutlich unter 90 % errechnete sich mit 74.22 ± 11.99 % der Mittelwert für die akrosompositiven Spermien, die mit der Triple-stain-Technik untersucht wurden.

Die Werte der Gruppen II und III lagen ausnahmslos unter den Werten der Gruppe I. Der größte Abfall fand sich mit 22.38 Prozentpunkten im Rahmen der Triple-stain-Färbung zwischen Gruppe I und Gruppe III. Um 21.68 Prozentpunkte fiel die Zahl der Spermien mit intaktem Akrosom zwischen der Nativejakulatgruppe und der Gruppe nach Kryokonservierung mit Stickstoffdampf bei der PNA-lectin-Färbung. Alle weiteren Differenzen lagen unter 20 Prozentpunkten.

Außer in der PNA-lectin-Gruppe zeigte sich bei den anderen beiden Färbetechniken ein stärkerer Verlust der Akrosomen nach der Kryokonservierung mit der biologischen Friermaschine.

Die Senkung der Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom nach Kryokonservierung ist in Abb. 4.16 erkennbar.



**Abb. 4.16** Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain)

Bei Concanavalin-A-lectin und Triple-stain sieht man eine stärkere Akrosomenschädigung nach Kryokonservierung mit der Maschine. Bei PNA-lectin hingegen liegen die Werte der Gruppe II unter denen der Gruppe III.



**Tab. 4.22** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Akrosomenschädigung von *subfertilen* Spendern

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>PNA-lectin (n = 63)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Concanavalin-A-lectin (n = 63)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Triple-stain (n = 51)</b>	<0.0001	<0.0001	0.04

Tab. 4.22 zeigt, dass die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen signifikant sind. Es liegen fast alle p-Werte im hoch signifikanten Bereich. Eine Ausnahme bildet die Signifikanz der Differenz zwischen Gruppe II und III bei der Triple-stain Technik. Hier fällt der p-Wert mit 0.04 nur knapp signifikant aus.

Tab. 4.19 gibt den Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen von *subfertilen* Spendern wieder. Die Werte wurden mit der Triple-stain-Technik erhoben.

**Tab. 4.23** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Triplestain-Technik (n = 51; M±SD)

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>lebend - mit Akrosom</b>	55.92 ± 17.47	27.75 ± 16.23	26.57 ± 14.09
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	17.53 ± 9.60	19.10 ± 10.98	23.73 ± 13.0
<b>tot - mit Akrosom</b>	18.30 ± 11.57	27.43 ± 14.20	25.27 ± 17.45
<b>tot - ohne Akrosom</b>	8.25 ± 7.28	25.73 ± 14.92	24.43 ± 13.29

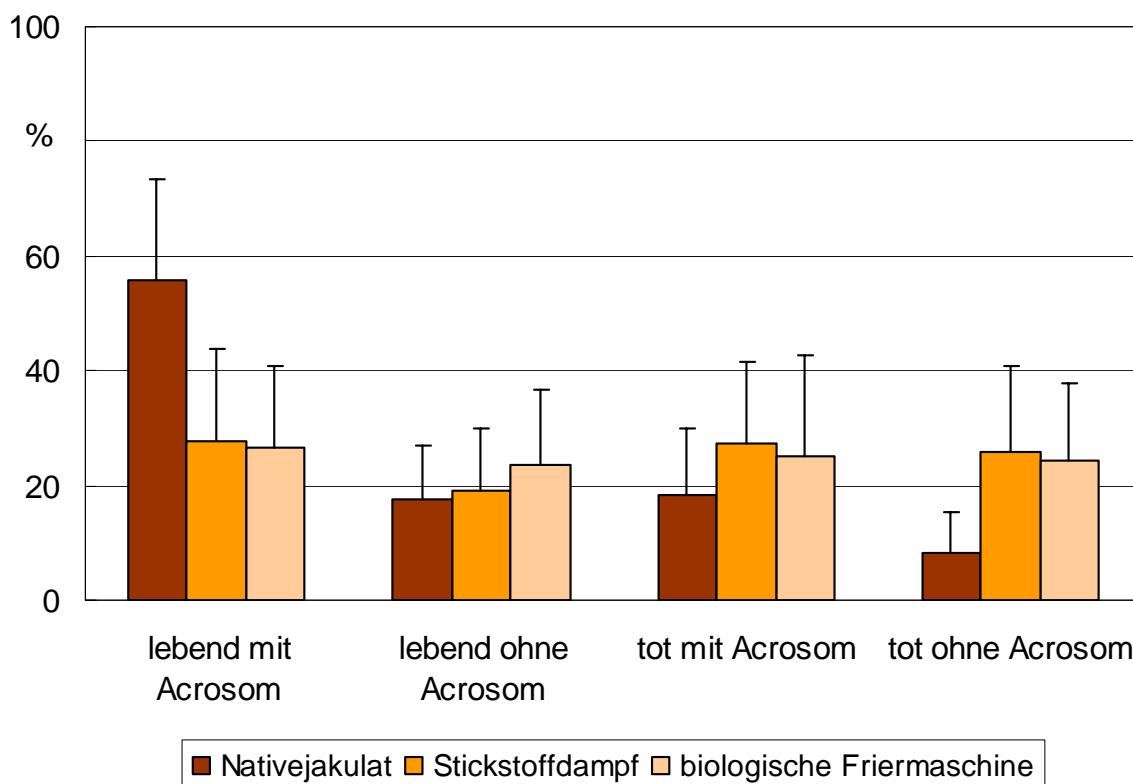
In der Gruppe der Spermatozoen, die aufgrund des Färbeergebnisses als lebend mit Akrosom eingestuft werden konnten, betrug der Mittelwert ± SD im Nativejakulat 55.92 ± 17.47 %. Er nahm in der Gruppe der mit Stickstoffdampf gefrorenen Spermatozoen um 28.17 Prozentpunkte auf 27.75 ± 16.23 % ab. In der Gruppe der mit Maschine gefrorenen Spermatozoen fiel der Mittelwert um 29.35 Prozentpunkte auf 26.57 ± 14.09 %. Die Differenz zwischen Gruppe II und Gruppe III lag hier bei 1.18 Prozentpunkten.

Der Mittelwert der lebenden Spermatozoen ohne Akrosom in der Nativejakulatgruppe lag bei 17.53 ± 9.60 %. Er stieg in Gruppe II um 1.57 Prozentpunkte auf 19.10 ± 10.98 % und in Gruppe III um 6.2 Prozentpunkte auf 23.73 ± 13.0 %. Die Differenz zwischen den beiden Kryogruppen lag bei 4.63 Prozentpunkten.

In der Gruppe der toten Spermatozoen mit intaktem Akrosom ergab sich ein Mittelwert für die Gruppe I von 18.30 ± 11.57 %. Auch hier stiegen die Werte in den beiden Kryogruppen deutlich an. Und zwar um 9.13 Prozentpunkte in Gruppe II auf 27.43 ± 14.20 % und um 6.97 Prozentpunkte auf 25.27 ± 17.45 % in Gruppe III. Hier war der Anstieg in Gruppe II also um 2.16 Prozentpunkte größer als in Gruppe III.

Auch in der Sparte der toten Spermatozoen ohne Akrosom stieg der Mittelwert von  $8.25 \pm 7.28 \%$  in Gruppe I auf  $25.73 \pm 14.92 \%$  in Gruppe II stärker an als in Gruppe III. Hier betrug der Mittelwert nur  $24.43 \pm 13.29 \%$ .

Abb. 4.17 zeigt die oben beschriebenen Werte.



**Abb. 4.17** Einfluss der Kryotechnik auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Triplestain-Technik (n = 51)

Man sieht deutlich den Rückgang der lebenden Spermatozoen mit Akrosom in den beiden Kryogruppen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist allerdings eher gering, was auch in einem nicht signifikanten p-Wert von 0.51 in Tab 4.24 zum Ausdruck kommt. In dieser Tabelle sind auch die weiteren Signifikanzwerte der einzelnen Differenzen aufgeführt.

**Tab. 4.24** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Überlebensrate sowie auf den Akrosomenstatus von menschlichen Spermatozoen *subfertiler* Spender, erhoben mit der Triple-stain-Technik (n = 51)

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>lebend - mit Akrosom</b>	<0.0001	<0.0001	0.51
<b>lebend - ohne Akrosom</b>	0.48	0.01	0.02
<b>tot - mit Akrosom</b>	<0.0001	0.004	0.25
<b>tot - ohne Akrosom</b>	<0.0001	<0.0001	0.44

Die Differenzen zwischen den Gr. I - II sowie Gr. I - III zeigten fast ausschließlich signifikante bis hoch signifikante Werte. Ausnahme bildete die Differenz zwischen Gr. I - II im Einteilungskriterium lebend - ohne Akrosom. Hier erreichte der p-Wert mit 0.48 nicht das Signifikanzniveau. Beim Vergleich der Gr. II - III hingegen lag nur ein Wert im signifikanten Bereich. Beim Kriterium lebend - ohne Akrosom lag der Wert bei 0.02. Alle anderen Differenzen dieses Gruppenvergleichs erreichten p-Werte, die deutlich größer als das Signifikanzniveau von 0.05 waren.

Im folgenden Kapitel 4.3 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertungen zur Beurteilung des Einflusses der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen sowohl ohne als auch unter Berücksichtigung der Fertilität aufgeführt.

### 4.3 Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen ohne und unter Berücksichtigung der Fertilität

Im Abschnitt 4.3 sind die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen, auch unter Berücksichtigung der Fertilität aufgeführt. In Unterabschnitt 4.3.1 wurden die Werte ohne Berücksichtigung der Fertilität bearbeitet. Unterabschnitt 4.3.2 zeigt die Auswertung ausschließlich der fertilen Proben und 4.3.3 ausschließlich der subfertilen Proben.

#### 4.3.1 Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität

Tab. 4.25 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität wieder. Zur Beurteilung der entsprechenden Veränderungen wurde die Anilin-Blau- und Acridin-Orange-Färbung verwendet. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug  $n = 75$ .

**Tab. 4.25** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

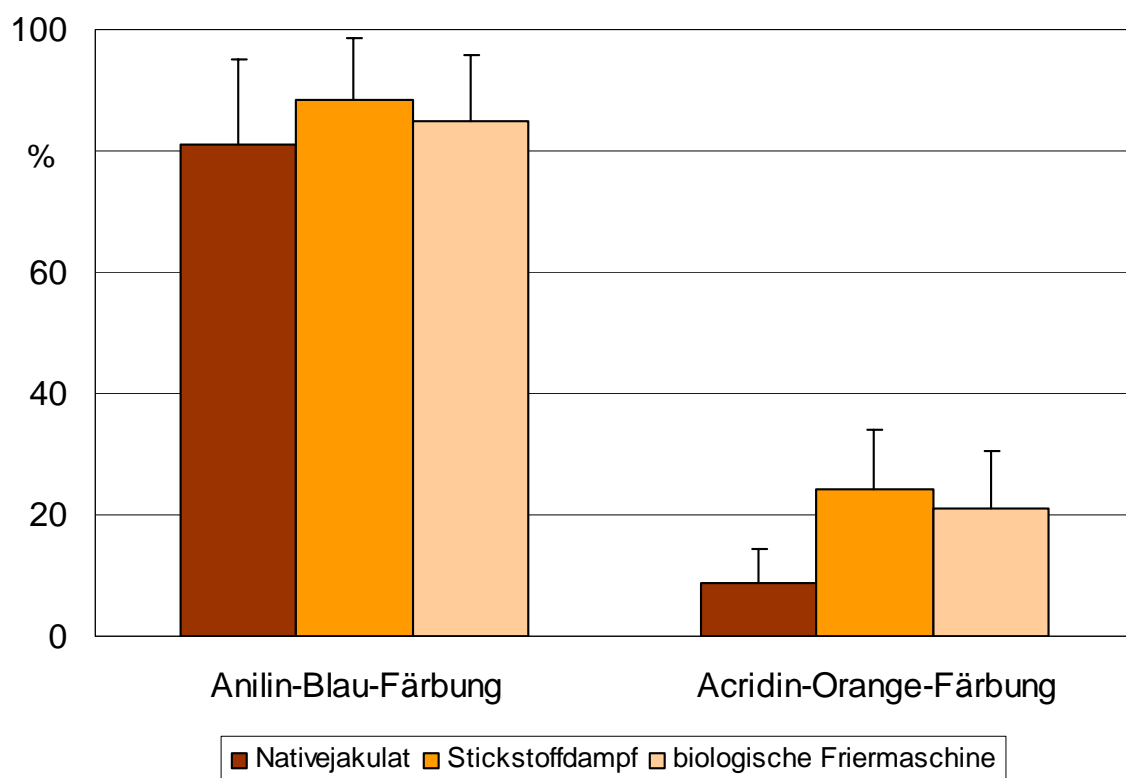
	Nativejakulat (Gr. I)	Stickstoffdampf (Gr. II)	biologische Friermaschine (Gr. III)
<b>Anilin-Blau-Färbung (n = 75)</b>	$80.93 \pm 14.29$	$88.25 \pm 10.29$	$84.96 \pm 10.99$
<b>Acridin-Orange-Färbung (n = 75)</b>	$8.87 \pm 5.53$	$24.37 \pm 9.5$	$20.9 \pm 9.56$

Im Nativejakulat zeigten  $80.93 \pm 14.29$  % der mit Anilin gefärbten Spermien eine Chromatindekondensation. Nach der Kryokonservierung mit der programmierten biologischen Friermaschine (PBF) stieg der Mittelwert um 4.03 Prozentpunkte auf  $84.96 \pm 10.99$ %. Deutlich mehr, nämlich auf  $88.25 \pm 10.29$ %, stieg der Mittelwert allerdings

in der Gruppe der im Stickstoffdampf kryokonservierten Spermien. Dies entsprach 7.32 Prozentpunkten im Vergleich zur Nativgruppe. Es ergab sich also ein Unterschied von 3.29 Prozentpunkten zwischen den beiden Kryogruppen.

Im Rahmen der Acridin-Orange-Färbung lag der Mittelwert der Spermien in Gruppe I, welche eine Chromatindekondensation zeigten, bei nur  $8.87 \pm 5.53\%$ . Während in Gruppe II der Mittelwert um 15.50 Prozentpunkte auf  $24.37 \pm 9.5$  anstieg, zeigte die Gruppe III mit  $20.9 \pm 9.56$  nur eine Erhöhung um 12.03 Prozentpunkte im Vergleich zur Nativgruppe.

Abb. 4.19 stellt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen ohne Berücksichtigung der Fertilität, erhoben mit der Anilin-Blau- und Acridin-Orange-Färbung, grafisch dar.



**Abb. 4.19** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

Auffällig dabei ist eine starke Diskrepanz zwischen den beiden Färbemethoden. Während die Werte aller Gruppen bei der Anilin-Blau-Färbung deutlich über der 80%-Marke lagen, wurde

bei der Acridin-Orange-Färbung noch nicht einmal die 30%-Marke erreicht. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Spermien mit Chromatindekondensation in der Nativejakulatgruppe lagen bei dieser Färbemethode sogar unter der 10%-Marke.

**Tab. 4.26** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Chromatinschädigung

	Gr. I - Gr. II	Gr. I - Gr. III	Gr. II - Gr. III
<b>Anilin-Blau-Färbung (n = 75)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Acridin-Orange-Färbung (n = 75)</b>	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Die in Tab. 4.26 aufgeführten Signifikanzen zeigen bei beiden Färbemethoden mit jeweils  $p < 0.0001$  hoch signifikante Werte für die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.3.2 Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen fertiler Spender

Tab. 4.27 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern wieder. Zur Beurteilung der entsprechenden Veränderungen wurde die Anilin-Blau- und Acridin-Orange-Färbung verwendet. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug  $n = 12$ .

**Tab. 4.27** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

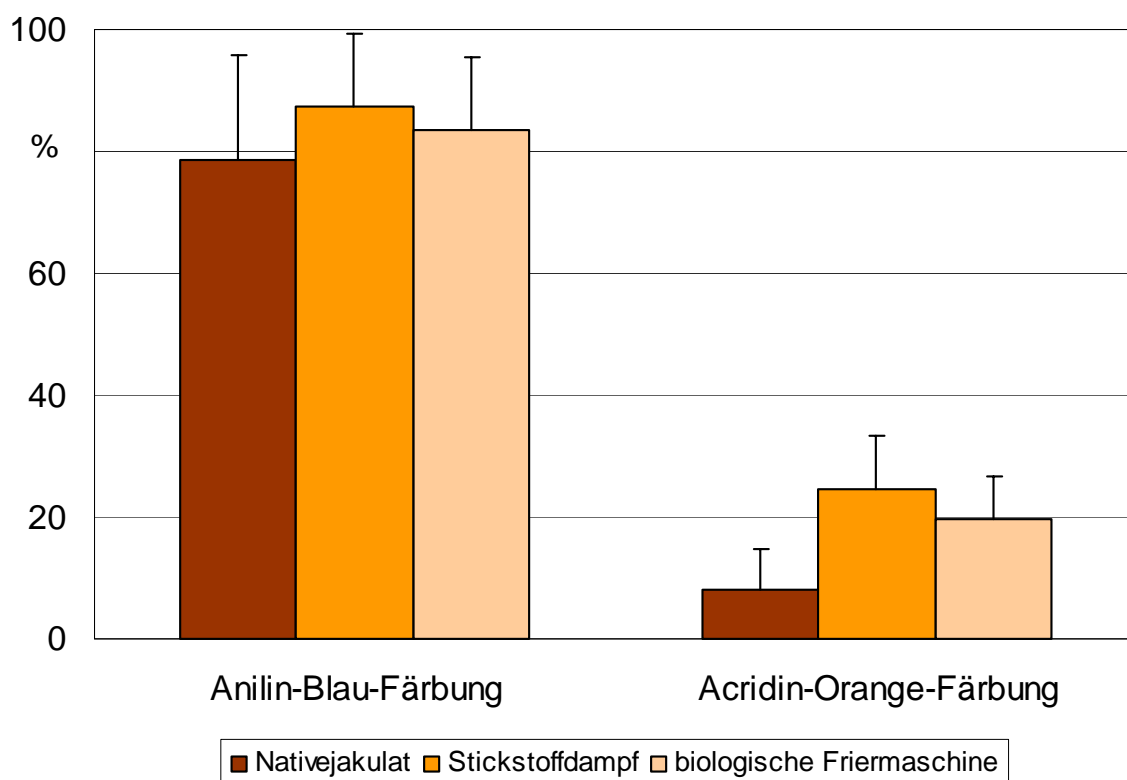
	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Anilin-Blau-Färbung (n = 12)</b>	78.50 ± 17.31	87.42 ± 11.86	83.5 ± 11.99
<b>Acridin-Orange-Färbung (n = 12)</b>	8.08 ± 6.54	24.5 ± 8.72	19.58 ± 7.14

Im Nativejakulat zeigten  $78.50 \pm 17.31$  % der mit Anilin gefärbten Spermien eine Chromatindekondensation. Nach der Kryokonservierung mit der programmierten biologischen Friermaschine (PBF) stieg der Mittelwert um 5.0 Prozentpunkte auf  $83.5 \pm 11.99$  %. Deutlich mehr, nämlich auf  $87.42 \pm 11.86$  %, stieg der Mittelwert allerdings in der Gruppe der im Stickstoffdampf kryokonservierten Spermien. Dies entsprach 8.92 Prozentpunkten im Vergleich zur Nativgruppe. Es ergab sich also ein Unterschied von 3.92 Prozentpunkten zwischen den beiden Kryogruppen.

Im Rahmen der Acridin-Orange-Färbung lag der Mittelwert der Spermien in Gruppe I, welche eine Chromatindekondensation zeigten, bei nur  $8.08 \pm 6.54$  %. Während in Gruppe II der Mittelwert um 16.42 Prozentpunkte auf  $24.5 \pm 8.72$  % anstieg, zeigte die Gruppe III mit  $19.58 \pm 7.14$  % nur eine Erhöhung um 11.5 Prozentpunkte im Vergleich zur Nativgruppe.

Abb. 4.20 stellt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern, erhoben mit der Anilin-Blau- und Acridin-Orange-Färbung, grafisch dar.





**Abb. 4.20** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *fertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

Auffällig ist wiederum die starke Diskrepanz zwischen den beiden Färbemethoden. Während die Werte aller Gruppen bei der Anilin-Blau-Färbung um die 80%-Marke verteilt waren, wurde bei der Acridin-Orange-Färbung noch nicht einmal die 30%-Marke erreicht. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Spermien mit Chromatindekondensation in der Nativejakulatgruppe lagen bei dieser Färbemethode unter der 10%-Marke.

**Tab. 4.28** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Chromatinschädigung von *fertilen* Spendern

	Gr. I - Gr. II	Gr. I - Gr. III	Gr. II - Gr. III
<b>Anilin-Blau-Färbung; (n = 12)</b>	0.003	0.07	0.008
<b>Acridin-Orange-Färbung; (n = 12)</b>	0.002	0.002	0.02

Die in Tab. 4.28 aufgeführten Werte zeigen für die Anilin-Blau-Färbung mit  $p = 0.003$  bzw.  $p = 0.008$  signifikante Differenzen für Gruppenvergleiche Gr. I - II sowie Gr. I - III. Die Differenz der Gr. I - III lag mit  $p = 0.07$  über dem Signifikanzniveau von  $p \leq 0.05$ . Mit Werten zwischen  $p = 0.002$  und  $p = 0.02$  lagen die Differenzen der einzelnen Gruppen bei der Acridin-Orange-Färbung alle im signifikanten Bereich.

### 4.3.3 Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen subfertiler Spender

Tab. 4.29 gibt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern wieder. Zur Beurteilung der entsprechenden Veränderungen wurde die Anilin-Blau- und die Acridin-Orange-Färbung verwendet. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug  $n = 63$ .

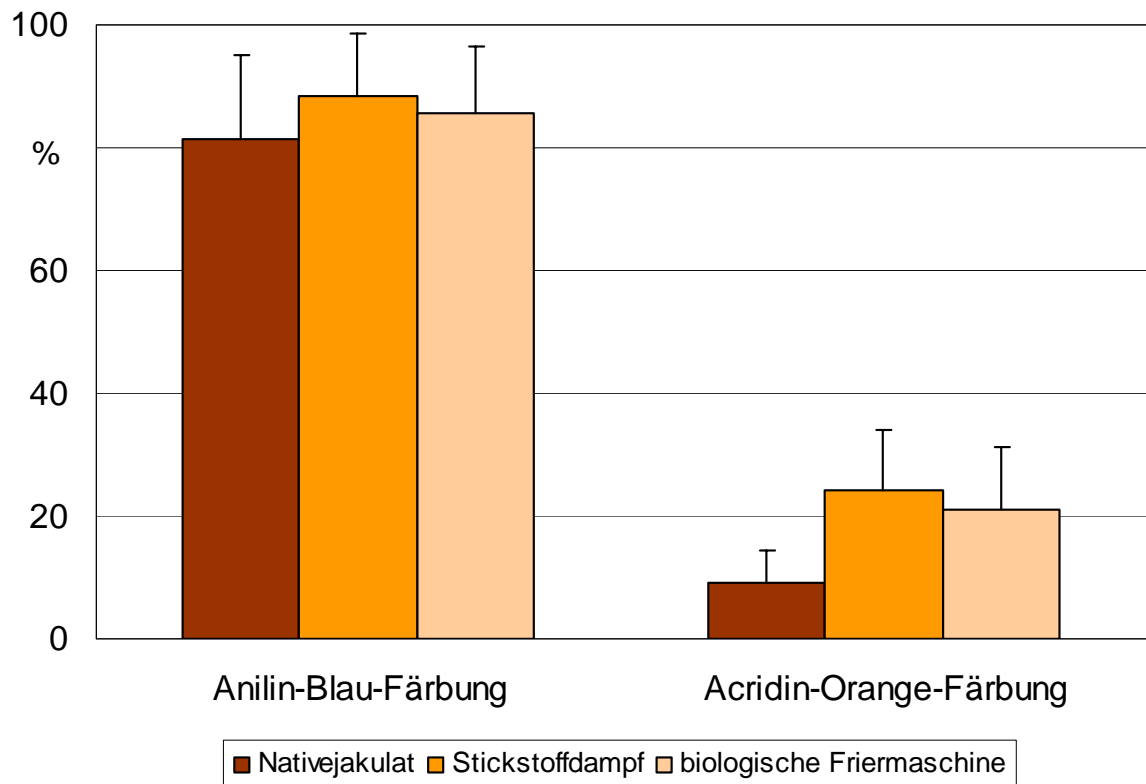
**Tab. 4.29** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

	<b>Nativejakulat (Gr. I)</b>	<b>Stickstoffdampf (Gr. II)</b>	<b>biologische Friermaschine (Gr. III)</b>
<b>Anilin-Blau-Färbung (n = 63)</b>	81.33 ± 13.75	88.56 ± 10.10	85.48 ± 10.90
<b>Acridin-Orange-Färbung (n = 63)</b>	9.02 ± 5.36	24.35 ± 9.70	21.16 ± 9.98

Im Nativejakulat zeigten  $81.33 \pm 13.75$  % der mit Anilin gefärbten Spermien eine Chromatindekondensation. Nach der Kryokonservierung mit der programmierten biologischen Friermaschine (PBF) stieg der Mittelwert um 4.15 Prozentpunkte auf  $85.48 \pm 10.90$  %. Deutlich mehr, nämlich auf  $88.56 \pm 10.10$  %, stieg der Mittelwert allerdings in der Gruppe der im Stickstoffdampf kryokonservierten Spermien. Dies entsprach 7.23 Prozentpunkten im Vergleich zur Nativgruppe. Es ergab sich also ein Unterschied von 3.08 Prozentpunkten zwischen den beiden Kryogruppen.

Im Rahmen der Acridin-Orange-Färbung lag der Mittelwert der Spermien in Gruppe I, welche eine Chromatindekondensation zeigten, bei nur  $9.02 \pm 5.36$  %. Während in Gruppe II der Mittelwert um 15.33 Prozentpunkte auf  $24.35 \pm 9.70$  % anstieg, zeigte die Gruppe III mit  $21.16 \pm 9.98$  % nur eine Erhöhung um 12.14 Prozentpunkte im Vergleich zur Nativgruppe.

Abb. 4.21 stellt den Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern, erhoben mit der Anilin-Blau- und Acridin-Orange-Färbung, grafisch dar.



**Abb. 4.21** Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur menschlicher Spermatozoen von *subfertilen* Spendern, mit verschiedenen Methoden erhoben (Anilin-Blau, Acridin-Orange)

Auffällig ist wiederum die starke Diskrepanz zwischen den beiden Färbemethoden. Während die Werte aller Gruppen bei der Anilin-Blau-Färbung über der 80%-Marke lagen, wurde bei der Acridin-Orange-Färbung noch nicht einmal die 30%-Marke erreicht. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Spermien mit Chromatindekondensation in der Nativejakulatgruppe lagen bei dieser Färbemethode wieder unter der 10%-Marke.

**Tab. 4.30** Signifikanzen der Differenzen (p-Werte) zwischen den Gruppen in Bezug auf die Chromatinschädigung von *subfertilen* Spendern

	<b>Gr. I - Gr. II</b>	<b>Gr. I - Gr. III</b>	<b>Gr. II - Gr. III</b>
<b>Anilin-Blau-Färbung (n = 63)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>
<b>Acridin-Orange-Färbung (n = 63)</b>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>&lt;0.0001</i>	<i>0.0002</i>

Die in Tab. 4.30 aufgeführten Signifikanzen zeigen bei beiden Färbemethoden mit p-Werten zwischen  $p < 0.0001$  und  $p = 0.0002$  signifikante bis hoch signifikante Werte für die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.4 Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der fertilen und subfertilen Proben der Gruppen I - III und die Signifikanzen der Differenzen

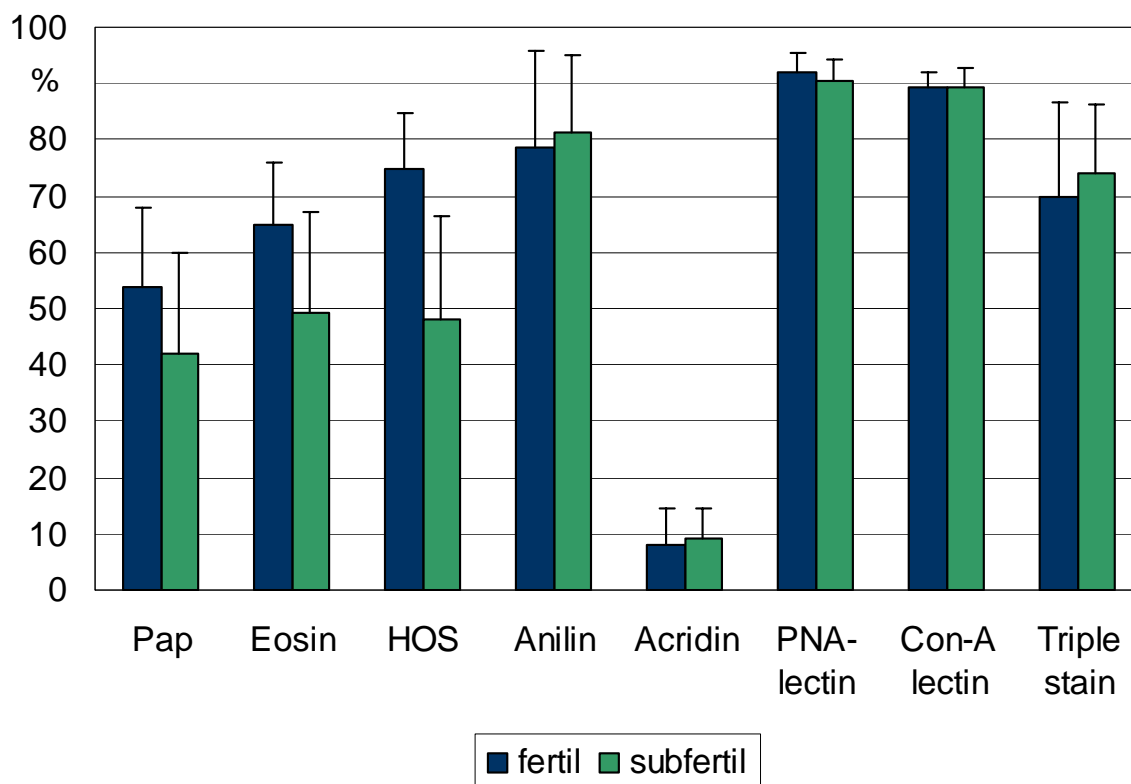
In diesem Abschnitt wurden die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Gruppen I - III (Nativejakulat, Stickstoffdampf und biologische Friermaschine) sowie die jeweiligen Signifikanzen der Differenzen tabellarisch und grafisch gegenübergestellt.

**Tab. 4.31** Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Nativejakulatgruppe (Gr. I) und die Signifikanzen der Differenzen

	<b>fertile Gruppe</b>	<b>subfertile Gruppe</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Morphologie (PAP)</b>	53.75 $\pm$ 14.18	42.14 $\pm$ 17.61	0.023
<b>Eosin-Test</b>	64.83 $\pm$ 10.97	49.30 $\pm$ 17.99	0.001
<b>HOS-Test</b>	74.67 $\pm$ 10.07	48.13 $\pm$ 18.10	< 0.0001
<b>Anilin-Blau-Färbung</b>	78.50 $\pm$ 17.31	81.33 $\pm$ 13.75	0.601
<b>Acridin-Orange-Färbung</b>	8.08 $\pm$ 6.54	9.02 $\pm$ 5.36	0.649
<b>PNA-lectin</b>	92.08 $\pm$ 3.20	90.46 $\pm$ 3.81	0.137
<b>Concanavalin-A-lectin</b>	89.33 $\pm$ 2.50	89.21 $\pm$ 3.68	0.884
<b>Triple-stain-Färbung</b>	69.73 $\pm$ 16.82	74.22 $\pm$ 11.99	0.3

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Nativejakulatgruppe und die Signifikanzen der Differenzen aufgeführt. Es zeigt sich, dass nur die morphologischen Veränderungen sowie die Ergebnisse des Eosin- und HOS-Testes zwischen den *fertilen* und *subfertilen* Spendern in der Nativejakulatgruppe signifikant

verschieden zueinander sind. Alle anderen Parameter zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Nativejakulatgruppe.



**Abb. 4.23** Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Nativejakulatgruppe (Gr. I)

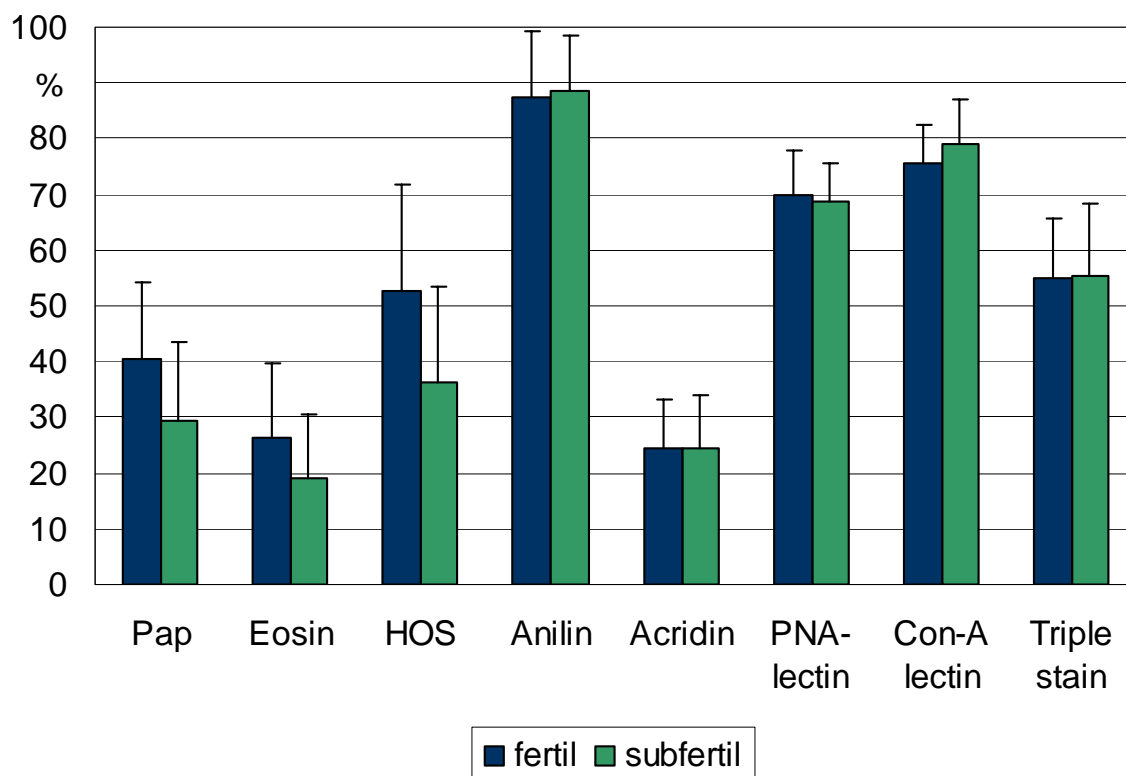
Auch in der grafischen Darstellung lassen sich die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse nachvollziehen. Die Unterschiede in den Mittelwerten der Parameter PAP, Eosin und der *fertilen* und *subfertilen* Spender sind deutlich zu sehen, während die Unterschiede der übrigen Parameter nur gering ausfallen, was in den Signifikanzwerten deutlich über 0.05 zu erkennen ist.

**Tab. 4.32** Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Stickstoffdampfgruppe (Gr. II) und die Signifikanzen der Differenzen

	<b>fertile Gruppe</b>	<b>subfertile Gruppe</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Morphologie (PAP)</b>	40.58 ± 13.75	29.46 ± 13.95	0.021
<b>Eosin-Test</b>	26.50 ± 13.18	19.22 ± 11.20	0.094
<b>HOS-Test</b>	52.58 ± 19.16	36.07 ± 17.25	0.014
<b>Anilin-Blau-Färbung</b>	87.42 ± 11.86	88.56 ± 10.10	0.760
<b>Acridin-Orange-Färbung</b>	24.5 ± 8.72	24.35 ± 9.70	0.958
<b>PNA-lectin</b>	69.75 ± 7.97	68.78 ± 6.9	0.698
<b>Concanavalin-A-lectin</b>	75.58 ± 6.95	78.95 ± 8.11	0.153
<b>Triple-stain-Färbung</b>	55.09 ± 10.48	55.18 ± 13.29	0.858

In Tab. 4.32 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Stickstoffdampfgruppe (Gr. II) und die Signifikanzen der Differenzen aufgeführt. Es zeigt sich, dass nur die morphologischen Veränderungen sowie die Ergebnisse des HOS-Testes zwischen den *fertilen* und *subfertilen* Spendern in der Stickstoffdampfgruppe (Gr. II) signifikant verschieden zueinander sind. Die Eosinwerte unterscheiden sich mit einem p-Wert von 0.094 in dieser Gruppe nicht mehr signifikant voneinander. Auch alle anderen Parameter zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Stickstoffdampfgruppe (Gr. II).





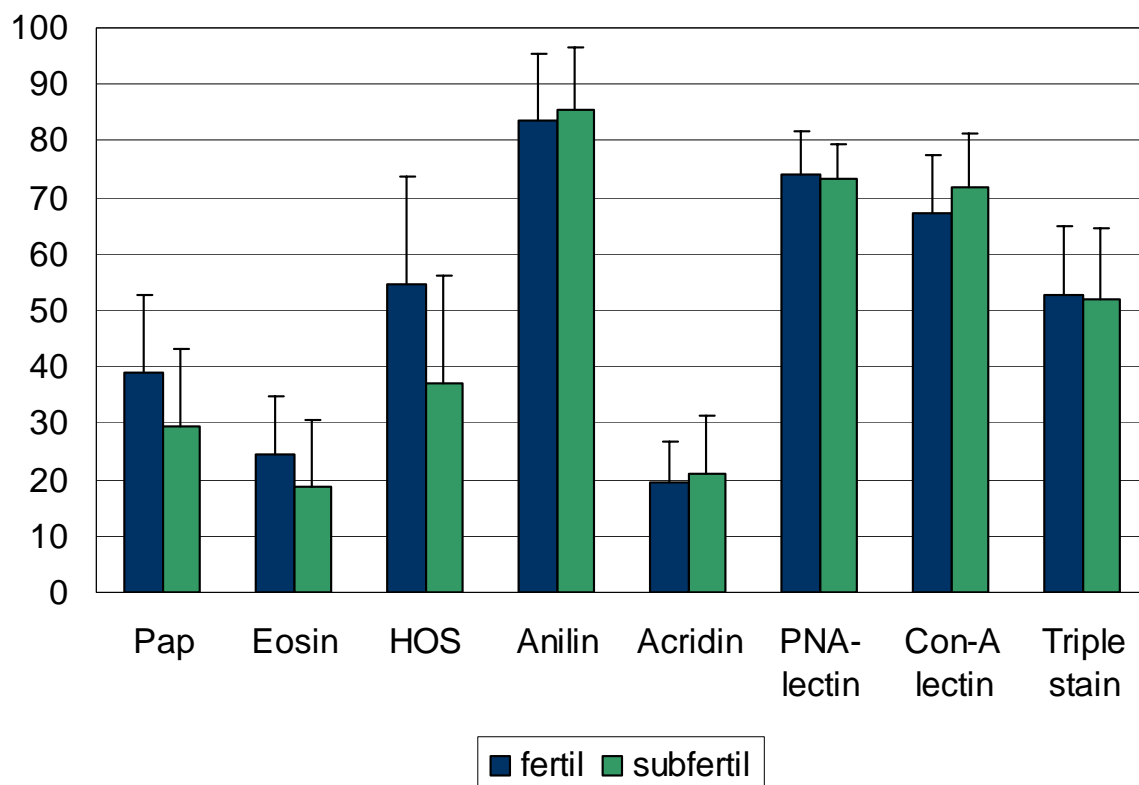
**Abb. 4.24** Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Stickstoffdampfgruppe (Gr. II)

Auch in der grafischen Darstellung lassen sich die in Tab. 4.32 aufgeführten Ergebnisse nachvollziehen. Die Unterschiede in den Mittelwerten der Parameter Pap und der *fertilen* und *subfertilen* Spender sind deutlich zu sehen. Die Differenz zwischen den Eosinwerten der *fertilen* und *subfertilen* Spender in der Stickstoffdampfgruppe ist im Vergleich zur Nativejakulatgruppe geringer. Die Unterschiede der übrigen Parameter fallen ebenfalls nur gering aus.

**Tab. 4.33** Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Friermaschinengruppe (Gr. III) und die Signifikanzen der Differenzen

	<b>fertile Gruppe</b>	<b>subfertile Gruppe</b>	<b>Signifikanz</b>
<b>Morphologie (Pap)</b>	38.75 ± 13.75	29.29 ± 13.93	0.045
<b>Eosin-Test</b>	24.33 ± 10.49	18.68 ± 11.96	0.113
<b>HOS-Test</b>	54.67 ± 18.87	37.02 ± 19.14	0.009
<b>Anilin-Blau-Färbung</b>	83.5 ± 11.99	85.48 ± 10.90	0.604
<b>Acridin-Orange-Färbung</b>	19.58 ± 7.14	21.16 ± 9.98	0.521
<b>PNA-lectin</b>	74.08 ± 7.48	73.25 ± 6.30	0.724
<b>Concanavalin-A-lectin</b>	67.25 ± 10.35	71.92 ± 9.42	0.167
<b>Triple-stain-Färbung</b>	52.55 ± 12.26	51.84 ± 12.85	0.908

In Tab. 4.33 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Friermaschinengruppe (Gr. III) und die Signifikanzen der Differenzen aufgeführt. Es zeigt sich erneut, dass nur die morphologischen Veränderungen sowie die Ergebnisse des HOS-Testes zwischen den *fertilen* und *subfertilen* Spendern in der Friermaschinengruppe (Gr. III) signifikant verschieden zueinander sind. Auch in Gr. III unterscheiden sich die Eosinwerte mit einem p-Wert von 0.113 in dieser Gruppe nicht mehr signifikant voneinander. Auch alle anderen Parameter zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Friermaschinengruppe (Gr. III).



**Abb. 4.25** Grafische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter der *fertilen* und *subfertilen* Proben der Friermaschinengruppe (Gr. III)

Auch in der grafischen Darstellung lassen sich die in Tab. 4.33 aufgeführten Ergebnisse nachvollziehen. Die Unterschiede in den Mittelwerten der Parameter Pap und der *fertilen* und *subfertilen* Spender sind deutlich zu sehen. Die Differenz zwischen den Eosinwerten der *fertilen* und *subfertilen* Spender in der Friermaschinengruppe (Gr. III) ist zu gering, um als signifikant bewertet zu werden. Die Unterschiede der übrigen Parameter fallen ebenfalls nicht signifikant aus.

# 5 Diskussion

---

## 5.1 Einfluss der Kryomethode auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität

Die schädigenden Auswirkungen des Einfrier-Auftau-Prozesses auf die Vitalität, Membranintegrität und Morphologie menschlicher Spermatozoen ist in der Forschung der Kryokonservierung schon lange Zeit bekannt [*Crister et al. 1987, Crister et al. 1988, Yoshida*].

Wie kontrovers die Rolle der einzelnen Parameter, wie z. B. der Morphologie, für eine erfolgreiche Befruchtung bislang diskutiert wurde zeigen verschiedene Berichte. Manche Forscher halten die Morphologie für den besten Parameter, um das Fertilisationspotenzial der Spermatozoen zu bestimmen [*Bostofte et al., Check et al. 1991, Crister et al. 1987, Rogers et al. 1983*]. *FrancaVilla* [31] z. B. fand eine signifikante Korrelation zwischen Samenmorphologie und Schwangerschaftsrate in der intrauterinen Befruchtung (IUI). *CHECK* [13] wiederum konnte keine der o. g. Resultate durch seine Studien bestätigen. Der am häufigsten beschriebene negative Effekt der Einfrier-Auftau-Prozedur ist eine deutliche Beeinträchtigung der Spermienbeweglichkeit [*Yoshida et al.*]. *Serafini et al.* [92] konnten ebenfalls demonstrieren, dass bei Kryokonservierung eine Abnahme der normal geformten Spermatozoen, der Vitalität und damit der Fertilitätskapazität auftritt. *Check et al.* [14] beobachteten, dass der Anteil der motilen Spermien nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur signifikant höher war, wenn der Einfriervorgang mit einem semiprogrammierbaren Einfriergerät (Cellevector) stattfindet, verglichen mit einem unkontrollierten und schnellen Einfrieren mittels Stickstoffdampf.

Vitalität, Membranintegrität und Morphologie sind sicherlich Parameter die eng miteinander verbunden sind. So ist die Vitalität zum Beispiel von der Membranintegrität mitbestimmt. Stark ausgeprägten Abnormalitäten der Morphologie, wie z.B. im Bereich des Nacken und Mittelstückes sowie des Schwanzes, können ebenfalls vitalitätslimitierend sein.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigten unabhängig davon ob sie als fertil oder subfertile einzustufen waren, dass die Vitalität der Spermatozoen aus der Gruppe I (Nativejakulat) nach dem Kryoprozess (Gruppe II und III) signifikant erniedrigt war ( $p < 0.0001$ ). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Gruppenvergleich II vs. III kein signifikanter Unterschied ( $p = 0.358$ ). Das bedeutet also, dass bezüglich der Vitalität kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kryomethoden zu erheben war (Tabelle 4.2).

Darüber hinaus zeigte sich Vergleichbares für die Membranintegrität und die Morphologie. Auch hier waren die Ergebnisse der Proben, unabhängig vom Fertilitätspotential, zwischen der Nativejakulatgruppe und den beiden Kryomethoden signifikant verschieden ( $p < 0.0001$ ). Zwischen den beiden Kryomethoden jedoch konnte wie bei der Vitalitätstestung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0.167$ ;  $p = 0.700$ ) (Tab. 4.2).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Untersuchungen unter Berücksichtigung des Fertilitätspotentials, so konnte gezeigt werden, dass sich die Werte in Bezug auf Vitalität, Membranintegrität und Morphologie sowohl der fertilen als auch subfertilen Proben, nach der Kryokonservierung unabhängig von der Methode signifikant verschlechterten (fertil:  $p = 0.02$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.007$ ; subfertil:  $p < 0.0001$ ) (Tab. 4.6, Tab. 4.10).

In Hinsicht auf die beiden Kryogruppen (Gr. II – Gr. III) waren auch nach Differenzierung der Proben in fertil und subfertil keine signifikanten Unterschiede der Vitalität, Membranintegrität und Morphologie festzustellen (fertil:  $p = 0.35$ ,  $p = 0.18$ ,  $p = 0.47$ ; subfertil:  $p = 0.53$ ,  $p = 0.34$ ,  $p = 0.94$ ) (Tab. 4.6, Tab. 4.10).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass es unabhängig von der Kryomethode und vom Fertilitätspotential der Proben, zu einer signifikanten Verschlechterung der Parameter Vitalität, Membranintegrität und Morphologie in dieser Studie kamen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von *Check et al. 1991* und *Esteves et al.* überein.

Bezüglich des Vergleichs der beiden Kryomethoden untereinander zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied, weder im Gesamtkollektiv noch nach Berücksichtigung des Fertilitätspotentials (fertil, subfertil).

Bei Betrachtung der detaillierten Ergebnisse bezüglich der Morphologie ist zu erkennen, dass es einer signifikante Verschlechterungen im Bereich des Nacken, des Mittelstückes sowie des Schwanzes gab ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.04$ ) (Tab. 4.4). Bei Unterscheidung zwischen fertil und subfertil, erwies sich in der Gruppe der subfertilen Proben, die Schwanzregion als besonders

anfällig. Aber auch im Bereich des Kopfes scheint es zu deutlichen, teils signifikanten bis hochsignifikanten Schäden gekommen zu sein (Tabelle 4. 7, Tabelle 4.12).

Bezüglich der drei Parameter Vitalität, Membranintegrität und Morphologie lässt sich im Rahmen dieser Studie keine der beiden Kryomethoden favorisieren, da die Ergebnisse keinen eindeutig richtungweisenden Vorteil bei einer der beiden Kryomethoden aufzeigen konnten. Die Kryokonservierung schädigte die genannten Parameter also in etwa gleichem Ausmaß, unabhängig von der Kryomethode und dem Fertilitätspotential.

Erklärt werden können diese Parameterverschlechterungen sicherlich durch die physikalischen und chemischen Prozesse und deren Auswirkungen auf die Spermatozoen. Also zum Beispiel die intra- wie auch extrazelluläre Eiskristallbildung, sowie osmotische Schwankungen, welche zur Schädigung der Spermatozoenmembranen und somit auch zu Morphologieveränderungen und Beeinträchtigung ihrer Vitalität beitragen.

## **5.2 Einfluss der Kryomethode auf die Akrosomenstruktur (PNA-lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität**

Die Bedeutung des Akrosoms sowie der Akrosomreaktion wurde im Vorfeld schon weitreichend erörtert. Daher ist es verständlich wie wichtig ein intaktes Akrosom für die Akrosomreaktion und somit eine erfolgreiche Befruchtung ist. Dies zeigten auch die Studien von *Mack* und *McLaughlin*.

Die in den Untersuchungen erzielten Ergebnisse zeigen, dass unabhängig vom primären Fertilitätspotential (fertil/subfertil), die Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom nach dem Kryokonservieren signifikant vermindert ist ( $p < 0.0001$ ) (Tab. 4.14).

Es zeigt sich aber auch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kryomethoden. Tabelle 4.14 verdeutlicht, dass sich auch zwischen den beiden Kryogruppen hochsignifikant verschiedene Werte ergaben ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.04$ ). Betrachtet man die Mittelwerte der drei verschiedenen Färbemethoden zur Bestimmung des Akrosomstatus, so konnte gezeigt werden, dass die Werte der Concanavalin-A lectin und Triple-stain Methode bei der Stickstoffdampfgruppe (Gruppe II) weniger stark gefallen sind als in der Gruppe der biologischen Friermaschine (Gruppe III) (Tab. 4.13, Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu wurden bei der Auswertung mit Concanavalin-A lectin bessere Werte für die biologische Friermaschine als für die Stickstoffdampfmethod ermittelt.

Unterscheidet man nun zwischen fertilen und subfertilen Proben, so ist auch hier zu sehen, dass die Zahlen der Spermatozoen mit intaktem Akrosom nach dem Kryoprozess signifikant abfallen (Tab. 4.18, Tab. 4.22). Auch nach Unterscheidung zwischen fertil und subfertil divergierenden die Ergebnisse je nach verwendeter Färbetechnik. D. h. bei Auswertung mit der PNA-lectin Methode schneidet die biologische Friermaschine besser ab als die Kryokonservierung im Stickstoffdampf.

Wie bereits im Abschnitt 3.7 erörtert wurde, kann durch die Triple-stain-Technik allerdings eine differenziertere Unterscheidung als nur Akrosom positiv oder negativ erfolgen. In der Untersuchung der Spermatozoen ohne Berücksichtigung des Fertilitätspotentials sieht man den deutlichen und signifikanten Rückgang der Anzahl der Spermatozoen welche als lebend mit Akrosom eingestuft wurden zwischen der Nativejakulatgruppe und den beiden Kryogruppen. Vergleicht man diese (Gruppe II-Gruppe III) allerdings miteinander, ergeben

sich für alle Merkmale (lebend - mit Akrosom, lebend - ohne Akrosom, tot - mit Akrosom, tot - ohne Akrosom) keine, allenfalls knapp signifikante Ergebnisse (Tab. 4.16).

Die gleichen Schlussfolgerungen können auch bezüglich der Ergebnisse bei Einteilung der Proben in fertil und subfertil getroffen werden.

Einer Erklärung für die aufgezeigten Abweichungen der Ergebnisse der drei Methoden könnte durch den unterschiedlichen Mechanismus der Methoden selbst erklärt sein. So bindet der Farbstoff des PNA-lectin wie bereits im Kapitel 3.9 beschrieben an die äußere Akrosomenmembran, die Concanavalin-A lectin Methode wirkt auf Grund der Bindung an die innere Akrosomenmembran und die Triple-stain Färbung hingegen benötigt die Enzyme der Akrosomenmatrix zur Präsentation des Rosa-Bengalfarbstoffs. Führt man sich dies vor Augen, so wäre zu diskutieren, welche der hier angewandten Methoden die realistischsten Ergebnisse erzielt. So könnten zum Beispiel bei Verlust der äußeren Akrosomenmembran und Bestehen bleiben der inneren Membran unterschiedliche Ergebnisse der beiden Fluoreszenzmethoden (PNA lectin, Concanavalin-A lectin) gewonnen werden. Wobei bei diesen beiden Methoden keine Aussage über den Inhalt des Akrosoms möglich ist. So könnten vorhandene Akrosomenmembranen auch Mikroleckagen aufweisen, wodurch die im inneren des Akrosoms vorhandenen Enzyme verloren gegangen sein könnten oder zumindest in ihrer Zusammensetzung aus dem notwendigen Gleichgewicht gebracht sind.

Eine Kombination aus Methoden, welche an verschiedenen Stellen ansetzt ist somit sicherlich denkbar, allerdings muss dabei der Kosten- und Zeitfaktor berücksichtigt werden. Eine Methode, welche die Vorteile mehrerer verschiedener Methoden in sich vereint, wäre diesbezüglich sicher effizienter.

Zusammenfassend kann im Rahmen dieser Studie festgestellt werden, dass auf Grund der Unterschiedlichkeit der Ergebnisse, trotz Anwendung dreier Färbetechniken, keine der beiden Kryomethoden favorisiert werden kann.

Es könnte in zukünftigen Studien von Interesse sein diese drei, und weitere Methoden zur Bestimmung des Akrosomstatus, genauer zu beleuchten und bezüglich ihrer Aussagekraft miteinander zu vergleichen.



### 5.3 Einfluss der Kryomethode auf die Chromatinstruktur (Anilin-Blau und Acridin-Orange) menschlicher Spermatozoen, ohne und mit Berücksichtigung der Fertilität

Die Konsequenzen der Kryokonservierung auf die Integrität des Spermienkerns, der Chromatinstabilität und der Zentrosomen sind weniger erforscht. Eine normale Kondensation und Stabilisierung des Spermienchromatins erlaubt einen sicheren Transport des männlichen Genoms und die Dekondensation nach der Spermienpenetration oder -injektion in das Zytoplasma der Eizelle und ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Fertilisierung [Flaherty *et al.*]. Daher ist es wichtig die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Chromatinkondensation näher zu beleuchten.

Kryoschäden im Bereich des Chromatin von reifen Spermatozoen können durch zytoplasmatische Enzyme und biochemische Vorgänge repariert werden. Dies ist allerdings bei in Kryokonservierung befindlichen Spermatozoen auf Grund der deutlich reduzierten Stoffwechselaktivitäten im Bereich der Zellen nicht möglich [Van Loon *et al.*]. Ein Beispiel für auftretende Schäden durch die Kryokonservierung ist die so genannte Überkondensation. Royere *et al.* beobachteten, dass die Zahl überkondensierter Spermatozoen nach dem Einfrieren-Auftauprozess erhöht ist. Dies bewirkt eine Verzögerung der Präsentation des väterlichen Erbgutes, und somit ein Fehlschlagen der Fertilisation.

Ashwood-Smith und Edwards [1996] sind jedoch der Meinung, dass die zytoplasmatischen Enzyme der befruchteten Eizelle die Reparatur der Kryoschäden im Bereich des Chromatins des Spermatozoens übernehmen könnten.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Betrachtung des Gesamtkollektivs eine hoch signifikante Verschlechterung der Chromatinkondensation nach dem Kryoprozess ( $p < 0.0001$ ) (Tab. 4.26).

Tabelle 4.25 und Abb. 4.19 zeigen auf, dass die Kryokonservierung mit Stickstoffdampf einen stärkeren negativen Einfluss auf die Chromatinstruktur hat als die Konservierung mit der biologischen Friermaschine, unabhängig von der gewählten Färbemethoden.

Betrachtet man nur die fertilen Proben, so zeigt sich, dass bei Auswertung mit der Anilin-Blau-Färbung die Zunahme der komplett blau gefärbten Spermatozoen nach dem Kryokonservieren in der Stickstoffdampfgruppe mit  $p = 0.003$  stärker ausfällt, als in der Maschinengruppe mit  $p = 0.07$  (Tab. 4.28). Dies spricht in Bezug auf die Chromatinstruktur

für das Verfahren der biologischen Friermaschine. Auch der Gruppenvergleich (Gr. II – Gr. III) mit einem signifikanten  $p = 0.008$  bestätigt diese Beobachtungen.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Auswertung mittels Acridin-Orange-Färbung, dass im Gegensatz zur Anilin-Blau-Methode, ein signifikanter Unterschied zwischen der Nativejakulatgruppe und der Maschinengruppe besteht (Tab. 4.28).

Hierbei darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass die Anzahl der untersuchten Proben mit  $n = 12$  fertiler Spender, im Vergleich zum Gesamtkollektiv mit  $n = 75$  und den subfertilen Proben mit  $n = 63$ , gering ist. Es ist durchaus möglich, dass bei einer Untersuchung einer höheren Anzahl von fertilen Spendern ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Anzahl der rot gefärbten Spermien (DNA-Strangbrüche) zu erheben ist.

Auch nach der Untersuchung der Proben, welche als subfertil eingestuft worden, zeigen sich für beide Färbemethoden signifikante Unterschiede zwischen der Nativejakulatgruppe und den Kryogruppen (Tab. 4.30). Die Analyse der Werte der beiden Kryogruppen zeigt einen signifikanten Unterschied zu Gunsten der Maschinengruppe (Anilin-Blau:  $p < 0.0001$ , Acridin-Orange:  $p = 0.0002$ ).

Diese Ergebnisse sind kontrovers zu den Studien von *Huret* und *Miquereau*, die in ihren Untersuchungen gezeigt haben, dass die Chromatinstruktur von wieder aufgetauten Spermatozoen unverändert blieben.

In Einklang stehen unsere Ergebnisse z.B. mit *Royere et al.* und *Hammamah et al.*, die ebenfalls einen Abfall der Chromatinstabilität nach Färbung mit Acridin-Orange nachweisen konnten. Des Weiteren berichtete *Eliasson*, dass die Kerne von Spermatozoen infertiler Männer weniger stabil sind als die Kerne von Spermatozoen fertiler Männer.

Diese Ergebnisse zeigen die hohe Sensibilität des Chromatins bei der Kryokonservierung. Es wird aber auch deutlich, dass in diesem Bereich noch einiges an Forschungsarbeit gerade auch in Bezug auf die entsprechenden Methoden geleistet werden muss.

---

## **5.4 Signifikanzen der Differenzen der erhobenen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Nativejakulat-, Stickstoffdampf- und Maschinengruppe**

### **5.4.1 Signifikanzen der Differenzen der einzelnen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Nativejakulatgruppe**

Es wurden die Werte der untersuchten Parameter unter Berücksichtigung des Fertilitätspotentials auf die Signifikanzen der Differenzen untersucht. Beginnend mit der Nativejakulatgruppe zeigt Tab. 4.31 signifikante Differenzen bei der Pap-Färbung, dem Eosin-Test und dem HOS-Test ( $p = 0.023$ ,  $p = 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ). DNA-Kondensation und Akrosomenstatus hingegen zeigen keine signifikanten Differenzen zwischen der fertilen und subfertilen Gruppe. Morphologie, Vitalität, Membranintegrität sowie die Chromatinkondensation (Acridin-Orange-Färbung) wurden in dieser Studie als Parameter zur Einteilung in fertil und subfertil herangezogen. Es zeigen sich also signifikante Differenzen zwischen fertil und subfertil, außer der Acridin-Orange-Färbung, im Bereich der Parameter, welche zur Bestimmung des Fertilitätspotentials herangezogen worden.

Da bei der anfänglichen Einteilung ein entsprechend schlechter Wert in einem der oben genannten Parameter bereits zum Ausschluss aus der fertilen Gruppe führte, ist davon auszugehen, dass im Nativejakulat deutlich häufiger Veränderungen der Morphologie, Vitalität und Membranintegrität auftraten, als Veränderungen der Chromatinkondensation, was sich nun in der fehlenden Signifikanz der Differenzen ( $p = 0.649$ ) zwischen fertilen und infertilen Spermienproben zeigt. Aber auch die Anilin-Blau-Methode zur Bestimmung der Chromatinkondensation zeigt mit  $p = 0.601$  einen vergleichbaren Wert zwischen fertil und subfertil. Vergleicht man allerdings die beiden Methoden zur Bestimmung der Chromatinkondensation miteinander, so stellt man fest, dass die Ergebnisse weit voneinander abweichen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass verschiedene chemische Prozesse diesen Methoden zugrunde liegen, wodurch diese sichtliche Abweichung erklärt werden kann. Hier besteht sicherlich weiterer wissenschaftlicher Bedarf zur Klärung bezüglich der Aussagekraft beziehungsweise Genauigkeit verschiedener Methoden bezüglich der Chromatinkondensation.

Die Werte der Nativejakulatgruppe bezüglich des Akrosoms zeigen ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen fertilen und subfertilen Proben. Die drei Methoden (PNA-

lectin, Concanavalin-A-lectin und Triple-stain) weisen allerdings deutlich enger beieinander liegende Werte auf. So fallen die Mittelwerte der fertilen Gruppe zwischen 69.73 und 92.08 %. Die Differenz zur subfertilen Gruppe mit Werten zwischen 74.22 und 90.46 % zeigt aber keine Signifikanz ( $p > 0.05$ ).

Zusammenfassend lässt sich also für die Nativejakulatgruppe feststellen, dass sich nur die Differenzen zwischen der fertilen und der subfertilen Gruppe in Bezug auf Morphologie, Vitalität und Membranintegrität signifikant verhalten. Also bis auf die Chromatinkondensation (ermittelt durch die Acridin-Orange-Färbung) genau die Parameter die zur Einteilung in die jeweilige Gruppe führte. Dies unterstreicht die bekannten und allseits angewandten WHO-Kriterien.

#### **5.4.2 Signifikanzen der Differenzen der einzelnen Parameterwerte der fertilen und subfertilen Proben der Stickstoffdampf und der Maschinengruppe**

Ähnlich wie im Vergleich der Nativejakulatgruppe verhält es sich bei den beiden Kryogruppen. Auch hier ergeben sich Signifikanzen der Differenzen mit p-Werten zwischen 0.009 und 0.045 für die Morphologie und die Membranintegrität (Pap, HOS-Test). Die Vitalität hingegen zeigt bei beiden Kryogruppen mit  $p = 0.094$  für den Stickstoffdampf und  $p = 0.113$  für die biologischen Friermaschine keinerlei Signifikanz der Differenzen zwischen fertiler und subfertiler Gruppe.

Die verschiedenen physikalischen und chemischen Veränderungen die eine Spermienzelle während des Kryo- und Auftauprozesses erfährt können unabhängig von der Lokalisation der Schädigung zu deren Tod führen. Dies bedeutet also, dass nach der Kryokonservierung, unabhängig von der gewählten Kryomethoden, ein Verlust an Vitalität zu beobachten ist und zwar unabhängig von der Einteilung in fertil oder subfertil. Die Ursache scheint auf Grund der oben angeführten Ergebnisse (siehe auch Tabellen 4.32 und 4.33) vor allem durch Veränderungen der Morphologie (Pap) und Verlust der Membranintegrität (HOS-Test) bedingt zu sein. Bezüglich der restlichen Parameter (Chromatinkondensation, Akrosomenstatus) ergeben sich auch in der Stickstoffdampf- und der Maschinengruppe keine signifikanten Differenzen zwischen fertil und subfertil.

## 5.5 Schlussfolgerung

Die angeführten Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Anteil der vitalen Spermien mit normaler Morphologie, intakter Membranintegrität, kondensierter DNA und intaktem Chromosom nicht nur bei infertilen sondern auch bei fertilen Probanden nach der Kryokonservierung zum Teil hochsignifikant abfällt, unabhängig von der verwendeten Kryomethode.

Definitiv ist in dieser Studie die Schlussfolgerung, dass die Kryokonservierung mit Hilfe der biologischen Friermaschine signifikant weniger Schädigung auf die Chromatinkondensation nach sich zog, sowohl bei fertilen als auch bei subfertilen Proben. Gerade das Chromatin ist für den Erfolg einer Befruchtung und damit die Entstehung neuen Lebens unentbehrlich. Selbst bei der etablierten intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), bei der Störungen die das Eindringen des Spermiums in die Eizelle unmöglich machen können kompensiert werden, ist das intakte Chromatin jedoch absolute Grundvoraussetzung für eine ungestörte Befruchtung.

In Anbetracht der aufgeführten Ergebnisse und deren Diskussion ist also im Rahmen dieser Studie deutlich geworden, dass die Kryokonservierung zu Schädigungen der einzelnen betrachteten Parameter führt, sowohl bei der Verwendung der Stickstoffdampf Methode als auch der deutlich kostenintensiveren Methode mit der biologischen Friermaschine. Bei den meisten der untersuchten Parameter kann hier kein eindeutiger Vorteil für eine der beiden Kryomethoden herausgearbeitet werden, außer wie oben erörtert in Bezug auf die Chromatinkondensation. Da dieser allerdings eine wichtige Voraussetzung für das Stattfinden einer Befruchtung ist, sollte die Kryokonservierung mittels der computergesteuerten biologischen Friermaschine gerade auch bei subfertilen Männern zur Anwendung kommen. Damit kann gerade Einrichtungen und Instituten, die sich auf diesem Gebiet spezialisiert haben, die Anschaffung einer solchen Reparatur empfohlen werden.

# 6 Literaturverzeichnis

---

1. Al-Hasani S, Trotnow S, Barthel M (1982) Kryokonservierung von Kaninchenembryonen des 8-Zellstadiums im automatisierten "Offenen System". Geburtshilfe u. Frauenheilkunde. 848-852
2. Aloia RC, Curtin CC, Godron LM (1988) Lipid Domains and the relationship to the membrane functions Alan R. Liss, New York
3. Ashwood-Smith JM, Friedmann G (1979) Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196 C° in dimethylsulfoxide. Cryobiology 16: 132-140
4. Ashwood-Smith MJ, Edwards RG (1996) DNA repair by oocytes. Mol Hum Reprod. 2(1): 46-51
5. Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. J. Cell Biol. 93: 298-305
6. Banerjee S, Smallwood A, Hultien M (1995) ATP-dependent reorganization of human sperm nuclear chromatin. J Cell Sci 108: 755-65
7. Bank H, Maurer RR (1973) Survival of frozen rabbit embryos. Cryobiology 10: 508
8. Behrmann SJ, Sawada Y (1966) Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. Fertil Steril 17: 457-466
9. Blackshaw AW (1954) The prevention of temperature shock of bull and ram semen. Australian Journal of biological Science 7: 573-582
10. Bostofte E, Serup J, Rebbe H (1985) The clinical value of morphological rating of human spermatozoa. Int J Fertil 30(3):31-7
11. Bunge RG, Keettel W, Sherman J (1954) Clinical use of frozen sperm, report of four cases. Fertil. Steril. 5: 520-529
12. Chang MC, Walton A (1940) The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. Proceedings of the Royal society of London Series B 129, 517-527
13. Check JH, Bollendorfer A, Press M, Blu T (1992) Standard sperm morphology as a predictor of male fertility potential. Arch-Androl, 28: 39-41

14. Check ML, Check DJ, Katsoff JH (1996) Improved results of thawed sperm cryopreserved with slow stage cooling with a cellvator. *Arch Androl* 37: 61–4
15. Check ML, Check JH, Long R (1991) Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 27: 155–60
16. Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD (1987) Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 47(6): 980-4
17. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 50: 314-320
18. Darin-Bennett A, Poulos A, White IG (1974) The phospholipid and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J. of Reprod. And Fertil.* 41: 471-474
19. Darin-Bennett A, White IG (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology* 14: 466-470
20. De Leeuw FE, Colenbrander B, Verklerj AJ (1988) Cold-induced changes in bovine sperm plasma membrane: a freeze-fracture study. XI International congress of animal reproduction and artificial insemination (Dublin) 3: 237
21. Denil J, Kupker W, Al-Hasani S, Schill T, Kuczyk MA, Jonas U, Diedrich K (1996) Successful combination of transrektal elektroejaculation and intracytoplasmatic sperm injection in the treatment of anejaculation. *Hum Reprod*, 11: 1247-1249
22. Dittrich F, Trotnow S, Wurmthaler C (1982) Erlanger Kryokonservierungstechnik-Automatisierung des offenen Gefriersystems mit Selbstauslösung des Seeding. *Verhandlungsbericht der VII. Veterinar - Humanmedizinischen Tagung, Gießen*
23. Eliasson R, Enquist AM (1981) Chromatin stability of human spermatozoa in relation to men fertility. *Int J Androl* 3 (Suppl.): 73–4
24. Eliasson R, Treichl L (1971) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 22(2):134-7
25. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A (1996) Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertil Steril.* 66(5):798-804
26. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240 : 1131- 1133

27. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM (1991) Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol* 7: 297- 304
28. Farrant J (1965) Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature* 205: 1284
29. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matheews CD (1995) Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 197-210
30. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A (1992) Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in Spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 15: 330- 337
31. Francavilla F, Romano R, Santucci R, Poccia G (1990) Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligozoospermia and/or asthenozoospermia. *Fertil-Steril*, 53: 892-897
32. Hahn J (1980) The problems and future possibilities of up-to date bovine embryo preservation. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and AI Madrid* 2: 263-267
33. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998) Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30
34. Hammamah S, Royere D, Nicolle JC, et al (1990) Effect of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 30: 59–64
35. Holt WV, North RD (1984) Partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. of Experimental Zoology* 230: 473-483
36. Höppner W, Reinel D, Hartmann M (1986) Untersuchungen zur Fertilität von Patienten mit malignen Hodentumoren zum Zeitpunkt der Orchidektomie. *Andrologia* 18: 398-405
37. Huret JL, Miquereau MA (1984) Nuclear chromatin decondensation abilities of human spermatozoa. *Arch Androl* 13: 147–52
38. Ibrahim ME, Moussa M, Dedersen H (1990) Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor. *Int. J. Androl.* 13: 352-360



39. Jeyendran RPS, Van Der Ven HH, Perez AL, Palez M, Crabo BG, Zaneveld (1984) 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
40. Kaden R, Donnerhack A, Katzorke T (1983) Spermadeponierung in zentraler Kryosperma-Bank. *Fortschr Med* 101: 1322-1326
41. Kaden R, Grossgebauer K, Lübke F, Rohloff D, Sperling K (1986) Standardisierte Humansperma-Kryokonservierung. *Akt Dermatol* 12: 95-99
42. Kaden R, Katzorke T, Propping D, Klippel KF (1986) Kallikrein als Zusatz zum Kryosperma. In: Schill WB, Bollmann W (eds.) *Spermakonservierung, Insemination, Invitro-Fertilisation*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore: 92-96
43. Köhn FM, Schill WB (1988) Kryospermabank München – Zwischenbilanz 1974-1986. *Hautarzt* 39: 91-96
44. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R (1992) Thioldisulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.* 13: 342-348
45. Kramer JA, Krawetz SA (1997) RNA in spermatozoa: Implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod*; 3: 473–8
46. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van Der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986) Sperm morphology feature as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 46: 1118-1123
47. Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Matta JF, Simmons KF, Oehninger S (1988) Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 49: 116-117
48. Krzanowska H (1982) Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J Reprod Fertil.* 64(1): 97-101
49. Kuber W, Lunglmayr G, Seitz W, Grauhoff H, Weißbach L (1980) Fertilität bei Patienten mit Seminom des Hodens. *Urologe A* 19: 272-275
50. Lahav-Baratz S, Rothschild E, Grach B, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Dirnfeld M (2002) The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 17: 157-160

- 
51. Leibo SP (1977) Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. Elliott K, Whealan, J. (eds) The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series) Amsterdam, Elsevier North-Holland
  52. Leibo SP, Mazur, P (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. Daniel JC (ed). Methods in mammalian reproduction. New York, San Francisco, London, Academic Press
  53. Liu DY, Backer HWG (1992) Sperm nuclear Chromatin normality: relationship between sperm morphology , sperm - zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. Fertil. Steril. 58: 1178- 1184
  54. Lovelock J E (1953) The mechanism of the protective action of Glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochimica et Biophysica Acta 11: 28-36
  55. Ludwig M, Al-Hasani S, K pker W, Diedrich K (1998) Kryokonservierung menschlicher Eizellen im Pronukleusstadium: Prinzipien und Ergebnisse. Diedrich, K (ed) Weibliche Sterilit t: Ursachen, Diagnostik und Therapie, 1. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
  56. Luyet BJ, Hodapp EL (1938) Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. Proceedings of the society of the experimental biology and medicine 39: 433-434
  57. Lyon M, Whittingham DG, Glenister P (1977) Long-term storage of frozen mouse embryos under increased background irradiation. Ciba Foundation Symp. No. 52, Amsterdam
  58. Mack SR, Zanefeld LJ (1987) Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. Gamete Res 18: 375-383
  59. Mahadevan M, Trounson A (1983) Effect of cryoprotective media and dilution method on the preservation of human spermatozoa. Andrologia 15: 355
  60. Mantegazza, P (1866) Sullo sperma umano. Rendiconti dell'Istituto Lombardo di Scienze e Lettere 3, 183-196
  61. Maurer RR (1966) Repeated superovulation and ovum transfer and the survival of transferred ova and newborn in the rabbit 104. Thesis: Cornell University, Ithaca, New York
  62. Maurer RR (1978) Freezing mammalian embryos: A review of the techniques Criogenology 2: 45- 68
  63. Mazur P (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J. General Phys. 47: 347

- 
64. Mazur P (1970) Cryobiology. The freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949
  65. Mazur P (1977a) Slow-freezing injury in mammalian cells. Elliott K, Whealan J (eds.) *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series), Amsterdam, Elsevier North-Holland: 19-4R
  66. Mazur P (1977c) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rate. *Cryobiology* 14: 251-272
  67. McGann LE (1975) Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents *Cryobiology* 15: 382-390
  68. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG (1992) Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 95: 527-534
  69. Meistrich ML (1993) Nuclear morphogenesis during spermatogenesis. Kretser D (ed). *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, USA
  70. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, Van Zyl JA (1990) The evaluation of morphologic characteristics of human Spermatozoa according to strict criteria. *Hum. Reprod.* 5: 586-592
  71. Meryman HT (1956) Mechanism of freezing in living cells and tissues. *Science* 124: 5-15
  72. Meryman HT (1968) Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature* 218: 333-336
  73. Milovanov VK (1934) *Iskustvennoe osemenenie, S. L. zivontny* (artificial insemination of livestock) Seljhozgiz Moscow
  74. Monaco PJ, Rasch EM (1982) Differences in staining with D -specific fluorochromes during spermiogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 585
  75. Morris GJ, Acton E, Avery S (1999) A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 14: 1013-1021
  76. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG (1987) Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil.* 81(1): 127-35
  77. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod.* 10(5):1123-9

- 
78. Onnen-Isemann C (2000) Ungewollte Kinderlosigkeit und die Auswirkungen der Reproduktionsmedizin: Der Fall Deutschland [38 Absätze]. *Qualitative Social Research [Online Journal]*.1(1)
  79. Ossenbuhn S (1998) Exogenous influences on human fertility: Fluctuations in sperm parameters and results of in-vitro fertilization coincide with conceptions in the normal population. *Hum Reprod* 13: 2165-2171
  80. Phillips PH (1939) Preservation of bull semen. *J. of. Biological Chemistry* 130, 415
  81. Polge CA, Smith U, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666
  82. Poulos A, Darin-Bennett A, White IG (1973) The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comperatve Biochemistry and physiology Series B.* 46B: 541-549
  83. Quinn PJ, Chow PYW, White IG (1980) Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. of Reprod. and Fertil.* 60: 403-407
  84. Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der assistierten Reproduktion, *Dtsch Ärztebl* 95, 49: A-3166
  85. Roche Lexikon Medizin 2. Aufl. Urban und Schwarzenberg Verlag
  86. Rogers BJ, Bentwood BJ, Van Campen H, Helmbrecht G, Soderahl D, Hale W (1983) Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing Capacity. *J. of Androl.* 4: 119-125
  87. Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J (1988) Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human Spermatozoen: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamet. Res.* 21: 51
  88. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995) Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. of Androl.*, 16: 80- 87
  89. Sakkas D, Uner F, Bianchi PG, et al (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 11: 837-843
  90. Saling P, Leyton L (1989) 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57: 1123–1130

- 
91. Schill WB (1987) Beratung des Hodentumorpatienten aus andrologischer Sicht. *Fertilität* 3: 12-16
  92. Serafini PC, Hauser D, Moyer D, Marrs RP (1986) Cryopreservation of human Spermatozoa correlation of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona free hamster ova. *Fertil. steril.* 46: 691- 695
  93. Shaffner CS, Henderson EW, Card CG (1941) Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science* 20: 259-265
  94. Siebzehnrübel ER, Trotnow S, Kniewald S, Hünlich T (1986) Aspekte der Embryokonservierung. Schill W, Bollmann (eds) *Spermakonservierung, Insemination, In-vitro-Fertilisation*. Urban & Schwarzenberg
  95. Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC (1995) The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod.* 10(8):2031-43
  96. Singer SJ, Nicolson, GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720 –731
  97. Spallanzani L (1776) *Opuscoli di Fisica Animale e Vegetabile Opuscola 2. Observationie spcienze intorno ai vermicelli spermatici dell’ homo e degli animali*. Modena
  98. Talbot P, Chacon RS (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool.* 215(2): 201-8
  99. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 42(1): 87-91
  100. Terquem A, Dadoune JP (1983) Aniline blue staining of human Spermatozoa chromatin evaluation of nuclear maturation. Andre. J. (ed.) *The sperm cell*
  101. Tournaye H, Camus M, Goossens A (1995) Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 10: 115-119
  102. Trotnow S, Hünlich T, Kniewald T (1981) Successful cryopreservation and transplantation of mouse embryo. *Arch. Andrology, Suppl.* A 146
  103. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki (1997) Mammalian fertilization: a carbohydrate mediated event. *Biol Reprod.* 57(3): 487-94

- 
104. van Lis JM, Kalsbeek GL (1973) The interaction between human spermatozoa and the lectin concanavalin A. *Andrologie* 5(1): 45-57
  105. Van Loon AA, Den Boer PJ, Van der Schans GP, Mackenbach P, Grootegoed JA, Baan RA, Lohman PH (1991) Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation. *Exp Cell Res.* 193(2):303-9
  106. Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P (1993) Use of assisted fertilization. *Hum Reprod.* 8(11):1784-5
  107. Watson PF (1981a) The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of low temperature of biological membrane.* (G. J. Morris, A. Clarke, eds), Academic Press, London
  108. Watson PF (1981b) The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62: 483-492
  109. Watson PF, Morris GJ (1987) Cold shock injury in animal cells. In: *Temperature and Animal Cells.* ( K. Bowler, B. J. Fuller, eds) Society of Experimental Biology Symposium No. 41. The Company of Biology Symposium No. 41. The Company of Biologists, Cambridge
  110. Weißbach L, Bredefeld EA, Seeber S (1985) Hodentumoren: Frühzeitige Diagnose und stadiengerechte Therapie sichern den Erfolg. *Dtsch Ärztebl* 82: 1340-1350
  111. Whittingham DG (1977b) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. Elliott K, Whaelan (eds) *The freezing of mammalian embryos.* Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series) Amsterdam, North-Holland
  112. World Health Organization (1992) WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3<sup>rd</sup> Ed. London: Cambridge University Press
  113. Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T, Yajima A (1990) Fertilization of fresh and frozen human spermatozoa. *Assist Reprod Technol Androl* 1: 164-72

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD med. vet. Dr. rer. nat. Mohamad Eid Hammadeh für die Bereitstellung des Themas und für die jederzeit bereitwillige, freundliche Hilfe und Unterstützung in allen nicht immer einfachen Phasen meiner Dissertation. Zugleich gilt mein Dank Frau Dr. med. Constanze Fischer-Hammadeh für die Betreuung und Beratung bezüglich der fachlichen und wissenschaftlichen Aspekte.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Drs. h.c. Werner Schmidt, Direktor der Universitätsfrauenklinik des Saarlandes, für die Möglichkeit der uneingeschränkten Nutzung der Laborräume und benötigten Materialien sowie Chemikalien.

Des Weiteren gilt mein Dank den medizinisch-technischen Assistentinnen des IVF-Labors für Ihre hilfreiche und unermüdliche Unterstützung bei allen labortechnischen Arbeiten und Fragen, insbesondere Frau Stephanie Seyfried gebührt mein besonderer Dank für Ihre persönliche moralische Unterstützung.

Herrn Dipl. mat. T. Georg vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik danke ich für seine Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Verarbeitung des Datenmaterials.

Ein besonders lieber Dank geht an meine Schwiegermutter für das Korrekturlesen und für die konstruktive Kritik, die diese Arbeit mitgeformt hat.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung während meines Studiums, dieser Arbeit und in den schwereren Zeiten, in denen sie mir zur Seite standen.

Mein größter Dank an meinen lieben Mann Michael, der mich nicht nur unterstützt, sondern auch unermüdlich motiviert hat. Für seine und die geopfert Zeit meiner Tochter Sarah-Marie mein tiefer Dank und das Versprechen nun umso mehr für sie da zu sein.

## **Publikationen**

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W** (1999) Comparison between vitality, chromatin and morphology structure damage as well as membrane integrity of human spermatozoa after freeze-thawing with biological programmed freezer or liquid nitrogen vapour. Proceedings of the 15<sup>th</sup> Annual meeting of the ESHRE, Tours, France

**Hammadeh ME, Zeppezauer M, Szarvasy D, Schmidt W** (1999) Association between aetiology of infertility and immunoglobulin concentration in follicular fluid and their effect on fertilization rate in IVF/ET programm. Proceedings of the First congress on controversies in obstetrics gynecology & infertility, Prague, Czech Republic, 1999

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W** (1999) Comparison between vitality, chromatin and morphology structure damage as well as membrane integrity of human spermatozoa after freeze-thawing with biological programmed freezer or liquid nitrogen vapour. Human Reproduction. Abstract Book 1(14): 77

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W** (2001) Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. J Assist Reprod Genet. 18(7): 364-70

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W** (2000) Effect of cryopreservation technique on acrosome structure of human spermatozoa. Fertility Sterility 74, 38:161-162

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Schmidt W** (2001) Comparison between acrosome cryoinjury of human spermatozoa after freeze-thawing with liquid nitrogen vapour or biological freezer. Book of Abstracts

**Hammadeh ME, Szarvasy D, Amer AS, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Schmidt W** (2001) Relationship Between Freezing Technique and Acrosome Integrity of Human Spermatozoa. The 17th World Congress on Fertility and Sterility (IFFS) November 2001, Melbourne, Australia. Monduzzi Editore.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Diana Wagner, geb. Kamrath  
Geburtsdatum: 10. Mai 1973  
Geburtsort: Vacha/Rhön  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Adresse: Windsberger Str. 93, 66954 Pirmasens

## Schulbildung

09/79-01/81 Polytechnische Oberschule „Werner Schmidt“, Frankenheim  
02/81-08/89 Polytechnische Oberschule „Julius Fucik“, Bad Brambach  
09/89-08/91 Erweiterte Oberschule „Soja Kosmodemjanskaja“, Oelsnitz  
Abschluss: Abitur

## Berufsausbildung

10/91-11/92 Ausbildung zur Krankenschwester am Sertürnerkrankenhaus, Einbeck  
12/92-09/94 Weiterführung der Ausbildung zur Krankenschwester am Wenckebachkrankenhaus, Berlin  
Abschluss: Krankenpflegeexamen

## Studium

10/94-03/96 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin  
ab 04/96 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg  
  
09/98 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/00 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
04/00-04/01 Tätigkeit als PJ an der Universitätsklinik Homburg  
04/01 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

## Beruf

06/01-01/02 Tätigkeit als ÄiP in der Universitätsklinik Homburg/Saar, Abtl. für Allgemein Chirurgie  
02/02-08/02 Tätigkeit als ÄiP im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin, Abtl. für Allgemein Chirurgie  
09/02-11/02 Tätigkeit als ÄiP in der Universitätsklinik Homburg/Saar, Abtl. für Innere Medizin II  
12/02-06/06 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Universitätsklinik Homburg/Saar, Abtl. für Allgemein Chirurgie  
  
07/06- dato Tätigkeit als Assistenzärztin im St. Josef Krankenhaus Neunkirchen/Saar, Abtl. für Chirurgie