

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Saar

**Erfolgsprognose von IVF-Behandlungen nach in-vitro  
Dekondensation der Spermien und Beurteilung des  
Spermienchromatins nach Acridin-Orange Färbung oder  
mittels morphometrischer, computer-gestützter Spermien-  
Analyse**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

Vorgelegt von: Alexandra Müller, geb. Bernardi  
geb. am 11.03.1976 in Püttlingen

# INHALT

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

### 1.1. Summary

## 2. EINLEITUNG

- 2.1. Historischer Überblick
- 2.2. Allgemeine Einleitung
- 2.3. In-vitro Fertilisation (IVF)
- 2.4. Chromatin-Kondensation
- 2.5. Eigene Fragestellung

## 3. MATERIAL UND METHODEN

- 3.1. **Patienten**
  - 3.1.1. Klassisches Spermogramm
  - 3.1.2. Samenaufbereitung
  - 3.1.3. Chromatin-Dekondensation
    - 3.1.3.1. Acridin-Orange Färbung
    - 3.1.3.2. Färbung nach Papanicolaou
    - 3.1.3.3. Morphometrische Analyse
- 3.2. **Patientinnen**
  - 3.2.1. Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation
- 3.3. **In-vitro Fertilisation**
  - 3.3.1. Nachweis der Schwangerschaft
  - 3.3.2. Aufbereitung der nicht befruchteten Eizellen
  - 3.3.3. Färbung der nicht befruchteten Eizellen
  - 3.3.4. Auswertung der gefärbten Eizellen

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. Patienten**

#### 4.1.1. Klassische Samenanalyse

##### 4.1.1.1. pH-Wert

##### 4.1.1.2. Comburtest und Martest

##### 4.1.1.3. Dichte

##### 4.1.1.4. Motilität

#### 4.1.2. Chromatin-Dekondensation

##### 4.1.2.1. Nachweis von kondensiertem Chromatin mit der Acridin-Orange-Färbung

##### 4.1.2.2. Nachweis der Dekondensation mittels der morphometrischen Analyse

A: Fläche der Spermien (area)

B: Minimaler und maximaler Durchmesser (DMIN und DMAX)

C: Form der Spermienköpfe (FCI)

### **4.2. Patientinnen**

#### 4.2.1. a Gewonnene, fertilisierte und befruchtete Eizellen

#### 4.2.1. b Unbefruchtete Eizellen

#### 4.2.2 Fertilisation

##### 4.2.2.1. Klassische Samenanalyse und Fertilität/Gravidität

A: Dichte und Fertilität

B: Motilität und Fertilität

C: Dichte und Gravidität

D: Motilität und Gravidität

##### 4.2.2.2. Chromatin-Kondensation und Fertilität/Gravidität

##### 4.2.2.2.1. Acridin-Orange Färbung

A: Acridin-Orange Färbung und Fertilität

B: Acridin-Orange Färbung und Gravidität

#### 4.2.2.2.2. Morphometrie

A: Fläche und Fertilität

B: Minimaler Durchmesser und Fertilität

C: Maximaler Durchmesser und Fertilität

D: Form (FCI) und Fertilität

E: Fläche und Gravidität

F: Minimaler Durchmesser und Gravidität

G: Maximaler Durchmesser und Gravidität

H: Form (FCI) und Gravidität

## **5. DISKUSSION**

### **5.1. Stellenwert der klassischen Samenanalyse und der Aufbereitung von Samenproben**

5.1.1. Dichte

5.1.2. Motilität

### **5.2. Chromatin Kondensation**

5.2.1. Acridin-Orange-Färbung und Fluoreszenz

5.2.2. PAP-Färbung und Morphometrie

### **5.3. Fertilität**

5.3.1. Fertilität und klassische Samenanalyse

5.3.1.1. Einfluss der Dichte

5.3.1.2. Einfluss der Motilität

5.3.2. Fertilität und Chromatin-Kondensation

5.3.2.a Fertilität und Acridin-Orange Färbung

5.3.2.b Fertilität und Morphometrie

### **5.4. Unbefruchtete Eizellen**

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

## **7. DANKSAGUNG**

## **8. LEBENSLAUF**

## **1. Zusammenfassung**

Immer häufiger stellen sich Paare mit unerfülltem Kinderwunsch in einer Klinik vor. Vor einer invasiven Diagnostik der Partnerin sollte immer ein Routine-Spermiogramm des Partners durchgeführt werden. Dieses gibt vor allem Aufschluss über Zahl und Beweglichkeit der Spermien sowie ihre Morphologie. Allerdings vermag die Samenanalyse nicht den Zustand des Spermienchromatins zu erfassen. Da aber laut Meinung einiger Autoren die Chromatinstruktur in direkter Korrelation zur Fertilität steht (HAIDL, 1996; LARSON et al., 2000), sollte der Kondensationsgrad des Nativspermas bei der Beurteilung der Qualität der vorliegenden Samenprobe mit einbezogen werden.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die In-vitro induzierte Dekondensation des Spermien-Chromatins als prognostischer Test vor einer In-vitro-Fertilisation (IVF) herangezogen werden kann.

Zu diesem Zweck wurden 52 Paare, die sich einer IVF-Behandlung an der Unifrauenklinik Homburg unterzogen, untersucht.

Die Proben der Patienten wurden der üblichen Routinediagnostik im Rahmen eines Spermiogramms unterzogen, wobei vor allem auf die Dichte und die Motilität sowohl vor als auch nach der Spermienaufbereitung geachtet wurde.

Dabei ergaben sich hochsignifikante Unterschiede für die Dichte vor und nach Aufbereitung mittels der PureSperm Dichtegradientenzentrifugation ( $p=0,01$ ).

Die Betrachtung der Motilität vor und nach Aufbereitung zeigte ebenfalls hochsignifikante Unterschiede ( $p=0,01$ ).

Eine Korrelation der Dichte oder der Motilität der Spermien der G.1 -sowohl vor als auch nach Aufbereitung- mit der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate nach Durchführung der In-vitro-Fertilisation konnte nicht gezeigt werden.

Lediglich in der G.2 gab es eine signifikante Korrelation zwischen der Dichte vor Aufbereitung und der Anzahl eingetretener Schwangerschaften ( $p=0,02$ ;  $r=0,47$ ), sowie zwischen der Dichte nach Aufbereitung ( $p=0,04$ ;  $r=0,44$ ) und der Fertilisationsrate.

Die globale Motilität nach Aufbereitung in der G.2 und die Zahl eingetretener Schwangerschaften zeigten ebenfalls eine signifikante Korrelation ( $p=0,04$ ;  $r=0,47$ ), während die globale Motilität nach Aufbereitung nicht signifikant mit der Fertilisationsrate korrelierte ( $p=0,06$ ;  $r=0,42$ ).

Weiterhin wurde der Kondensationsgrad des Spermien-Chromatins untersucht. Nach der Beurteilung des Nativzustandes wurden die Spermien mit entsprechenden Detergentien und reduzierenden Chemikalien - zur Induktion der Dekondensation - versetzt.

Die Patienten wurden dazu in zwei Gruppen geteilt: in Gruppe 1 (G.1) wurde LIS und DTT zu den Spermien gegeben, in Gruppe 2 (G.2) Heparin und SDS.

Die Veränderungen des Kondensationsgrades des Spermien-Chromatins wurden jeweils 30, 60 und 120 Minuten nach Zugabe der Substanzen evaluiert.

Die Beurteilung des Chromatins erfolgte durch zweier verschiedene Färbungen: Zum einen mit der Acridin-Orange Färbung, die über verschiedenfarbige Fluoreszenzen das Ausmaß der Kondensation zeigt. Grüne Fluoreszenz erscheint bei Spermien mit noch vollständig kondensiertem Chromatin, gelb und orange bei beginnender und rot bei abgeschlossener Dekondensation.

Zum anderen wurde die Papanicolaou-Färbung (PAP) genutzt, um über die Färbung der Oberfläche die Größenzunahme durch die Dekondensation sichtbar zu machen.

Um diese morphometrischen Veränderungen zu erfassen, wurden die PAP-gefärbten Spermien mittels einem interaktiven semi-automatischen Bildanalyse-System (ibas) vermessen: dabei wurde vom Untersucher der Spermienkopf mit der Maus umrandet, und danach vom PC über die Anzahl der umfahrenen Pixel die Fläche des Kopfes bestimmt. Daraus berechnete der Computer weitere Maße wie den minimalen und maximalen Durchmesser der Spermienköpfe. Auch ein Wert, der die Formveränderung des Kopfes durch die Dekondensation darstellt und wurde berechnet: FCI (FCircularity Shape). Dabei zeigte sich z.B. eine Veränderung eines ovalen zu einem eher runden Spermienkopf nach abgeschlossener Dekondensation.

Beide für die Induktion der Dekondensation des Spermienchromatins verwandten Substanzkombinationen - LIS+DTT in der G.1 versus Heparin+SDS in der G.2 - führten zu hochsignifikanten Zunahmen des Dekondensationsgrades, sowohl unter Verwendung der Acridin-Orange Färbung ( $p < 0,01$ ), als auch der PAP-Färbung und Auswertung per Computer (ibas) ( $p < 0,01$ ).

Dabei gab es Unterschiede im Wirkungsgrad der beiden Kombinationen: in der G.2 war die Abnahme grüner Spermien 120min nach Zugabe von Heparin+SDS signifikant größer ( $p = 0,02$ ) als nach Zugabe von LIS+DTT in der G.1. Also hatten diese Substanzen bei einer größeren Zahl von Spermien eine Dekondensation hervorgerufen als die Chemikalien der G.1.

Bei der Beurteilung mittels PAP-Färbung und morphometrischer Auswertung per PC dagegen ergab sich durch LIS+DTT (G.1) bei einer größeren Zahl an Spermien eine Größenzunahme als durch Heparin+SDS. Die Unterschiede zeigten sich hier schon nach kürzeren Zeitintervallen als bei der Acridin-Orange



Färbung: bereits 30min nach Zugabe der Substanzen war der Unterschied zwischen G.1 und G.2 signifikant ( $p=0,04$ ), und ab 60min danach hochsignifikant ( $p=0,01$ ).

Der Prozentsatz grüner, also kondensierter Spermien in der G.1 zeigte eine signifikante Korrelation zur Fertilisationsrate ( $p=0,04$ ;  $r=-0,42$ ). Bezüglich der Rate an Schwangerschaften ließ sich keine Korrelation feststellen.

Die mittels der morphometrischen Analyse erfassten Parameter - die Fläche (area), der maximale Durchmesser, und die Form des Kopfes (FCI) - korrelierten weder nativ noch nach 120min Inkubation mit der Schwangerschafts- oder der Fertilisationsrate.

Lediglich der minimale Durchmesser der nativen Spermienköpfe der G.1 korrelierte signifikant mit der Befruchtungsrate ( $p=0,048$ ;  $r=0,39$ ).

Damit lässt sich durch die Beurteilung der Chromatinveränderungen im Rahmen einer chemisch induzierten Dekondensation, zumindestens mit den in dieser Studie verwendeten Methoden, keine sichere Prognose auf den Ausgang einer IVF-Therapie treffen.

Möglicherweise kann aber eine weiterentwickelte Form der morphometrischen Analyse Aufschluss geben über bislang nicht diagnostizierbare Ursachen der männlichen Sterilität.

Auch die nicht befruchteten Eizellen wurden nach Färbung untersucht und in verschiedenen Gruppen eingeteilt, je nachdem wie sich das Spermienchromatin darin entwickelt hatte.

Dabei enthielten die meisten Eizellen der G.1 vollständig dekondensiertes Chromatin, während in den Eizellen der G.2 hauptsächlich nicht mehr funktionstüchtiges, zerstreutes Chromatin (scattered) enthalten war.

In der G.1 waren 89,36% der Eizellen zwar von einem Spermium penetriert, aber nicht befruchtet worden, in der G.2 waren es 80,95%.

Betrachtete man die Anzahl eingetretener Schwangerschaften in Abhängigkeit von der Zahl vorher transferierter Eizellen, so trat am häufigsten eine Schwangerschaft ein, wenn 2 befruchtete Eizellen transferiert wurden.

## 1.1 Summary

When a couple comes to the fertility clinic, a tedious process is started. Prior to starting an invasive series of diagnostics, a routine semen analysis should be undertaken. This reveals the count and motility, as well as the morphology of the specimen, while their chromatin status remains hidden. Since some authors (HAIDL, 1996; LARSON, 2000) found significant correlations between fertility rate and chromatin structure, semen analysis should include the degree of chromatin condensation to define the fertility state of men.

The purpose of this study was to examine whether in vitro induced decondensation of the male chromatin would succeed as a predictive marker prior to IVF procedures.

Semen and oocytes from 52 couples undergoing in-vitro fertilization treatment at the women hospital at the university of Saarland (Homburg) were examined.

The ejaculate of the male participants underwent the routine diagnostic, drawing main attention to sperm concentration and motility before and after semen processing using PurSperm density gradient method.

After semen processing, the spermatozoa were incubated either with LIS+DTT (G.1, n=26) or with Heparin+SDS (G.2, n=26).

The sperm preparation produced highly significant differences regarding motility ( $p=0,01$ ) and density ( $p=0,01$ ) of spermatozoa in comparison to the value in the native samples.

Neither number nor motility before or after semen processing in G.1 showed any correlation to the fertilisation or pregnancy rate after IVF.

Whereas in G.2, a positive correlation between pregnancy rate and sperm number before semen processing ( $p=0,02$ ;  $r=0,47$ ), as well as between fertility rate and number of sperms after semen processing ( $p=0,04$ ;  $r=0,44$ ) was found.

Another significant correlation between motility in G.2 after semen processing and the pregnancy rate ( $p=0,04$ ;  $r=0,47$ ), as well as the fertility rate ( $p=0,055$ ;  $r=0,42$ ) was found.

Furthermore, the chromatin status of the spermatozoa in the native sample was examined before and after inducing decondensation.

Therefore, the semen samples were divided into two groups: the spermatozoa of the first group (G.1) were incubated with LIS and DTT, the others with Heparin and SDS (G.2). Decondensation status was inspected within different time intervals (30, 60 and 120 minutes) after incubation.

To evaluate the grade of condensation, two different staining and examination methods were used:

on the one hand Acridin-Orange staining, that shows different fluorescent colours indicating different grades of decondensation: green when the DNA is condensed, yellow to orange when decondensation starts and red for full decondensation.

On the other hand Papanicolaou staining was used in order to make the swelling of the decondensed chromatin visible.

To consider the grade of decondensation, an interactive semi-automatic image analysis system (**ibas**) was used, which allows measuring the area of the sperm head as well as other parameters such as minimal and maximal diameter. Another variable describing the continuity of the shape (FCI) was calculated out of the previous measured parameters.

Both groups of chemicals, LIS+DTT in G.1 and Heparin+SDS in G.2 were effective in producing a highly significant enlargement of the sperm heads (chromatin decondensation), as assessed by the Acridin-Orange method ( $p < 0,01$ ) as well as by PAP-staining ( $p < 0,01$ ).

If decondensation was examined by Acridin-Orange staining, there were less green-fluorescing sperm heads after incubation for 120min with Heparin+SDS than after treatment with LIS+DTT ( $p = 0,02$ ).

But if decondensation was analysed by PAP-staining and evaluated with ibas, the area of more sperm heads grew significantly larger after incubation with LIS+DTT for 30min ( $p = 0,04$ ), and even highly significant larger after 60-120min ( $p = 0,01$ ) compared to Heparin+SDS.

The percentage of native, green (=condensed) sperm heads of G.1 showed a significant correlation to the fertilisation rate ( $p = 0,04$ ;  $r = -0,42$ ), but not to the pregnancy rate.

Neither fertility nor pregnancy rate showed a correlation to the number of spermatozoa after 120 min of incubation.

Furthermore, the area, the maximum diameter and FCI neither before nor after 120 min of incubation, showed any correlation to the fertilisation or pregnancy rate after IVF.

An exception was the minimal diameter of the native sperm heads (G.1), that showed a significant correlation with the fertilisation rate ( $p = 0,048$ ;  $r = 0,39$ ).

This leads to the conclusion, that inducing an in-vitro decondensation with LIS+DTT or Heparin+SDS and examining the extent of decondensation with

Acridin-Orange or PAP staining, cannot be established as a predictive test for the success of an IVF.

It can still be used to reveal forms of sub- or infertility, which so far can not be diagnosed with the current methods.

The penetrated oocytes were stained and divided into groups according to the condition of the sperm chromatin inside the cytoplasm.

The largest number of the penetrated oocytes matched to G.1 were those with fully decondensed sperm chromatin. Most of those matched to G.2 included destroyed chromatin (scattered).

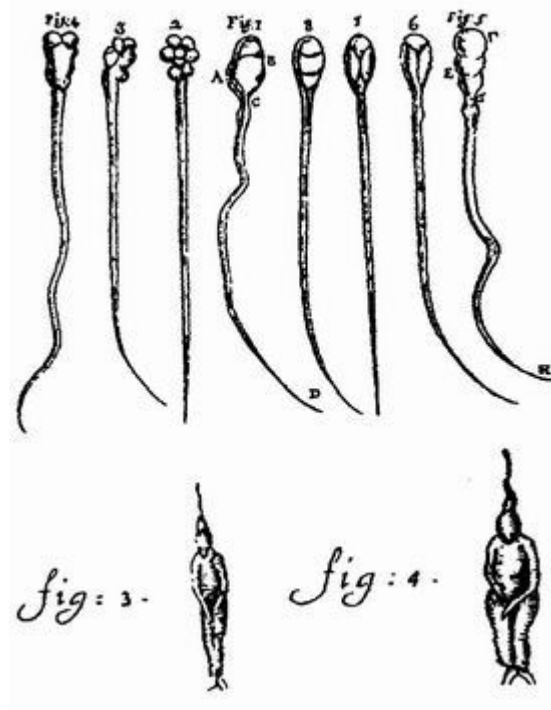
89,36% of the oocytes matched to G.1 have been penetrated by sperm, but have not been fertilized. The same situation was found in 80,95% oocytes of G.2.

When looking at the amount of gravidities in relation to the number of transferred oocytes, most gravidities occurred when two oocytes were transferred.

## 2. Einleitung

### 2.1. Historischer Überblick

Der biologische Ablauf der Zeugung eines Menschen ist noch nicht sehr lange bekannt, erst im 19. Jahrhundert entdeckte VON BAER das Säugetierei und die Befruchtung. Vorher war lange Zeit die Meinung von Aristoteles führend, die das Entstehen eines Embryos auf das Zusammentreffen und die Verfestigung von Menstruationsblut und Samenflüssigkeit zurückführte. Die erste Samenanalyse wurde 1677 von ANTON VAN LEUWENHOECK durchgeführt, dem es bereits gelang - neben ihrer Dichte und Motilität - verschiedene morphologische Varianten der Spermatozoen mit einer einfachen konvexen Linse zu erkennen, und der diese als „lebende Tierchen“ im menschlichen Ejakulat beschrieb (OMBELET et al., 1995).



**Grafik 1: Samenzellen nach  
Leuwenhoeck**

Vielfach wurden Versuche unternommen Embryonen zu übertragen, vor allem im Bereich der Landwirtschaft. Im Jahre 1890 gelang erstmals eine solche Prozedur, indem HEAPE auf natürlichem Wege befruchtete Eizellen aus dem Eileiter eines Angorakaninchens spülte und sie einer ebenfalls gedeckten Häsin einsetzte, die daraufhin neben ihren eigenen Nachkommen 2 Angorakaninchen zur Welt brachte.

Mit der Entwicklung von Techniken zur Embryonenkultur (PINCUS 1930, HAMMOND 1949), der Verabreichung von Hormonen zum Heranreifen mehrerer Follikel während eines Zyklus (PINCUS 1940), Methoden zum Einfrieren von Embryonen (SMITH 1952) und der Möglichkeit von Hormonbestimmungen (Östradiol, LH; radioimmunologische Bestimmung nach YALOW und BERSON, 1962) rückte die Möglichkeit der In-vitro Fertilisation (IVF) in greifbare Nähe.

STEPTOE und EDWARDS begannen bereits 1963 mit Untersuchungen bzgl. der In-vitro Fertilisation und Embryonenübertragungen, bis ihnen im Jahre 1978 der erhoffte Durchbruch gelang: das erste mittels In-vitro Fertilisation gezeugte Kind wurde geboren. Nach nur 4 Jahren, im April 1982, folgte das erste deutsche „Retortenbaby“.

Dieser Fortschritt in der assistierten Reproduktionsmedizin gewinnt heute dadurch immer mehr an Bedeutung, dass die Qualität und Anzahl der Spermatozoen in den letzten 50 Jahren kontinuierlich abgenommen hat (CARLSEN et al., 1992), und weil das Alter von Erstgebärenden immer weiter zunimmt.

## **2.2. Allgemeine Einleitung**

Die Reproduktionsmedizin soll denjenigen Paaren helfen, die ungewollt kinderlos sind. Besteht eine Infertilität, so kommt es zwar zur Konzeption, die Frucht kann jedoch nicht ausgetragen werden (SCHMITT-MATTHIESEN,



1998). Bei Sterilität ist keine Konzeption möglich. Eine Sterilität besteht dann, wenn es über einen Zeitraum von mehr als 12 Monaten trotz regelmäßigem und ungeschütztem Geschlechtsverkehr nicht zu einer Schwangerschaft kommt. Dabei unterscheidet man die primäre von der sekundären Sterilität: eine Frau, die noch nie schwanger war, ist primär steril; wohingegen eine Frau, bei der nach einer oder mehreren Schwangerschaften danach keine erneute Schwangerschaft mehr eintritt, sekundär steril ist.

Circa 10-15 % der Paare im reproduktiven Alter - mit steigender Tendenz - leiden unter solchen Problemen (PFLEIDERER et al., 2000). In etwa 45 % sind diese Probleme auf weibliche Ursachen zurückzuführen, bei 40 % der Betroffenen liegt – entweder zusätzlich oder ausschließlich - eine männliche Ursache vor. Es verbleiben ca. 15 % an Fällen, bei denen sich keine Ursache für die Sterilität finden lässt, bei diesen spricht man von idiopathischer Sterilität (KIRSCHBAUM et al., 2001).

Liegt die Ursache der Infertilität beim männlichen Partner, so kann es dafür eine Reihe von Gründen geben: Die Ursache verminderter Spermatozoenqualität kann sowohl prätestikulär, testikulär als auch posttestikulär begründet sein.

Bei den testikulären Fehlfunktionen unterscheidet man primäre und sekundäre Störungen, wobei die primären zu den genetischen Dysfunktionen gehören. Je schlechter bei einer orientierenden Samenanalyse die Ejakulatparameter, desto eher können Chromosomenanomalien vorliegen. Von sekundären testikulären Dysfunktionen spricht man bei idiopathischen, toxischen und infektiösen Schäden (IRIANNI und CODDINGTON, 1982). Sie sollen die Hauptursache für die zunehmende Verschlechterung der Samenqualität sein, ebenfalls diskutiert werden dabei Umweltgifte (WONG et al., 1998), der Genuss von Alkohol (DONNELLY et al., 1999) sowie das Rauchen (MAHMOUD et al., 1998). Die schwerste Störung der Spermienparameter stellt das OAT-Syndrom (Oligo-

Asthenoteratozoospermie) dar. Dabei ist der Anteil an pathologisch geformten Samenzellen (Teratozoospermie) erhöht, und zusätzlich die Dichte der Spermien (Oligozoospermie) sowie auch deren Beweglichkeit (Asthenozoospermie) vermindert.

Beim weiblichen Geschlecht liegt die Hauptursache für eine Infertilität in einer Tubenpathologie, gefolgt von einem pathologischen Zyklus und der Endometriose.

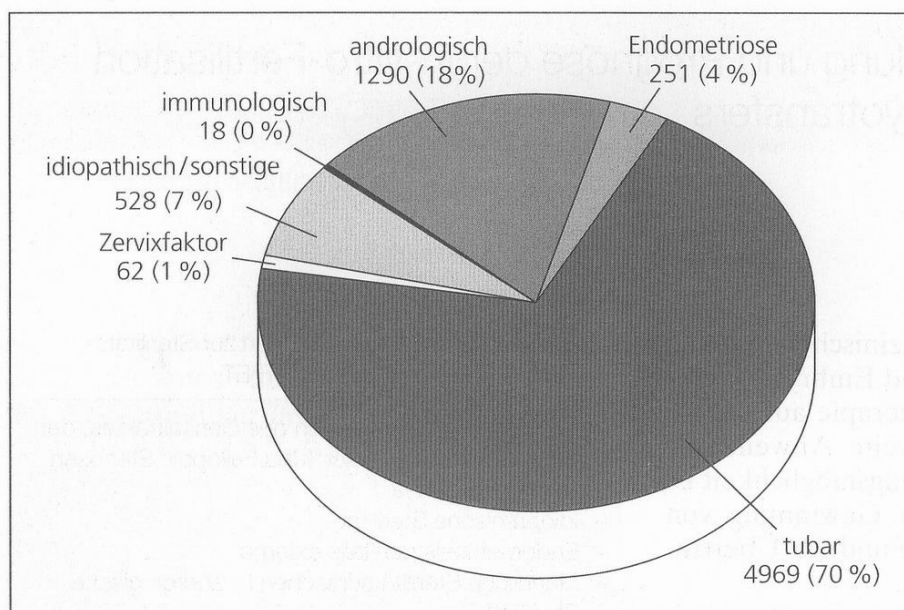


Abb. 4.1  
Indikationen für IVF

## Grafik 2: Weibliche Indikationen für IVF

Stellt sich nun ein Paar in der Kinderwunsch-Sprechstunde vor, wird ein langwieriger Prozess in Gang gesetzt. Vor einer belastenden, invasiven Diagnostik der Frau sollte immer ein Spermogramm des Partners durchgeführt werden. Dieses ist eine wichtige Grundlage für die Beurteilung der Fertilität des Mannes und für die Entscheidung, welches Verfahren der assistierten Reproduktion (wie Intrauterine Insemination (IUI), in-vitro Fertilisation (IVF) oder intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)) gewählt wird.

Durch die klassische Samenanalyse lässt sich eine wichtige Aussage zur Qualität der vorliegenden Samenprobe treffen (BAARTOV et al., 1993).

Allerdings erfasst das Spermioogramm nur Parameter wie das Ejakulatvolumen, pH-Wert, Spermidichte, -motilität und -morphologie. Damit lässt sich der Erfolg einer assistierten Reproduktion nur in einem begrenzten Umfang ermessen, denn ein Drittel aller infertilen Patienten weist vollkommen normale Spermienparameter auf (AITKEN et al., 1982). Außerdem kann ein Ejakulat in seiner Zusammensetzung heterogen sein (SAKKAS et al., 2000), sodass sich die Festlegung der Qualität schwierig gestaltet. Auch die Probengewinnung, Bewertung oder Festsetzung der Normwerte variiert zwischen verschiedenen Labors, sodass die klassische Samenanalyse zwar notwendig ist, aber zur Beurteilung der Fertilität alleine nicht ausreicht.

Der genaue Nachweis der Fertilität ist letztlich nur die eingetretene Schwangerschaft (FISCH und LIPSCHULTZ, 1992). Deshalb ist das Entwickeln neuer Parameter und Untersuchungsmethoden, die eine bessere Erfolgsprognose des gewählten Verfahrens der assistierten Reproduktion erlauben, ein wichtiges Forschungsthema.

### **2.3. In-vitro Fertilisation (IVF)**

Bei der Durchführung des Spermiogramms wird das Ejakulat aufbereitet. Ziel dieser Aufbereitung ist es, morphologisch normale und motile Spermien aus der Gesamtprobe zu selektieren. Die ideale Aufbereitung schädigt zudem die Samenzellen nicht und führt zu einer möglichst geringen Zellkontamination (YOVICH, 1995; MENKVELD et al., 1990a). Es existieren mehrere Methoden zur Spermioselektion, wie z.B. Swim-up, Sephadrex-Tropfen Filtration (LOPEZ et al., 1993), Glaswoll-Filtration (PAULSON und POLAKOSKI, 1977)

oder die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (GORUS und PIPELEERS, 1981).

Aufgrund erheblicher Nachteile wurde die Percoll-Methode 1996 vom Markt genommen und durch die Pure-Sperm Dichtegradientenzentrifugation ersetzt. Diese Methode separiert die Spermatozoen aufgrund ihrer Dichte und isoliert so motile und morphologisch normale Spermien, wodurch sie der Swim-Up Methode überlegen ist (PRAKASH et al., 1998).

Bei relativ hohen Ausgangsdichten gibt es keine großen Unterschiede im Dichteverlust zwischen der Percoll- und der Swim-Up Methode, doch je niedriger die Ausgangsdichte desto grösser der Dichteverlust durch die Percoll-Methode (SUN et al., 1987; WILKE et al., 1991; WANG 1991). Deshalb sollten bei Proben mit niedriger primärer Dichte eher andere Verfahren angewandt werden (ARCIDIACONO et al., 1983).

Unter einer **In-vitro Fertilisation (IVF)** versteht man das extrakorporale Zusammenbringen von Eizellen und Spermien. Zur Vorbereitung wird die Frau kontrolliert ovariell hyperstimuliert, sodass während eines Zyklus nicht nur eine, sondern mehrere Eizellen heranreifen.

Die ovarielle Hyperstimulation ist ein großer Durchbruch für die Reproduktionsmedizin, da deutlich höhere Schwangerschaftsraten erzielt werden können (TROUNSON et al., 1981). Seit Mitte der achtziger Jahre werden GnRh-Analoga zur Vorbereitung eingesetzt (MACNAMEE et al., 1989), in Kombination mit HMG oder FSH (hochgereinigt oder rekombinant) (ELTER et al., 2001). Das ovarielle Hyperstimulationssyndrom ist eine ernstzunehmende mögliche Nebenwirkung (RIZK und SMITH, 1992).

Nach der ovariellen Hyperstimulation werden die Eizellen abpunktiert und mit den aufbereiteten Spermien zusammengebracht. Werden in einem Zeitraum von 18-24 Stunden Eizellen befruchtet, so werden 1-3 davon nach Erreichen des Embryonalstadiums der Frau wieder zugeführt.

Die Zahl der IVF-Therapien hat sich von 742 im Jahr 1982 gesteigert auf 28.945 im Jahr 2000, und ist bis zum Jahr 2003 wieder tendentiell rückgängig auf 28.058 (deutsches IVF-Register 2003).

Im Schnitt wird durch eine IVF-Behandlung eine Schwangerschaftsrate von 28 % erreicht (Im Vergleich: 27 % bei ICSI-Therapie).

Zahlen des deutschen IVF-Registers 2003:

Insgesamt wurden 86.458 Behandlungen im Rahmen der Reproduktionsmedizin durchgeführt. Dabei hatten IVFs einen Anteil von 30,26 %, ICSIs einen Anteil von 55,68 %, der Rest entfiel auf Kryotherapie und GIFT (gamete-in-fallopian-tube).

Für den Erfolg einer IVF-Therapie spielen viele Faktoren eine Rolle, wie zum Beispiel das Alter der Frau, wobei bei Untersuchungen meist 35 Jahre als das Alter angesehen wird, ab dem die Erfolgsrate statistisch gesehen sinkt. Zum anderen soll die Wahl eines bestimmten Stimulationsprotokolls einen Einfluss ausüben, ebenso die Zahl der übertragenen Embryonen.

Indikationen für eine IVF-Therapie gibt es sowohl von weiblicher als auch von männlicher Seite, bzw. können auch Probleme auf beiden Seiten gleichzeitig auftreten. Indikation von Seiten des Mannes ist hauptsächlich ein eingeschränktes Spermogramm, aber auch urogenitale Auffälligkeiten oder pathologische Funktionstests der Spermien kommen in Frage (Deutsches IVF-Register, Jahresbericht 2003).

Heute wird das Verfahren der In-vitro Fertilisation meist als Routineverfahren bei männlicher Subfertilität eingesetzt (DIEDRICH, 1987).

## 2.4. Chromatin-Kondensation

Bei der Fertilisation handelt es sich nicht nur um ein Zusammenkommen zweier Zellen, sondern auch um eine Verschmelzung des Chromatins von väterlicher und mütterlicher Seite. Die Befruchtung an sich ist ein aktiver Prozess zwischen anfangs ruhenden Keimzellen (YANIGIMACHI, 1988). Das Chromatin des Spermiums ist stark kondensiert zu einer genetisch inerten Form (WARD and COFFEY, 1991; BELLVE and O'BRIEN, 1983), während die Eizelle sich noch im Stadium der Metaphase 2 der Meiose befindet. Erst wenn ein Spermium die Eizelle penetriert hat, „erwachen“ die Gameten, wobei anfangs die Samenzelle die Oocyte aktiviert, und danach die Eizelle zur Bildung der zur DNA-Synthese fähigen Vorkerne führt (ZIRKIN et al., 1989; PERREAULT, 1990).

Vor der Fertilisation stehen die Spermio-genese und die Chromatin-Kondensation der männlichen DNA. Die Struktur des Spermien-Chromatins wird umgewandelt, um eine dichtere Verpackung zu erreichen (DADOUNE, 1995). Diese Kondensation findet statt, um den Kern eines Spermiums vor enzymatischen, chemischen und physikalischen Angriffen zu schützen (EVENSON et al., 1980; HAMMADEH et al., 1997). Die erhöhte Stabilität des kondensierten Spermienchromatins scheint das Fehlen von DNA-Reparaturenzymen in Säugetierspermien auszugleichen (MATSUDA et al., 1985). Die Kondensation läuft auf mehreren Entwicklungsstufen ab: zum einen während der Elongation des Spermatids (HURET, 1986), zum anderen während der epididymalen Passage (KRZANOWSKA, 1982) und zuletzt nach der Ejakulation (BJÖRNDAHL, 1986).

Die Histone spielen eine wichtige Rolle bei der Kondensation: Acht Histonmoleküle bilden einen Kern, um den sich ca. 200 Basenpaare winden. Diese Einheit nennt man Nukleosom. Verknäulen sich Nukleosomen untereinander, entsteht die typische Chromatinstruktur (WOLFFE, 1997). Wäre

dies nur der einzige Schritt der Chromatinkondensation, so wäre der Spermienkopf immer noch doppelt so groß als er es nach abgeschlossener Kondensation ist (BALHORN, 1982). Deshalb werden in reifen Spermien zusätzlich Histone durch Protamine ersetzt (BIZARRO et al., 1998; COURTENS et al., 1995). Protamine sind kleine, argininreiche Proteine (CURRY and WATSON, 1995), deren Volumen weniger als die Hälfte der Histone beansprucht. In einem Zwischenschritt werden die Histone erst ersetzt durch sogenannte Transitionsproteine, einer heterogenen Gruppe basischer Proteine (HECHT et al., 1989). Diese wiederum werden von den Protaminen verdrängt, was durch die Verwendung monoklonaler Antikörper bewiesen wurde (LESCOAT et al., 1993; COURTENS et al., 1995). Protamine lassen sich bei menschlichen Spermatozoen differenzieren in Protamin 1 und 2 (BALHORN, 1989). Protamine verfügen zentral über Polyargininstrecken. Diese verbinden sich über Wasserstoffbrücken mit Phosphodiestern, dort wo sich im Bereich der kleinen Kurve der DNA gegenüberliegende DNA-Abschnitte annähern. Dadurch wird die DNA neutralisiert, hydrophobe Abstoßungen werden gemindert und die DNA-Abschnitte verdichten sich. Hinzu kommen noch Disulfidbrücken zwischen benachbarten Protaminen, die über cystinreiche Abschnitte der Protamine geknüpft werden. Dadurch nimmt die Verknäulung und damit die Stabilität weiter zu (BALHORN et al., 2000). Spermien mit einem Mangel an Protaminen sind instabiler und damit anfälliger für äußere Einflüsse (BIZARRO et al., 1998; CALVIN und BEDFORD, 1971). Insbesondere das Protamin 2 scheint bei der Dekondensation eine große Rolle zu spielen: die Spermatozoen infertiler Männer enthalten einen deutlich geringeren Gehalt an Protamin 2 als die fertiler Männer (BALHORN, 1989). Nach Abschluss der Kondensation ist die DNA mindestens sechsmal dichter kondensiert als in einer Körperzelle, was nicht nur den Transfer des männlichen Genoms durch den weiblichen Genitaltrakt erleichtert (YANIGIMACHI, 1994), sondern sie auch auf diesem Weg vor äußeren Einflüssen schützt.

Nach der Ejakulation wird die Quartärstruktur des Chromatins gebildet, indem Zink aus dem Prostatasekret zwischen die Chromatinschleifen tritt und an freie Thiolgruppen bindet. Dadurch entsteht ein Gleichgewicht zwischen freien Thiolbrücken und Disulfidbindungen (BJÖRNDAHL, 1996; KVIST et al., 1987). Ebenso bewirkt die Inkubation im Seminalplasma unter kapazitierenden Bedingungen unter in-vitro Bedingungen eine erhöhte Chromatininstabilität (ROSENBORG et al., 1990), wie auch die Inkubation in ZnCl<sub>2</sub> (KVIST et al., 1990).

Dringt nun ein Spermium in eine Eizelle ein, muss diese Kondensation rückgängig gemacht werden. Dazu werden die Protamine wieder durch Histone ersetzt. Diese binden an die DNA, sodass das väterliche Genom in seine genetisch aktive Form übergeht (PERREAULT, 1987; LONGO, 1978). Ein wichtiger Aspekt der Dekondensation bei Säugetieren ist die Aufspaltung der Disulfidbrücken durch Gluthathion, das sich im Ooplasma der Eizelle befindet (WIESEL und SCHULTZ, 1981; PERREAULT et al., 1988; FUNAHASHI et al., 1995; SUTOVSKY und SCHATTEN, 1997). Allerdings reicht Gluthathion nicht aus, um das Chromatin wieder vollkommen zu dekodensieren (PERREAULT et al., 1984). Möglicherweise bedarf es auch des Nukleoplasmins, um die Protamine vollständig von der DNA zu entfernen (YANIGIMACHI, 1994). Nukleoplasmin ist ein Faktor zur Dekodensierung des Spermienchromatins, der in das Ooplasma sezerniert wird nach dem Zusammenbrechen des Keimbläschens (PHILPOTT und LINO, 1992; KATAGIRI und OSHUMI, 1994).

Ungefähr sechs bis neun Stunden nachdem ein Spermium die Eizelle penetriert hat (IVF) bzw. injiziert wurde (ICSI) und nachdem sich der männliche und weibliche Vorkern komplett gebildet haben, beginnt die DNA-Synthese. Untersuchungen an Eizellen von Meerschweinchen oder Schweinen haben gezeigt, dass sich der weibliche Vorkern vor dem männlichen bildet.



Bei Untersuchungen von penetrierten, aber nicht befruchteten Eizellen zeigte sich, dass 76 % solcher Zellen Spermien enthielten deren Chromatin nicht dekondensiert war (SELVA et al., 1993). Ursache könnte zum einen eine durch Routineuntersuchungen nicht entdeckte Abnormalität des Chromatins sein, zum anderen eine fehlende Aktivierung der Spermatozoen durch die Eizelle (BEDFORD und KIM, 1993; FLAHERTY et al., 1995). Die Bildung des männlichen Pronukleus wird durch Eizellfaktoren gesteuert, und ist somit abhängig von der Reife der Eizellen (TESARIK und KOPENCY, 1989b; PERREAULT et al., 1992).

Der Kondensationsgrad des Chromatins ist ein entscheidender Faktor für seine Fähigkeit zur Befruchtung (MANICARDI et al., 1995; SAKKAS, 1999; BIANCHI et al., 1996).

Eine unzureichende Kondensation des Chromatins führt sehr wahrscheinlich auch zu einem Versagen der Dekondensation und folglich zu einem Versagen der Befruchtung (ZIRKIN et al., 1985; HAMMADEH et al., 2000).

Ein Versagen der Spermien-Dekondensation in der Eizelle könnte auf eine geringfügige Abnormalität des Spermiums zurückzuführen sein, die z.B. die Chromatinkondensation beeinflusst, aber mit den herkömmlichen Analyse-Methoden nicht zu erkennen ist (BEDFORD und KIM, 1993). Bei solchen Abnormalitäten könnte es sich z.B. um morphologische oder biochemische Defekt handeln, die während der Spermio-genese oder der Chromatin-Kondensation entstanden sind (AITKIN, 1994; ZAMBONI, 1994). Weitere Studien zur Dekondensation des Vorkerns könnten also Erklärungen liefern für bisher nicht erfassbare Ursachen männlicher Infertilität (FELIX et al., 1994; STEARNS und KIRSCHNER, 1994; ARCHER und SOLOMON, 1994).

Um die Schritte der Chromatin-Dekondensation in-vitro zu induzieren, benötigt man 2 Gruppen von Substanzen: Detergentien, um die Spermienmembran so zu

destabilisieren, dass anschließend Substanzen mit reduzierenden Eigenschaften zum Chromatin im Nukleus vordringen können.

Dabei können verschiedene Kombinationen von Substanzen genutzt werden. In der vorliegenden Studie wurden **LIS (lithium diiodosalicylate)** als Detergens und **DTT (dithiothreitol)** als reduzierende Substanz in der Gruppe 1 (G.1) verwendet und **Heparin** in Kombination mit **SDS (sodium dodecyl sulphate)** (DELGADO et al., 1982; LALICH et al., 1982) in der G.2.

In vielen Studien zur in-vitro Dekondensation wurden Polyanionen verwendet, wobei Heparin das effektivste war (JAGER et al., 1990). Wieso Heparin in der Lage ist, menschliche Spermien in-vitro zu decondensieren, ist noch nicht genau nachgewiesen worden. Einige Autoren berichten über Heparin-Rezeptoren auf der Plasmamembran von Spermien (DELGADO et al., 1982; LASALLE and TESTART, 1992; CARELL and LIU, 2002). Heparin ist eine Substanz, die auch in vivo bei der Befruchtung eine große Rolle spielt: sie ist unter anderem ein Bestandteil der Follikularflüssigkeit der Gebärmutterflüssigkeit sowie des Cytoplasmas der Eizellen (DELGADO et al., 1982; FOLEY et al., 1978; DELGADO et al., 1980). DELGADO et al. (1982) sind der Ansicht, dass die Bindung von Heparin an die Plasmamembran eines Spermiums diese dadurch destabilisiert, sodass es nun möglich ist, andere Moleküle in den Kern aufzunehmen wie z.B. reduziertes Glutathion. Auch ein direkter Effekt des Heparins auf das Spermienchromatin, zu dem es eine starke Affinität aufweist, wird diskutiert (CHARGAFF and OLSON, 1938). Dass Heparin in vivo die gleichen Funktionen erfüllt ist eher unwahrscheinlich, da die einzigen Zellen, die in vivo zur Synthese von Heparin fähig sind, Mastzellen sind. Außerdem wurde in Eizell-Kumulus Komplexen kein Heparin nachgewiesen, wohl aber andere Glykosaminoglykane (BALL et al., 1982; GEBAUER et al., 1978; SALUSTRI et al., 1989). Unter diesen wird das Heparansulphat als die wahrscheinlichste Substanz diskutiert, da es ein Struktur analogon des Heparins

und zu sehr ähnlichen Leistungen fähig ist (DELGADO et al., 1982; JACKSON et al., 1992). ROMANATO et al. (2001) kamen bei einer Untersuchung bezüglich der Rolle von Heparansulphat bei der Dekondensation in-vitro zu dem Schluss, dass diese Rolle eher durch strukturelle Eigenschaften zustande kommt als allein durch die Tatsache, dass Polyanionen mit der DNA um positiv geladene Protamine konkurrieren. Darüber hinaus könnte dies bedeuten, dass das im Eizell-Kumulus Komplex vorhandene Heparansulphat auch bei der Dekondensation in-vivo eine Rolle spielt (JACKSON et al., 1992; BELLIN et al., 1986; ERIKSEN et al., 1997).

Eine solche in-vitro herbeigeführte Dekondensation kann zur Beurteilung des Befruchtungspotentials von Spermatozoen genutzt werden, weil dadurch intrinsische Mechanismen in Gang gesetzt werden (KVIST, 1980), die denen in vivo ähneln (BEDFORD et al., 1972; SOUPERT und STRONG, 1974).

Um den Zustand des Chromatins zu beurteilen stehen mehrere Verfahren zur Auswahl: die Acridin-Orange Färbung, die Anilin Blau Färbung (HENKEL et al, 1994), die Giemsa-Färbung (WINDT et al., 1994), Ethidium-Bromid (FILATOV et al., 1999) oder die Chromomycin-Färbung (BIANCHI et al., 1996).

Die Fähigkeit des Chromatins, einen solchen Farbstoff zu binden, soll Abnormalitäten wieder spiegeln, die sich während des Ablaufs der Kondensation – bei den Veränderungen der Zusammensetzung der Nucleoproteine - ergeben.

Die in dieser Studie verwendete Acridin-Orange Färbung basiert darauf, dass unzureichend kondensiertes Chromatin Protamine enthält, die nur wenige Verbindungen durch Disulfidbrücken aufweisen. Dadurch wird die DNA anfälliger und wird durch die Säurefixation der Acridin-Orange Färbung aufgespalten. An diese denaturierte, einsträngige DNA lagert sich das Acridin-

Orange an und leuchtet rot im Fluoreszenzlicht (ICHIMURA et al., 1969; TEJADA et al., 1984). Je höher die Konzentration an Acridin-Orange, desto intensiver die Färbung (ICHIMURA et al., 1975). Ist die DNA stabil, d.h. sind viele vernetzende Disulfidbrücken vorhanden im Sinne der Kondensation, so bindet Acridin-Orange als Monomer an die doppelsträngige DNA und fluoresziert grün. Bei gelber oder orangefarbener Fluoreszenz ist ebenfalls DNA enthalten, die nur unzureichend kondensiert sind, sodass solche Spermien ebenfalls als rot gewertet werden sollten (TEJADA et al., 1984).

Der Unterschied zwischen fertilen und infertilen Samenproben nach Acridin-Orange Färbung liefert Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Chromatinkondensation und Fertilität: Proben infertiler Patienten verfügen über einen deutlich geringeren Anteil kondensierter Spermien (EVENSON et al., 1999).

Nach Färbung mit Anilin-Blau ermittelten HOFMANN et al. (1990) gleiche Ergebnisse.

Im Gegensatz dazu fanden ANGELPOPOULOS et al. (1998) bei Normospermie keinen deutlich höheren Anteil kondensierter Spermien als bei Oligospermie, ebenso wenig fanden sie eine Korrelation zwischen dem Anteil kondensierter Spermien und der Schwangerschafts- oder Fertilisationsrate nach IVF/ICSI.

Während der Spermienreifung bei Durchwanderung des Ductus epididymis verändert sich die Acridin-Orange Fluoreszenz von rot über orange, gelb und schließlich zu grün. Nahezu alle Spermienkerne aus der cauda epididymis, sowie auch ejakuliertes Sperma von Hamster, Mäusen und Hasen leuchten grün (KOSOWER et al., 1992). Dahingegen zeigt menschliches Sperma so gut wie immer auch Anteile an gelber oder roter Fluoreszenz (KOSOWER et al., 1992; CALVIN et al., 1971; ICHIMURA et al., 1971; PEACOCKE, 1973; TEJADA et al., 1973). Es konnte gezeigt werden, dass dies häufiger der Fall ist bei Proben

infertiler Männer (KOSOWER et al., 1992; EVENSON et al., 1980; LE LANNOU et al., 1988; ROUX and DADOUNE, 1989; ROYERE et al., 1991).

Es wird postuliert, dass die endgültige Gestalt der Spermien von der Chromatinkondensation während der Spermiogenese abhängig ist (FAWCETT et al., 1971; MEISTRICH et al., 1976) dass also das Chromatin den Spermienkopf modelliert. ZAMBONI et al. (1992) führten eine abnormale Spermienmorphologie auf Abnormalitäten des Spermienkopfes einschließlich des Kerns zurück. In einer anderen Studie zeigte ein Großteil morphologisch abweichender Spermien auch eine wachsende Heterogenität chromatiner Strukturen (EVENSON et al., 1984). Im Gegensatz dazu zeigten zytogenetische Analysen von ROSENBUSCH et al. (1992) keinen Zusammenhang zwischen abnormaler Spermienmorphologie und genetischen Fehlern.

1991 schätzten WARD und COFFEY, dass die DNA mehr als 90 % des Kernvolumens einnimmt. Obwohl in neueren Studien eher davon ausgegangen wird, dass Wasser das Hauptvolumen des Kernes ausmacht (ALLEN et al., 1996), ist es doch nachvollziehbar, dass die organisierte und kondensierte Chromatin-Struktur durch die äußere Form bzw. Größe des Spermienkopfes reflektiert wird, sodass Änderungen der Form auch nahe legen, dass sich die Chromatinstruktur verändert hat.

Zur Untersuchung der Chromatin-Dekondensation wurde neben der Fluoreszenztechnik die morphometrische Beurteilung des Spermienkopfes per Computer-gestützter Bildanalyse verwendet. In dieser Studie wurden nach PAP-Färbung der Ausstriche die Spermien mit Hilfe eines computergestützten Verfahrens –**IBAS**- vermessen. IBAS steht für **I**nteraktives **B**ild-**A**nalyse-**S**ystem (KONTRON, 1980). Nachdem es Bilder, die über ein Mikroskop erfasst wurden in digitale Bilder umwandelt, können durch eine Kontrastverstärkung

Spermien gegenüber dem Hintergrund und auch gegeneinander abgegrenzt werden.

Ein anderer Aspekt dieser Studie war die weibliche Seite.

Es wurde ausgewertet, wie viele Eizellen im Schnitt pro Stimulation entstanden, welcher Prozentsatz davon fertilisiert wurde und wie viele Schwangerschaften resultierten.

Auch die nicht befruchteten Eizellen wurden untersucht um mögliche Ursachen für das Ausbleiben der Fertilisation zu finden. So wurde das in den penetrierten, aber nicht befruchteten Oocyten befindliche Spermienchromatin auf seinen Kondensationsgrad hin untersucht.

## **2.5. Eigene Fragestellung**

Diese Studie war hauptsächlich der Fragestellung gewidmet, inwieweit es mit in-vitro dekodensierenden Substanzen möglich ist, das Verhalten des Spermien-Chromatins in-vivo und speziell bei IVF-Versuchen vorherzusagen.

Bei entsprechend guter Korrelation wäre es damit möglich, einen prädiktiven Test für den Ausgang einer IVF-Therapie zu etablieren, zumindest was die Eigenschaften und wahrscheinlichen Verhaltensweisen des väterlichen Chromatins betrifft.

Ebenso wurde untersucht, welche Kombination an dekodensierenden Substanzen eine stärkere Größenzunahme –also eine stärkere Dekondensation - der Spermienköpfe hervorgerufen hat; und welche der beiden Methoden zur Erfassung der Veränderung des Kondensationsgrades – Acridin-Orange oder ibas - die zuverlässigere war.

Außerdem wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob die Ergebnisse der klassischen Samenanalyse mit dem Chromatin- Kondensationsgrad in Korrelation stehen.

Auch die Zusammenhänge zwischen den Resultaten der Samenanalyse und der Fertilisations- und Schwangerschaftsrate wurden untersucht.

Ein anderer Aspekt dieser Untersuchung war die Beurteilung der Eizellen. Wie war die Fertilisationsrate im Vergleich zu anderen IVF-Zentren?

In welchem Zustand befand sich das Spermienchromatin in den nicht befruchteten Oocyten?

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

An dieser Studie nahmen zwischen April 2000 und Oktober 2001 52 Paare teil, die Patienten in der Kinderwunschsprechstunde der Universitätsfrauenklinik des Saarlandes waren. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $28,31 \pm 8,06$  Jahren.

#### **3.1. Patienten**

Nach ca. 4 Tagen Karenz wurden die Samenproben in den Räumlichkeiten des IVF-Labors der Frauenklinik durch Masturbation in ein steriles Kunststoffgefäß gewonnen. Dann wurde innerhalb der ersten Stunde routinemäßig ein Spermogramm (WHO, 1992) durchgeführt und sodann die Ergebnisse schriftlich in einem dafür vorgesehenen standardisierten Formblatt fixiert.

Nach ca. 15-20 Minuten war die Nativprobe liquefiziert, und es wurden von jedem Patienten 5 Ausstrichpräparate angefertigt.

Die untersuchten Samenproben wurden nach den Routineuntersuchungen des Labors verwendet für einen IVF-Zyklus, also bezieht sich die Erhebung der Schwangerschaften direkt auf die untersuchten Proben.

##### **3.1.1. Durchführung des klassischen Spermogramms**

Die Erhebung des Spermogramms wurde routinemäßig vom Fachpersonal der Universitätsfrauenklinik vorgenommen und schriftlich auf einem standardisierten Formblatt festgehalten.

Für die vorliegende Studie wurden alle Werte der klassischen Samenanalyse verwendet außer der Bestimmung der Morphologie nach den Strict Tygerberg Kriterien.



## **Bestimmung des Ejakulat-Volumens**

Nachdem die Samenprobe in eine graduierte sterilen Konustube (Falcon; Plymouth, England) pipettiert worden war, konnte das Volumen direkt abgelesen werden. Es sollte mehr als 2 ml betragen (WHO, 1999).

## **Bestimmung des pH-Wertes des Ejakulates**

Um den pH-Wert zu bestimmen wurden 5  $\mu$ l der Samenprobe auf Spezialindikatorpapier pipettiert (Merck; Darmstadt; Bereich: pH-Wert zwischen 6,5-10).

Nach ca. 30 Sekunden zeigt eine gleichmäßige Färbung des Indikatorpapiers den pH-Wert der Probe an, der zwischen 7,2 und 7,8 liegen sollte (WHO, 1999).

## **Bestimmung der Leukozytenzahl im Ejakulat (Comburtest)**

Anhand des Comburtestes läßt sich die Esterase-Aktivität und somit die Anwesenheit von Granulozyten im Sperma nachweisen. Nach Pipettierung von 5  $\mu$ l Ejakulat auf den Teststreifen

(Roche; Mannheim) konnte anhand des Farbumschlags die Menge an vorhandenen Leukozyten abgelesen werden.

## **Test auf Spermientikörper im Ejakulat (Martest = mixed agglutination test)**

Der Martest kann spezifische, an die Oberfläche der Spermatozoen gebundene IgG-Antikörper nachweisen. Dazu wurde ein Tropfen Ejakulat (10  $\mu$ l) auf einen

Objektträger pipettiert und dort mit einem Tropfen IgG-beschichteter Latexpartikel (FertiPro N.V.; Berneem, Belgien) sowie einem Tropfen Antihuman-IgG-Antiserum (Gamma chain; Hoechst Boehringer) vermischt. Nach Aufbringen eines Deckglässchens wurden die Objektträger unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Das Antihuman-IgG-Antiserum dient der Aktivierung der Latexpartikel gegen menschliche IgG-Antikörper. Befinden sich solche Antikörper an der Oberfläche von Spermatozoen, so verbinden sie sich mit den Latexpartikeln und es kommt zur Agglutination.

Pro Patient wurden 100 Spermatozoen ausgezählt und der Prozentsatz der mit Latexpartikeln behafteten Spermatozoen berechnet. Mehr als 90% der Spermatozoen sollten frei sein von adhären Latexpartikeln (WHO, 1999).

## **Bestimmung der Dichte und Motilität der Spermien**

Um die Spermiedichte zu bestimmen wurden 10µl des Ejakulates in die 10 mm Vertiefung einer Maklerkammer

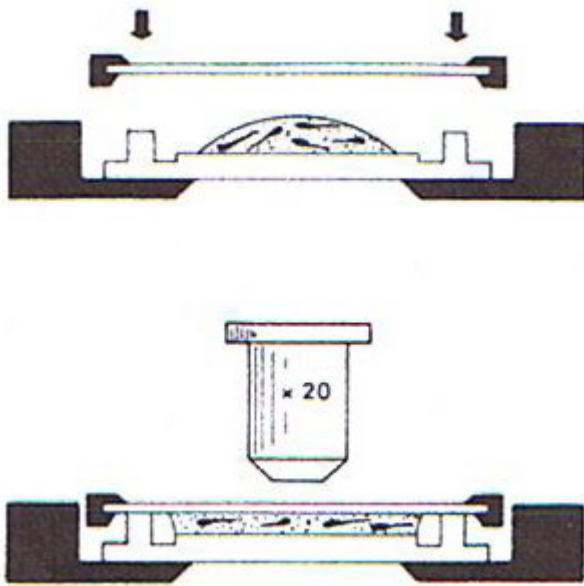
(Makler, 1980) pipettiert und abgedeckt. Der Boden dieses Deckglases ist in 100 Quadrate eingeteilt, von denen bei 20facher Vergrößerung 3x10 ausgezählt wurden.

Nimmt man den Mittelwert des Ergebnisses, so erhält man die Anzahl der Spermien in Millionen pro Milliliter. Laut der WHO

(1999) sollte die Dichte mindestens 20 Millionen Spermien pro Milliliter betragen. In dieser Studie wurden nur Proben ab einer Dichte von 20 Millionen pro Milliliter verwendet. Bei einer geringeren Dichte wurden die Proben statt einer IVF- einer ICSI-Therapie zugeführt.

Multipliziert man die Dichte mit dem Volumen der Probe, so ergibt sich die Gesamtspermienzahl. Sie sollte laut der WHO (1999) größer als 40 Millionen betragen.

Außer der Dichte wurde auch die Motilität der Spermatozoen in der Maklerkammer beurteilt. Es wurden ebenfalls 3x10 Quadranten auf die Anzahl motiler Spermien untersucht, deren Zahl als prozentualer Anteil an der Gesamtspermienzahl wiedergegeben wird. Dieser Anteil sollte nicht kleiner als 40 % sein (WHO, 1999).



**Grafik 3: Spermienzählkammer nach Makler.**

### **Bestimmung der Vitalität der Spermien (HOS-Test= hypo osmotic swelling test)**

Dieser Test beruht darauf, dass eine intakte Zellmembran semipermeabel ist. Unter hypoosmotischen Bedingungen kommt es deshalb zu einem Wassereinstrom mit einer Volumenzunahme, sodass das Spermium sichtbar anschwellt. (Drevius und Eriksson, 1966).

Der HOS-Test dient als ein Verfahren zur Prüfung der Vitalität von Spermien. Abgestorbene Spermien zeigen keine Schwellung durch den HOS-Test.

### **Bestimmung der Vitalität der Spermien (Eosin-Test)**

Die Lebensfähigkeit von Spermien kann über eine Vitalfärbung mit Eosin nachgewiesen werden. Das Verfahren beruht auf der Anfärbarkeit toter Spermatozoen, deren geschädigte Plasmamembran bestimmte Farbstoffe aufnehmen kann wozu sie in intaktem Zustand bei vitalen Spermien nicht in der Lage ist.

Man mischt dazu einen Tropfen (10-15 $\mu$ l) frisches Ejakulat mit einem Tropfen 0,5%iger Eosin-Lösung auf einem Objektträger und legt ein Deckglas darüber.

Nach 1-2 Minuten wird das Präparat bei 400facher Vergrößerung betrachtet, wobei 100 Spermien ausgezählt wurden, getrennt nach dem Kriterium gefärbt oder ungefärbt. Die (rosa) gefärbten Spermien gelten dabei als tot, die (weißen) ungefärbten als lebend.

### **3.1.2. Ejakulataufbereitung**

Der Sinn der Aufbereitung liegt darin, eine Anreicherung motiler Spermien zu erreichen und Begleitsubstanzen des Ejakulates – wie Mikroorganismen, Leukozyten oder Prostaglandine -, die sich negativ auf die Therapie auswirken könnten, zu entfernen.

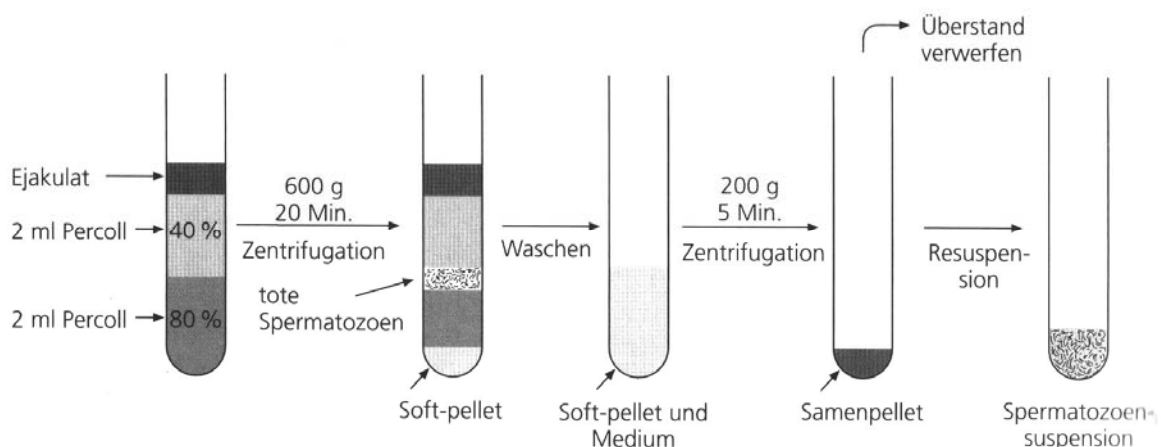
Bei den in dieser Studie verwendeten Samenproben wurde die PurSperm-Dichtegradientenzentrifugation verwendet.

### ***PurSperm-Dichtegradientenzentrifugation:***

Bei PurSperm handelt es sich um die gereinigte Version der Percoll-Methode, die im Oktober 1996 (wegen des Risikos der Kontamination mit Endotoxinen, der Membranalteration und möglicher entzündlicher Reaktionen) vom Markt genommen wurde. Im Gegensatz zu Percoll, das eine PVP beschichtete Silika ist, enthalten die Ersatzprodukte wie PurSperm, IxaPrep, SilSelect u.ä. Silanbeschichtete Silika-Partikel.

Die PurSperm Dichtegradientenzentrifugation beruht auf unterschiedlichen spezifischen Massen und Sedimentationsgeschwindigkeiten einzelner Bestandteile des Ejakulates, erstmals beschrieben (für die Percoll-Methode) von PERTOFT und Mitarbeitern (1977).

Um einen Gradienten herzustellen wird eine 100%ige PurSperm-Stammlösung (NidaCon Laboratories AB, Gothenburg, Schweden) schrittweise verdünnt zu Lösungen von 80 und 40%. Man schichtet dann die Hälfte des Ejakulats auf 2-2,5ml der 40%igen Lösung, die ihrerseits auf dieselbe Menge 80%ige PurSperm-Lösung geschichtet wurde. Anschließend wird für 600xg für 20 min zentrifugiert, und ca. 0,6ml der untersten Fraktion bilden das *soft pellet*, das anschließend zweimal gewaschen wird. Danach erfolgt erneut die Messung von Dichte und Motilität in der Maklerkammer.



**Grafik 4: Dichtegradientenzentrifugation mit PurSperm.**

### **3.1.3. Chromatin-Dekondensation**

Die Chromatin-Dekondensation wurde in-vitro durch zwei verschiedene Substanzgruppen induziert. Dies waren LIS+DTT (lithium diiodosalicylate+dithiothreitol) in der G.1 und Heparin+SDS (sodium dodecyl sulphate) in der G.2.

Anschließend erfolgte die Beurteilung des Chromatins durch zwei unterschiedliche Methoden: direkt durch die Acridin-Orange Färbung und die resultierende verschiedenfarbige Fluoreszenz, und indirekt über die Schwellung der Spermienköpfe durch die Papanicolaou Färbung und spätere morphometrische Analyse der Spermienköpfe mit dem interaktiven Bildanalyse-System (ibas).

Dazu wurden anfangs je fünf Ausstriche des Nativspermas, anschließend 5 Ausstriche nach Samenaufbereitung, und wieder je fünf Ausstriche nach dreißig, sechzig und einhundertzwanzig Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzgruppen der G.1 und G.2 angefertigt. Die Objektträger wurden nach je fünf Minuten Lufttrocknung mit einer Sprühfixierung bestehend aus Glutaraldehyd und PBS (siehe Anhang 2) fixiert.

#### **3.1.3.1. Acridin-Orange Färbung**

##### ***Vorbereitung***

Zuerst wurden wie in Kapitel 3.1.2. Ausstrichpräparate hergestellt, sprühfixiert (Anhang 1) und getrocknet. Danach wurden sie für mindestens zwei Stunden in Carnoy's-Lösung fixiert. Diese Lösung wurde hergestellt aus einem Teil reiner Essigsäure (Merck; Darmstadt) und drei Teilen Methanol (Merck; Darmstadt).

### ***Färbung mit Acridin-Orange***

Die Färbelösung wurde hergestellt aus der sogenannten stock solution und 2 weiteren Bestandteilen, die für jeden Färbevorgang frisch gemischt wurden. Löst man 1 mg Acridin-Orange (Sigma; St. Louis, USA) in 100 Milliliter destilliertem Wasser (Seromed; Berlin), so erhält man die stock solution, die man bei Dunkelheit und einer Temperatur von 4°C über mehrere Monate lang aufbewahren kann. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 40 Milliliter 0,1 molarer Zitronensäure (Merck; Darmstadt) mit 2,5 Milliliter 0,3 molarer Natriumhydrogenphosphat-Lösung (Merck; Darmstadt) und 10 Milliliter der stock solution gemischt. Die entstandene Lösung sollte eine Konzentration von 0,19 mg/ml haben und einen pH-Wert von 2,5 (TEJADA et al., 1984). Die Objektträger wurden für 5 Minuten in dieser Färbelösung inkubiert und anschließend mit reichlich destilliertem Wasser (Seromed; Berlin) gespült. Danach wurden die Objektträger mit Glycerin und Deckglässchen versehen und mit Zellulosepapier abgetupft.

### ***Auswertung der Acridin-Orange Färbung***

Die Präparate wurden entweder direkt im Anschluss an den Färbevorgang oder nach spätestens 4 Tagen abgedunkelter Zwischenlagerung bei einer Temperatur von -22 °C mit einem 490 nm Exzitationsfilter und einem 530 nm Barrierefilter bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl (Merck; Darmstadt) ausgewertet. Pro Objektträger wurden jeweils 100 Spermien ausgezählt, wobei die Belichtungszeit so kurz wie möglich gehalten wurde. Dabei wurde unterschieden zwischen grün, gelb, orange und rot fluoreszierenden Spermienköpfen.

Waren Spermien darunter, deren Köpfe unregelmäßig rot und grün leuchteten, wurden sie als rot gewertet; während solche mit grünem Kopf und Rötung im

Nackebereich als grün gewertet wurden, da es sich hierbei um Zytoplasma-RNA handelte (ISCHIMURA et al., 1975).

### **3.1.3.2. Färbung nach Papanicolaou**

Die PAP-Färbung erlaubt die Differenzierung zwischen basophilen und azidophilen Zellkomponenten sowie die detaillierte Beurteilung des Kernchromatins. Besondere Nützlichkeit kommt ihr bei der Beurteilung der Spermienmorphologie und der Untersuchung unreifer Spermien zu. Da durch die PAP-Färbung die Konturen der Spermien gut zu erkennen sind und in der Regel auch ein guter Kontrast zum Hintergrund entsteht, wurde sie in dieser Studie dazu genutzt, den Spermienkopf möglichst gut sichtbar zu machen um die Erfassung mit dem Bildanalyse-System zu erleichtern.

#### ***Vorbereitung***

Wie bereits beschrieben (3.1.2.) wurden jeweils von der Nativprobe sowie von der Probe nach verschiedenen langen Inkubationszeiten mit den verwendeten Substanzen zur Induktion der Dekondensation Ausstriche angefertigt. Die Objektträger wurden nach ca. 5-minütiger Lufttrocknung mit einer Sprühfixierung bestehend aus 3,5 Milliliter Glutaraldehyd und 96,5 ml PBS behandelt.

#### ***PAP-Färbung***

Die Färbung nach Papanicolaou ist sehr komplex und wurde daher maschinell standardisiert (Shandon; Cheshire, England)



durchgeführt. Der Ablauf des Färbeprozesses ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 1: Standardisierte, modifizierte Färbung nach Papanicolaou.**

Färbelösung	Vorgang
Isopropanol 80%	1min eintauchen
Isopropanol 85%	1,5min eintauchen
Aqua dest.	1,5min eintauchen
Haematoxylin	3min eintauchen
Aqua dest.	2min eintauchen
Isopropanol 70%	1min eintauchen
Ammoniak in Isopropanol 70%	6sec eintauchen
Isopropanol 70%	1,5min eintauchen
Isopropanol 95%	2x2min eintauchen
Orange G Lösung	2min eintauchen
Isopropanol absolut	1,5min eintauchen
Isopropanol 95%	2x1,5min eintauchen
EA 50 Lösung	2,5min eintauchen
Isopropanol absolut	1,5min eintauchen
Isopropanol absolut	3x2min eintauchen
Xylol	4x1min eintauchen

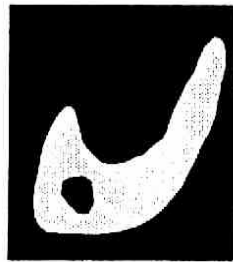
### 3.1.3.3. Morphometrische Analyse der Spermien

Nach der Färbung wurden die noch feuchten Objektträger mit Entellan (Merck; Darmstadt) eingedeckt und nach Lufttrocknung mit dem semiautomatischen Bildanalysestystem ausgewertet.

Die Auswertung wurde vorgenommen, indem der Untersucher mit dem Cursor die jeweiligen Umrisse eines Spermienkopfes umrandete. Aus der Anzahl der umkreisten Pixel ergibt sich die Fläche eines Spermienkopfes (**Area**).

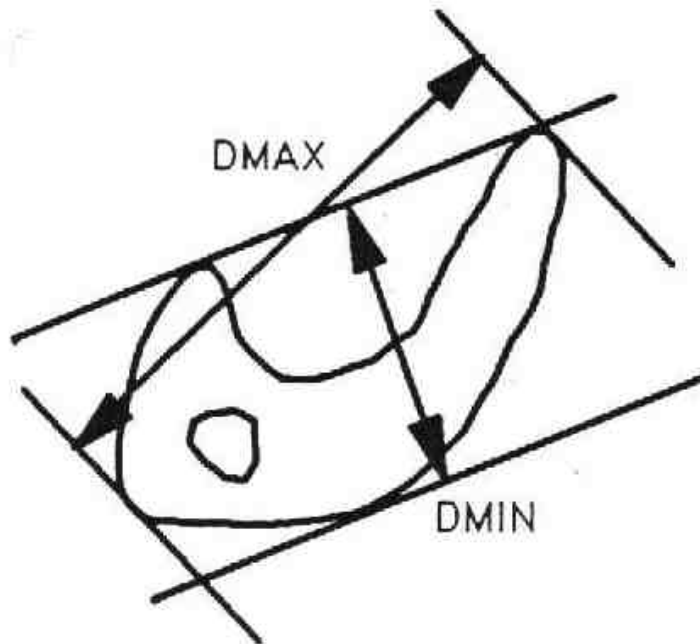
**AREA**

Area of the object. The number of pixels is multiplied by the scaled pixel area.



**Grafik 5: Fläche des Objekts. Sie ergibt sich aus der Multiplikation der Pixelzahl mit der skalierten Pixelfläche.**

Andere erfasste Parameter zur Definition des Spermienkopfes waren der minimale (**DMIN**) und der maximale Durchmesser **DMAX**. Die Erhebung dieser Parameter wird an der folgenden Grafik ersichtlich:



**Grafik 6: Schematische Darstellung der Erfassung von kleinsten und größten Durchmesser.**

**FCI** (Circularity shape) stellt eine Möglichkeit dar, die äußere Form zu beurteilen, und wird berechnet wie folgt:

$$\mathbf{FCIRCLE} = \frac{4 \times \pi \times \mathbf{AREA}}{\mathbf{PERIM}^2}$$

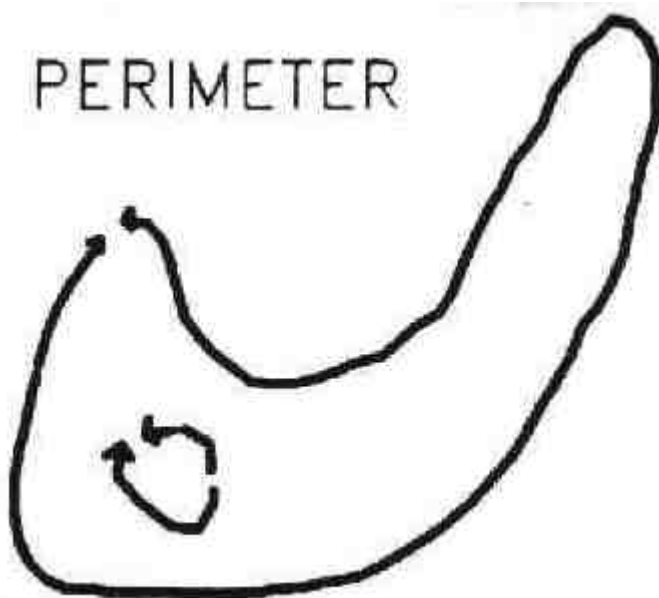
Die Werte für **FCI** rangieren zwischen Zahlen nahe 0 für elongierte oder raue Objekte und 1 für runde Objekte.

Der Faktor **PERIMETER** (=Umfang) wurde folgendermaßen erhoben:

$$\mathbf{Perimeter} = \mathbf{Perimx} + \mathbf{Perimy} + \mathbf{Perimxy} \times \sqrt{2}$$

Perimx stellt die Länge des Perimeters Richtung x-Achse dar, Perimy in Richtung y-Achse.

Perimxy ist die Länge des Perimeters in 45° und 135°-Richtung auf die x-Achse zu.



**Grafik 7: Erfassung des Umfangs zur Berechnung anderer Parameter.**

### **3.2. Patientinnen**

52 Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von  $26,52 \pm 6,71$  Jahren nahmen an dieser Studie teil. Die Frauen wurden nach Down-Regulation kontrolliert ovariell hyperstimuliert (COH) und anschließend unter sonographischer Kontrolle transvaginal punktiert. Die Follikel werden mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und in einem Reagenzglas aufgefangen.

Die reifen Eizellen wurden kultiviert und zur Befruchtung mittels IVF verwendet.

### **3.2.1. Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation (COH)**

Zur Stimulation wurde in dieser Studie das sog. lange Protokoll verwendet. Dabei wurden die Patientinnen im vorherigen Zyklus mit Gonadotropin-releasing Hormon-Agonisten (GnRH-a; Decapetyl Depot; Ferring, Kiel, Deutschland) behandelt, um eine Down-Regulation der Hypophyse zu erreichen. Zwei Wochen später wurden die Östradiol- und Progesteron-Spiegel bestimmt, um zu erfahren ob gewisse Basismengen (Grenzwerte  $< 30\text{pg/ml}$  für Östradiol und  $< 1.5\text{ng/ml}$  für Progesteron) vorhanden waren. War dies gewährleistet, wurde die Stimulation eingeleitet mit 150-225 IU/Tag hMG (humanes menopausales Gonadotropin; Menogon; Ferring, Kiel, Deutschland) für mindestens 7 Tage. Eine andere Stimulationsmöglichkeit war die Kombination aus 150 IU/Tag rFSH (rekombinantes Follikel stimulierendes Hormon; Gonal-F; Serono, Unterschliessheim, Deutschland) und ab dem 7. Tag zusätzlich gegebenes hMG. Die Menge der IU wurde je nach ovarielltem Ansprechen für jede Patientin individuell angepasst. Hatten sich mindestens 2 Follikel zu einem Durchmesser von  $>18\text{-}20\text{mm}$  entwickelt, erhielt jede Patientin eine Dosis von 10.000. IU hCG (humanes Chorion Gonadotropin; Choragon; Ferring, Kiel, Deutschland) als intramuskuläre Injektion, und 36 Stunden danach konnten die Follikel unter Ultraschallkontrollen aspiriert werden. Befruchtete Eizellen wurden für 24 Stunden weiter kultiviert. Hatten von diesen Zellen einige das Embryonalstadium erreicht, so wurden maximal 3 davon in den Uterus transferiert. Von dem Tag der Eizellen-Gewinnung an bis zur 7. Schwangerschaftswoche erhielten die Patientinnen 300mg/Tag Progesteron in Form von Vaginalkapseln.

Etwa 8-10 Follikel sollten unter einer üblichen Stimulationsbehandlung heranwachsen.

### 3.3. In-vitro Fertilisation

Nach der COH erfolgte die Punktion der Eizellen. Anschließend wurden sie in einem Medium gewaschen, bestehend aus Ham's F10 und 10% inaktiviertem Patientenserum, und danach für 2-3 Stunden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> Gasphase aufbewahrt. In diesem Medium befindlich wurden sie in eine 4-Lochplatte gesetzt, und danach wurden jeder Kultur ca. 100.000-120.000 Spermien hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 18-24 Stunden wurde überprüft, ob eine Befruchtung eingetreten war. Dazu wurden einige Kumuluszellen mechanisch mit Glaskapillaren verschiedener Größe entfernt bis man den Zellkern beurteilen konnte. Eine Befruchtung war eingetreten wenn 2 Vorkerne (Pronuclei) in den Eizellen zu erkennen sind.

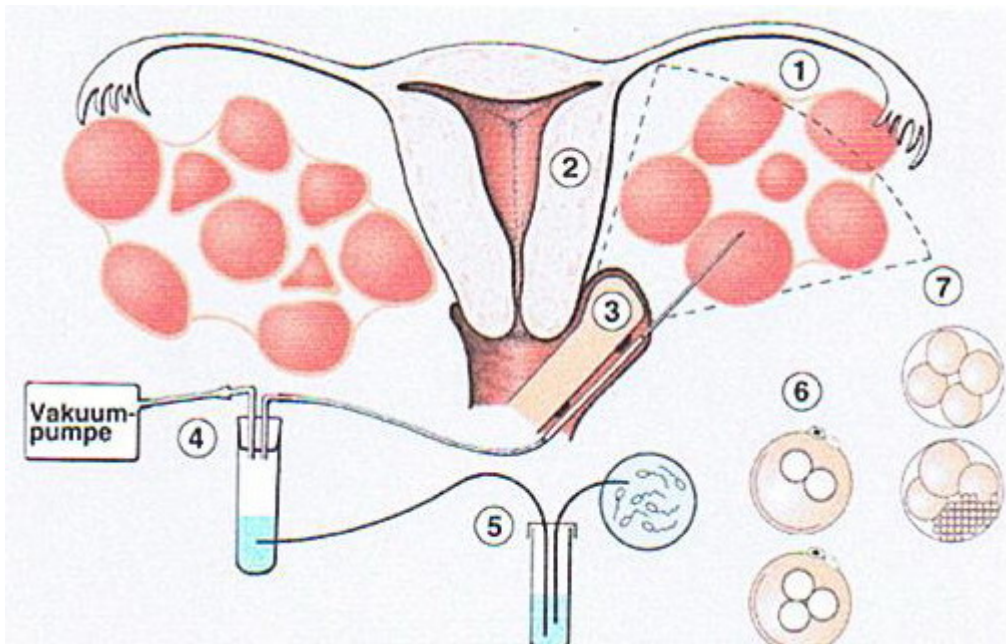
Befanden sich mehr als 3 Eizellen im Vorkernstadium, konnten diese kryokonserviert werden für einen erneuten IFV-Zyklus.

Die weiteren Entwicklungschancen lassen sich zum Teil schon in diesem Stadium erkennen: Ein ideales Muster der Nukleoli in den Vorkernen wäre eine symmetrische Anordnung an der Berührungsstelle der beiden Vorkerne.

Haben sich am nächsten Tag die fertilisierten Eizellen geteilt, können die so entstandenen Embryonen mit 2-6 Zellen (Blastomeren) transferiert werden.

Nach 48 Stunden Kultur bestehen die Embryonen aus 4-8 Zellen und sind ca. 0,1mm groß.

Anschließend erfolgte der Transfer der Embryonen: Nach Reinigung des Muttermunds mit Kulturmedium wurden die Embryonen in einen Transferkatheter aufgezogen und schließlich möglichst atraumatisch transuterin in die Tube oder das Cavum uteri abgesetzt.



**Grafik 8: In-vitro Fertilisation.** (Quelle: Der Gynäkologe:12/2002, 35:1233-1266)

1: Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation

2: Endometrium

3: Follikelpunktion

4: Absaugen der Follikel mittels Vakuumpumpe

5: Inkubation der Eizellen mit den Spermien (IVF)

6: Vorkernstadium. Zwei Vorkerne zeigen die regelrechte

Fertilisation an, drei Vorkerne bedeuten eine Triploidie: Solche

Eizellen können nicht weiter verwendet werden

7: Embryonen (Blastomeren)

### 3.3.1. Nachweis der Schwangerschaft

Am 12. und am 14. Tag nach dem Embryotransfer wurde zum Nachweis einer eingetretenen Schwangerschaft eine quantitative Bestimmung des beta-HCGs

(humanes Chorion-Gonadotropin) durchgeführt. War eine Gravidität zustande gekommen, wurde der weitere Verlauf der Schwangerschaft unter sonografischer Kontrolle weiter beobachtet.

### **3.3.2. Beurteilung der nicht befruchteten Eizellen**

#### **3.3.2.1. Aufbereitung der nicht befruchteten Eizellen**

Zu Anfang wurden die Eizellen mit Calcium-freiem PBS 0,1M gespült. Danach erfolgte das Ablösen der restlichen Granulosazellen und der Zona pellucida durch das Aufbringen von Tyrode's Lösung (s. Anhang) für 30-60 Sekunden und erneutes Spülen mit 0,1M PBS. Anschließend wurden die Oocyten fixiert mit Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer (Baka et al.; modifiziert nach Messinger und Albertini) mit folgenden Einzelbestandteilen:

0,1M Piperazine N-N'-bis(2-ethanosulfonicacid)(Pipes; Sigma ), pH 6,9; 5mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O; 2,5mM Ethylenglycol-bis (Beta-Aminoethylether)N,N,N',N'Tetrasäure (EGTA) (Sigma); 2% Formaldehyd; 0,5% TritonX-100 (Sigma) und 1µmol Taxol (Sigma). Danach wurden die Eizellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und hinterher mehrmals mit Blocking solution (Anhang 2) gespült, bestehend aus: 0,1M PBS mit 2% BSA (bovines Serum-Albumin (Sigma), 2% Milchpulver, 2% Normal Ziegen-Serum (Amersham Cooperation; Arlington Heights, USA); 0,1M Glycin; 0,01% TritonX-100. Nach diesem Schritt wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysine beschichtete Objektträger (Sigma) aufgebracht.



### **3.3.2.2. Färbung der nicht befruchteten Eizellen**

Zur Visualisierung polymerisierter Tubulinstrukturen wurden die Zellen zunächst rehydriert in einer Lösung bestehend aus 0,1M PBS mit 0,1% Triton X-100, danach erfolgte die Inkubation der Oocyten für 90 min bei 39° C mit einem monoklonalen Antikörper (monoklonales anti- $\alpha$ Tubulin, Maus IgG, Maus-Aszites Flüssigkeit; Sigma), während gleichzeitig die Eizellen mit monoklonalen acetylierten Tubulin-Antikörpern (Clone-6-11B-1, Maus-Aszites Flüssigkeit; Sigma) inkubiert wurden um die Spermenschwänze sichtbar zu machen. Danach wurde mit 0,1M PBS plus 0,5% Triton X-100 und 0,5% BSA gespült. Anschließend wurden die Oocyten mit Blocking solution versetzt und erneut für eine Stunde bei 39° C inkubiert. Es folgte das Versetzen mit FITC-konjugiertem Ziegen anti-Maus IgG (Sigma) und die Inkubation für 40 min bei 37° C. Danach wurde wieder mit der PBS-Triton-BSA-Lösung gespült.

Die darauf folgenden Arbeitsschritte dienten dazu, die in der Oocyte enthaltene DNA von Eizelle und Spermium sichtbar zu machen. Dazu wurde Propidium-Iodid (Sigma) in einer Verdünnung von 10 $\mu$ g/ml für 10 min aufgebracht und danach wieder gründlich mit 0,1M PBS gespült. Zum Schluss wurden die Objektträger mit einer Lösung aus 0,1M PBS mit 50% Glycerol und 25mg/ml Sodium Acid eingedeckt (wirkt dem schnellen Verblässen der fluoreszierenden Färbung bei Lichtexposition entgegen). Bis zum Zeitpunkt der Auswertung wurden die behandelten Eizellen dunkel, feucht und kühl aufbewahrt.

### **3.3.2.3. Auswertung der gefärbten Eizellen**

Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz Aristoplan Mikroskop, wobei Diapositive (Filmmaterial: Fuji Sensia, 400 ASA) verwendet wurden, fotografiert mit einem Variophot Orthomat mit manuell eingestellten Belichtungszeiten von 2-4 sec und einer Blende 20-80.

Die Eizellen wurden je nach Zustand des Spermienchromatins in 4 Gruppen geteilt: Gruppe **1** steht für Eizellen, die teilweise dekondensiertes Chromatin enthielten, **2** für Eizellen, die vollständig dekondensiertes Chromatin enthielten, und **3** für solche, deren Chromatin zerstreut (scattered), also nicht mehr funktionstüchtig war. In der Gruppe **4** wurden diejenigen Eizellen erfasst, bei denen kein Spermium eingedrungen war.

## **4. Ergebnisse**

### **4.2. Patienten**

#### **4.2.1. Klassische Samenanalyse**

##### **4.1.1.1. pH-Wert**

Der durchschnittliche pH-Wert der Proben der G.1 betrug  $8,62 \pm 0,3$ .

In der G.2 war der entsprechende Wert  $11,3 \pm 13,63$ .

Die erhobenen pH-Werte der Samenproben von G.1 und G.2 zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,88$ ).

##### **4.1.1.2. Comburtest und Martest**

Die Ergebnisse des Comburtests auf Leukozyten in der Samenprobe ( $p=0,51$ ) ließen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen.

Auch im Martest ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p=1,0$ ).

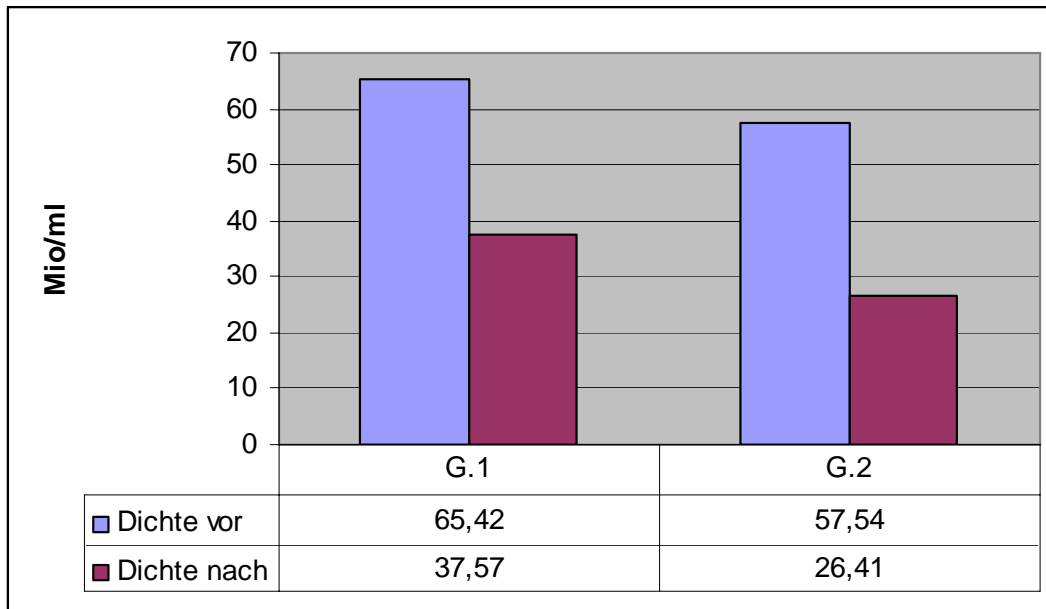
##### **4.1.1.3. Spermien-Dichte vor und nach Aufbereitung**

Die Dichte der Spermien in der G.1 betrug im Schnitt  $65,42 \pm 27,7$  vor und  $34,57 \pm 26,19$  Mio./ml nach Aufbereitung.

Die entsprechenden Werte der G.2 waren  $57,54 \pm 30,95$  vor und  $26,41 \pm 23,55$  Mio./ml nach der Aufbereitung.

Die Auswertung der Dichte sowohl vor ( $p=0,27$ ) als auch nach Aufbereitung ( $p=0,16$ ) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen G.1 und G.2.

Die Reduktion der Dichte durch die PureSperm-Dichtegradientenzentrifugation war in beiden Gruppen hochsignifikant ( $p=0,01$  in G.1 und G.2).



**Grafik 9: Abnahme der Spermiendichte durch die Aufbereitung**

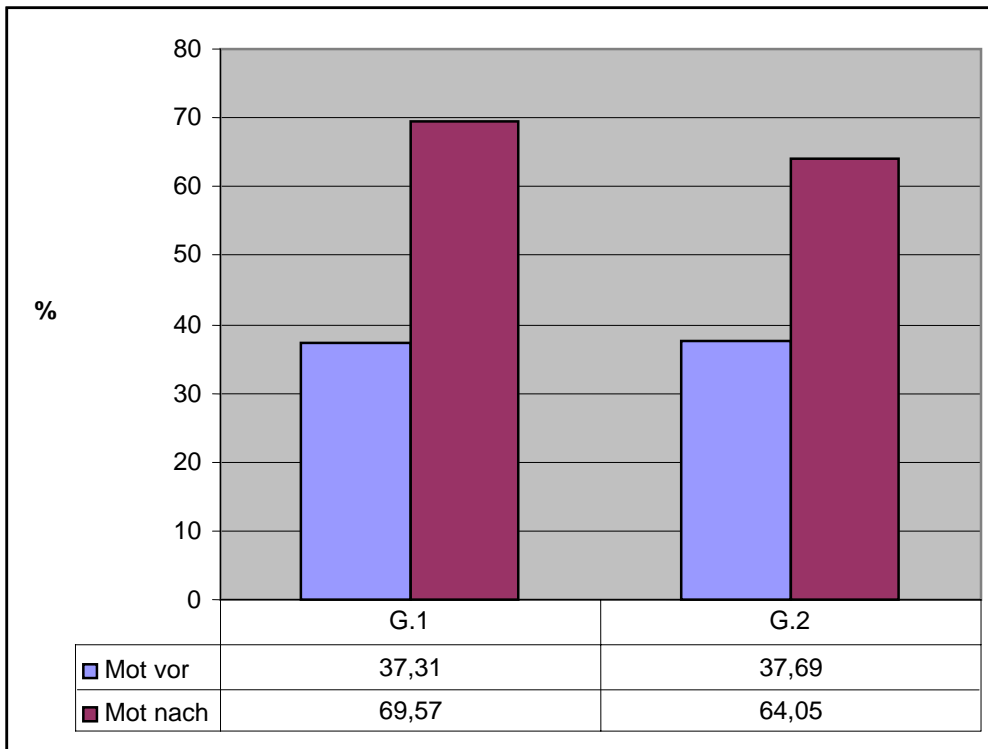
#### 4.1.1.4. Motilität

In der G.1 befanden sich  $37,31 \pm 17,45\%$  motile Spermien vor und  $69,57\%$  nach Aufbereitung.

Die Werte in der G.2 verbesserten sich von  $37,69 \pm 19,61\%$  auf  $64,05 \pm 16,85\%$  motiler Spermien nach Aufbereitung.

Durch die Aufbereitung wurde die Motilität der Proben hochsignifikant verbessert, sowohl in der G.1 ( $p=0,01$ ) als auch in der G.2 ( $p=0,01$ ).

Die Motilität in den Nativproben zeigte zwischen der G.1 und G.2 keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,88$ ).



**Grafik 10: Zunahme der Motilität durch die  
Aufbereitung**

**Tabelle 2: Ergebnisse der klassischen Samenanalyse**

		Perzentile					
		MW±SD	25	50	75	Minimum	Maximum
G.1	pH	8,62±0,3	8,5	8,7	8,78	7,9	9
	Comburtest	2,62±0,7	2	3	3	1	3
	Martest	0,12±0,33	0	0	0	0	1
	Dichte vor	65,42±27,7	45	64	100	8	100
	Dichte nach	34,57±26,19	15	30	42,5	3	100
	Mot vor	37,31±17,45	25	30	50	10	70
	Mot nach	69,57±20,7	62,5	80	82,5	90	62,5
G.2	pH	11,3±13,63	8,3	8,6	9	7,9	12
	Comburtest	2,73±0,6	3	3	3	1	3
	Martest	0,15±0,37	0	0	0	0	1
	Dichte vor	57,54±30,95	32,25	48,5	92,5	12	100
	Dichte nach	26,41±23,55	12,5	20,35	35	0,3	80
	Mot vor	37,69±19,61	18,75	40	50	5	70
	Mot nach	64,05±16,85	50	65	80	30	85

## **4.1.2. Chromatin-Dekondensation**

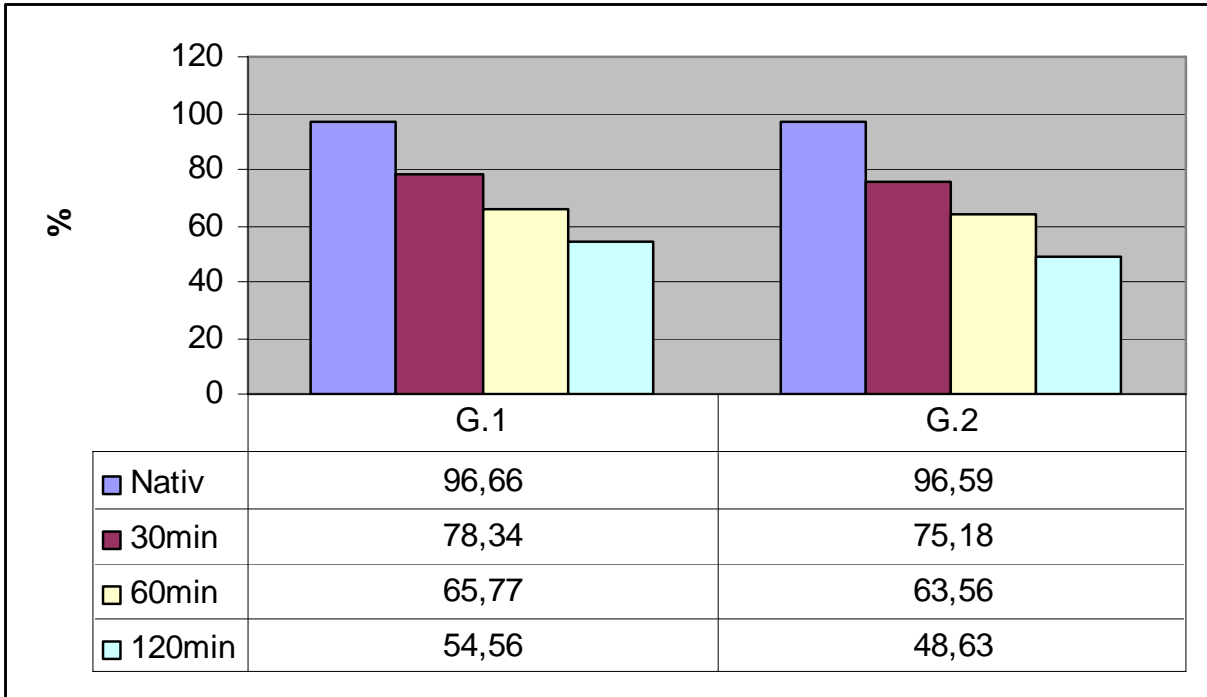
### **4.1.2.1. Nachweis von kondensiertem Chromatin mit der Acridin-Orange-Färbung**

In der Nativprobe der G.1 befanden sich  $96,66 \pm 4,25\%$  Spermien mit kondensiertem Chromatin. Dieser Anteil sank nach der Inkubation mit LIS+DTT für 30min auf  $78,34 \pm 15,23\%$ , nach 60min auf  $65,77 \pm 16,84\%$  und nach 120min Inkubation auf einen Anteil von  $54,56 \pm 17,68\%$  kondensierter Spermien.

Dies bedeutete einen hochsignifikanten Verlust von Spermien mit kondensiertem Chromatin in der G.1, sowohl zwischen nativen Spermien und nach 120 min Inkubation ( $p=0,00$ ) als auch zwischen den einzelnen Zeitpunkten (Nativ-30min, 30min-60min, 60min-120min: jeweils  $p=0,01$ ).

In der G.2 fanden sich zu Beginn  $96,58 \pm 5,57\%$  Spermien mit kondensiertem Chromatin. Nach 30min Inkubation mit Heparin+SDS fanden sich noch  $74,18 \pm 13,18\%$ , nach 60min  $63,56 \pm 9,57\%$ , und nach 120min Inkubation  $48,63 \pm 10,7\%$  kondensierte Spermien. Entsprechend zur G.1 waren die Unterschiede bzgl. des Anteils kondensierter Spermien sowohl zwischen den einzelnen Zeitpunkten (Nativ-30min, 30min-60min, 60min-120min) als auch zwischen dem Ausgangswert und dem Wert 120min nach Inkubation hochsignifikant (jeweils  $p=0,001$ ).

Der Gehalt an Spermien mit kondensiertem Chromatin vor der Inkubation war ähnlich in beiden Gruppen ( $p=0,55$ ), erst nach einer Inkubationszeit von 120min zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen G.1 und G.2 ( $p=0,02$ ).



**Grafik 11: Prozentsatz an Spermien mit kondensiertem Chromatin (grüne Fluoreszenz) nach 30,60 und 120 Minuten Inkubation**



**Tabelle 3: Ergebnisse der Acridin-Orange Färbung (MW=Mittelwert aus je 100 ausgewerteten Spermien)**

		MW±SD		Perzentile		Minimum	Maximum
				25	50	75	
G.1	Nativ	96,66±4,25	94,52	98	100	83	100
	30min	78,34±15,23	76	82	87,5	25	96
	60min	65,77±16,84	62	69,3	78	26	91
	120min	54,56±18,68	50,25	58,5	64,25	2,04	82
G.2	Nativ	96,61±5,68	93	100	100	77	100
	30min	74,02±13,43	68	76	84,5	32,58	91
	60min	63,54±9,77	55,25	65,5	72	42	77
	120min	48,41±10,86	39	51	54	28	65,45

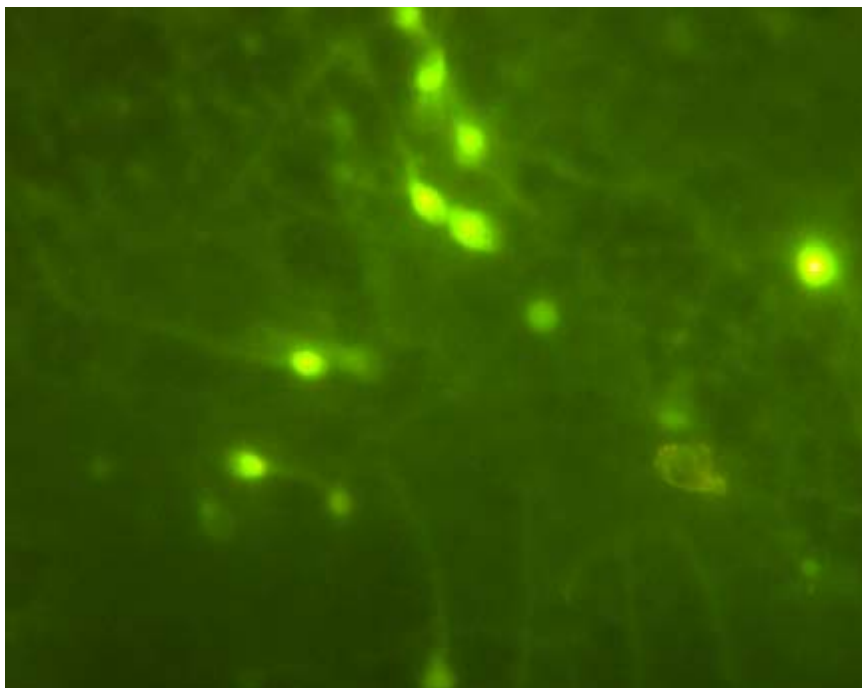


Bild 1: Native, kondensierte Spermien.

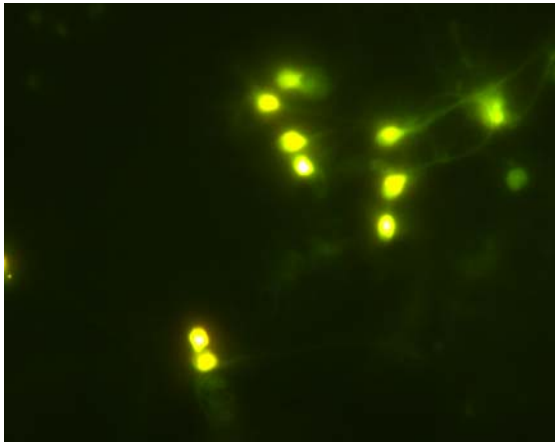


Bild 2: Spermien nach 30 Minuten Inkubation mit decondensierenden Substanzen. Zunehmend gelbe Fluoreszenz als Zeichen der beginnenden Dekondensation.

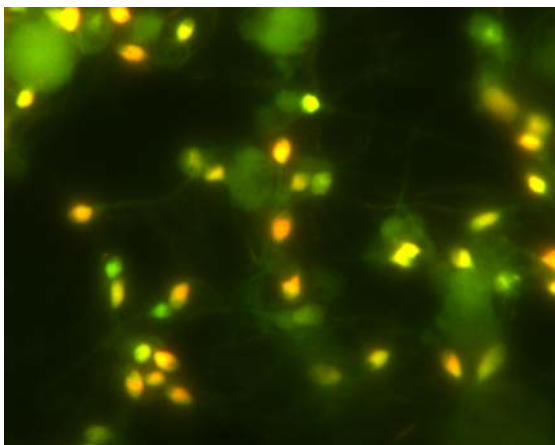


Bild 3: Fortschreiten der Dekondensation nach 60 Minuten Inkubation.

#### **4.1.2.2. Nachweis der Dekondensation mittels der morphometrischen Analyse (ibas)**

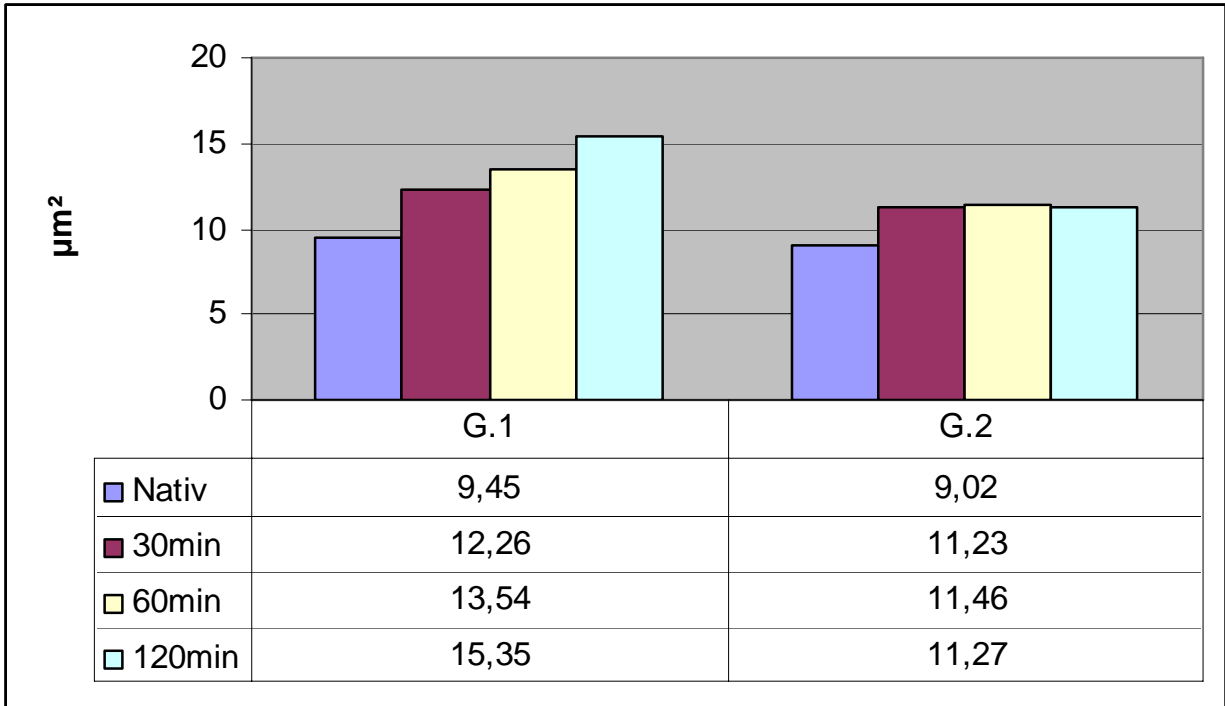
##### **A: Fläche der Spermienköpfe (area)**

Die durchschnittliche Fläche der in der Nativprobe der G.1 enthaltenen Spermien betrug  $9,45 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$ . Die Auswertung der Fläche nach 30min Inkubation mit LIS+DTT ergab einen Wert von  $12,26 \pm 2,16 \mu\text{m}^2$ . Nach 60min Inkubation war sie auf  $13,54 \pm 3,14 \mu\text{m}^2$  angestiegen, und nach 120min Inkubation wurde eine Fläche von  $15,35 \pm 7,78 \mu\text{m}^2$  gemessen.

Die Fläche der nativen Spermien der G.2 war  $9,02 \pm 1,15 \mu\text{m}^2$  groß. 30min nach Zugabe von Heparin+SDS steigerten sich diese Werte auf  $11,23 \pm 1,85 \mu\text{m}^2$ , nach 60min Inkubation war nur noch ein minimaler Anstieg der Fläche auf  $11,46 \pm 1,97 \mu\text{m}^2$  zu verzeichnen. Nach 120min Inkubation wurde eine Fläche von  $11,27 \pm 2,82 \mu\text{m}^2$  gemessen.

Dies war ein hochsignifikanter Zuwachs der Fläche sowohl in der G.1 als auch G.2 (jeweils  $p=0,001$ ).

Bezüglich der Fläche der Spermienköpfe gab es in den Nativproben keinen signifikanten Unterschied zwischen G.1 und G.2 ( $p=0,18$ ), aber bereits nach 30min Inkubation zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,04$ ), ebenso nach 60 ( $p=0,003$ ) und 120min Inkubation ( $p=0,001$ ).



**Grafik 12: Zunahme der Fläche der Spermienköpfe nach 30,60 und 120 Minuten Inkubation**

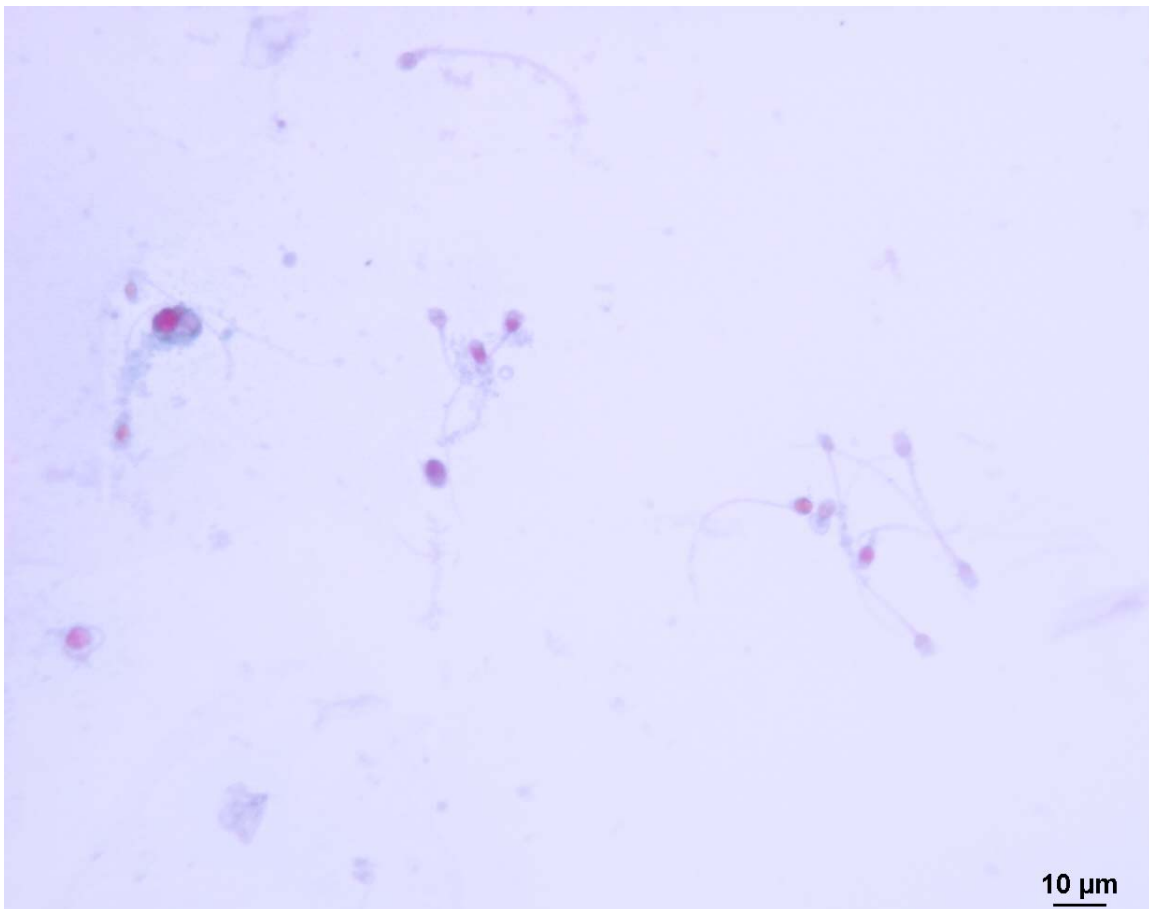


Bild 4: Native Spermien.

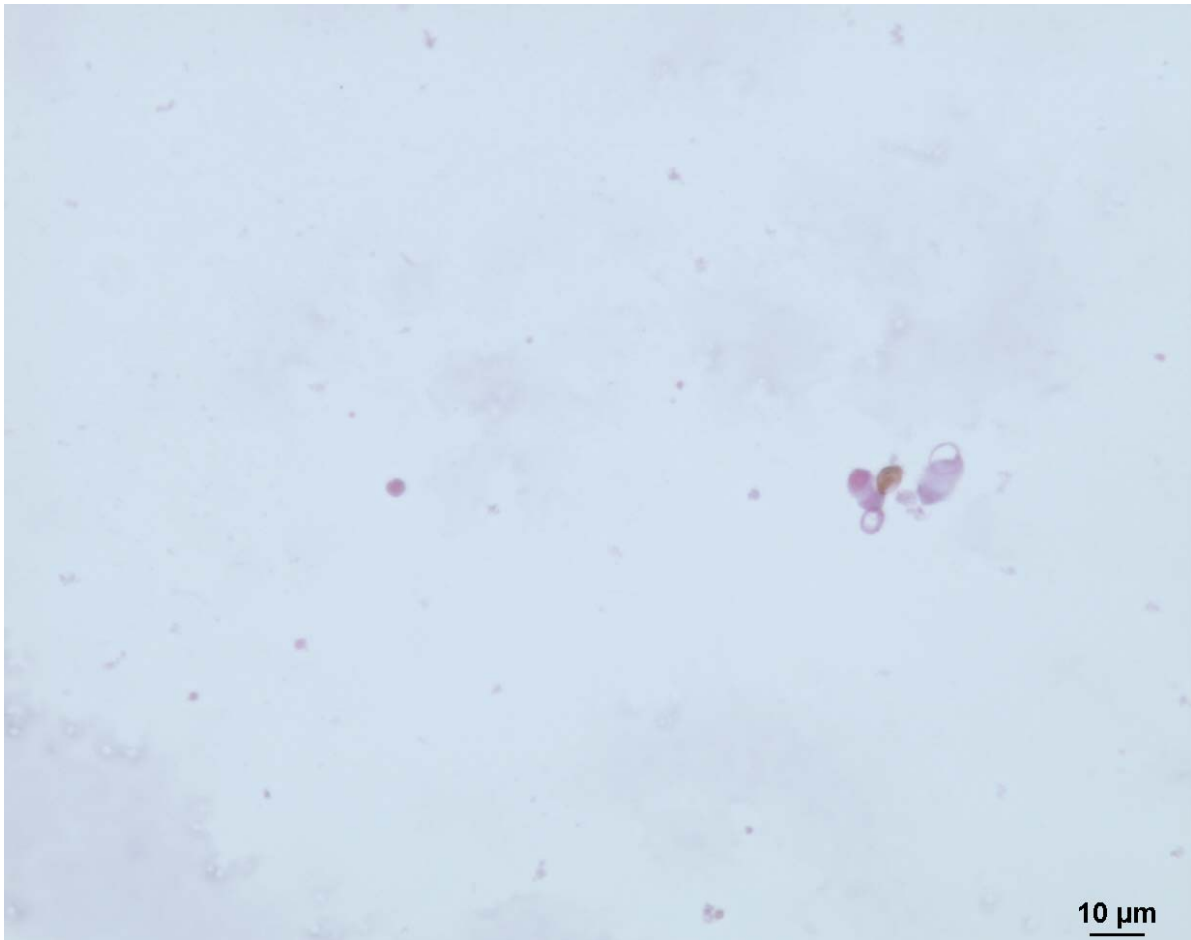


Bild 5: Dekondensierte Spermien nach 120 Minuten  
Inkubation.

### **B: Minimaler (DMIN) und maximaler Durchmesser (DMAX)**

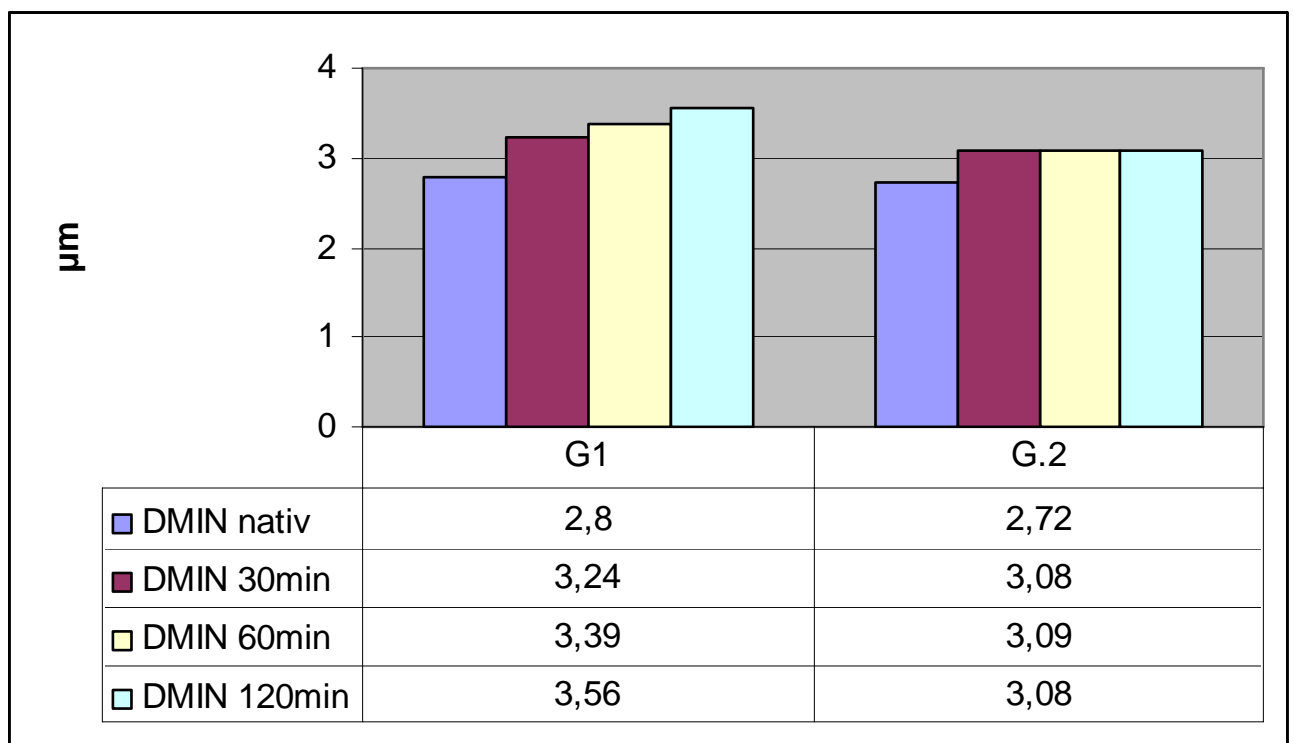
Der minimale Durchmesser (DMIN) der nativen Spermien der Gruppe 1 betrug  $2,8 \pm 2,82 \mu\text{m}$ . 30min nach Zugabe von LIS+DTT vergrößerte sich dieser Wert auf  $3,24 \pm 3,19 \mu\text{m}$ , 60min danach auf  $3,39 \pm 3,34 \mu\text{m}$  und 120min danach auf  $3,56 \pm 3,48 \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).

Für die nativen Spermien der G.2 ergab sich ein minimaler Durchmesser von  $3,72 \pm 2,75 \mu\text{m}$ . Wurden sie mit Heparin+SDS inkubiert, stieg dieser Wert nach

30min auf  $3,08 \pm 3,05 \mu\text{m}$ , nach 60min auf  $3,09 \pm 3,01 \mu\text{m}$  und nach 120min auf  $3,08 \pm 3,0 \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).

Die Veränderungen des minimalen Durchmessers von der Nativprobe zu dem Zeitpunkt nach 120min Inkubation waren in beiden Gruppen hochsignifikant (jeweils  $p=0,001$ ).

Die Ausgangswerte für den minimalen Durchmesser unterschieden sich zwischen der G.1 und G.2 nicht signifikant ( $p=0,2$ ), erst nach 30min Inkubation begannen die Unterschiede signifikant zu werden ( $p=0,02$ ), was sich nach 60min Inkubation ( $p=0,003$ ) wie auch nach 120min Inkubation ( $p=0,002$ ) fortsetzte.



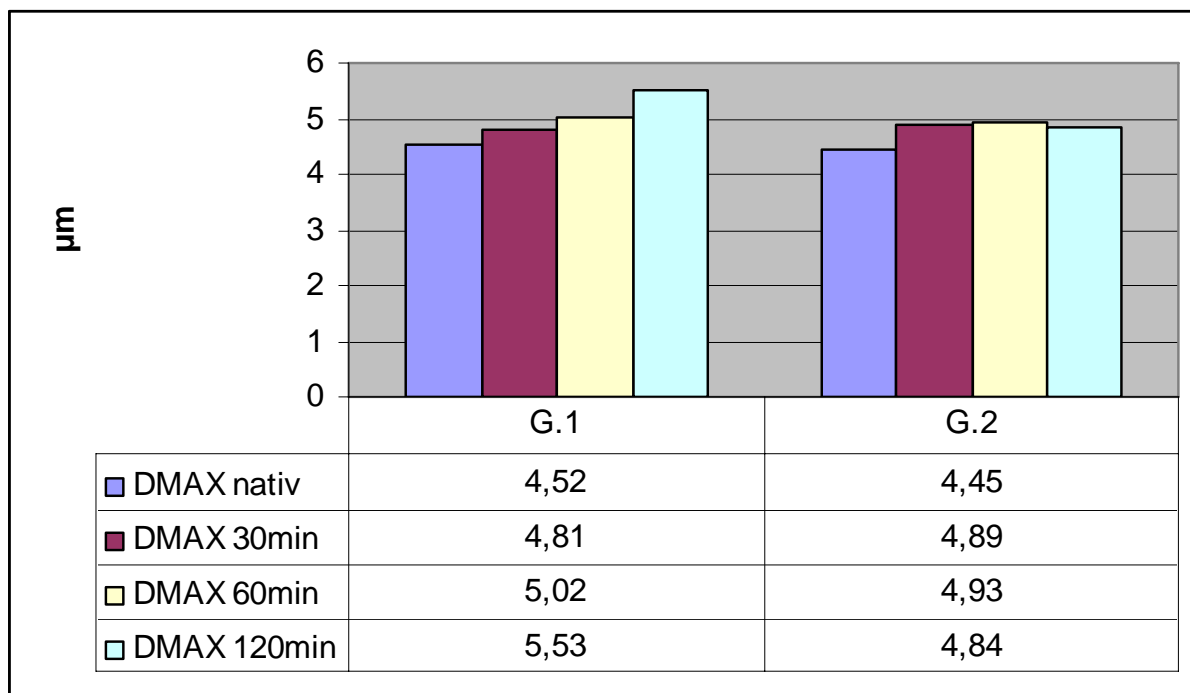
**Grafik 13: Veränderung des minimalen Durchmessers der Spermienköpfe durch die Induktion der Dekondensation**

Die Zunahme des Durchmessers lässt sich nicht nur anhand des minimalen, sondern auch anhand des maximalen Durchmessers (D<sub>MAX</sub>) belegen: betrug er in der G.1 bei den nativen Spermien noch  $4,52 \pm 4,57 \mu\text{m}$ , so ließ sich ein Anstieg 30min nach Inkubation auf  $5,02 \pm 4,96 \mu\text{m}$  verzeichnen, ebenso nach 60min auf  $5,25 \pm 5,1 \mu\text{m}$  und nach 120min auf  $5,53 \pm 5,22 \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).

Die G.2 zeigte anfangs noch Werte von  $4,45 \pm 4,39 \mu\text{m}$  für den maximalen Durchmesser der nativen Spermien, nach 30min Inkubation von  $4,89 \pm 4,8 \mu\text{m}$ , nach 60min von  $4,93 \pm 4,85 \mu\text{m}$  und nach 120min von  $4,84 \pm 4,65 \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).

Auch bezüglich des maximalen Durchmessers waren die Veränderungen zwischen nativen Spermien und solchen nach 120 min Inkubation signifikant ( $p=0,001$  in der G.1 und  $0,01$  in der G.2).

In den Nativproben der G.1 und G.2 wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich des maximalen Durchmessers der Spermienköpfe gemessen. Dies setzte sich auch 30min nach Inkubation fort, erst nach 60 ( $p=0,023$ ) und 120min ( $p=0,001$ ) Inkubation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.



**Grafik 14: Veränderung des maximalen Durchmessers der Spermienköpfe durch die Induktion der Dekondensation**

### **C: Form der Spermienköpfe (FCI)**

FCircularity dient als Parameter für die Form. Die Veränderung des FCI war signifikant zwischen den nativen Spermien und denen nach 120min Inkubation, sowohl in der G.1 als auch G.2 (G.1:  $p=0,02$ ; G.2:  $p=0,03$ ).

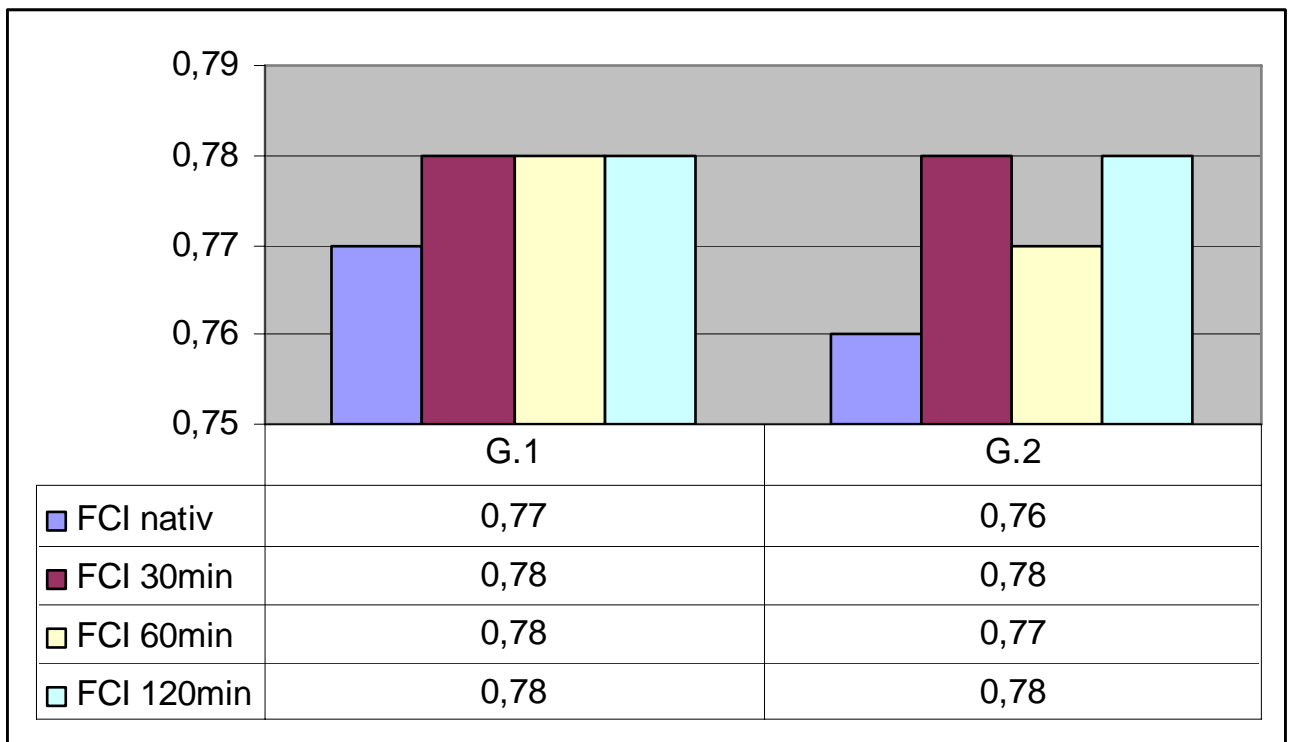
Die nativen Spermien der Gruppe 1 zeigten einen Wert von  $0,77 \pm 0,77$ . Nach 30min Inkubation wurde  $0,78 \pm 0,78$  gemessen, nach 60min  $0,78 \pm 0,78$  und nach 120min  $0,78 \pm 0,79$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).

Die korrespondierenden Werte der G.2 waren  $0,76 \pm 0,76$  in der Nativprobe, nach 30min  $0,78 \pm 0,78$ , nach 60min  $0,77 \pm 0,78$  und nach 120min Inkubation  $0,78 \pm 0,78$  (siehe Tabelle 4.1.2.2.).



Diese Veränderungen zwischen der Form der nativen Spermien und denen 120min nach Inkubation waren sowohl in der G.1 ( $p=0,02$ ) als auch in der G.2 signifikant ( $p=0,03$ ).

Die Form der Spermien (FCI) unterschied sich zu keinem Zeitpunkt (Nativ  $p=0,45$ ; 30min  $p=0,23$ ; 60min  $p=0,18$  und 120min nach Inkubation  $p=0,44$ ) signifikant voneinander.



**Grafik 15: Veränderung der Form (FCI) der Spermienköpfe durch die Induktion der Dekondensation**

**Tabelle 4: Ergebnisse der morphometrischen Analyse**(Einheiten: Area:  $\mu\text{m}^2$ ; DMIN und DMAX:  $\mu\text{m}$ )

		MW $\pm$ SD	Perzentile			Minimum	Maximum
			25	50	75		
<b>G.1Area</b>	nativ	9,45 $\pm$ 1,33	8,87	9,62	10,36	6,79	11,19
	30min	12,26 $\pm$ 2,16	10,63	11,75	13,43	9,48	17,82
	60min	13,54 $\pm$ 3,14	11,19	12,78	15,49	10,05	20,67
	120min	15,35 $\pm$ 7,78	11,67	13,51	16,62	9,14	49,45
DMIN	nativ	2,8 $\pm$ 0,23	2,69	2,82	2,95	2,37	3,29
	30min	3,24 $\pm$ 0,27	3,08	3,19	3,35	2,77	4,02
	60min	3,39 $\pm$ 0,41	3,11	3,34	3,64	2,83	4,37
	120min	3,56 $\pm$ 0,7	3,07	3,48	3,95	2,75	6,19
DMAX	nativ	4,52 $\pm$ 0,38	4,36	4,57	4,85	3,83	5,16
	30min	5,02 $\pm$ ,044	4,67	4,96	5,33	4,21	5,98
	60min	5,25 $\pm$ 0,58	4,88	5,1	5,5	4,42	6,84
	120min	5,53 $\pm$ 1,2	4,95	5,22	5,81	4,39	10,83
FCI	nativ	0,77 $\pm$ 0,03	0,75	0,77	0,78	0,68	0,81
	30min	0,78 $\pm$ 0,02	0,77	0,78	0,79	0,76	0,82
	60min	0,78 $\pm$ 0,02	0,77	0,79	0,79	0,72	0,82
	120min	7,78 $\pm$ 0,02	0,76	0,79	0,8	0,73	0,83
<b>G.2Area</b>	nativ	9,02 $\pm$ 1,15	7,9	9,17	9,8	6,89	11,58
	30min	11,23 $\pm$ 1,85	10,09	10,89	11,72	9,26	17,9
	60min	11,46 $\pm$ 1,97	10,08	10,79	12,28	9,58	18,21
	120min	11,27 $\pm$ 2,82	9,59	10,39	12,9	7,73	21,37
DMIN	nativ	2,72 $\pm$ 0,23	2,51	2,75	2,9	2,24	3,18
	30min	3,08 $\pm$ 0,24	2,95	3,05	3,23	2,66	3,84
	60min	3,09 $\pm$ 0,28	2,89	3,05	3,26	2,71	3,83
	120min	3,08 $\pm$ 0,36	4,4	4,65	5,15	4,11	7,08
DMAX	nativ	4,45 $\pm$ 0,34	4,27	4,39	4,67	3,87	5,32
	30min	4,89 $\pm$ 0,47	4,64	4,8	5,12	4,14	6,23
	60min	4,93 $\pm$ 0,46	4,66	4,85	5,12	4,22	6,36
	120min	4,84 $\pm$ 0,63	4,4	4,65	5,15	4,11	7,08
FCI	nativ	0,76 $\pm$ 0,03	0,75	0,76	0,79	0,66	0,8
	30min	0,78 $\pm$ 0,03	0,76	0,78	0,79	0,7	0,082
	60min	0,77 $\pm$ 0,03	0,76	0,78	0,79	0,71	0,81
	120min	0,78 $\pm$ 0,03	0,75	0,78	0,08	0,73	0,82

## **4.2. PATIENTINNEN**

### **4.2.1. Gewonnene, fertilisierte und befruchtete**

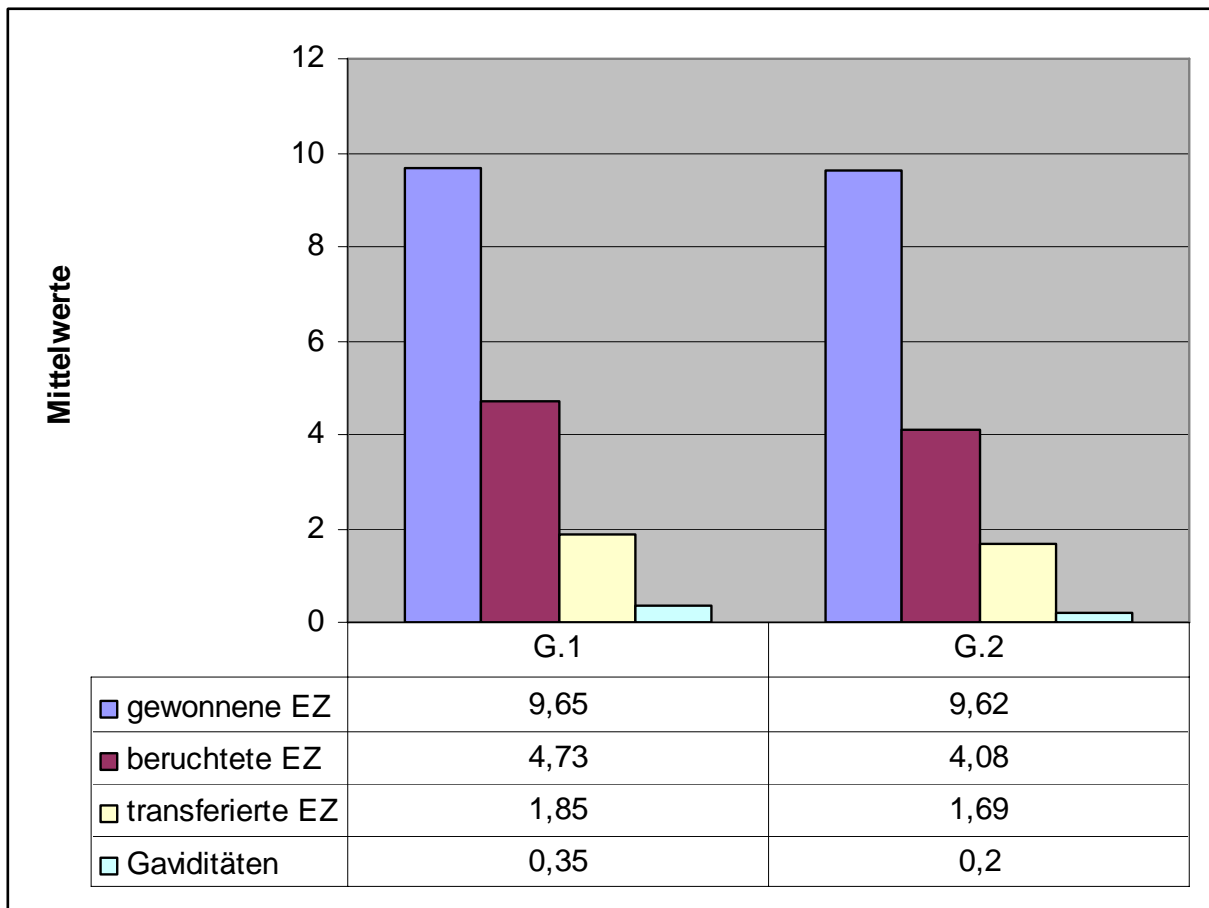
#### **Eizellen**

Nach hormoneller Hyperstimulation wurden in der G.1 im Mittel  $9,42 \pm 6,58$  Eizellen (EZ) gewonnen. Davon wurden  $4,96 \pm 4,49$  Eizellen befruchtet und schließlich  $1,85 \pm 1,01$  Embryonen in die Uterushöhle transferiert. Daraus entwickelten sich  $0,35 \pm 0,49$  Schwangerschaften (siehe Tabelle 4.2.1.1.).

Ähnlich Ergebnisse waren der G.2 zu beobachten: Von  $9,62 \pm 6,0$  Eizellen wurden  $4,08 \pm 4,35$  befruchtet,  $1,69 \pm 1,05$  transferiert mit  $0,2 \pm 0,41$  resultierenden Schwangerschaften (siehe Tabelle 4.2.1.1.).

Die Differenz zwischen der Zahl befruchteter Eizellen und schließlich transferierter Embryonen ergibt sich aus der Tatsache, dass in der Bundesrepublik Deutschland maximal 3 befruchtete Eizellen implantiert werden dürfen.

Weder bezüglich der Zahl gewonnener ( $p=0,91$ ), befruchteter ( $p=0,56$ ) noch transferierter ( $p=0,62$ ) Eizellen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen G.1 und G.2 feststellen, ebenso in Hinblick auf die Befruchtungsrate ( $p=0,87$ ) und die Zahl eingetretener Schwangerschaften ( $p=0,35$ ).



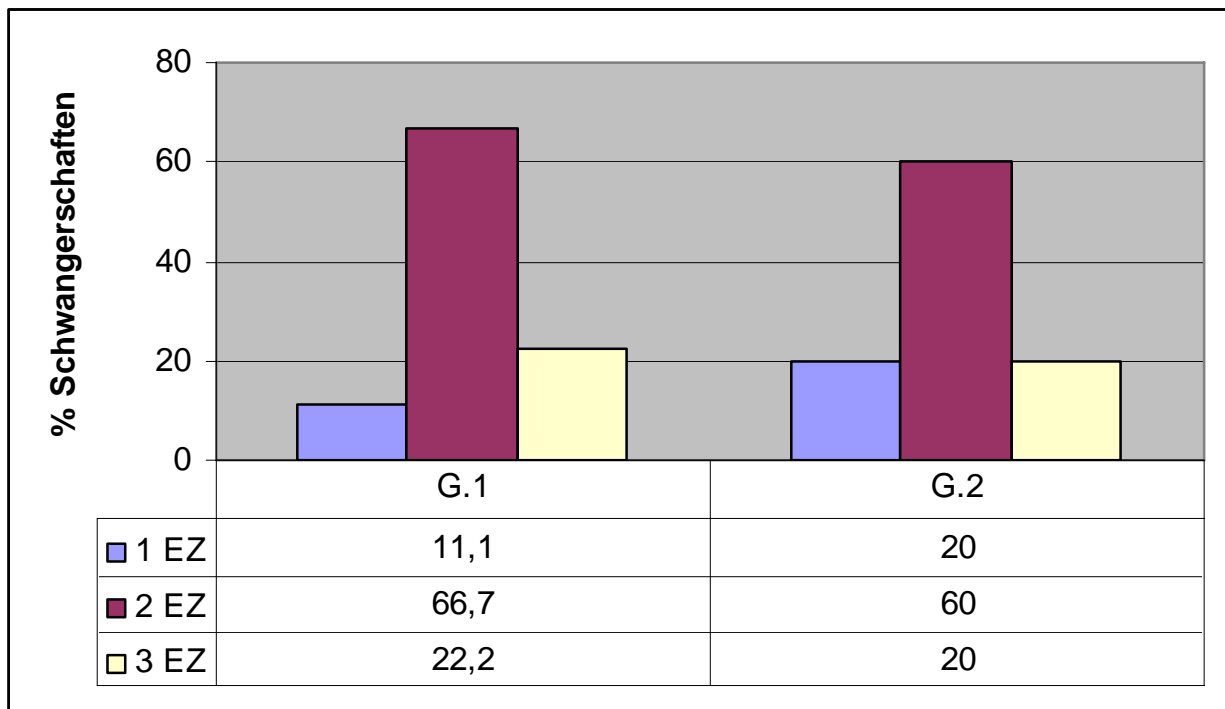
**Grafik 16: Mittelwerte gewonnener, befruchteter und transferierter Eizellen (EZ)**

Die Anzahl transferierter Eizellen korrelierte weder in der G.1 mit den eingetretenen Schwangerschaften ( $p=0,33$ ), noch in der G.2 ( $p=0,45$ ).

**Tabelle 5: Anzahl der Schwangerschaften je nach  
Zahl transferierter Eizellen**

		MW±SD	Perzentile			Minimum	Maximum
			25	50	75		
<b>G.1</b>	gewonn. EZ	9,65±6,38	4,75	8,5	14,25	2	27
	Befr. EZ	4,73±4,53	1	4	3	0	20
	Transf. EZ	1,85±1,01	1	2	3	0	3
	Fertil.rate	43,72±27,46	22,92	44,51	66,07	0	90,9
	Gravid.rate	0,35±0,49	0	0	1	0	1
<b>G.2</b>	gewonn. EZ	9,62±6	6	8,5	11,5	1	30
	Befr. EZ	4,08±4,35	1	3	6	0	21
	Transf. EZ	1,69±1,05	1	2	2,25	0	3
	Fertil.rate	45,41±32,98	15	45,59	67,31	0	100
	Gravid.rate	0,2±0,41	0	0	0	0	1

Betrachtet man die Zahl der eingetretenen Schwangerschaften getrennt nach Anzahl der transferierten Eizellen, so kann man beobachten dass die meisten Schwangerschaften in den Gruppen auftraten, in der 2 Eizellen transferiert wurden. Dies waren in der G.1 66,7% der Schwangeren, in der G.2 60,0%.



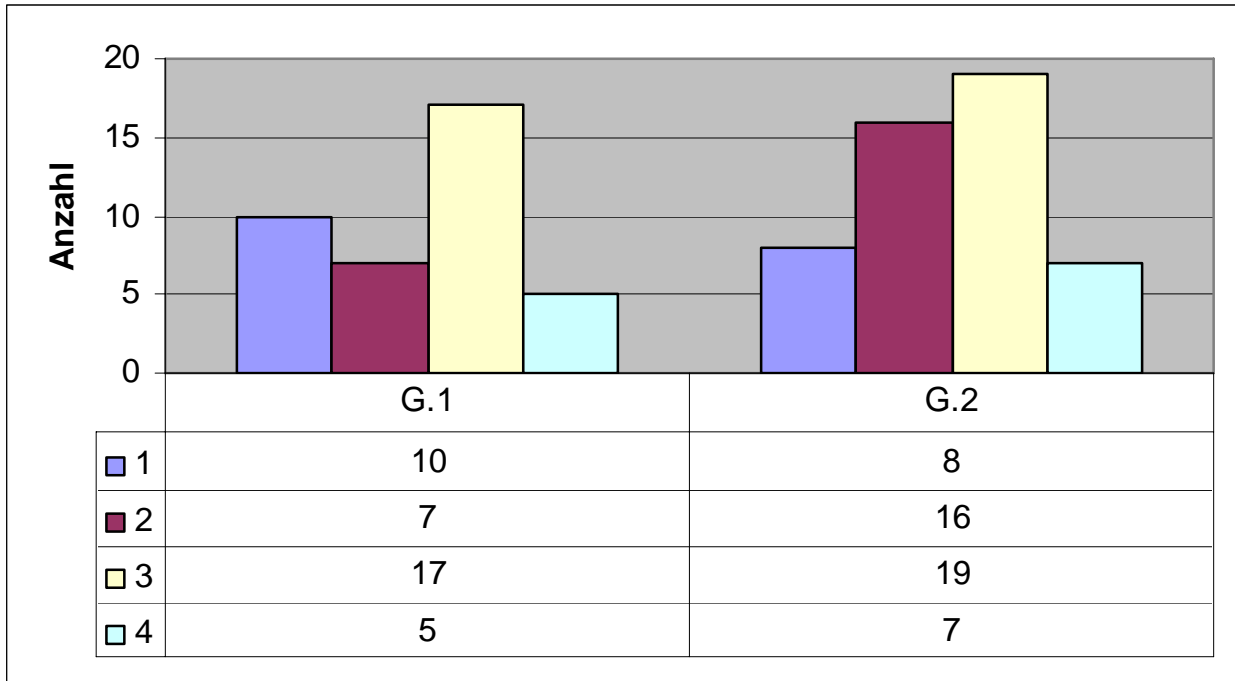
**Grafik 17: Eintretene Schwangerschaften in  
Abhängigkeit von der Zahl transferierter  
Eizellen (EZ)**

#### 4.2.1.2. Unbefruchtete Eizellen

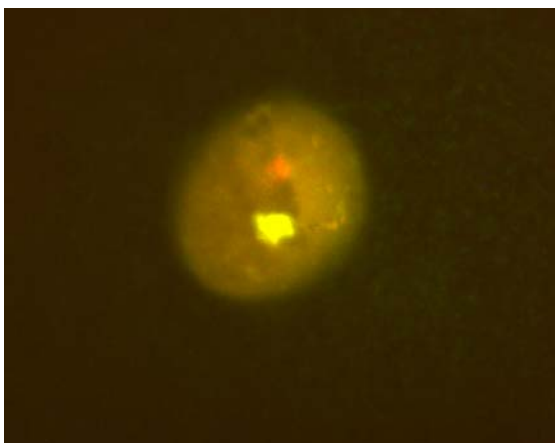
In beiden Gruppen konnten einige Eizellen gefärbt und ausgewertet werden (G.1: n=39; G.2: n=50). Dabei wurden sie nach dem Zustand des Spermienchromatins beurteilt: Gruppe **1** steht für Eizellen, die teilweise dekondensiertes Chromatin enthielten, **2** für Eizellen, die vollständig dekondensiertes Chromatin enthielten, und **3** für solche, deren Chromatin zerstreut, also nicht mehr funktionstüchtig war. In der Gruppe **4** wurden diejenigen Eizellen erfasst, bei denen kein Spermium eingedrungen war.

Danach ergab sich folgende Verteilung: in der G.1 zeigten sich 10 Eizellen mit nur teilweise dekondensiertem Chromatin (**1**), 7 Eizellen wurden der Gruppe **2** zugeteilt, 17 Eizellen der Gruppe **3** und 5 Eizellen der Gruppe **4**.

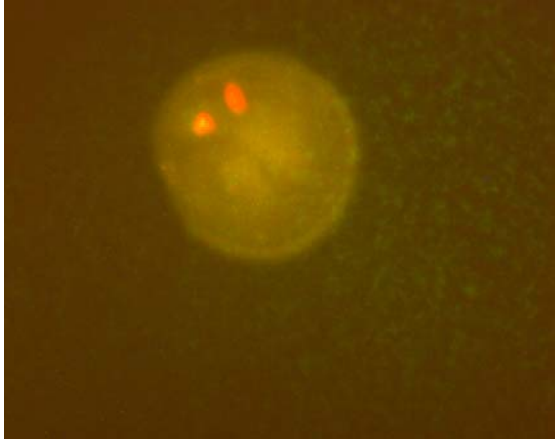
In der G.2 entfielen 8 Eizellen auf die Gruppe 1, 16 Eizellen auf die Gruppe 2, 19 Eizellen auf die Gruppe 3 und 7 auf die Gruppe 4.



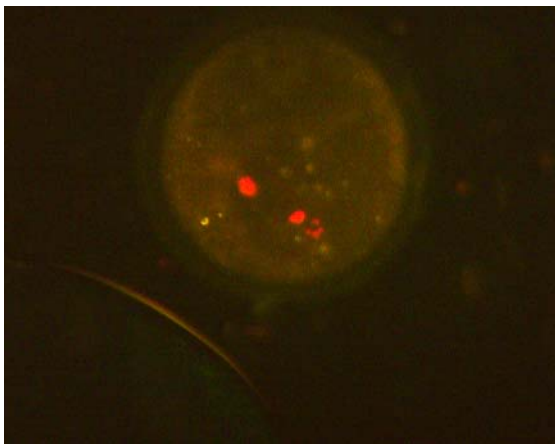
**Grafik 18: Verteilung der nicht befruchteten Eizellen**



**Bild 6: Nur ein Vorkern (1).**



**Bild 7: Zwei Vorkerne (2).**



**Bild 8: Zerstreutes Spermienchromatin (scattered) (3).**

## **4.2.2 FERTILISATION**

### **4.2.2.1. Klassische Samenanalyse und Fertilität**

#### **A: Spermien-Dichte und Fertilität**

Als Maßstab für die Fertilität wurde die Befruchtungsrate, also der Anteil der gewonnenen Eizellen die befruchtet wurden, verwendet.



Betrachtet man die G.1, so gab es keinen Zusammenhang zwischen der Befruchtungsrate und der Dichte, weder vor Aufbereitung der Spermien ( $p=0,78$ ;  $r=0,06$ ) noch danach ( $p=0,23$ ;  $r=0,28$ ).

In der G.2 waren die Verhältnisse vor der Aufbereitung ähnlich ( $p=0,25$ ;  $r=0,23$ ), danach ergaben sich allerdings Abweichungen: Nach der Aufbereitung korrelierten Dichte und Befruchtungsrate ( $p=0,04$ ;  $r=0,44$ ) signifikant miteinander.

### **B: Spermien-Motilität und Fertilität**

Bei den Motilitätsverhältnissen der G.1 zeigte sich vor Aufbereitung kein Zusammenhang mit der Fertilitätsrate ( $p=0,22$ ;  $r=0,25$ ), ebenso wenig nach Aufbereitung ( $p=0,42$ ;  $r=0,19$ ).

Ähnliches gilt für die G.2: auch hier ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen der Motilität vor Aufbereitung und der Befruchtungsrate nachweisen ( $p=0,27$ ;  $r=0,22$ ), lediglich die Motilität nach Aufbereitung korrelierte schwach, aber nicht signifikant mit der Fertilitätsrate ( $p=0,055$ ;  $r=0,42$ ).

### **C: Spermien-Dichte und Gravidität**

In der Gruppe 1 ergab sich kein Anhalt für eine Korrelation zwischen der Dichte und der Zahl eingetretener Schwangerschaften, weder vor der Samenaufbereitung ( $p=0,69$ ;  $r=0,08$ ), noch danach ( $p=0,1$ ;  $r=0,37$ ).

Betrachtet man die eingetretenen Schwangerschaften in der G.2, ergibt sich eine signifikante Korrelation nur vor der Aufbereitung ( $p=0,02$ ;  $r=0,46$ ), aber nicht mehr danach ( $p=0,13$ ;  $r=0,35$ ).

## **D: Spermien-Motilität und Gravidität**

Weder wurde für die globale Motilität vor Aufbereitung in der G.1 und die Zahl eingetretener Schwangerschaften eine signifikante Korrelation gefunden ( $p=0,77$ ;  $r=0,06$ ), noch für die Motilität nach Aufbereitung ( $p=0,43$ ;  $r=0,18$ ).

Bei der Betrachtung der globalen Motilität nach Aufbereitung und der Zahl der Schwangerschaften in der G.2 ( $p=0,04$ ;  $r=0,47$ ) ergab sich eine signifikante Korrelation. Vor Aufbereitung war diese Beziehung nicht nachweisbar ( $p=0,09$ ;  $r=0,35$ ).

### **4.2.3. Chromatin-Kondensation und Fertilität/Gravidität**

#### **4.2.3.1. Acridin-Orange Färbung**

##### **A: Acridin-Orange Färbung und Fertilität**

Zwischen den nativen Spermien der G.1 mit überwiegend kondensiertem Chromatin (grün leuchtend in der Fluoreszenzfärbung) und der Befruchtungsrate zeigte sich eine signifikante Korrelation ( $p=0,04$ ;  $r=-0,42$ ).

Nach 120 min Inkubation zeigten die Spermien mit überwiegend dekondensiertem Chromatin (gelb-orange-rot leuchtend in der Fluoreszenzfärbung) und der Befruchtungsrate keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,31$ ;  $r=-0,21$ ).

In der G.2 ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen den Zustand des Chromatins und der Befruchtungsrate erkennen (Nativ  $p=0,89$ ;  $r=-0,03$ ; 120min  $p=0,5$ ;  $r=-0,15$ ).

## **B: Acridin-Orange Färbung und Gravidität**

Wie schon bei der Fertilitätsrate beobachtet gab es auch zwischen den nativen, kondensierten Spermien beider Gruppen und der Schwangerschaftsrate keine signifikante Korrelation (G.1:  $p=0,52$ ;  $r=-0,21$ ; G.2:  $p=0,9$ ;  $r=-0,15$ ). Auch die dekondensierten Spermien nach 120min Inkubation zeigten keine Korrelation zur Schwangerschaftsrate (G.1:  $p=0,46$ ;  $r=0,15$ ; G.2:  $p=0,64$ ;  $r=0,10$ ).

### **4.2.3.2. Morphometrie**

#### **A: Spermien-Fläche und Fertilität**

Die Fläche der nativen Spermienköpfe zeigte in beiden Gruppen keine signifikante Korrelation zur Befruchtungsrate (G.1:  $p=0,09$ ;  $r=0,34$ ; G.2:  $p=0,87$ ;  $r=0,03$ ).

#### **B: Minimaler Durchmesser der Spermien und Fertilität**

Der minimale Durchmesser der nativen Spermien in der G.1 korrelierte signifikant mit der Befruchtungsrate ( $p=0,048$ ;  $r=0,39$ ).

In der G.2 ergab sich keine Korrelation ( $p=0,37$ ;  $r=0,19$ ). Betrachtete man die Spermien beider Gruppen 120min nach Inkubation mit den dekondensierenden Substanzen, ergab sich für keine der beiden Gruppen eine signifikante Korrelation (G.1:  $p=0,64$ ;  $r=-0,1$ ; G.2:  $p=0,64$ ;  $r=-0,1$ ).

### **C: Maximaler Durchmesser der Spermien und Fertilität**

Die nativen Spermien in der G.1 zeigten zwischen ihrem maximalen Durchmesser und der Befruchtungsrates keine signifikante Korrelation ( $p=0,55$ ;  $r=-0,12$ ). Auch nach 120min Inkubation ergab sich keine Korrelation ( $p=0,26$ ;  $r=-,23$ ).

In der G.2 verhielt es sich ebenso (Nativ:  $p= 0,59$ ;  $r=-0,12$ ; 120min:  $p=0,47$ ;  $r=-0,15$ ).

### **D: Form der Spermien (FCI) und Fertilität**

Die Form der Spermien (FCI) der G.1 zeigten nativ keine Korrelation zur Befruchtungsrates ( $p=0,18$ ;  $r=0,27$ ). Ebenso verhielt es sich nach 120min Inkubation ( $p=0,45$ ;  $r=0,15$ ).

Auch in der G.2 ergaben sich keine Korrelationen (Nativ:  $p=0,27$ ,  $r=0,23$ ; nach 120min:  $p=0,52$ ;  $r=0,14$ ).

### **E: Fläche der Spermien und Gravidität**

Die Fläche der Spermienköpfe in der Nativprobe der G.1 korrelierte nicht mit der Schwangerschaftsrates ( $p=0,51$ ;  $r=0,14$ ). Auch in der G.2 ergab sich keine Korrelation ( $p=0,63$ ;  $r=0,1$ ).

## **F: Minimaler Durchmesser der Spermien und Gravidität**

Der minimale Durchmesser der Spermien der G.1 korrelierte weder im Nativzustand ( $p=0,57$ ) noch nach 120min Inkubation ( $p=0,23$ ) mit der Schwangerschaftsrate.

In der G.2 ergaben sich ebenfalls nativ ( $p=1,0$ ) und nach 120min ( $p=0,65$ ) keinerlei Korrelationen.

## **G: Maximaler Durchmesser der Spermien und Gravidität**

Die nativen Spermien zeigten in beiden Gruppen keine Korrelation zur Graviditätsrate (G.1:  $p=0,77$ ; G.2:  $p=0,26$ ). Auch nach 120min ergab sich kein Zusammenhang (G.1:  $p=0,73$ ; G.2:  $p=0,92$ ).

## **H: Form der Spermien (FCI) und Gravidität**

Zu keinem Betrachtungszeitpunkt konnte in beiden Gruppen eine signifikante Korrelation zwischen der äußeren Form und der Schwangerschaftsrate festgestellt werden (Nativ G.1:  $p=0,98$ ; G.2:  $p=0,36$ ; 120min G.1:  $p=0,17$ ; G.2:  $p=0,2$ ).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Stellenwert der klassischen Samenanalyse und der Aufbereitung von Samenproben**

Anhand der Richtlinien der WHO (1999) zur Samenanalyse erfolgt die klassische Beurteilung der männlichen Fertilität. Mittels dieser rein deskriptiven Beurteilung werden Werte wie die Dichte der Spermatozoen, ihre Anzahl sowie ihre Beweglichkeit erhoben. Dadurch lässt sich eine wichtige Aussage zur Qualität der vorliegenden Probe treffen (BAARTOV et al., 1993). Ebenso werden in der Samenanalyse der pH-Wert, das Volumen, und das Vorhandensein von Granulozyten oder Autoantikörpern untersucht.

Die Anzahl der Spermien erlaubt eine wichtige Aussage über die Fertilität des Patienten sowie über die Auswahl des geeigneten Verfahrens der assistierten Reproduktion. Auch die Motilität muss in solche Überlegungen mit einbezogen werden, da sie einen aussagekräftigen Anhaltspunkt dazu bietet, ob eine Samenprobe zu einer Fertilisation in-vitro fähig ist (DONNELLY et al., 1998).

In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich diese Werte in den beiden Gruppen G.1- der LIS und DTT zugefügt wurde- und G.2 – nach Zugabe von Heparin und SDS- nicht signifikant, sodass man von sehr ähnlichen Einflussgrößen auf die nachfolgend untersuchten Parameter ausgehen kann.

Eine wichtige Voraussetzung für die assistierte Reproduktion ist die Spermienaufbereitung, nicht nur um die beweglichen und morphologisch normalen Spermien heraus zu filtern, sondern auch um das Seminalplasma und andere zelluläre Bestandteile des Ejakulates wie beispielsweise Leukozyten zu

entfernen. Für diese Aufbereitung wurde in der vorliegenden Arbeit die Dichtegradientenzentrifugation (PurSperm) verwendet.

### **5.1.1. Dichte**

Die Abnahme der Dichte durch die Aufbereitung mit der PurSperm Dichtegradientenzentrifugation war signifikant (G.1: von  $65,42 \pm 27,7$  Mio./ml auf  $34,57 \pm 26,19$  Mio./ml; G.2: von  $57,54 \pm 30,95$  Mio./ml auf  $26,41 \pm 23,55$  Mio./ml; jeweils  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 2).

Diese Reduktion der Dichte ist zu erwarten, da ein Teil der Spermien herausselektiert wird.

Auch SANCHEZ et al. (1994) beschrieb eine Abnahme der Dichte nach Percoll- und Glaswoll-Aufbereitung sowie nach Swim-up. Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit dem unterschiedlichen Ausmaß der Dichteverluste bei verschiedenen Ausgangsdichten (mini-Swim-Up: HENKEL et al., 1994; Glaswollfiltration: KATAYAMA et al., 1989). Beim direkten Vergleich der Percoll/PurSperm Methode mit der Swim-up Methode haben einige Autoren eine signifikante Erhöhung des Anteils an morphologisch normal geformten Spermien durch Percoll festgestellt (VAN DER ZWALMEN et al., 1991), während die Swim-up Methode auch zu einer – allerdings nicht signifikanten - Besserung der Morphologie führte (SHALIKA et al., 1995). Beide Autoren berichten einstimmig über eine signifikant höhere Zunahme der Motilität durch Percoll im Vergleich zu Swim -up.

Bei der Bewertung von Dichteverlusten durch die Spermienaufbereitung wurden in vielen dieser Untersuchungen (SANCHEZ et al., 1994; AKERLÖF et al., 1987; BRANDEIS und MANUEL, 1993) - wie auch in der vorliegenden Studie - relativ hohe Standardabweichungen der Dichte nach Aufbereitung beobachtet. Mögliche Ursachen dafür sind die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung

der Dichte oder das Vorhandensein von Fehlformen, die zu einer Veränderung in der Selektivität führen.

### **5.1.2. Motilität**

Ein ebenfalls routinemäßig bestimmter Parameter der klassischen Samenanalyse ist die Motilität. Hier unterscheidet man zwischen globaler Motilität, also jenen Spermien, die keine lineare Beweglichkeit zeigen, und der progressiven Motilität, die solche Spermien erfasst, die sich linear fortbewegen.

In dieser Studie wurde die globale Motilität betrachtet, welche sich durch die Dichtegradientenzentrifugation (PureSperm) signifikant verbesserte (G.1: von  $37,31 \pm 17,45\%$  auf  $69,57 \pm 20,7\%$ ,  $p = 0,009$ ; G.2: von  $37,69 \pm 19,61\%$  auf  $64,05 \pm 16,85\%$ ,  $p = 0,005$ , Tabelle 2).

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Zunahme der Motilität nach Aufbereitung durch Percoll und Swim-up beschreiben auch Arbeiten von BRANDEIS und MANUEL (1993) sowie CHECK et al. (1992).

Im Vergleich zur Swim-up Aufbereitung erzielten AKERLÖF et al. (1987) bessere Ergebnisse bezüglich der Motilität und der Morphologie durch die Percoll-Aufbereitungsmethode, CHEN et al. (1995) berichten über eine höhere Motilität.

VAN DER ZWALMEN et al. (1991) und SHALIKA et al. (1995) berichten einstimmig über eine signifikant höhere Zunahme der Motilität durch Percoll im Vergleich zu Swim -up.

Zu gegenteiligen Ergebnissen kommen ENGLERT et al. (1992). Sie beobachteten besserer Ergebnisse hinsichtlich der Morphologie und der Motilität nach Aufbereitung mittels der Swim-up Methode.



AITKEN und WEST (1990) untersuchten die unterschiedliche Verteilung der beweglichen Spermien in den verschiedenen Percoll-Schichten. Sie konnten zeigen, dass in den Schichten mit größerer Dichte auch der Anteil beweglicher Spermien signifikant höher ist als in Schichten niedriger Dichte.

Zwar belegen alle Studien einen höheren Anteil motiler Spermien nach PureSperm Aufbereitung, jedoch ist eine direkte Vergleichbarkeit selten gegeben. Schon bei der Verwendung der Dichtegradientenzentrifugation zeigen sich deutliche Unterschiede: in der vorliegenden Studie wurde die modifizierte mini-PureSperm Technik eingesetzt, während andere Autoren ein Percoll mit fünf (BERGER et al., 1985) oder mit drei Dichtegradienten (BRANDEIS und MANUEL, 1993) verwendeten.

Außerdem wurden in einigen Studien Selektionen der Patienten durchgeführt, z.B. erfassten HENKEL et al. 1994 nur subfertile Proben, andere dagegen fertile (JOHNSON et al., 1996).

Auch können sich Abweichungen ergeben durch unterschiedliche Kulturmedien (FISCH et al., 1990) oder verschieden hohe Sauerstoffanteile im Inkubator (GRIVEAU et al., 1996).

### **Zusammenfassung der Resultate der klassischen Samenanalyse vor und nach Aufbereitung:**

↳ Die PureSperm-Dichtegradientenzentrifugation führt zu einer signifikanten Abnahme der Dichte der Spermatozoen (G.1 und G.2  $p < 0,001$ ).

↳ Der Anteil an motilen Spermatozoen nimmt durch die PureSperm-Dichtegradientenzentrifugation signifikant zu (G.1:  $p = 0,009$ ; G.2:  $p = 0,005$ ).

## 5.2. Chromatin-Kondensation

Viele Autoren betrachten die Spermienmorphologie als den besten Parameter zur Beurteilung des männlichen Fertilisierungspotentials (ROGERS et al., 1983; YANG et al., 1995; OMBELET et al., 1997), sowie der Fertilisierungs- und Schwangerschaftsrate bei IVF-Therapien (KOBAYASO et al., 1991; GROW et al., 1994; LIM et al., 1998).

Ebenso gilt der Kondensationsgrad des Spermienchromatins als entscheidender Faktor für die Fähigkeit eines Spermiums, eine Eizelle zu befruchten (MANICARDI et al., 1995; BIANCHI et al., 1996; HAIDL, 1996; SAKKAS, 1999), insbesondere seit Einführung der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) (DADOUNE, 1995).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Veränderungen des Chromatins, z.B. anhand eines Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) nachgewiesen, in Korrelation zur Fertilität stehen (EVENSON et al., 1999; LARSON et al., 2000). Nach Ansicht von IBRAHIM et al. (1988) führt abnormales Spermienchromatin zu habituellen Aborten, allgemein kann eine unvollständige Kondensation bzw. Dekondensation zu Fehlern bei der Fertilisation führen (SAKKAS et al., 1998). Andererseits gibt es gesunde Kinder, die durch Injektion einer elongierten, also unreifen Spermide in eine Eizelle gezeugt wurden (TESARIK et al., 1995), sodass eine normale Embryoentwicklung möglich erscheint trotz unvollständiger Kondensation oder Dekondensation des Chromatins (AUGER und DADOUNE, 1993).

Die intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) soll das Risiko bergen, dass aufgrund der ausbleibenden Selektion - die in-vivo oder auch in-vitro (IUI oder IVF) stattfindet - Spermatozoen mit geschädigter DNA injiziert werden. Dies kann dazu führen, dass entweder die Dekondensation nicht abläuft oder

dass die embryonale Entwicklung gestört ist (BIANCHI et al., 1993; SAILER et al., 1995), sodass z.B. höhere kongenitale Fehlbildungsraten resultieren. Jedoch weisen neuere Studien daraufhin, dass es durch Verwendung von ICSI keine erhöhte Rate an peripartalen Malformationen gibt (PALERMO et al., 2000; VAN STEIRTEGHEM, 2001).

### **5.2.1. Acridin-Orange Färbung und Fluoreszenz**

In der Nativprobe der G.1 befanden sich  $96,66 \pm 4,25\%$  Spermien mit kondensiertem Chromatin. Dieser Anteil sank nach der Inkubation mit LIS+DTT für 30min auf  $78,34 \pm 15,23\%$ , nach 60min auf  $65,77 \pm 16,84\%$  und nach 120min Inkubation auf einen Anteil von  $54,56 \pm 17,68\%$  kondensierter Spermien (siehe Tabelle 3). Dies bedeutete einen hochsignifikanten Verlust von Spermien mit kondensiertem Chromatin in der G.1, sowohl zwischen nativen Spermien und nach 120 min Inkubation ( $p=0,001$ ) als auch zwischen den einzelnen Zeitpunkten (Nativ-30min, 30min-60min, 60min-120min: jeweils  $p=0,001$ ).

In der G.2 fanden sich zu Beginn  $96,58 \pm 5,57\%$  Spermien mit kondensiertem Chromatin. Nach 30min Inkubation mit Heparin+SDS fanden sich noch  $74,18 \pm 13,18\%$ , nach 60min  $63,56 \pm 9,57\%$ , und nach 120min Inkubation  $48,63 \pm 10,7\%$  kondensierte Spermien (siehe Tabelle 3). Auch hier waren die Unterschiede bzgl. des Anteils kondensierter Spermien sowohl zwischen den einzelnen Zeitpunkten (Nativ-30min, 30min-60min, 60min-120min) als auch zwischen dem Ausgangswert und dem Wert 120min nach Inkubation hochsignifikant (jeweils  $p=0,001$ ).

Verschiedene Autoren haben Spermien an unterschiedlichen Orten des männlichen Genitalsystems entnommen und mittels der Acridin-Orange Färbung auf ihren Kondensationsgrad hin untersucht. Dabei zeigte sich in einer

Studie von KOSOWER et al. (1992), dass nahezu alle Spermienkerne aus der cauda epididymis, sowie auch ejakuliertes Sperma von Hamstern, Mäusen und Hasen grün fluoreszieren. Menschliches Sperma zeigt dagegen eine etwas größere Variabilität, sodass auch in nativem Ejakulat immer Anteile mit gelber oder roter Fluoreszenz erscheinen (KOSOWER et al., 1992; PEACOCKE, 1973; TEJADA et al., 1973; CALVIN et al., 1972; ISCIMURA et al., 1971).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden: der Anteil grüner Spermien war am größten in der jeweiligen Nativgruppe von G.1 (96,66%) und G.2 (96,58%), dennoch fanden sich auch geringe Prozentsätze anderer Fluoreszenzen: in der G.1 fluoreszierten 2,15% gelb, 1,19% orange, roten Spermien waren nicht vorhanden. In der G.2 fluoreszierten 2,58% gelb, 0,83% orange, rote Fluoreszenz ließ sich auch hier nicht darstellen (siehe Tabell 3).

Die beschriebene größere Variabilität des Dekondensationsgrades von menschlichem Sperma im Nativzustand ist bei infertilen Männern noch stärker ausgeprägt als bei fertilen (KOSOWER et al., 1992; ROYERE et al., 1991; EVENSON et al., 1980; ROUX and DADOUNE, 1989; LE LANNOU et al., 1980). Durch eine unterschiedlich hohe Anzahl an Disulfidbrücken oder Abweichungen bei dem Austausch von Protaminen während der Spermatogenese kann es zu Variationen des Kondensationsgrades innerhalb eines Ejakulates kommen (BARTOOV et al., 1980; ENGH et al., 1992).

### **Zusammenfassung der Resultate der Acridin-Orange Färbung:**

- ↳ Bereits 30 Minuten nach Zugabe der dekodensierenden Substanzen zeigte sich ein signifikanter Zuwachs des Dekondensationsgrades in beiden Gruppen (G.1 und G.2 jeweils  $p=0,001$ ).

↪ Dieser signifikante Unterschied setzte sich zwischen allen untersuchten Zeitpunkten fort, sowohl in Gruppe 1 ( $p=0,001$ ) als auch in Gruppe 2 ( $p=0,001$ ).

### **5.2.2. Morphometrie und Papanicolaou-Färbung**

Die ersten jemals durchgeführten morphometrischen Analysen von Spermien wurden im Rahmen der Züchtung von Nutztieren durchgeführt (CARY, 1913; WILLIAMS, 1920; WILLIAMS, 1923). Dabei kam man zu dem Schluss, dass die Chancen auf eine Befruchtung umso größer wären, je einheitlicher die Formen der Spermien innerhalb einer Probe seien (WILLIAMS und SAVAGE, 1925). MOENCH (1927) übertrug die Grundzüge dieser Ergebnisse auf den Menschen, und fand heraus, dass menschliche Spermien per se weniger einheitliche Formen aufweisen als tierische, dass aber auch hier der Grundsatz gelte, dass in Proben fertiler Männer eine größere Einheitlichkeit der Spermien zu finden sei als bei infertilen.

Einige Jahre später projizierten MOENCH und HOLT (1932) Bilder von Spermien auf einen Bildschirm und maßen die longitudinale Achse ihrer Köpfe aus. Im Rahmen dieser Studie konnten sie ihre Ergebnisse erneut bestätigen: die Ergebnisse der morphometrischen Analyse von Samenproben fertiler Spender lagen innerhalb der Normalverteilung. Die Autoren veröffentlichten Zahlen, wie groß maximal die Variabilität der Daten sein sollte, um von einer normalen Befruchtungsfähigkeit ausgehen zu können. Solch ein Wert war bereits von WILLIAMS (1925) für Bullensperma errechnet worden, und fiel erwartungsgemäß abweichend zu dem von humanem Sperma aus. Diesen Unterschied versuchten MOENCH und HOLT (1932) damit zu erklären, dass Menschen häufigeren Geschlechtsverkehr haben als Tiere.

Ein Artikel aus dem Jahr 2003 (RODRIGUES GOULART et al., 2003) befasste sich mit verschiedenen Methoden zur morphologischen Erfassung von Spermienköpfen. Dabei wurde die Exaktheit der Methoden verglichen. Als am wenigsten korrekt wurden die manuelle und die voll-automatische Methode, bei der ein Computer sowohl die Erfassung als auch die Auswertung vornimmt, beurteilt. Nach Ansicht der Autoren ist es für eine korrekte Auswertung unerlässlich, dass die Möglichkeit zur Intervention durch den Auswerter gegeben ist, vor allem bei der Objekterkennung. So wurde als die verlässlichste Methode die semi-automatische Messung empfohlen, die auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand.

AZIZ et al. (1999) suchten in der Literatur nach Autoren, die morphometrische Untersuchungen an lebenden Spermien durchführten. Diese (AZIZ et al. 1998a; AZIZ et al.; 1998b; IRVINE et al., 1994; KATZ et al., 1986; MACLEOD and IRVINE, 1995; SOFIKITIS et al., 1994; YAMAMOTO et al., 1997) waren der Meinung dass die alleinige Betrachtung der Morphometrie nur wenig Rückschluss auf die Fertilität zulasse, wohl aber, dass gute Ergebnisse bei künstlicher Befruchtung eintreten, wenn die Größe der Spermienköpfe in einer Probe möglichst einheitlich ist. Betrachtet man die morphometrischen Daten im Zusammenhang mit der Dichte und Motilität, so wird die Beurteilung der Fertilität verbessert.

AZIZ et al. (1999) benutzten eine Hamilton-Thorn Analyzer und ermittelten eine durchschnittliche Fläche der Spermienköpfe von  $17,8\mu\text{m}^2$  (Median).

Mit derselben Technik kamen IRVINE et al. (1994) zu dem Ergebnis, dass ein durchschnittlicher Spermienkopf ein Fläche von  $26,8\mu\text{m}^2$  (Median) erreicht.

CUI (1997) benutzte einen Laser zum einscannen der Spermien und ein System aus Computer und Mikroskop, wobei er unterschied zwischen Spermien die eine X-Chromosom enthielten und eine durchschnittliche Fläche von  $14,74\pm 2,09\mu\text{m}^2$

besaßen, und Y-Chomosom tragenden Spermien mit einer Fläche im Schnitt von  $13,93 \pm 1,79 \mu\text{m}^2$ .

Bei KATZ et al. (1986) ergaben sich für die Fläche mittels Phasenkontrast-Optik Werte von  $13,73 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$  (Median).

Auch GERGELEY et al. (1999) führten Messungen der verschiedenen Teile von Spermatozoen durch, dabei fanden sie Werte für die Fläche des Kopfes zwischen  $11,1 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$  und  $11,5 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$ .

Der Mittelwert der Fläche der in dieser Studie gemessenen nativen Spermienköpfe betrug  $9,45 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$  in der G.1 und  $9,03 \pm 1,15 \mu\text{m}^2$  in der G.2 (siehe Tabelle 4). Somit wurden in dieser Studie geringere Werte für die Fläche von Spermien erhoben als in anderen, bisher sich damit befassenden Studien.

Die unterschiedlichen Ergebnisse werden von AZIZ et al. (1999) mit verschiedenen Mess- und Ausarbeitungsmethoden sowie unterschiedlichen Beleuchtungsstärken erklärt.

Darüber hinaus analysierte GERGELEY (et al., 1999) die unterschiedliche Morphometrie reifer und unreifer Spermien. Grundlage der Bestimmung der Reife war neben biochemischen Markern wie der Spermien Kreatin-Kinase auch die Tatsache, dass im Rahmen der Reifung der Spermatozoen bei Durchwanderung des ductus epididimys auch ein Großteil des Cytoplasmas abgestoßen wird, und dass der Spermischwanz dabei weiter an Größe zunimmt. Es wurden die Dimensionen des Spermischwanzes gemessen, außerdem die Fläche und Durchmesser von Kopf und Mittelstück. Dabei fanden sie heraus, dass es bezüglich des Schwanzes und des Mittelstücks signifikante Unterschiede zwischen reifen und unreifen Spermatozoen gab, während die Dimensionen des Spermienkopfes ähnlich waren und keinen Bezug zur Reife erkennen ließen.

Auch HUSZAR et al. beschrieben 1994 die Unfähigkeit unreifer Spermatozoen mit zurückgebliebenem Cytoplasma an die zona pellucida zu binden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass im Rahmen der Kondensation endogene mit exogenen Veränderungen einhergehen: es wird nicht nur Cytoplasma abgestoßen, sondern auch die Plasmamembran verändert sich, so dass die Bindung an die zona pellucida möglich wird.

Die hier benutzte computergestützte Auswertung der Spermien erfolgte an nicht-vitalen Spermien. Abnorme Spermien sind nach (FREDRICKSON et al., 1977; TYLER and CROCKETT, 1982) häufiger in der Population toter Zellen anzutreffen. Außerdem wurde einer anderen Studie dargelegt, dass es keine Korrelation gibt zwischen den Kernformen toter und vitaler Spermien (OSTERMEIER and PARRISH, 1997). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Ergebnisse der Auswertung so wenig mit den Ergebnissen der Fertilisation korrelieren.

OSTERMEIER et al. postulierten 2000 dass eine Probe vitaler Spermien mit relativ einheitlicher Kernform einen höheren Prozentsatz an Spermien mit akzeptablem DNA-Gehalt, Chromatin-Konformation und nuklearer Matrix aufweist.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse der Morphometrie:**

↳ Die in dieser Studie verwendete semi-automatische Erfassung von Spermien wurde in einer kürzlich erschienen Arbeit von RODRIGUES GOULART (2003) als die verlässlichste Methode zur Auswertung von Spermienköpfen beurteilt.



- ↳ Die ermittelten Werte für die Fläche des Kopfes nativer Spermien sind in der vorliegenden Arbeit niedriger als die anderer Autoren (KATZ, GERGELEY; CUI; etc.). Da aber auch die von ihnen beschriebenen Werte nicht einheitlich sind, kann man sie nicht als Standard heranziehen, sondern muss die verschiedenen Einflussgrößen wie Messmethodik, Beleuchtungsstärke usw. bei der Bewertung mit einbeziehen.
- ↳ GERGELEY et al. (1999) vertreten die Ansicht, dass die morphometrische Analyse des Mittelstücks und des Schwanzes der Spermien den Reifezustand des Chromatins widerspiegeln, der Kopf hingegen nicht.

### **5.3. Fertilität**

Da sich für die beiden Gruppen G.1 und G.2 weder bei den Ergebnissen der klassischen Samenanalyse vor/nach Aufbereitung kein deutlicher Unterschied ergab, kann man davon ausgehen, dass sich hierdurch keine störenden Einflüsse zur Beurteilung der Fertilität ergeben.

In der G.1 (n=26) wurden im Schnitt 9,65 Eizellen entnommen, wovon 4,73 befruchtet wurden. Das entspricht einer Fertilisationsrate von 43,72%. Von den befruchteten Eizellen wurden durchschnittlich 1,85 transferiert. Diese transferierten Eizellen führten in 35% der Fälle zu einer Schwangerschaft (Tabelle 5).

In der G.2 (n=26) wurden 6,62 Eizellen entnommen, davon 4,08 befruchtet. Die Befruchtungsrate betrug demnach 45,41%. Im Schnitt wurden dann 1,69 Embryonen transferiert, was in 20% der Fälle zu einer Schwangerschaft führte (Tabelle 5).

Durch das deutsche Embryonenschutzgesetz (1991) ist die Anzahl befruchteter Eizellen, die nach einer assistierten Reproduktion der Patientin transferiert werden dürfen, auf drei beschränkt. Betrachtet man sich die Anzahl eingetretener Schwangerschaften getrennt nach Zahl der transferierten Eizellen (0-3), so zeigt sich dass sowohl in der G.1 als auch G.2 die Schwangerschaftsrate am höchsten ausfiel, wenn zuvor 2 Eizellen transferiert wurden. In der G.1 wurden so 66,7% der Frauen schwanger, in der G.2 waren es 60,0% (Tabelle 5).

Wurde hingegen nur ein Embryo übertragen, so wurden in der G.1 11,1% der Frauen schwanger, in der G.2 20,0%. Die Schwangerschaftsrate nach Transfer von drei Embryonen betrug 22,2% in der G.1 und 20,0% in der G.2 (Tabelle 5).

Betrachtet man sich diese Zahlen im Vergleich mit den Ergebnissen des deutschen IVF-Registers (Quelle: Jahresbericht 2003), so sind die Schwangerschaftsraten im Schnitt gleich mit ca. 28% (Durchschnitt G.1 und G.2 zusammen 27,5%). Unterschiede gab es dagegen bei der Fertilisationsrate: betrug sie im Schnitt 50,38% laut des Registers, so wurden im Rahmen dieser Studie etwas geringere Werte erzielt mit 44,57% (G.1 und G.2 insgesamt).

Auch in der Anzahl transferierter Embryonen ergaben sich Abweichungen: die Daten des Registers zeigen, dass im Durchschnitt 2,17 Embryonen pro IVF-Versuch übertragen wurden. Den Teilnehmern dieser Studie wurden im Schnitt 1,77 Embryonen transferiert (Tabelle 5).

Außerdem zeigten sich Unterschiede bezüglich der Schwangerschaftsraten in Hinblick auf die Zahl der zuvor transferierten Embryonen (hier wurden die Zahlen für Frauen unter und über 35 zusammengefasst): wurde nur ein Embryo transferiert, wurden im Schnitt in dieser Studie 15,55% der Frauen schwanger, laut den IVF-Register-Zahlen waren es 13,03%. Bei Übertragung zweier

Embryonen wurden ihnen zufolge 29,14% der Frauen schwanger, dagegen stehen 63,35% Schwangere in dieser Studie. 20,1% wurden schwanger nach Transfer von drei Embryonen, wohingegen laut des Registers im Schnitt 29,08% schwanger wurden.

### **5.3.1. Fertilität und klassische Samenanalyse**

#### **5.3.1.1. Einfluss der Dichte**

In der vorliegenden Studie zeigte sich für die Spermien der G.1 weder vor noch nach Aufbereitung eine Korrelation zur Befruchtungs- oder Schwangerschaftsrate.

Dahingegen ergab sich in der G.2 eine signifikante Korrelation der Dichte nach Aufbereitung mit der Befruchtungsrate ( $p=0,04$ ;  $r=0,44$ ). Die Dichte vor Aufbereitung korrelierte nicht damit ( $p=0,25$ ;  $r=0,23$ ). Betrachtet man die eingetretenen Schwangerschaften, so ergab sich eine signifikante Korrelation zur Dichte vorher ( $p=0,02$ ;  $r=0,46$ ), nicht zur Dichte nach Aufbereitung ( $p=0,13$ ;  $r=0,35$ ).

ENGINSU et al. (1991) beschrieben in einer Studie keinerlei Korrelation zwischen Dichte oder Motilität und der Fertilisationsrate, widerlegten ihre Ergebnisse aber in einer darauf folgenden Studie (1996) selbst, indem sie eine leichte Korrelation dieser Parameter feststellten.

Mehrere Autoren haben ebenfalls widersprüchliches beschrieben: während bei BENOFF et al. (1999) zwar die Fertilität mit der Motilität korreliert, aber nicht mit der Dichte; gelangten BILJAN et al. (1994) und ENGINSU et al. (1992) zu dem Ergebnis, dass Fertilität und Dichte, aber nicht Fertilität und Motilität korrelieren.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie haben HAMMADEH et al. (1997) gezeigt, dass die Dichte im aufbereiteten und im nativen Ejakulat (Aufbereitung mit Percoll/PurSperm-Dichtegradientenzentrifugation) einen wichtigen prädiktiven Parameter für die Fertilisation und das Auftreten einer Schwangerschaft im Rahmen einer IVF-Behandlung darstellt.

Zu gleichen Ergebnissen gelangten auch VAN UEM et al. (1985), HORVATH et al. (1989) sowie FISCH et al. (1990), die eine direkte Korrelation zwischen der Dichte des aufbereiteten Ejakulats (Swim-up) mit der Fertilisationsrate bestätigten.

Bei der Untersuchung der IVF Ergebnisse bei Patienten mit Oligozoospermie beobachteten MATSON et al. (1989) eine signifikant niedrigere Fertilisationsrate (41%) als bei solchen mit Normozoospermie (62%).

THANKI et al. (1992) haben gezeigt, dass die Fertilisations- und Schwangerschaftsraten deutlich niedriger ausfallen, wenn die Konzentration der verwendeten motilen Spermien unter 3Mio./ml lag.

Der Versuch, die Fertilität mit Parametern der klassischen Samenanalyse zu korrelieren, erbrachte in einer Studie von MOLINA et al. (2001) nur sehr niedrige Werte ( $p=0,5$ ). Dies legt nahe, dass beide Werte voneinander unabhängige physiologische Prozesse der Spermio-genese reflektieren, sodass eine starke Korrelation nicht zu erwarten wäre.

### **5.3.1.2. Einfluss der Motilität**

Die Motilität der Spermien der G.2 korrelierte nach Aufbereitung zwar schwach mit der Fertilitätsrate, aber nicht signifikant ( $p=0,055$ ;  $r=0,42$ ).

Die Anzahl der Schwangerschaften korrelierte signifikant mit der Motilität der G.2 nach Aufbereitung ( $p=0,04$ ;  $r=0,47$ ), nicht mit der vor Aufbereitung ( $p=0,09$ ;  $r=0,35$ ).

In einer Studie von DONNELLY et al. (1998) wurde die Beziehung zwischen Spermienmorphologie und –beweglichkeit sowie von Ergebnissen einer in-vitro Fertilisation untersucht. Sie fanden für beide Parameter der Samenanalyse signifikante Korrelationen sowohl für die Befruchtung als auch für Schwangerschaftsraten. Allerdings war hier der zugrunde liegende Wert die progressive Motilität, nicht die globale wie in der vorliegenden Studie.

Einige Autoren führten die Bewertung der Motilität computerassiiert durch. Sie berichten über einen signifikanten Einfluss der Motilität auf die Fertilitätsraten (IRVINE et al., 1994; LARSEN et al., 2000; GARRETT et al., 2003).

ZAINI et al. (1985) beurteilten die Motilität als wichtigen prognostischen Faktor für IVF Ergebnisse, wenn die Spermien von Männern mit Oligozoospermie stammten. Wurde dagegen die Gesamtpopulation untersucht, so stellte sich kein aussagekräftiger Zusammenhang heraus.

Im Gegensatz dazu fanden POLANSKY und LAMB (1988) sowie BONDE et al. (1998) keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Motilität und Fertilität bei subfertilen Patienten.

Nach (AITKEN et al., 1988) ist die Messung der Dichte und der Motilität sinnvoll, da auch bei der in-vitro Fertilisation noch die Penetration der Eizelle durch ein motiles Spermium erfolgen muss. Andererseits muss durch das extrakorporale Zusammenbringen von Eizelle und Spermium das Spermium nicht mehr den weiblichen Genitaltrakt passieren. So könnte man sich vorstellen, einige wenige, motile Spermien müssten ausreichen, um in einem IVF-Versuch eine Befruchtung herbei zu führen.

In verschiedenen Studien wurden Mindestwerte –sog. Cut-off Punkte - für Dichte und Motilität ermittelt, die Ejakulate erfüllen müssten um zu einer erfolgreichen Fertilisation zu führen.

Bei FISCH et al. (1990) nahm ab einer Dichte der Samenprobe unter 20Mio/ml und einer Motilität unter 80% die Fertilität deutlich ab, während sie bei ENGINSU und EVERS (1996) bei gleicher Dichte bei einer Motilität von 30% sprunghaft abnahm. HAMMADEH et al. (1997) verzeichneten ab einer Dichte von 20Mio/ml eine signifikante Zunahme der Fertilität und auch der Schwangerschaftsrate.

In dieser Studie konnte bei relativ niedriger Fallzahl und gleichmäßiger Verteilung der Werte für Dichte und Motilität kein solcher Cut-off Punkt erarbeitet werden.

### **Zusammenfassung der Beziehung zwischen Fertilität und klassischer Samenanalyse:**

↪ Zwischen der Dichte nach Aufbereitung und der Fertilitätsrate zeigte sich eine signifikante Korrelation nur in der G.2 ( $p=0,04$ ;  $r=0,44$ ).

↪ Zwischen der Motilität und der Fertilitätsrate der G.2 wurde nur eine schwache Korrelation beobachtet, die nicht signifikant war ( $p=0,055$ ;  $r=0,42$ ).

### **5.3.2. Fertilität und Chromatin-Kondensation**

Neben Parametern wie Dichte, Motilität oder anderen Werten der klassischen Samenanalyse wird die Chromatin-Kondensation als Einflussfaktor für die Fertilität diskutiert (HAMMADEH et al., 1996; JOHANISSON und ELIASSON, 1981; LE LANNOU und BLANCHARD, 1988; SUKCHAROEN, 1995). EVENSON et al. (1999) konnten zeigen, dass in Ejakulaten infertiler

Patienten nach Acridin-Orange Färbung weniger gut kondensierte Spermien enthalten waren als in solchen fertiler, was auch das Ergebnis einer Arbeit von HOFMAN et al. (1990) – allerdings nach Anilin Blau Färbung - bekräftigt.

### **5.3.2.a Fertilität und Acridin-Orange Färbung**

In dieser Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Fertilisationsrate und der Anzahl an Spermien mit kondensiertem Chromatin (grün fluoreszierend) in der Nativprobe der G.1 (LIS+DTT) ( $p=0,04$ ;  $r=-0,42$ ). In der G.2 (Heparin+SDS) hingegen konnte keine Korrelation zwischen Chromatinkondensation und Fertilitätsrate festgestellt werden ( $p=0,9$ ;  $r=-0,03$ ). Nach Zugabe der dekondensierenden Substanzen der G.1 und G.2 ergaben sich für beide Gruppen zu jedem Untersuchungszeitpunkt (30, 60 und 120 Minuten nach Zugabe der Substanzen) keine Korrelationen mehr zwischen Chromatinkondensation und Fertilität.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der G.1 fanden auch HAIDL und SCHILL (1994) eine signifikante Korrelationsrate zwischen normaler Kondensation (Anilin Blau Färbung) und der Fertilisationsrate im IVF-Programm.

Ebenso zeigten HAMMADEH et al. (1998 und 2001) dass der Grad der Chromatinkondensation ein wichtiger prädiktiver Faktor für den Erfolg einer IVF-Behandlung ist.

BAKER und LIU (1996) fanden dagegen bei ihren Untersuchungen eine Korrelation der Chromatin-Kondensation zur Fertilisationsrate nach Färbungen mit Anilin Blau und Acridin-Orange.

KATAYOSE et al. (2003) untersuchten den Zusammenhang zwischen Chromatin-Kondensation und der Fertilisationsrate nach IVF, wobei der Grad der Kondensation sowohl mittels Acridin-Orange, als auch mittels Diamid-Acridin-Orange bestimmt wurde. Diamid ist in der Lage, Thiol-Gruppen von

nuklearen Protaminen zu oxidieren. Sie fanden eine positive Korrelation zwischen der Fertilisationsrate und der Diamid- Acridin-Orange Färbung. Im Gegensatz dazu ergab sich keine Korrelation zur Fertilität wenn das Chromatin derselben Probanden mit Acridin-Orange gefärbt wurde.

EGGERT-KRUSE et al. (1996b) fanden keinen Zusammenhang zwischen Acridin-Orange Färbung und der Chromatinkondensation, sodass sie diesen Test als klinisch irrelevant beurteilten.

Ebenso verhielt es sich bei ANGELOPOULOS et al. (1998): auch sie sahen keine Korrelation zwischen dem Anteil kondensierter Spermien und der Schwangerschafts- oder Fertilisationsrate. Da sie sowohl bei Normospermie als auch bei Oligospermie keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl kondensierter Spermatozoen finden konnten, zweifeln sie den Zusammenhang zwischen Chromatin –Kondensation und Fertilität an.

Nach Kombination von normaler Morphologie und Chromomycin-Färbung konnten auch BIANCHI et al. (1996) keine Korrelation zwischen Chromatin-Kondensation und Fertilisations- oder Schwangerschaftsrate feststellen.

### **Zusammenfassung der Beziehung zwischen Fertilität und Acridin-Orange Färbung:**

↪ Die Anzahl an Spermien mit kondensiertem Chromatin in der Nativprobe der G.1 zeigte eine signifikante Korrelation ( $p=0,04$ ;  $r=0,42$ ) zur Befruchtungsrate. Im Gegensatz dazu ergab sich in der G.2 keine signifikante Korrelation ( $p=0,89$ ;  $r=-0,03$ ).

↪ Nach 120 Minuten Inkubation der Spermien mit LIS+DTT in der G.1 oder mit Heparin+SDS in der G.2 zeigten sich keine



Korrelationen zwischen Dekondensationsgrad der Spermien und der Fertilität.

### **5.3.2.b Fertilität und Morphometrie**

Mehrere Autoren sind der Ansicht, dass die endgültige Gestalt der Spermien von der Chromatinkondensation während der Spermiogenese abhängig ist (FAWCETT et al., 1971; MEISTRICH et al., 1976), dass also das Chromatin den Spermienkopf modelliert. Die organisierte und kondensierte Chromatinstruktur würde nach diesen Autoren durch die äußere Form bzw. Größe des Spermienkopfes reflektiert, sodass Änderungen der Form auch nahe legen würden, dass sich die Chromatinstruktur verändert hat.

Zu den morphometrischen Parametern, die über die ibas-Messung erfasst wurden, gehörte die Fläche der Spermienköpfe. Beträgt diese bei den nativen Spermien noch im Schnitt  $9,45\mu\text{m}^2$ , so steigt sie durch die Inkubation mit den dekondensierenden Substanzen kontinuierlich bis auf  $15,35\mu\text{m}^2$  an (G.1, 120min nach Inkubation). Die korrespondierenden Zahlen in der G.2 waren  $9,02\mu\text{m}^2$  bei den nativen und  $11,46\mu\text{m}^2$  bei den Spermien nach 120min Inkubation.

Eine signifikante Korrelation der Fläche der nativen Spermienköpfe zur Fertilitätsrate (G.1:  $p=0,09$ ;  $r=0,34$ ; G.2:  $p=0,87$ ;  $r=0,03$ ) oder zur Anzahl eingetretener Schwangerschaften (G.1:  $p=0,51$ ; G.2:  $p=0,63$ ) konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden.

Für die folgenden durch die semi-automatische Methode erfassten Werte verhält es sich ähnlich: eine signifikante Korrelationen zwischen dem maximalen Durchmesser der Spermienköpfe und der Fertilitätsrate konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, sowohl in der Nativprobe als auch nach 120 Minuten

Inkubation mit dekondensierenden Substanzen (Nativ: G.1:  $p=0,55$ ;  $r=-0,12$ ; G.2:  $p=0,59$ ;  $r=-0,12$ . Nach 120 Minuten: G.1:  $p=0,26$ ;  $r=-,023$ ; G.2:  $p=0,47$ ;  $r=-,015$ ). Ebenso wenig korrelierte der maximale Durchmesser der Spermienköpfe mit der Anzahl eingetretener Schwangerschaften, sowohl in der Nativprobe als auch nach 120 Minuten Inkubation (G.1:  $p=0,77$ ;  $r=-0,3$ ; G.2:  $p=0,26$ ;  $r=-1,14$ . Nach 120 Minuten: G.1:  $p=0,73$ ;  $r=-0,35$ ; G.2:  $p=0,92$ ;  $r=-0,11$ ).

Die äußere Form (FCI) der nativen Spermien zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang mit der Befruchtungsrate (G.1:  $p=0,18$ ;  $r=0,27$ ; G.2:  $p=0,27$ ;  $r=0,23$ ) oder der Schwangerschaftsrate (G.1:  $p=0,98$ ,  $r=-0,03$ ; G.2:  $p=0,36$ ;  $r=-0,93$ ). Auch nach 120min Inkubation mit den dekondensierenden Substanzen ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zur Befruchtungsrate (G.1:  $p=0,45$ ;  $r=0,15$ ; G.2:  $p=0,52$ ;  $r=0,14$ ) oder Schwangerschaftsrate (G.1:  $p=0,17$ ;  $r=-1,38$ ; G.2:  $p=0,2$ ;  $r=-1,28$ ).

Darüber hinaus zeigte sich keine Korrelation zwischen der Graviditätsrate und dem minimalen Durchmesser der nativen Spermien (G.1:  $p=0,57$ ;  $r=-0,57$ ; G.2:  $p=1,0$ ;  $r=0,00$ ). Nach 120min Inkubation ergaben sich ebenfalls keine Korrelationen zwischen dem minimalen Durchmesser und der Fertilitätsrate (G.1:  $p=0,64$ ;  $r=-0,1$ ; G.2:  $p=0,64$ ;  $r=-0,1$ ) oder der Schwangerschaftsrate (G.1:  $p=0,23$ ;  $r=-1,21$ ; G.2:  $p=0,64$ ;  $r=-0,46$ ).

Bei der Betrachtung des minimalen Durchmessers der nativen Spermienköpfe in der G.1 zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation ( $p=0,048$ ;  $r=0,39$ ) zur Fertilitätsrate, in der G.2 nicht ( $p=0,37$ ;  $r=0,19$ ).

## **Zusammenfassung der Ergebnisse der Fertilität und Morphometrie:**

- ↳ In der G.1 zeigte sich zwischen dem minimalen Durchmesser der nativen Spermienköpfe und der Fertilitätsrate eine signifikante Korrelation ( $p=0,048$ ;  $r=0,39$ ), die Ergebnisse der G.2 korrelierten hingegen nicht mit der Fertilitätsrate.
  
- ↳ Alle anderen mittels Ibas erhobenen Parameter (Fläche, maximaler Durchmesser, FCI) korrelierten weder in der Nativprobe noch 120min nach Inkubation mit den dekodensierenden Substanzen der G.1 und G.2 mit der Fertilitätsrate oder der Anzahl der Schwangerschaften.

### **5.4. Unbefruchtete Eizellen**

In beiden Gruppen konnten einige unbefruchtete Eizellen weiter gefärbt und ausgewertet werden (G.1:  $n=12$ ; G.2:  $n=8$ ). Dabei wurden sie einer der Gruppen 1-4 zugeordnet: in der Gruppe 1 sind die Eizellen eingeordnet die teilweise dekodensiertes Chromatin enthielten, in der Gruppe 2 die Eizellen, die vollständig dekodensiertes Chromatin enthielten, und in der Gruppe 3 die Eizellen, deren Chromatin zerstreut, also nicht mehr funktionstüchtig war. In der Gruppe 4 wurden diejenigen Fälle erfasst, bei denen kein Spermium innerhalb der Eizellen zu erkennen war.

In beiden Gruppen überwiegen die Eizellen, die dekondensiertes Spermienchromatin enthalten (G.1 40,43%, G.2 42,86%). In der G.1 ist die zweithäufigste Gruppe diejenige mit teilweise dekondensiertem Spermienchromatin (34,04%), gefolgt von Eizellen mit zerstreutem Spermienchromatin (14,89%) und in 10,64% der Eizellen war kein Spermium eingedrungen (siehe Grafik 18).

In der G.2 ist die zweithäufigste Gruppe diejenige mit zerstreutem Chromatin (30,95 %), in 19,05% der Eizellen ließ sich kein Spermienchromatin nachweisen und bei 7,14% der Eizellen war es nachweisbar aber nur teilweise dekondensiert (siehe Grafik 18).

Zusammenfassend wurden 89,36% der Eizellen der G.1 zwar penetriert, aber nicht befruchtet, während es in der G.2 80,95% waren.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Untersuchungen von SELVA et al. (1993), die bei 76% der Eizellen, die penetriert wurden, sich aber nicht bis zum Vorkernstadium weiter entwickelten, Spermien-Nuclei fanden.

SAKKAS et al. (1996) beobachteten einen ähnlichen Anteil von 84,3% penetrierter, aber unfertilisierter Oocyten.

Über abweichende Ergebnisse berichteten VAN BLERKOM et al. (1994) mit 22% penetrierten Eizellen, die als nicht befruchtet beurteilt wurden.

Kommt es nach Penetration der Eizelle nicht zur Dekondensatioin des Spermienchromatins, so ist von einem intrinsischen Spermiendefekt auszugehen.

Nach TESARIK (1998) könnten solche Defekte zu einer vorzeitigen Inaktivierung des „Maturation Promoting factor“ (MPF) in der Eizelle führen. Andererseits wurde aber auch über erfolgreiche Befruchtungen mit solch unreifen Spermien berichtet (TESARIK, 1996).

Schlechte Erfolgsraten nach ICSI werden eher auf einen Mangel an Faktoren der Eizellaktivierung (MPF, SAOF, Oszillin) (TESARIK, 1998; KÜPKER et al., 1998) zurückgeführt als auf die Verwendung unreifer Spermien (BOURGAIN et al., 1998). Dies ist bei ICSI zum Teil darauf zurück zu führen, dass die das Spermium umhüllende Membran die gegenseitige Aktivierung des männlichen und weiblichen Chromatins behindert. Bei der in-vitro Fertilisation (IVF) bleibt dagegen diese Membran in der Oocytenmembran zurück, sodass der Dialog zwischen Eizelle und Spermium z.B. über zytoplasmatische Faktoren wie der SAOF direkt beginnen kann (SCHILL et al., 1998). Doch das Vorhandensein solcher Eizellfaktoren ist an ein Zeitfenster gebunden, wie an Mäusen demonstriert wurde: für 1,5-2,5 Stunden sind die Faktoren verfügbar, danach injizierte Spermien bilden keinen Vorkern mehr aus (MALESZEWSKI, 1992).

Die Reife des Spermiums, vor allem der Gehalt an Disulfidbrücken im Nucleus, steht in direkter Beziehung zu seiner Fähigkeit zur Dekondensation des Chromatins und zur Vorkernbildung (PERREAULT et al., 1987). Bei der Passage der Spermien im Ductus epididymis kann es zu einer Vermehrung der Disulfidbrücken kommen, was ebenso wie Brüche der Chromosomen zu einer insuffizienten Dekondensation des Spermienchromatins innerhalb der Oozyte führen kann.

Anhand der vorliegenden Daten kann die Chromatinkondensation mit den in der vorliegenden Arbeit benutzten Methoden (Substanzen zur in-vitro Dekondensation, Färbemethoden, Auswertung) nicht zur Beurteilung der Erfolgsaussichten einer IVF-Therapie herangezogen werden.

Eine Steigerung der Erfolgsraten einer IVF-Therapie könnten in Zukunft durch geeignete Verfahren erreicht werden, z.B. durch eine Selektion der Embryonen und der Auswahl und Übertragung des qualitativ hochwertigsten Embryo (single embryo transfer). Diese Maßnahme würde auch zu einer Senkung der Inzidenz für risikoreiche Mehrlinsschwangerschaften führen.

Allerdings müssten dafür einige Änderungen im deutschen Embryonenschutzgesetz vorgenommen werden.

Ob sich mit der morphometrischen Analyse von Spermien der Erfolg der assistierten Reproduktion abschätzen lässt, sollte Schwerpunkt weiterer Studien sein.

In Kombination mit dem herkömmlichen Spermogramm lässt sich aber sicherlich eine umfassendere Aussage zur vorliegenden Samenprobe treffen, sodass wichtige Entscheidungshilfen für das weitere Vorgehen vorliegen.

Eventuell kann die morphometrische Analyse dazu dienen, Patienten mit zurzeit nicht diagnostizierbarer In- oder Subfertilität zu erkennen, um Alternativen für das weitere Verfahren anzuwenden.

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM (1982) An analysis of sperm function in case of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 38: 212-221.
  
2. Aitken RJ (1988) Assessment of sperm function for IVF. *Hum. Reprod.* 3: 89-95.
  
3. Aitken RJ and West KM (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fraction of human semen separation in Percoll gradients. *Int. J. Androl.* 13: 433-451.
  
4. Akerlöf E, Fredericson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L and Pousette A (1987) Comparison between swim-up and Percoll gradient centrifugation technique for the separation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 10: 663-669.
  
5. Al-Hasani S, Alpüstün S, Ludwig M, Diedrich K, Bauer O, Klöpker W, Wolff A and Krebs D (1996) The combination of two semen preparation techniques (Glass-wool filtration and Swim-up) and their effect on the morphology of recovered spermatozoa and outcome of IVF-ET. *Int. J. Androl.* 19: 55-60.
  
6. Allen MJ, Bradbury EM and Balhorn R (1996) The natural subcellular structure of the bovine sperm cell. *Jour. of structural biology* 114: 197-208.

7. Amann RP (1989) Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10: 89-97.
8. Angelopoulos T, Moshel Y, Lu L, Macanas E, Grifo J, Krey L (1998) Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in-vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 4: 740-747.
9. Aziz N, Fear S, Kingsland CR, Lewis-Jones I (1998) Sperm head morphometry and its influence on male fertility. *Fertil. Steril.* 70: 883-891.
10. Aziz N, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I (1998) Human sperm head morphometry and distribution and its influence on male fertility. *Hum. Reprod.* 13: 133 (Abstract)
11. Aziz N, MRCOG, Lewis-Jones I (1999) Human sperm morphometry and male fertility. *Ass. Reprod.* 4: 199-204.
12. Baartov B, Elters F, Pansky M, Lederman H, Caspi E and Soffer Y (1993) Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod* 8: 65-70.
13. Baker HWG, Liu DY (1996) Assessment of nuclear maturity. Human spermatozoa in assisted reproduction. A Acosta und T Kruger, The Parthenon Publishing group 2: 193-203.
14. Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 93: 298-305.



15. Balhorn R, Brewer L, Corzett M (2000) DNA condensation by protamin and arginine-rich peptides: analysis of torois stability using single DNA- molecules. *Mol, Reprod. Dev.* 56: 230-234.
16. Ball GD, Bellin ME, Ax RL, First NL (1982) Glycosaminglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28: 113-122.
17. Benoff S, Cooper G, Paine T, Hurley I, Napolitano B, Jacob A, Scholl G, Hershlag A (1999) Numerical dose-compensated in-vitro fertilization inseminations yield high fertilization and pregnancy rates. *Fertil. Steril.* 6: 1019-1027.
18. Berger T, Marrs RP, and Moyer DL (1985) Comparison of techniques for selecting spermatozoa. *Fertil. Steril.* 43: 268-273.
19. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A and Sakkas D (1996) Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa : evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 139-144.
20. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizarro D et al. (1996) Use of guanine-cytosine (GC) specific fluorochrome chromomycin A3 as an indicator of poor sperm morphology. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13: 246-250.
21. Biljan MM, Taylor CT, Manasse PR, Joughin EC, Kingsland CR, Lewis-Jones DI (1994) Evaluation of different sperm function tests as screening methods for male fertizing potential – the value of the sperm migration test. *Fertil. Steril.* 62: 591-598.

22. Bizarro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Mariethoz E, Sakkas D (1998) In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 127-132.
23. Boersma A and Braun J (1999) Computerassistierte Untersuchung der Spermienmorphologie in der Tiermedizin. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 112: 81-85.
24. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen T, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE (1998) Relation between semen quality of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 352: 1172-1177.
25. Bourgain C, Nagy ZP, De Zutter H, Van Ranst H (1998) Ultrastructure of gametes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 13: Suppl. 1, 107-116.
26. Brandeis, VT and Manuel MT (1993) Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J. Assist. Reprod. Genet.* 6: 409-416.
27. Calvin HI and Bedford JM (1971) Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymus. *J. Reprod. Fertil. : Suppl.* 13, 65-75.
28. Carell D und Liu L (2002) Heparin binding sites are present at a higher concentration on sperm of subfertile men than donors of known fertility. *Arch. Androl.* 48: 147-154.

29. Cary WH (1916) Examination of semen with reference to gynaecological aspects. *Am. J. Obstet. Dis. Women Child.* 74: 615-638.
30. Chargaff E und Olson K (1938) Studies on the chemistry of blood coagulation. VI. Studies on the action of heparin and other coagulants. The influence of protamine on the anticoagulant effect in vivo. *J. Biol. Chem.* 122: 153-167.
31. Check JH, Katsoff D, Kozak J and Lurie D (1992) Effect of Swim-Up, Percoll and Sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test. *Hum. Reprod.* 7: 109-111.
32. Chen SU, Ho HN, Chen HF, Cao KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS (1995) Comparison between two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12: 698-703.
33. Courtens JL, Kistler WS, Plöen L (1995) Ultrastructural immunolocalisation of histones (H2B, H3, H4) transition protein (TP1) and protamine in rabbit spermatids and spermatozoa nuclei. *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 569-582.
34. Cui KH (1997) Size differences between X and Y bearing spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 61-67.
35. Curry MR, Watson PF (1995) Sperm structure and function. The spermatozoon. JG Grudzinkas, JL Yovich, Cambridge reviews in Hum. Reprod., Cambridge University Press: 59-60.

36. Dadoune JP (1995) The nuclear status of human sperm cells. *Micron*. 26: 323-345.
37. Dean J (1983) Decondensation of mouse sperm chromatin and reassembly into nucleosomes mediated by polyglutamic acid in vitro. *Dev. Biol.* 99: 210-216.
38. Delgado N, Reyes R, Juacuja L, Merchant H, Rosado A (1982) Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch. Androl.* 8: 87-95.
39. Donnelly ET, Lewis SE, MyNally JA, Thompson W (1998) In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.* 2: 305-314.
40. Drevius L, Eriksson H (1966) Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 42: 136-156.
41. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B (1996a) Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum. Reprod.* 11: 139-146.
42. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, Tilgen W, Runnebaum B (1996b) The acridin orange test: a clinical relevant screening method for sperm quality during infertility investigation ? *Hum. Reprod.* 4: 784-789.
43. Elter K, Nelson LR (2001) Use of third generation GnRH antagonists in in-vitro fertilization embryo transfer: a review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56: 576-588.

44. Engh E, Clausen OP, Scholberg A et al. (1992) Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry. *Int. J. Androl.* 15: 407-415.
45. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC, Evers JLH and Geraedts JPM (1991) Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 6: 854-585.
46. Enginsu ME, Pieters MHEC, Dumoulin JCM and Geraedts JPM (1992) Male factor as determinant of in-vitro fertilization outcome. *Hum. Reprod.* 7: 1136-1140.
47. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC, Evers JLH and Geraedts JPM (1993) Predictive value of morphologically normal sperm concentration in the medium for in-vitro fertilization. *Int. J. Androl.* 16. 113-120.
48. Enginsu ME, Evers JLH (1996) Efficiency and predictive value of different methods of morphological evaluation. *Human spermatozoa in assisted reproduction.* A Acosta and T Kruger, The Parthenon Publishing Group 2: 117-123.
49. Englert Y, Van den Bergh M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J, Legreve A (1992) Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 7: 399-402.
50. Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1980) Comparison of human and mouse sperm by flow cytometry. *Chromosoma.* 78: 225-238.

51. Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210 : 1131-1133.
52. Evenson D, Jost L, Marshall D et al. (1999) Utility of sperm structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14: 1039-1049.
53. Filatov MV, Semenova EV, Vorabeva OA et al. (1999) Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 825-830.
54. Fisch B, Kaplan-Kraicer R, Amit S, Zukerman Z, Ovadia J and Tadir Y (1990) The relationship between sperm parameters and fertilizing capacity in vitro: a predictive role for swim-up migration. *J. Vitro. Fert. Embryo. Trans.* 7: 38-44.
55. Fisch H, Lipshultz LI (1992) Diagnosing male factor of infertility *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 398-405.
56. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD (1995) Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 10: 2623-2629.
57. Foresta C, Zorui M, Rossati M, Varotto A (1992) Sperm nuclear instability and staining with anilin blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in fertile men. *Int. J. Androl.* 15: 330-337.

58. Fredricson B, Waxegard G, Brege S and Lundberg I (1977) On the morphology of live spermatozoa of human semen. *Fertil. Steril.* 28: 168-174.
59. Garret C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HWG (2003) Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm mophometry and straight line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum. Reprod.* 18: 1643-1649.
60. Gebauer H, Lindner H, Amsterdam A (1978) Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. *Biol. Reprod.* 18: 350-358.
61. Gergeley A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Huszar G (1999) Morphometric assessement of mature and diminished-maturity spermatozoa that reflect differences in maturity. *Hum. Reprod.* 14: 2007-2014.
62. Gopalkrishnan K, Hurkadli K, Padwal V, Balaiah D (1999) Use of acridine-orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Androl.* 5: 277-81.
63. Griveau JF, Grizard G, Boucher D and LeLannou D (1998) Influence of oxygen tension on function on isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. *Hum. Reprod.* 13: 3108-3113.
64. Goud PT, Goud AP, Rybouchkin AV, Sutter P, Dhont M (1998) Chromatin decondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after inzytoplasmatic sperm injection into hamster oocytes. *Hum. Reprod.* 13: 1336-1345.

65. Haidl G, Schill WB (1994) Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. *Arch. Androl.* 32: 263-266.
66. Hammadeh ME, Al.Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, Schmidt W (1996) The effect of chromatin condensation (Anilin blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmatic sperm injection programme. *Hum. Reprod.* 11: 2468-2471.
67. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1997) Sperm count in ejaculates and after sperm selection with discontinuous Percoll gradient centrifugation technique, as a prognostic index of IVF outcome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 259: 1-7.
68. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998) Association between sperm chromatin condensation, morphology based on strict criteria and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30: 29-35.
68. Hammadeh ME, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W (2001) Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male infertility. *Arch. Androl.* 46: 99-104.
69. Hecht NB (1989) Mammalian protamines and their expression. *Histones and basic nuclear protamines.* L. Hnilica, CRC Press, 347-370.
70. Henkel R, Franken DR, Lombaard CJ and Schill WB (1994) Selective capacity of glass wool filtration for the separation of human spermatozoa with



condensed chromatin; a possible therapeutic modality for male factor cases ? J. Assist. Reprod. Genetic. 11: 395-400.

71. Hofmann N (1988) Wege zur Andrologie. Cux Druck, 8-48.

72. Hofman N, Hilscher B, Bierling C (1990) Quantitative Untersuchungen der Korrelation von Störungen der Chromatinkondensierung mit der Spermatozoenmorphologie. Fertilität 6: 208-213.

73. Horvath PM, Bohrer M, Shelden RM, Kemmann E (1989) The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulatory women undergoing intrauterine insemination. Fertil. Steril. 52: 288-294.

74. Hoshi K, Katayose K, Yanagida K, Kimura Y and Sato A (1996) The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. Fert. Steril. 66: 634- 639.

75. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ et al. (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol. Hum. Reprod. 20: 613-619.

76. Huret JL (1986) Nuclear chromatin decondensation of human sperm : a review. Arch. Androl. 16: 97-109.

77. Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA et al. (1994) A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. Hum. Reprod. 9: 2324-2334.

78. Ischimura S, Zama M, Fujita H, Ito T (1969) The nature of strong binding between acridine orange and desoxyribonucleic acid as revealed by equilibrium dialysis and thermal renaturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 116-125.
79. Ischimura S, Zama M and Fujity H (1971) Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochem. Biophys. Acta* 240: 489-495.
80. Ichimura S (1975) Differences in the red fluorescence of acridine orange bound to single-stranded RNA and DNA. *Biopolymers* 14: 1033.
81. Jackson R, Busch S, Cardin A (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71: 481-539.
82. Jager S, Wijchman J and Kremer J (1990) Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zool.* 256: 325-322.
83. Jeyendran RS, Van der Hen HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.
84. Johannisson E, Eliasson R (1981) Ethidium bromide uptake by spermatozoa from fertile and infertile men. *Int. J. Androl. Suppl* 3: 72-73.

85. Johnson D, Confino E and Jeyendran RS (1996) Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertil. Steril.* 66: 459-462.
86. Katayama KP, Stehlik E and Jeyendran RS (1989) In vitro fertilization outcome: glass-wool-filtered sperm versus swim-up sperm. *Fertil. Steril.* 52: 670-672.
87. Katz DF, Ocerstreet JW, Samuel SJ et al. (1986) Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J. Androl.* 7: 203-210.
88. Kosower NS, Katayose H and Yanigimachi R (1992) Thio-disulfide status and acridin-orange fluorescence of mammalian sperm nuclei, *J. Androl.* 13: 342-348.
89. Küpker W, Diedrich K, Edwards R G (1998) Principles of mammalian fertilization. *Hum. Reprod.* 13: Suppl. 1, 20-31.
90. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skekkebaek NE, Giwercman A (2000) Computer-assisted semen analysis semen parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum. Reprod.* 15: 1562-1567.
91. Lasalle B und Testart J (1992) Relationship between fertilising ability of frozen human spermatozoa and capacity for heparin binding and nuclear decondensation. *J. Reprod. Fertil.* 95: 313-324.

92. Lescoat D, Blanchard Y, Lavault MT, Quernee D, LeLannou D (1993) Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis. *Andrologia* 25: 93-99.
93. Le Lannou D and Blanchard Y (1988) Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by percoll density gradient centrifugation or swim up procedure. *J. Reprod. Fertil.* 55: 551-556.
94. Liu Y und Baker HWG (1992) Test of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58: 455-473.
95. Macleod IC Irvine DS (1995) The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Hum. Reprod.* 10: 580-586.
96. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizarro D, Bianchi U and Sakkas D 1995 Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol. Reprod.* 52: 864-867.
97. Macnamee MC, Howles CM, Edwards RD, Taylor PJ, Elder KT (1989) Short-time luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in-vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 52: 264-269.
98. Matson PL, Troup SA, Lowe B, Ibrahim ZH, Burslem RW, Lieberman BA (1989) Fertilization of human oocytes in vitro by spermatozoa from oligozoospermic and normospermic men. *Int. J. Androl.* 12: 117-123.

99. Moench GL (1927) A consideration of some of the aspects of sterility. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* (13) 334-345.
100. Moench GL, Holt H (1932) Biometrical studies of head lengths of human spermatozoa. *J. Lab. Clin. Med.* 17: 297-316.
101. Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L (2001) Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients in relationship to seminal parameters. *Hum. Reprod.* 16: 534-539.
102. Monaco PJ, Rash EM (1982) Differences in staining with DNA specific fluorochromes during spermatogenesis. *Histochem.* 30: 585.
103. Naish SJ, Perreault SD and Zirkin BR (1987) DNA synthesis following microinjection of heterologous sperm and somatic cell nuclei into hamster oocytes. *Gamete Res.* 18: 109-120.
104. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M (2001) Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 4: 219-225.
105. Oehninger S, Kruger T (1995) The diagnosis of male infertility by semen quality. Clinical significance of sperm morphology assessment. *Hum. Reprod.* 10: 1037-1038.
106. Ostermeier GC and Parrish JJ (1997) Objective assessment of the nuclear shape differences which exist between live and dead bovine sperm cell populations. *Biol. of Reprod.* 56 (Suppl.1): 212.

107. Ostermeier GC, Sartor-Bergfelt R, Susko-Parrish JL and Parrish JJ: Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag. Biotech. Net*, Vol 2 September 2000, ABN 055.

108. Palermo GD, Neri QV, Hariprashad JJ, Davis OK, Veeck LL, Rosenwaks Z (2000) ICSI and its outcome. *Semin. Repros. Med.* 18: 161-169.

109. Peacocke AR (1973) The interactions of acridines with nucleic acids. In: Acheson R.M. (Ed.), *Acridines*. New York, Interscience Publishers: 723-754.  
Perreault SD, Naish SJ and Zirkin BR (1987) The timing of sperm hamster nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 36: 239-244.

110. Perreault SD Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM and Keefer CL (1988) Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 39: 157-167.

111. Perreault SD (1990) Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization in: BD Bavister, J Cummings and ERS Roldan (Eds.), *Fertilization in mammals*, Serono Symposia, USA, Norwell, MA: 285-296.

112. Perreault SD (1992) Chromatin remodeling in mammalian zygotes. *Mut. Res.* 296: 43-55.

113. Pertoft H, Rubin K, Kjellen L, Laurent TC, Klingeborn B (1977) The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, Percoll (TM). *Exp. Cel. Res.* 110: 449-457.

114. Polansky FF, Lamb EJ (1988) Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. *Fertil. Steril.* 49: 1059-1065.
115. Reyes R, Rosado A, Hernandez O and Delgado NM (1989) Heparin and glutathion: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete res.* 23: 39-47.
116. Rizk B und Smith J (1992) Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation using GnRH agonists for IVF and related procedures. *Hum. Reprod.* 7: 320-327.
117. Rodrigues Goulart A, de Alencar Hausen M, Monteiro-Leal LH 2003 Comparison of three computer methods of sperm head analysis. *Fertil. Steril.* 80: 625-630.
118. Romanato M, Bertolesi G, Calvo JC, Calvo L (2001) Heparan sulfate: a putative sperm decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *J. Androl.* 22 (Suppl.): 85.
119. Roux C and Dadoune JP (1989) Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin decondensation. *Androl.* 21: 275-281.
120. Royere D, Hamamah S, Nicolle JC and Lansac J (1991) Does in vitro capacitation alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa? Cytochemical studies. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 177-182.

121. Saacke RG (1998) AI fertility: Are we getting the job done? Proceedings of the 17<sup>th</sup> Technical conference of artificial insemination and reproduction national association of animal breeders. 6-13.

122. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995) Mammalian DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 16: 80-87.

123. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizarro D, Bianchi PG, Bianchi U (2000) The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.* 15: 1112-1116.

124. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizarro D (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 11: 837-843.

125. Sakkas D (1999) The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum. Reprod.* 14: 4-5.

126.

127. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1989) Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell oocyte complex during follicle stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 264: 13840-13847.



128. Sanchez R, Villagran E, Risopatron J and Celis R (1994) Evaluation in nuclear maturity in human spermatozoa obtained by sperm preparation methods. *Andrologia* 26: 173-176.
129. Schatten G, Simerly C and Schatten H (1985) Microtubule configurations and during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4152-4156.
130. Schill T, Al-Hasani S, Küpker W, Diedrich K (1998) Lichtmikroskopische Untersuchung der Zytomorphologie und Zytogenetik an nicht fertilisierten Oocyten nach In-vitro Fertilisation und intracytoplasmatischer Spermieninjektion. *Geburtsh. und Frauenheilk.* 58: 79-87.
131. Schmitt-Matthiesen H, Hepp H (eds) (1998) *Gyn kologie und Geburtshilfe*. Schattauer, Stuttgart New York.
132. Selva J, Wolf J P, Rince P, Rodrigues D, Frydman R, Jouannet P (1993) Cytogenetic analysis of human oocytes after subzonal insemination. *Prenatal. Diagn.* 13: 311-321.
133. Shalika S, Dugan U, Pelesh D, Padilla S (1995) A Mono-Percoll separation technique improves sperm recovery of normal and male factor specimens when compared with the swim-up technique. *Hum. Reprod.* 10: 3195-3197.
134. Shibahara H, Onagawa T, Ayustawati S, Jorsaraei Y, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M (2003) *Int. J. Androl.* 4: 236-241.

135. Sofikitis NV, Miyagawa I, Zavos PM et al. (1994) Confocal scanning laser microscopy of morphometric human sperm parameters: correlation with acrosin profiles and fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 62: 376-386.
136. Spano M, Calugi A, Capuano V (1984) Andrological sperm analysis by flow cytometry and sizing. *Andrologia* 16: 367-375.
137. Spano M, Bonde JP, Kolstadt HA, Cordelli E, Leter G (2000) Sperm chromatin damage impairs human infertility. *Fertil. Steril.* 73: 43-50.
138. Sukcharon N (1995) The effect of discontinuous Percoll gradient centrifugation on sperm morphology and nuclear DNA normality. *J. Med. Assoc. Thai.* 78: 22-29.
139. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ and Friedman SA (1973) Test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42 : 87-91.
140. Tejada DP, Cameron JC, Normal A et al. (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 42 : 87-91.
141. Tesarik J (1996) Fertilization of oocyte by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Rev. Reprod.* 1:149-152.
142. Tesarik J (1998) Oocyte activation after intracytoplasmic injection of mature and immature sperm cells. *Hum. Reprod.* 13: Suppl. 1, 117-127.

144. Thanki KH, Gagliardi CL, Schmidt CL (1992) Poor in-vitro fertilization outcome with semen yielding low sperm density “swim-ups” is not because of altered sperm motion parameters. *Fertil. Steril.* 58: 770-775.
145. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J (1981) Pregnancies in human by fertilization in-vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 212: 681-682.
146. Tyler JPP and Crockett NG (1982) Comparison of the morphology of vital and dead human spermatozoa. *Jour. of Reprod. and Fert.* 66: 667-670.
147. Van Blerkom J, Davis P W, Merriam J. (1994) A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum. Reprod.* 9: 2381-2388.
148. Van der Zwalm P, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R (1991) Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum. Reprod.* 6: 581-588.
149. Van Steirteghem A (2001) Twenty years of IVF: realization and questions for the future. *Verh. K. Accd. Genneskd. Belg.* 63: 193-240 (abstract).
150. Van Uem JF, Acosta AA, Swanson RJ, Meyer J, Ackerman S, Burkman RJ, Veeck LL, McDowell JS, Bernardus R E, Jones HW Jr (1985) Male factor evaluation in in-vitro fertilization; Norfolk experience. *Fertil. Steril.* 44: 375-382.
151. Williams WW (1920) Diseases of the bulls interfering with reproduction. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 58: 29.

152. Williams WW (1923) The male as a spreader of genital infections. *Cornell Vet.* 13: 108-111.
153. Williams WW, Savage A (1925) Observations on the seminal morphology of bull. *Cornell Vet.* 15: 353-375.
154. Windt ML, de Beer P, Franken DR et al. (1994) Sperm decondensation and semen parameters: utilization of a simple staining technique for the evaluation of human sperm decondensation. *Andrologia* 26: 67-72.
155. Wogelmuth DJ (1983) Synthetic activities of the mammalian early embryo: molecular and genetic alterations following fertilization. In: JF Hartmann (Ed.), *Mechanism and control of animal fertilization*, Academic Press, New York: 415-452.
156. Wolffe A (1997) *Chromatin structure and function*. Academic Press 2: 81-84.
157. Wright SJ and Longo FJ (1988) Sperm nuclear enlargement in fertilized hamster eggs is related to meiotic maturation of the maternal chromatin. *J. Exp. Zool.* 247: 155-165.
158. Yamamoto Y, Maenosono S, Okada H et al. (1997) Comparison of sperm quality, morphometry and function among human sperm populations recovered via SpermPrep II filtration, swim-up and Percoll density gradient methods. *Androl.* 29: 303-310.

159. Zaini A, Jennings MG, Baker HW (1985) Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int. J. Androl.* 8: 427-435.

160. Zamboni L (1992) Sperm structure and its relevance for infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116: 325-344.

161. Zirkin BR, Perreault SD and Naish SJ (1985) Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. *Gamete res.* 11: 349-366.

## **7. Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. vet. med. Dr. rer. nat. M.E. Hammadeh für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung der praktischen Durchführung als auch der Erörterung theoretischer Fragen.

Prof. Dr. Dr. h c. mult. W. Schmidt danke ich sehr herzlich für die Benutzung des Labors der Universitätsfrauenklinik sowie der Verwendung von Hard- und Software (IBAS).

Ein ganz besonderes Dankeschön geht auch an die Mitarbeiterinnen des IVF- sowie des morphologischen Labors für ihre tatkräftige Unterstützung, insbesondere an Frau S. Seyfried und Frau E. Maurer.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dipl. math. T. Georg vom Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informatik für seine Mitarbeit bei der Erfassung und Auswertung der umfassenden Datenbanken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. R. Lindemuth vom Institut für Neurologie für seine Unterstützung bei der Computer-gestützten Image Analyse (IBAS) für die morphometrische Erfassung der Spermien.

Ebenso bedanke ich mich bei meiner Freundin D. Braun für ihre Hilfe und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann S. Müller für die tatkräftige Unterstützung bei allen Fragen, die mit geeigneter Software für spezielle Fragestellungen verknüpft waren.

Ebenfalls gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung.

## **8. Lebenslauf**

Geboren am 11.03.1976 in Püttlingen.  
Familienstand: Verheiratet, 1 Kind.

1982-1986 Grundschule Wiesbach

1986-1995 Illtalgymnasium Illingen, Abschluß mit dem Abitur

1995-1996 Freiwilliges soziales Jahr im Seniorenzentrum der AWO in  
Heusweiler

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Hochschule des  
Saarlandes  
1999 Auslandsfamulatur in Ghana  
Praktisches Jahr am Knappschafts Krankenhaus Sulzbach

2003- AiP und Assistenzzeit in der St. Elisabeth Saarlouis, Abteilung für  
Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie