

Aus der Universitätsfrauenklinik
Universitätskliniken, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. E.-F. Solomayer

*Die Wirkung der Kryokonservierung auf die
Apoptoserate menschlicher Spermatozoen
fertiler und subfertiler Männer mittels
Fluoreszenzimmunhistochemie*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2010

Vorgelegt von: Hiba Fouz
Geboren am 28.09.1982 in Trier

Gewidmet:
meinen Eltern
für Alles

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Summary	9
2. Einleitung	10
2.1 Apoptose und Nekrose	13
2.2 Hauptsignalwege der Apoptose und Stellenwert der Caspasen	14
2.2.2 Die extrinsisch vermittelte Apoptose	16
2.2.3 Die (mitochondrial) intrinsisch vermittelte Apoptose.....	18
2.2.4 Die stressvermittelte Apoptose.....	20
2.2.5 Gemeinsame Endstrecke der Apoptose.....	22
2.2.5.1 DNA-Fragmentation.....	22
2.2.5.2 Chromatinkondensation	23
2.2.5.3 Phosphatidylserinasymmetrie.....	23
2.2.5.4 Abbau des Zellgerüsts	23
2.3 DNA in Spermatozoen	24
2.3.1 Nukleäre DNA.....	24
2.3.2 Mitochondriale DNA.....	26
2.3.2.1 Relevanz der mitochondrialen DNA für Spermatozoen	26
2.2 Bedeutung der Apoptose in Spermatozoen	28
2.3 Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermatozoen	30
2.4 Eigene Fragestellungen	31
3. Material und Methodik.....	32
3.1 Gewinnung der Proben	32
3.2 Klassische Samenanalyse	32
3.2.1 Bestimmung von Viskosität und Volumen	32
3.2.2 Bestimmung des pH-Wertes	32
3.2.3 Cyturtest	33
3.2.4 Eosin-Test	33
3.2.5 Hypoosmotischer Spermischwelltest (HOS-Test)	33
3.2.6 Gemischter Antiglobulin-Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test, MAR-Test)	34
3.2.7 Spermatozoendichte	34

3.2.8 Spermienmotilität	35
3.2.9 Spermienmorphologie	35
3.3 Aufbereitung der Proben	37
3.4 Anfertigung der Proben und Einfrieren	37
3.5 Auftauen	39
3.5.1 Supravitaltests und Beurteilung der Spermienmotilität	
3.5.2 Anfertigung der Proben	39
3.6 TUNEL-Färbung	40
3.6.1 Prinzip	40
3.6.2 Vorbereitung	40
3.6.3 Durchführung	42
3.6.4 Auswertung	42
3.7 Caspase-3-Test	44
3.7.1 Prinzip	44
3.7.2 Vorbereitung.....	44
3.7.3 Durchführung	45
3.7.4 Auswertung	46
3.8 Statistische Auswertungen	47
4. Ergebnisse	48
4.1.1 Vergleich beider Gruppen	48
4.1.2 Einfluss der Aufbereitung	49
4.1.3 Einfluss der Kryokonservierung.....	49
4.1.4 Leukozytengehalt der Proben.....	53
4.2 Ergebnisse des TUNEL-Tests in der Gesamtgruppe und der fertilen und subfertilen Gruppe.....	55
4.2.1 Vergleich beider Gruppen	55
4.2.1 Auswirkung der Aufbereitung.....	55
4.2.3 Auswirkung der Kryokonservierung.....	55
4.2.4 Leukozytengehalt	56
4.3 Auswirkungen der Kryokonservierung auf den Nachweis von Caspase-3 (indirekte Fluoreszenzimmunhistochemie) in der fertilen und in der subfertilen Gruppe	58
4.3.1 Vergleich beider Gruppen	58
4.3.2 Auswirkung der Aufbereitung.....	58
4.3.3 Auswirkung der Kryokonservierung.....	58
4.3.4 Einfluss des Leukozytengehalts	58
4.4 Korrelationen zwischen TUNEL- und Caspase-3-Färbung	64

4.5 Korrelationen zwischen den Apoptoseparametern (TUNEL und Caspase-3) und den Parametern der klassischen Samenanalyse	66
4.5.1 Korrelation zwischen der TUNEL-Färbung und den Parametern der klassischen Samenanalyse	66
4.5.2 Korrelation zwischen der Caspase-3-Färbung und den Parametern der klassischen Samenanalyse	66
5. Diskussion	72
5.1 Die Parameter der klassischen Samenanalyse.....	72
5.2 DNA-Fragmentation (TUNEL-Test)	75
5.3 Caspase-3	88
5.3 Korrelationen zwischen den Parametern der Apoptose und der klassischen Samenanalyse.....	96
5.4 Fazit der Diskussion	99
6. Literaturverzeichnis.....	100
7. Danksagung.....	125
8. Lebenslauf.....	126

Abkürzungsverzeichnis

ART	Assistierte Reproduktionstechniken
ASA	IgG-Spermatozoen-Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HOS-Test	Hypoosmotischer Spermienschwelltest
ICSI	Inzrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In vitro-Fertilisation
MAR-Test	Mixed Antiglobulin Reaction Test
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROS	Reactive oxygen species
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
WHO	World Health Organization

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Die Kryokonservierung von menschlichen Spermatozoen spielt eine wichtige Rolle, beispielsweise für Patienten, welche sich einer fertilitätsschädigenden Therapie unterziehen müssen. Sie erhält die Gameten für einen langen Zeitraum am Leben und ermöglicht es den Patienten nach Abschluss der Therapie ihren Kinderwunsch zu verwirklichen. Die Parameter der klassischen Samenanalyse haben nur eine begrenzte prognostische Aussagekraft bezüglich des Ausgangs einer künstlichen Befruchtung. Zudem bieten sie keine Informationen über die Pathophysiologie der durch Kryokonservierung induzierten Schäden auf biochemischer Ebene. Daher sind weitergehende Untersuchungen notwendig, um die pathophysiologischen Zusammenhänge aufzudecken. Darüber hinaus ist der Stellenwert der Apoptose im ejakulierten Spermatozoon noch nicht abschließend geklärt, möglicherweise liegt eine abortive Form der Apoptose vor. Der Ursprung der DNA-Fragmentierung könnte Ausdruck einer Störung während der Gametogenese sein, insbesondere in den Stadien des Histon-Protamin-Austauschs.

In der vorliegenden Studie wurde das Vorliegen von DNA-Strangbrüchen und die Aktivität von Caspase-3, sowie die Auswirkung von Aufbereitung und Kryokonservierung auf menschliche Spermatozoen fertiler und subfertiler Männer mittels Fluoreszenzimmunhistochemie untersucht und in Beziehung gesetzt mit den klassischen Parametern der Samenanalyse.

Es lagen fertile (n=29) und subfertile Samenproben (n=14) vor. Alle Proben wurden jeweils auf DNA-Strangbrüche, anhand der TUNEL-Färbung sowie auf das Vorhandensein von Caspase 3, anhand der indirekten Fluoreszenzimmunhistochemie untersucht. Zusätzlich wurden die Proben anhand der Parameter der klassischen Samenanalyse und der histologischen Morphologie beurteilt. Dies erfolgte jeweils vor und nach Aufbereitung sowie nach dem Auftauen. Die Ergebnisse wurden mit den Parametern der klassischen Samenanalyse korreliert.

Die vorliegende Studie wies einen Anstieg von Markern der apoptotischen Signalkaskade in Spermatozoen nach Kryokonservierung nach. Der Prozess des Einfrierens und Auftauens führte in der fertilen Gruppe zu einem signifikanten Anstieg von DNA-Strangbrüchen (von $14,85 \pm 17,64\%$ auf $27,54 \pm 19,74\%$, p-Wert=0,004) und dem Anteil Caspase 3 positiver Spermatozoen (von $5,80 \pm 11,59\%$ auf $7,33 \pm 6,13\%$, p-Wert=0,014). In der subfertilen Gruppe konnten keine signifikanten Veränderungen für DNA-Fragmentation (Zunahme von

19,84±17,52% auf 29,48±16,97%, p-Wert=0,530) und Caspase 3-Gehalt (Zunahme von 7,53±8,56% auf 10,21±11,73%, p-Wert=0,638) nachgewiesen werden, wenn auch eine positive Tendenz zu sehen war.

Der Leukozytengehalt einer Probe war in vorliegender Studie ein entscheidender Parameter für die Zunahme einer DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung. Dies traf sowohl für die fertile wie auch die subfertile Gruppe zu. Proben mit einem Leukozytengehalt >25/μl (zweifacher Leukozytengehalt, Cytur-Test) zeigten im Gegensatz zu Proben mit einem Leukozytengehalt von 10-25/μl (einfacher Leukozytengehalt) eine signifikante Zunahme der DNA-Strangbrüche nach Kryokonservierung. In der fertilen Gruppe nahm der Anteil TUNEL-positiver Spermatozoen nach Kryokonservierung signifikant in Proben mit zweifachem Leukozytengehalt zu (8,70±9,78% vs. 22,39±15,79%, p-Wert=0,008). In der Gruppe mit nur einfach positivem Leukozytengehalt war kein signifikanter Effekt nachweisbar (21,47±21,88% vs. 33,87±22,78%, p-Wert=0,116).

Dies traf auch auf die subfertile Gruppe zu: Während die Proben mit einfach positivem Leukozytengehalt keine signifikante Veränderung zeigten (32,0±19,01% vs. 24,56±22,47%, p-Wert=0,225), konnte eine signifikante Zunahme nach Kryokonservierung im Anteil TUNEL-positiver Spermatozoen mit zweifachen Leukozytengehalt nachgewiesen werden (12,24±12,16% auf 33,69±10,52%, p=0,043).

Es ist davon auszugehen, dass der Einfrier-Auftau-Vorgang über die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies aus Leukozyten direkt die nukleäre DNA des Spermatozoon schädigt. Der Ausschluss von Proben mit erhöhtem Leukozytengehalt könnte den fehlenden Nachweis von DNA-Strangbrüchen nach Kryokonservierung in anderen Studien erklären.

Die Kryokonservierung führte zu einer unmittelbaren Schädigung des Spermatozoon mit Abnahme der Membranstabilität, Absterben von Spermatozoen und Reduktion der Globalmotilität.

Durch den Einfrier-Auftau-Prozess nahm die Membranstabilität (HOS-Test) sowohl in der fertilen Gruppe (Reduktion von 53,2±26,0% auf 36,25±20,58%, p=0,0001), wie auch in der subfertilen Gruppe ab (Reduktion von 45,71±24,37% auf 31,43±18,86%, p=0,033). Die Vitalität verringerte sich sowohl in der fertilen Gruppe (von 45,86±21,51% auf 24,62±18,22%, p=0,0001) wie auch in der subfertilen Gruppe (von 37,14±24,86% auf 17,22±13,7%, p=0,042).

Ebenso verhielt es sich mit der Globalmotilität: In der fertilen Gruppe nahm die Globalmotilität deutlich von 32,07±16,98% auf 6,52±06,87% ab (p=0,001). Die globalmotilen Spermien fielen in der subfertilen Gruppe von 30,71±21,02% auf 6,76±12,7% ab (p=0,12).

Da die Schäden an Spermatozoen im Rahmen der Kryokonservierung auf multiplen Mechanismen beruhen, ist ein mehrgefächelter Ansatz zu deren Vermeidung vorzuschlagen. Eine Hemmung der Apoptose könnte zu einer verbesserten Spermienqualität und höheren Vitalität nach Kryokonservierung beitragen. Zur Vermeidung von DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies sollte eine konsequente Entfernung von Leukozyten aus dem Seminalplasma vor Kryokonservierung erfolgen. Weiterhin ist durch Weiterentwicklung von kryoprotektiver Medien eine Verbesserung der Vitalität, Membranstabilität und Globalmotilität zu erreichen.

1.2. Summary

Cryopreservation of human spermatozoa is of great value for cancer patients. It preserves spermatozoa for a long time period for later use after completion of their therapy.

The parameters of classical semen test are of limited prognostic value concerning the outcome of assisted reproduction medicine. In addition they lack substantial information about the minute pathophysiology of the damage induced by cryopreservation. Furthermore the significance of apoptosis in ejaculated spermatozoa and in cryopreservation of ejaculated spermatozoa is still to be debated.

The effects of cryopreservation on apoptosis rate of human spermatozoa of fertile and subfertile men were investigated. This was achieved by analyzing the impact of cryopreservation on DNA-Fragmentation, Caspase 3 staining and on the classic semen analysis. The purpose of this study was to further explore the pathophysiology of cryoinjury on human spermatozoa.

Sperm cryopreservation was performed on semen samples from two groups of men classified as fertile (n = 29) and subfertile (n = 14), based on their reproductive history and semen analysis according to WHO guidelines. DNA-Fragmentation, Caspase 3 staining and the parameters of classic semen analysis were examined before and after thawing for all samples. This study showed that cryopreservation induces Apoptosis in spermatozoa. The mean percentage of DNA-Fragmentation ($14.85 \pm 17.64\%$ vs. $27.54 \pm 19.74\%$, $p=0.004$) and Caspase 3 staining ($5.80 \pm 11.59\%$ vs. $7.33 \pm 6.13\%$, $p=0.014$) increased significantly in the fertile semen group after cryopreservation of native sperm samples. DNA-Fragmentation and Caspase-3 increased also in Spermatozoa of the subfertile group, but p-values weren't significant.

The study showed that the content of leukocytes was most important whether cryopreservation led to DNA-Fragmentation or not. Only samples of fertile and subfertile group with a high percentage of leukocytes ($>25/\mu\text{l}$, Cytur-Test) showed DNA-Fragmentation after cryopreservation ($8.70 \pm 9.78\%$ vs. $22.39 \pm 15.79\%$, $p=0.008$). Samples of the fertile group containing a lower amount of leukocytes ($10-25/\mu\text{l}$, Cytur-Test) showed no significant increase of DNA-Fragmentation ($21.47 \pm 21.88\%$ vs. $33.87 \pm 22.78\%$, $p=0,116$).

Samples of the subfertile group showed the same results: A lower amount of leukocytes resulted in no significant changes in DNA-Fragmentation ($32.0 \pm 19.01\%$ vs. $24.56 \pm 22.47\%$, $p=0.225$). However DNA-Fragmentation increased after cryopreservation in samples with a higher amount of leukocytes ($12.24 \pm 12.16\%$ vs. $33.69 \pm 10.52\%$, $p=0.043$).

As other studies excluded probes with leukocytospermia this might explain why they failed to see DNA-Fragmentation after cryopreservation.

Cryopreservation led to a significant deterioration of all parameters of classical semen test and resulted in immediate damage of spermatozoa with loss of membrane integrity, vitality and reduction of global motility. Membrane integrity decreased significantly in the fertile group (reduction from $53.2 \pm 26.0\%$ to $36.25 \pm 20.58\%$, $p=0.0001$) as well in the subfertile group (reduction from $45.71 \pm 24.37\%$ auf $31.43 \pm 18.86\%$, $p=0.033$) after freezing and thawing. Vitality was also significantly decreased following cryopreservation. In the fertile group it declined from $45.86 \pm 21.51\%$ to $24.62 \pm 18.22\%$ ($p=0.0001$) and in the subfertile group it declined from $37.14 \pm 24.86\%$ to $17.22 \pm 13.7\%$ ($p=0.042$). The same applied to global motility, which dropped in the fertile group from $32.07 \pm 16.98\%$ to $6.52 \pm 06.87\%$ ($p=0.001$) and in the subfertile group from $30.71 \pm 21.02\%$ to $6.76 \pm 12.7\%$ ($p=0.12$).

As this study showed cryopreservation results in different mechanisms of damage therefore several means are required to improve the outcome quality of sperm. Inhibition of apoptosis might result in a higher sperm quality. As the release of reactive oxygen species (ROS) by leucocytes might contribute to a high degree to DNA-Fragmentation it is important to remove leucocytes consequently from samples prior to freezing. In addition to that enhancement of cryoprotective mediums might improve also the quality of sperm after freeze-thawing-process.

2. Einleitung

Seit 1978 das erste sogenannte Retortenbaby Louise Brown das Licht der Welt erblickte sind Schätzungen zu Folge inzwischen 3 Millionen Kinder nach einer künstlichen Befruchtung geboren worden. Diese Zahlen verdeutlichen den hohen Stellenwert der In-Vitro-Fertilisation in unserer heutigen Gesellschaft.

Dies hat vielfältige Gründe, an deren erste Stelle die moderne demographische Entwicklung unserer Gesellschaft zu nennen ist.

Aufgrund unterschiedlicher Gründe ist es zu einer Verschiebung des Durchschnittsalters der Frauen bei der Geburt ihres ersten Kindes gekommen – eine Entwicklung, die weiter anhält und fortschreitet. Die Daten des statistischen Bundesamtes sprechen für sich: Lag das mediane Alter der Mütter bei ihrer Erstgeburt im Jahre 1960 noch bei 24 Jahren, so verlagerte es sich im Jahre 2000 auf nunmehr 29 Jahre (Pötzsch O, 2005). Dies bedeutet, dass immer mehr Frauen eine Schwangerschaft bis Ende ihres zwanzigsten oder Anfang ihres dreißigsten Lebensjahres hinauszögern. Damit nehmen sie in Kauf, dass zu diesem Zeitpunkt aufgrund reduzierter Fertilität möglicherweise eine natürliche Konzeption unmöglich werden könnte und Kinderlosigkeit droht. In welchem Ausmaß die Fertilität mit zunehmendem Alter sinkt, untersuchten Stein et al. (1985) und Menken et al. (1986) in ihren epidemiologischen Studien. Demnach ist ab 29 Jahren ein deutlicher Abfall der Fertilität auf nur noch 85% im Vergleich zur Fertilität bei Frauen zwischen 20 und 24 Jahren zu beobachten. Ab einem Alter von 35 Jahren nimmt die Fertilität in noch stärkerem Umfang ab (Abbildung 1).

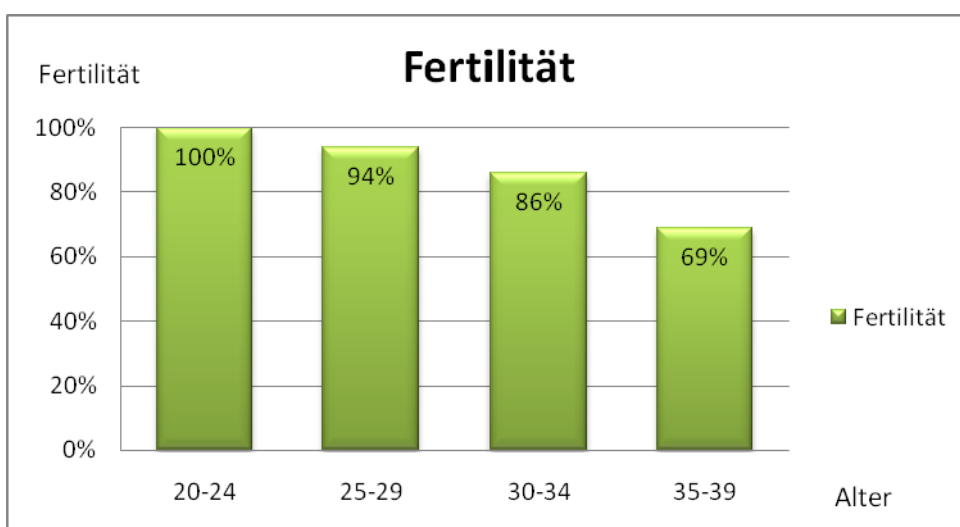


Abbildung 1: Abnahme der relativen Fertilität in Abhängigkeit vom Lebensalter (Daten aus Menken und U. Larrsen; *Aging, Reproduction and the Climacteric*, L. Mastroianni and A. Paulsen, Eds. (Plenum, New York, 1986), pp. 147-166.)

Zu diesem Schluss gelangen auch Leridon et al. (2008). Basierend auf den epidemiologischen Daten der französischen Gesellschaft aus dem Jahr 2000, untersuchten sie die Auswirkungen einer Verschiebung des Alters bei der Geburt des ersten Kindes. Eine Verschiebung von nur 2,5 Jahren führt aufgrund ungewollter Kinderlosigkeit zu einer Zunahme von 32% von Paaren, welche für eine assistierte Reproduktionsmedizin in Frage kommen. Ihre Berechnungen zeigen, dass eine Abnahme um 15% zu einer Zunahme von Paaren, welche für eine Behandlung mit künstlicher Befruchtung in Frage kommen, um 20% ansteigt.

Zudem mehren sich die Hinweise auf eine Reduktion der männlichen Fertilität innerhalb des letzten halben Jahrhunderts. Besondere Beachtung fanden hierbei die Untersuchungen von Carlsen et al. (1992). Sie werteten 61 Publikationen von 1938 – 1991 zur Spermatozoendichte aus und gelangten zu dem Ergebnis, dass eine deutliche Reduktion stattgefunden hatte (Abbildung 2). Während in den Jahren 1930-50 noch 50% aller Männer eine Spermatozoendichte von über $100 \times 10^6/\text{ml}$ aufwiesen, so lag der Anteil in den Jahren 1981-90 nur noch bei 6%. Da die Spermatozoendichte bis zu einem gewissen Ausmaß die Fertilität widerspiegelt, muss daher auch von einer Abnahme der Fertilität ausgegangen werden. Zu einem vergleichbaren Ergebnis gelangten auch Paasch et al. in ihren Publikationen aus den Jahren 2003 und 2008 über die Abnahme der Spermienqualität in der deutschen Bevölkerung.

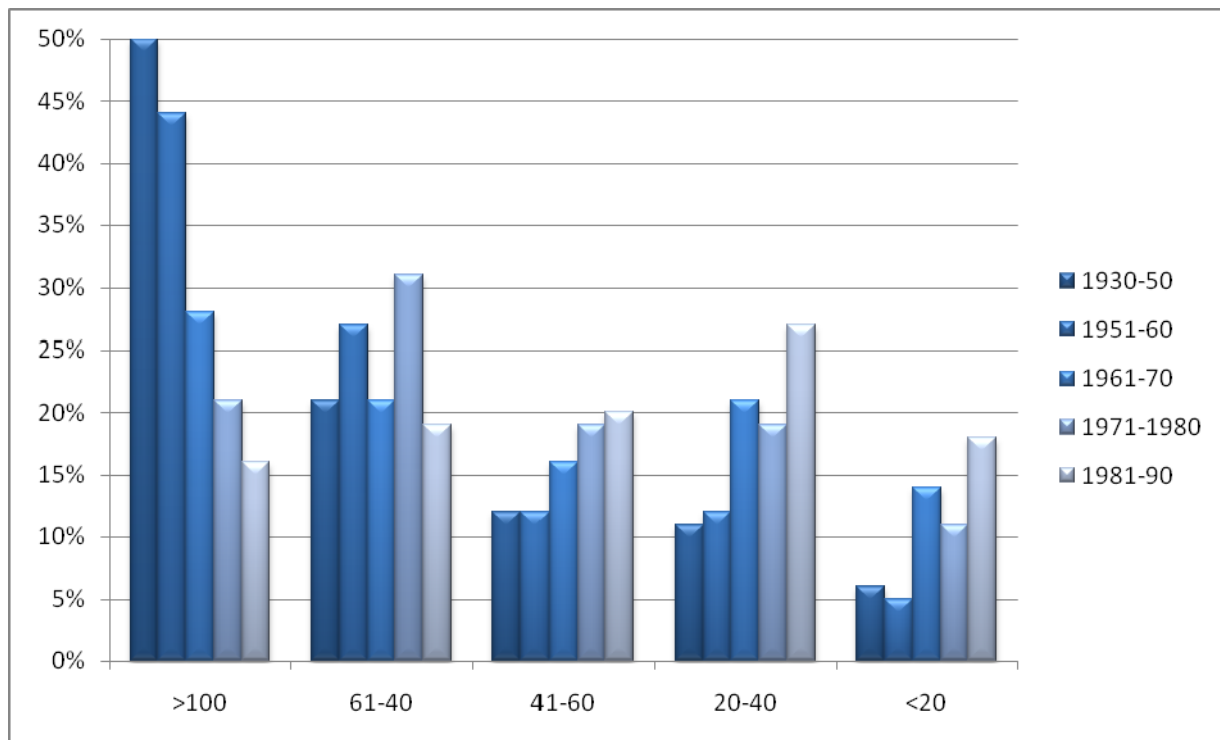


Abbildung 2: Abnahme der männlichen Fertilität von 1930-1990. Prozentsatz von Männer mit folgenden Spermatozoendichten: >100x10⁶/ml, 61-40 x10⁶/ml, 41-60 x10⁶/ml, 20-40 x10⁶/ml, <20 x10⁶/ml. (Daten aus Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 305(6854):609–613.)

In ihrer Studie zeigten Leridon et al. (2008) weiterhin, dass mit der Verschiebung des Alters bei der Geburt des ersten Kindes und der daraus resultierenden Konsequenz einer verminderten Fertilität jährlich 5% weniger Kinder geboren werden. Nehmen 50% aller Paare, welche für eine assistierte Reproduktion in Frage kommen, jene auch an, so kann dies bei derzeitigen Erfolgsraten nur 20% der „Geburtsverluste“ ausgleichen. Zudem sind die Prozeduren der assistierten Befruchtung mit einer hohen finanziellen und körperlich-psychischen Belastung verbunden. Daher ist es der Wunsch jedes behandelnden Arztes und jedes Patienten bereits zu Beginn größtmögliche Klarheit über die Wahrscheinlichkeit eines Behandlungserfolges zu haben. Die Erforschung von pathophysiologischen Vorgängen in der Entstehung der Subfertilität ist somit notwendig, um die Effektivität zu verbessern und frustrane Therapieversuche zu vermeiden.

Der Goldstandard zur Beurteilung der Samenqualität ist derzeit die sogenannte klassische Samenanalyse entsprechend den Vorgaben der WHO (1999). Erfasst werden pH-Wert, Spermatozoendichte, Vitalität (Eosin-Test), Membranstabilität (HOS-Test), Motilität,

Morphologie sowie Leukozytengehalt (Cytur-Test) und Antikörpergehalt (MAR-Test). Guzik et al (2001) untersuchten die Vorhersagekraft der Parameter der klassischen Samenanalyse in Bezug auf Fertilität und Infertilität. Sie gelangten zu dem Ergebnis, dass kein Parameter eine sichere Unterscheidung ermöglicht. Vielmehr bleibt bei ausschließlicher Beurteilung mittels Samenanalyse eine Grauzone zwischen beiden Gruppen bestehen. Subfertile Männer weisen somit trotz der offensichtlichen Einschränkung ihrer Fertilität teilweise ein normales Spermogramm auf. Es ist daher davon auszugehen, dass andere Funktionen ihrer Spermatozoen gestört sind, welche mit der klassischen Samenanalyse nicht erfasst werden. So statieren Köhn und Haidl (2007) in ihrer Veröffentlichung, dass „25–30% der Männer mit Kinderwunsch reduzierte Spermatozoenfunktionen aufweisen, die sich mit dem Routinespermogramm nicht nachweisen lassen.“ Weiterhin liefert die klassische Samenanalyse keine Aussagen über die pathophysiologischen Vorgänge, welche zu Subfertilität geführt haben. Seit einigen Jahren konzentrieren sich daher die Untersuchungen auf die Rolle des programmierten Zelltods sowie die Rolle der Mitochondrien des Spermatozoons in der Genese der Sub- und Infertilität. Man hofft hierdurch auch neue therapeutische Ansätze zu erhalten oder den Erfolg einer künstlichen Befruchtung besser vorhersagen zu können.

Mit der Verbesserung der Überlebensaussichten von an Malignomen erkrankten Kindern und Jugendlichen hat ein weiterer Aspekt das allgemeine Interesse geweckt: Die Kryokonservierung von Spermatozoen und Oozyten vor potentiell fertilitätsschädigender Therapie erhält die Gameten über lange Zeiträume am Leben und ermöglicht es den Patienten nach Abschluss der Therapiemaßnahmen im Erwachsenenalter ihren Kinderwunsch zu verwirklichen und ein weitgehend normales Leben zu führen. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden muss eine gewisse Schädigung der Gameten nach Kryokonservierung in Kauf genommen werden. Die Erfassung der pathophysiologischen Vorgänge dieser Schäden ist ein erster Schritt zu deren Vermeidung. Es gibt Hinweise, dass neben einer physikalischen Zellschädigung auch durch Induktion von Apoptose die Zelle durch den Einfrier-Auftau-Vorgang beeinträchtigt wird (Oehninger et al., 2003; Paasch et al., 2003). Es sind zur genauen Charakterisierung weitere Studien notwendig, um die negativen Auswirkungen der Kryokonservierung auf Gameten bestmöglich zu reduzieren.

Im Folgenden werden einleitend die derzeit bekannten Vorgänge der Apoptose und Nekrose dargestellt mit besonderem Augenmerk auf die Rolle der Caspasen und des Mitochondriums.

Weiterhin wird auf die Bedeutung der Apoptose und der Mitochondriendysfunktion in der Genese der Subfertilität eingegangen. Zuletzt werden die Auswirkungen einer Kryokonservierung auf die Spermatozoen zusammengefasst.

2.1 Apoptose und Nekrose

Den Begriff Apoptose prägten erstmals Kerr, Wylie und Currie 1972 in ihrer wegweisenden Veröffentlichung über den programmierten Zelltod. Dieser Vorgang läuft in der Zielzelle nach einem festgelegten Programm ab und unterscheidet sich morphologisch und funktionell von der Nekrose. Nachdem durch aktivierte Todesrezeptoren oder zellinterne Einflüsse durch eine Kaskade von Proteasen, den Caspasen, der programmierte Zelltod ausgelöst wurde, kommt es schließlich zu einem Zerfall der apoptotischen Zellen in membranumschlossene Vesikel. Die umliegenden Zellen erhalten Signale, dass jene Zelle in Apoptose gegangen ist und phagozytieren sie. Das Besondere dabei ist, dass die Entfernung der apoptotischen Zelle ohne Exkretion von Zytokinen aus dem Zellinneren und ohne gewebschädigende Entzündungsreaktion erfolgt (Wyllie AH, 1997).

Nekrose entsteht, wenn eine starke Zellschädigung durch eine Noxe, wie Hypothermie oder Hypoxie eintritt und dadurch Defekte in der Zellmembran auftreten. Es kommt zum Einstrom von Wasser und extrazellulären Ionen in das Zellinnere, zu Schwellung und letztendlich Ruptur der Zellorganellen. Im Rahmen der Zellauflösung werden schließlich DNA-Endonukleasen aktiviert, welche eine DNA-Fragmentierung in verschieden große Stücke bewirken. Die Ausströme von Zytoplasma und lysosomalen Enzymen führen zu einer Gewebsschädigung und zu entzündlichen Prozessen (Majno et al, 1995).

2.2 Hauptsignalwege der Apoptose und Stellenwert der Caspasen

Eingeleitet wird die Apoptose über einen Todesrezeptor an der Zellmembran, über die Einwirkung von äußeren Stimuli auf das Mitochondrium oder durch Stresseinwirkung am endoplasmatischen Retikulum (Kroemer et al., 1998; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Welihinda et al., 1999). Das Hauptsystem in der Ausführung des apoptotischen Signals wird von den Caspasen gebildet, welche eine hierarchische Kaskade der Signaltransduktion bilden. Caspasen spielen eine fundamentale Rolle in der Apoptose. Sie sind Proteasen mit Aspartatspezifität (**cysteiny aspartate-specific proteinases**) und werden als inaktive Proenzyme exprimiert und durch Proteolyse oder Autoaktivierung aktiviert (Salvesen et al., 1999). Neben einer Prodomäne enthalten sie je eine große (20 kDa) und eine kleine Untereinheit (10 kDa). Durch proteolytische Abtrennung der Prodomäne und der

Zusammenlegung von zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten entsteht eine Heterotetramerstruktur mit zwei unabhängig voneinander arbeitenden katalytischen Zentren (Thornberry und Lazebnik, 1998) (Abbildung 3).

Basierend auf der Struktur ihrer Prodomäne und ihrer Funktion, besteht die Familie der Caspasen aus 15 Mitgliedern (Alnemri et al., 1996; Deveraux und Reed, 1999). Die Einteilung der Caspasen kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen, beispielsweise entsprechend phylogenetischen Gesichtspunkten oder entsprechend der Länge ihrer Prodomäne. Aus letzterer Einteilung ergeben sich drei Caspasen-Gruppen: Die erste Gruppe beinhaltet Caspasen mit einer großen Prodomäne (Caspase-1, Caspase-4, Caspase-5, Caspase-12, Caspase-13 und Caspase-14), welche eine Rolle in Entzündungsvorgängen spielen und Entzündungs-Caspasen genannt werden (Deveraux et al., 1998). Die Caspasen der zweiten Gruppe weisen ebenfalls eine lange Prodomäne (> 90 Aminosäuren) auf, entweder mit einer DED- (death effector domain) (Caspase 8 und 10) oder einer CARD-Domäne (caspase-recruitment domain) (Caspase 9 und 2). Diese Caspasen werden auch als Initiatorcaspasen bezeichnet. Caspasen mit einer kurzen Prodomäne sind Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) (Deveraux et al., 1997; Deveraux et al., 1998; Roy et al., 1997; Xu et al., 2001).

Die DD-Domäne der Initiatorcaspase 8 dient der komplementären Bindung an das Adaptermolekül FADD (Fas-associated protein with death domain). Dieses koppelt an den aktivierten Todesrezeptor (FasL) und überführt hierdurch die Initiatorcaspase 8 in die aktive Form (Nicholson DW und Thornberry, 1997) (Abbildung 4).

Im nächsten Schritt werden die sogenannten Effektorcaspasen aktiviert (Caspase 3, 6 und 7). Nach Aktivierung der Effektorcaspase 3 wird unumstößlich der programmierte Zelltod ausgeführt (Marks et al., 1998). Es kommt zu den bekannten Erscheinungen wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Phosphatidylserinexternalisation und Abbau der Zellstrukturproteine.

Die Caspasen sind am Golgi-Apparat (Caspase 12), an den Mitochondrien (Caspase 9, 3 und 2), sowie an der Kernmembran, am Kern und im Zytoplasma lokalisiert (Bratton SB und Cohen GM, 2001). Fällt eine Caspase aus, so kann in der Kaskade eine andere eingreifen und ersetzend die Funktion übernehmen (Zheng et al., 2000). Aktivatoren und Inhibitoren modulieren das Signal durch Beschleunigung oder Abstoppen des Signals (Reed, 2000).

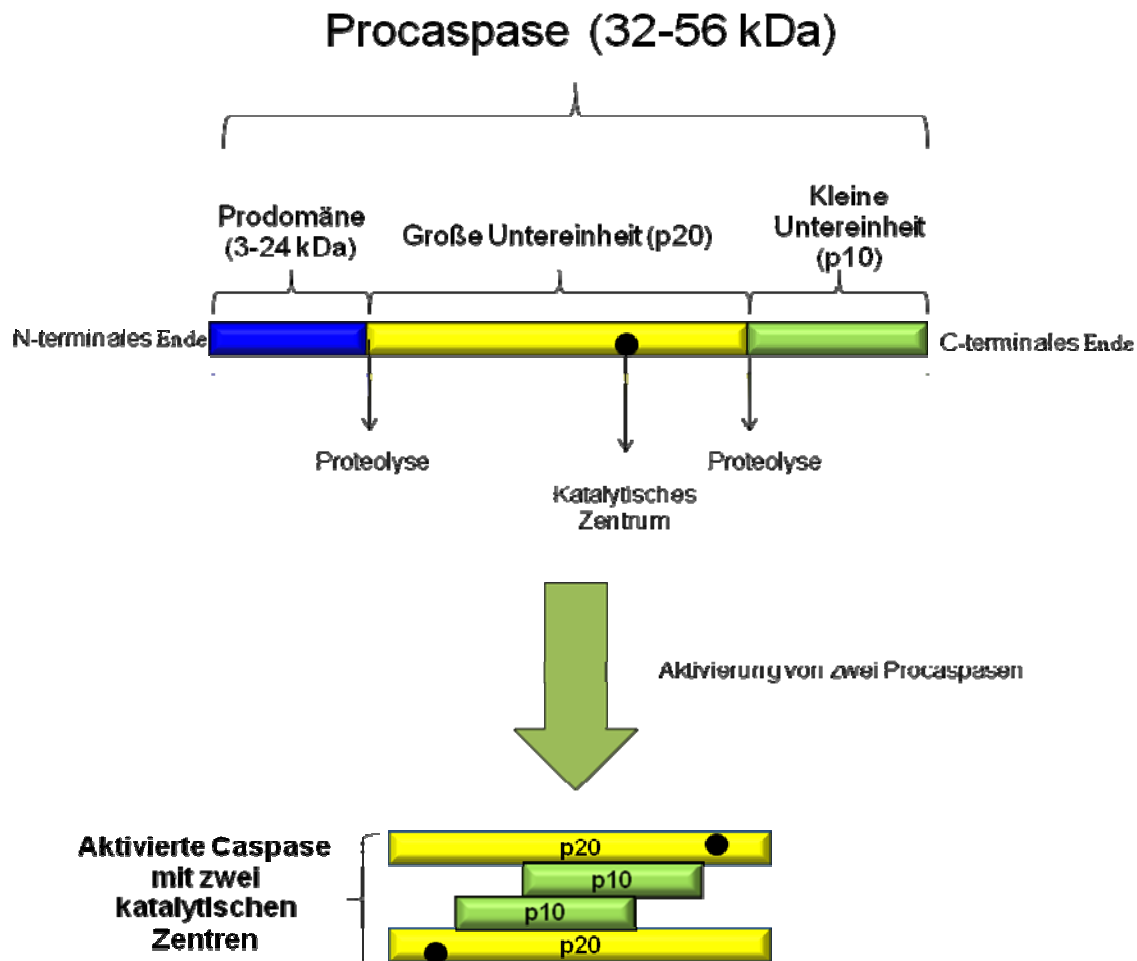


Abbildung 3: Schematische und vereinfachte Darstellung des Aufbaus einer Procaspase mit Prodomäne, großer und kleiner Untereinheit. Prozessierung von zwei Procaspasen durch Proteolyse in aktivierte Caspase mit zwei katalytischen Zentren (nach Chowdhury I et al., 2008).

Die drei erwähnten Hauptsignalwege der Apoptose werden im Folgenden ausführlicher dargestellt.

2.2.2 Die extrinsisch vermittelte Apoptose

Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung spezifischer Liganden an membranständige Todesrezeptoren ausgelöst. Diese Rezeptoren gehören der TNF-Rezeptor-Familie (Tumornekrosefaktor) an. Sie sind charakterisiert durch eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne (Smith et al, 1994), sowie eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD) (Tartaglia et al, 1993). Zu den am meisten charakterisierten Todesrezeptoren gehört Fas (Synonyme sind CD95 und Apo1) und TNFR1 (auch als p55 oder CD120a bezeichnet). Sie werden durch den Fas-Liganden bzw. den TNF- α aktiviert (Vassalli et al, 1992) (Nagata et al, 1992). Die Bindung des Fas-Liganden an seinen Rezeptor löst eine Konformationsänderung aus und

ermöglicht die Ankopplung des FADD-Proteins (Fas-associated Death Domain adapter protein) an die zytoplasmatische Todesdomäne des Rezeptors (Ashkenazi et al, 1998) und bildet damit den „death inducing signaling complex“ DISC. (Denecker et al, 2001). FADD weist neben einer sogenannten „death domäne“ (Todesdomäne, DD) über die es an die Todesdomäne des Rezeptors bindet, eine DED (death effector domain) auf. Dies ermöglicht mittels homophiler DED-DED-Bindung die Rekrutierung der Initiatorcaspase Procaspase-8 und darauffolgend ihre Aktivierung. Über eine Signalkaskade werden nun die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (Fernandes-Alnemri et al, 1996) (Abbildung 4).

In einigen Zellarten (als Zelltyp II bezeichnet) reicht die Generierung des DISC nicht aus, um ausreichende Mengen an aktiver Caspase-8 und im Weiteren ausreichende Mengen an Effektorcaspasen zu generieren. In diesen Zelltypen ist zur Auslösung des programmierten Zelltodes die mitochondriale Beteiligung Voraussetzung. Caspase-8 überführt dabei das Protein Bid in seine aktive Form, welches in das Mitochondrium diffundiert und die Freisetzung von Cytochrom c induziert (Luo X et al, 1998) (Li H. et al, 1998).

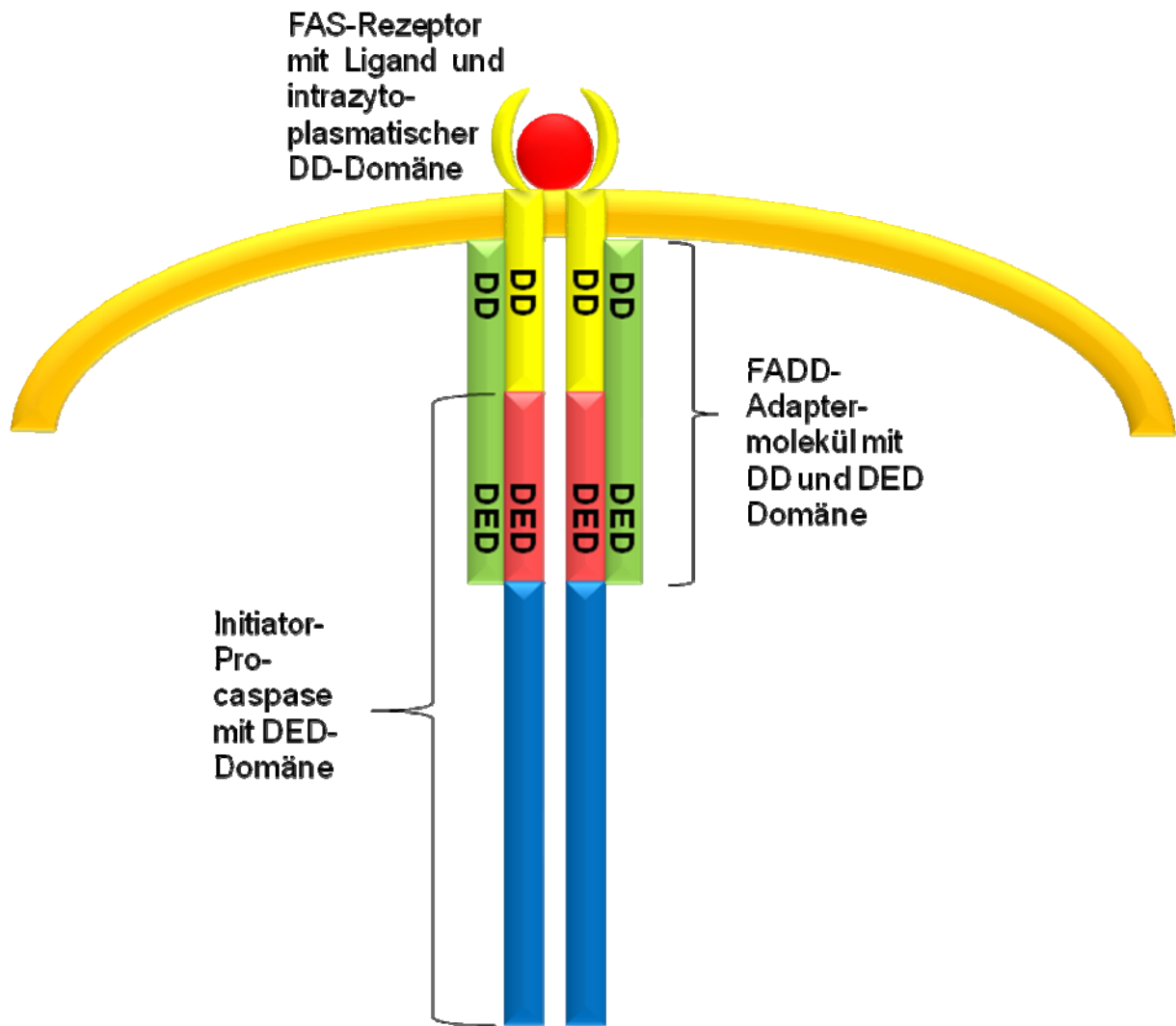


Abbildung 4: Aktivierung der Initiatorcaspase mittels FADD-Adaptermolekül im extrinsischen Apoptosesignalweg (nach Nicholson DW und Thornberry, 1997).

2.2.3 Die mitochondrial (intrinsisch) vermittelte Apoptose

Mitochondrien sind Organellen mit zwei gut definierten Kompartimenten: Der Matrix, umgeben von der inneren Membran und dem intermembranösen Raum, welcher von der äußeren Membran begrenzt wird. Die innere Membran ist zu multiplen Cristae gefaltet, welche die Oberfläche deutlich vergrößern. Es enthält den Proteinkomplex der Atmungskette, die ATP-Synthetase und den Adenin-Nukleotid-Translokator. Die innere Membran ist im Normalzustand fast undurchlässig und erlaubt hierdurch der Atmungskette einen elektrochemischen Gradienten ($\Delta\psi_m$) herzustellen. Dieser Gradient ist die Voraussetzung für die Generierung von ATP aus ADP. Nur 13 Untereinheiten der Atmungskette werden durch das mitochondriale Genom kodiert, während der Rest (99%) durch die nukleäre DNA kodiert wird.

Nach Einwirkung von bestimmten Stimuli, wie zytotoxischer Stress, Hitzeschock, DNA-Schädigung, Schäden an mitochondrialer DNA (Nakada et al., 2006), Überalterung, Einfluss von Toxinen (Ceramide, Ganglioside), oxidativer Stress (ROS), NO, virale Proteine oder proapoptische Proteine der Bcl-2 Familie, wird der programmierte Zelltod direkt am Mitochondrium ausgelöst (Kroemer und Reed, 2000).

Der apoptotische Stimulus führt zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zu einer Freisetzung von Cytochrom c, Procaspasen und dem Apoptosis-inducing factor. Nach derzeitigem Wissensstand spielt hierbei das proapoptische Protein Bax (aus der Familie der Bcl-2-Proteine) eine wichtige Rolle. Es bildet zusammen mit dem Protein Bid und mit Lipiden große Poren in der äußeren Mitochondrienmembran aus. Hierdurch können alle löslichen Proteine der intramitochondrialen Matrix durch diffundieren, was den Zusammenbruch des Membranpotentials zur Folge hat (Eskes et al, 2000).

Die entscheidende Rolle in der Ausführung der mitochondrialen Apoptose spielt das Cytochrom c, welches Bestandteil der Atmungskette ist. Durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wird es in das Zytoplasma freigesetzt (Kroemer et al, 1998). Es formt einen hochmolekularen zytoplasmatischen Komplex, welcher als Apoptosom bezeichnet wird (Acehan et al., 2002; Zou et al., 1999). Das Herzstück des Apoptosoms besteht aus dem Protein Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), welches eine N-terminale CARD-Domäne aufweist, die im ruhenden Status durch die C-terminale WD40 Domäne autoinhibiert wird.

Cytochrom c bindet an die WD40 Domäne und führt zu einer Konformationsänderung mit Entfaltung der zuvor verborgenen CARD-Domäne. Das entfaltete Apaf-1 assoziiert Bindung von dATP mit sechs weiteren Apaf-1 Proteinen und bildet hierdurch den Apoptosomkomplex, an den nun Procaspase 9 mittels homophiler CARD-CARD-Bindung andocken kann (Acehan et al., 2002; Bao et al., 2005). Procaspase 9 wird über die Bildung von Dimeren daraufhin aktiviert (Li P. et al, 1997). Aktivierte Caspase 9 ist nun in der Lage Caspase 3 über limitierte Proteolyse zu aktivieren, welches teilweise ebenfalls in den Komplex integriert ist (Bratton et al., 2000) (Abbildung 6). Aktivierte Caspase 3 geht seiner Funktion als zentrale Effektorcaspase nach und löst eine Aktivierungskaskade nachgeschalteter Caspasen aus (Caspase-7, -2,-6, -8 und -10) (Slee E.A. et al, 1999).

Neben der Aktivierung von Apaf-1, bewirkt Cytochrom c die direkte Oxidation von innenseitig-membranständigem Phosphatidylserin (PS) mit deren konsekutiver Externalisation (Kagan et al., 2000).

Apoptose führt zudem zu einer Freisetzung des AIF (apoptosis inducing factor) (Joza et al., 2001), einer Oxidoreduktase der inneren mitochondrialen Membran. Durch Proteolyse entsteht das lösliche AIF Protein. Die Freisetzung scheint caspasenunabhängig zu sein, der genaue Mechanismus noch unklar (Arnoult et al., 2003). Das lösliche AIF diffundiert in den Nukleus, wo es zu Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation in 50 kb Fragmente führt (Ye et al., 2002).

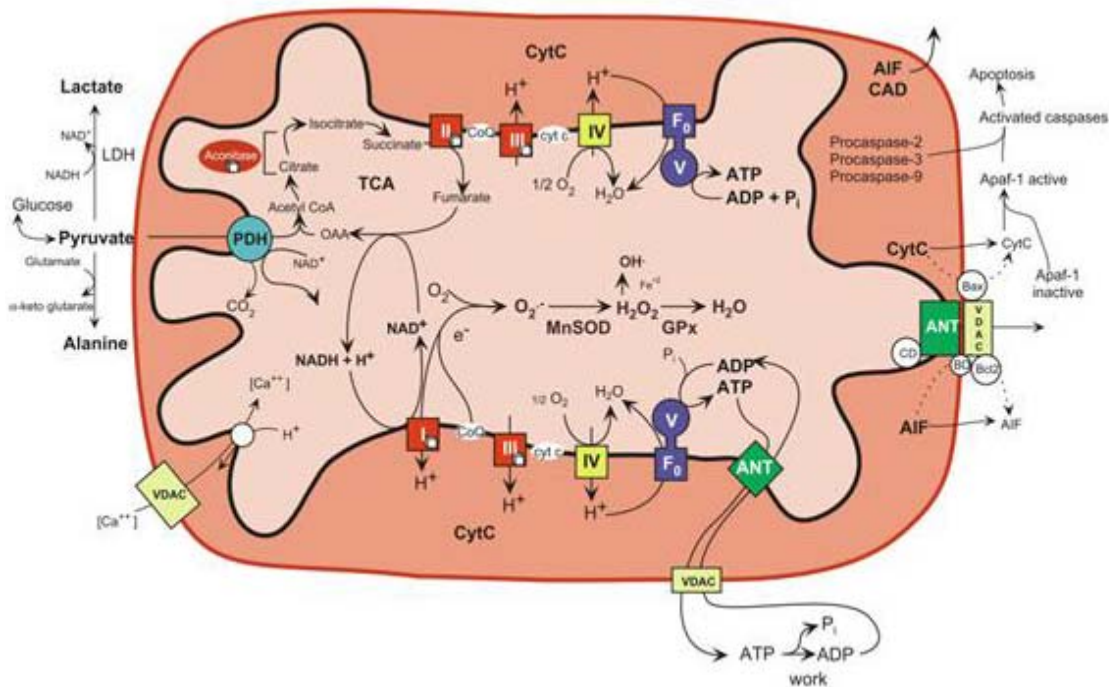


Abbildung 5: Darstellung der wichtigsten Funktionen eines Mitochondriums von der Generierung von ATP im Rahmen der oxidativen Glykolyse über die Generierung von freien Sauerstoffradikalen bis hin zur entscheidenden Regulation in der Initiierung der Apoptose. (Nach Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D.C. 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue):D823-D828. URL: <http://www.mitomap.org>.)

2.2.4 Die stressvermittelte Apoptose

Die Auslösung der sogenannten stressvermittelten Apoptose erfolgt durch Stimuli am endoplasmatischen Retikulum. Dies können Calciumionophore sein, welche den intraretikulären Calciumspiegel absenken, Glykolyseinhibitoren, chemische Toxine und eine Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen (Welihinda et al., 1999; Kaufman et al., 2002; Ma Y et al., 2002). Anhaltende Stresseinwirkung auf das endoplasmatische Retikulum führt dann zu einer Aktivierung von Pro-Caspase 12 (Nakagawa et al, 2000). Caspase-12 überführt

nun über Proteolyse unabhängig von Cytochrom c Procaspase-9 in seine aktive Form und löst damit die Apoptose aus (Morishima et al, 2002; Rao R.V. et al, 2002).

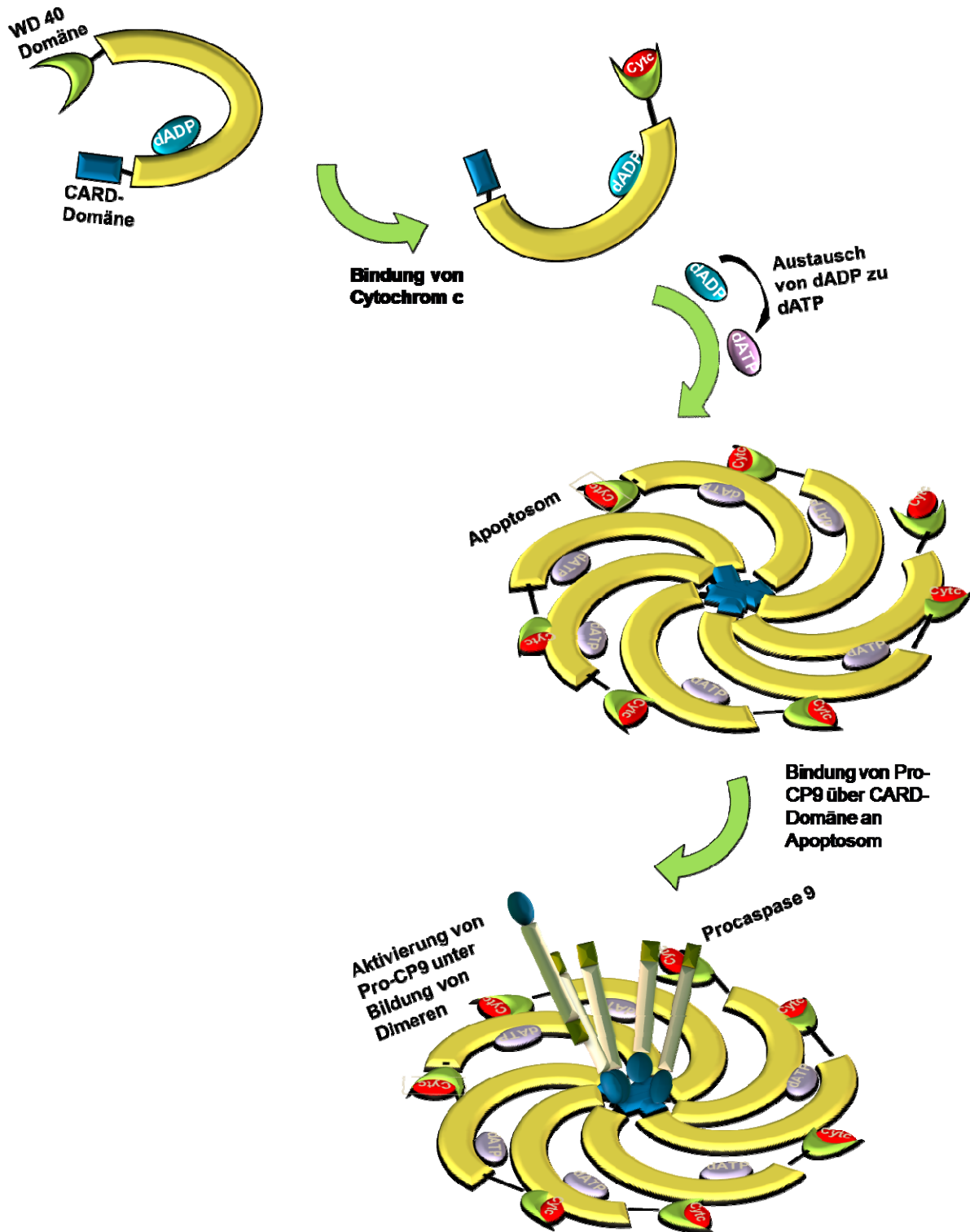


Abbildung 6: Entstehung des Apoptosomkomplexes und Aktivierung von Procaspase-9. Einzelheiten siehe Text (nach Kim H et al, 2005 und Acehan et al., 2002).

2.2.5 Gemeinsame Endstrecke der Apoptose

Die Auslösung der Apoptosesignalkaskade mündet in die terminale Aktivierung der Effektorcaspasen, an deren Anfang die Caspase-3 steht. Ihre Aktivierung bewirkt die letztendliche Ausführung des Apoptosesignals und führt zum Tod der Zelle, sobald eine bestimmte Masse aktivierten Enzyms in der Zelle vorliegt (Marks et al, 1998).

2.2.5.1 DNA-Fragmentation

Internukleosomale DNA-Fragmentierung gehört zu den späten Erscheinungen der Apoptose und wurde von Wyllie zuerst beschrieben (1980). Über den Ablauf und die Initialisierung des Vorgangs ist bekannt, dass die aktive Form der Effektorcaspase 3 zu einer Aktivierung einer DNase führt, welche im Rahmen der Apoptose zu internukleosomalen Doppelstrangbrüchen und zur Ausbildung von 180-200 bp DNA-Fragmenten führt (Liu et al, 1998). Diese DNase liegt im Zellkern in einer inaktiven Form als „DNA fragmentation factor“ (DFF) vor und setzt sich aus einer inhibitorischen Untereinheit DFF45 (45kD) und der Nuklease DFF40 (40kD) zusammen (Enari et al, 1998). Aktivierte Caspase-3 führt zu einer proteolytischen Spaltung des DFF mit Freisetzung der aktivierten DFF40/CAD Nuklease (Sakahira et al, 1998; Wolf et al, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Apoptose-induzierte DNA Spaltung in zwei Stadien abläuft: Zunächst wird die DNA in 50 kb Stücke gespalten, und erst im Anschluss findet die Fragmentierung in 180-200 bp Stücke statt (Oberhammer et al., 1993). Dies entspricht zunächst der Aufspaltung in Chromatinschleifen und später internukleosomaler DNA-Fragmentierung (Lagarkova et al., 1995).

2.2.5.2 Chromatinkondensation

Zu den späten Erscheinungen der Apoptose gehört die Chromatinkondensation. Es sind drei Signalwege beschrieben worden, welche zu einer Chromatinkondensation führen können. Ein Caspase-3 unabhängiger Signalweg, welcher über den mitochondrialen AIF (Apoptosis inducing factor) vermittelt wird (Susin et al., 1999), ein Caspase-3 abhängiger Signalweg, welcher durch das Protein Acinus ausgelöst wird (Sahara et al., 1999), sowie ein Caspase-3 abhängiger Signalweg, welcher zur internukleosomalen DNA-Fragmentation führt und über den aktivierten Faktor DFF40 ausgelöst wird (Liu et al., 1998).

2.2.5.3 Phosphatidylserinasymmetrie

Zellmembrane lebender Zellen weisen eine Phosphatidylserinasymmetrie auf, mit hauptsächlichlicher Verteilung der Phosphatidylserine an der Innenmembran der Zelle. Diese Verteilung wird aktiv durch eine Phosphatidylserintranslokase, der Aminophospholipidtranslokase, aufrechterhalten (Beyers et al, 1999). Zu den relativ frühen Merkmalen der Apoptose gehört das Erscheinen von Phosphatidylserinen an der Membranaußenseite (Verhoven et al, 1995) und ist gleichzeitig ein markantes Phagozytosesignal für Makrophagen (Fadok et al, 1999). Es wird angenommen, dass Cytochrom c, welches im Rahmen der intrinsischen Apoptose sowie im Rahmen der extrinsischen Apoptose in Typ II Zellen freigesetzt wird, eine Oxidation der Phosphatidylserine bewirkt und dadurch die Funktion der Aminophospholipidtranslokase hemmt (Matsura et al, 2005; Bayir et al, 2006).

2.2.5.4 Der Abbau des Zellgerüsts

Viele Strukturproteine werden im Rahmen der Apoptose gespalten und damit inaktiviert. Aktin wird beispielsweise durch aktivierte Caspase 3 (Synonym CPP-32/apopain) gespalten (Mashima et al, 1997; Ayala-Grosso CA, 2006). Aktin ist ein Bestandteil der Mikrofilamente, welche die Zellstruktur aufrechterhalten. Weitere Proteine sind bekannt, welche gespalten und inaktiviert werden und eine Rolle in der Aufrechterhaltung, Organisation und Aufbau des Zytoskeletts spielen. Beispiele hierfür sind Fodrin, Gelsolin, Spektrin, β -Katenin u.a. (Martin SJ et al, 1995).

2.3. DNA in Spermatozoen

2.3.1 Nukleäre DNA

In somatischen Zellen bildet die nukleäre DNA mit Histone Komplexe und führt hierüber zu der typischen Chromosomenstruktur. Die Histonproteine lagern sich zu einem oktameren Komplex zusammen, um den sich der DNA-Strang auf einer Länge von etwa 200 Nukleotiden herum windet. Dieser Komplex wird als Nukleosom bezeichnet. In einem weiteren Verdichtungsschritt lagern sich die Nukleosomen zu Spulen zusammen, den sogenannten Solenoiden. Diese haften in bestimmten Intervallen an der nukleären Matrix und bilden hierdurch DNA-Schleifen. Die Nukleosomen sind dabei spiralförmig unter Bildung einer Röhre angeordnet (Agarwal und Said, 2003, Abbildung 7).

Die Kondensationsstruktur der Germinalzellen ist im Gegensatz hierzu anders aufgebaut und wandelt sich im Lauf der Entwicklung der Spermatozoen: Im Keimepithel der Tubuli seminiferi erfolgt die Bildung befruchtungsfähiger Spermatozoen. Während der Spermatogenese durchlaufen die Keimzellen drei Entwicklungsphasen: Mitose, Meiose und letztlich Spermiogenese. Eine der Anforderungen an die DNA von Spermatozoen ist es, das Erbgut des Menschen einerseits so kompakt zu konservieren, dass es beim Transport vor Schäden geschützt ist, andererseits muss die DNA bei der Verschmelzung von Eizelle und Spermium rasch zur Verfügung gestellt werden können. Dies wird dadurch gelöst, dass in der späten haploiden Phase der Spermatogenese über 85% der Histone durch Protamine ausgetauscht werden (Hud et al., 1995). Die protamingebundene DNA lagert sich dabei in Form konzentrischer, dreidimensionaler Kreise aneinander, die man auch als "Doughnut " bezeichnet. Morphologisch führt dies zu einer starken Kondensation des Zellkerns (Ward und Coffey, 1991, Ward et al., 2010; Abbildung 7).

Protamine sind Kernproteine. Indem das zentrale Polyargininsegment des Protamins an die DNA bindet, bildet die N- und C-terminalen Enden untereinander Disulfidbrückenbindungen aus. Der Austausch findet schrittweise statt. Durch eine Serie von DNA-Strangbrüchen (McPherson und Longo, 1993) wird die Superhelixstruktur aufgelöst (Ward et al, 1989). Schließlich werden die Histone über einen weiteren Zwischenschritt (Braun, 2001) durch Protamine ausgetauscht.

Viele Faktoren können zu Schäden an nukleärer DNA führen und hierdurch zu der Infertilität des Mannes beitragen. Hauptsächlich sind vier Hauptursachen zu nennen: Fehler in der Protaminisation, Apoptose, oxidativer Stress und Genschäden (Agarwal und Said, 2003; Sharma et al, 2004; Lewis und Aitken, 2005; Shafik et al, 2006). Da keine DNA-Reparaturenzyme in ejakulierten Spermatozoen existieren und die Eizelle nur geringe Anteile von DNA-Schäden reparieren kann, sind DNA-Schäden in Spermatozoen irreversibel (Ahmadi und Ng, 1999).

DNA-Schäden in Spermatozoen wurden mit späteren Fehlbildungen (Fraga et al., 1991) und der Induktion von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Sorahan et al., 1997b), daher ist es wichtig diese Schäden zu erfassen und therapeutische Maßnahmen zu ergreifen.

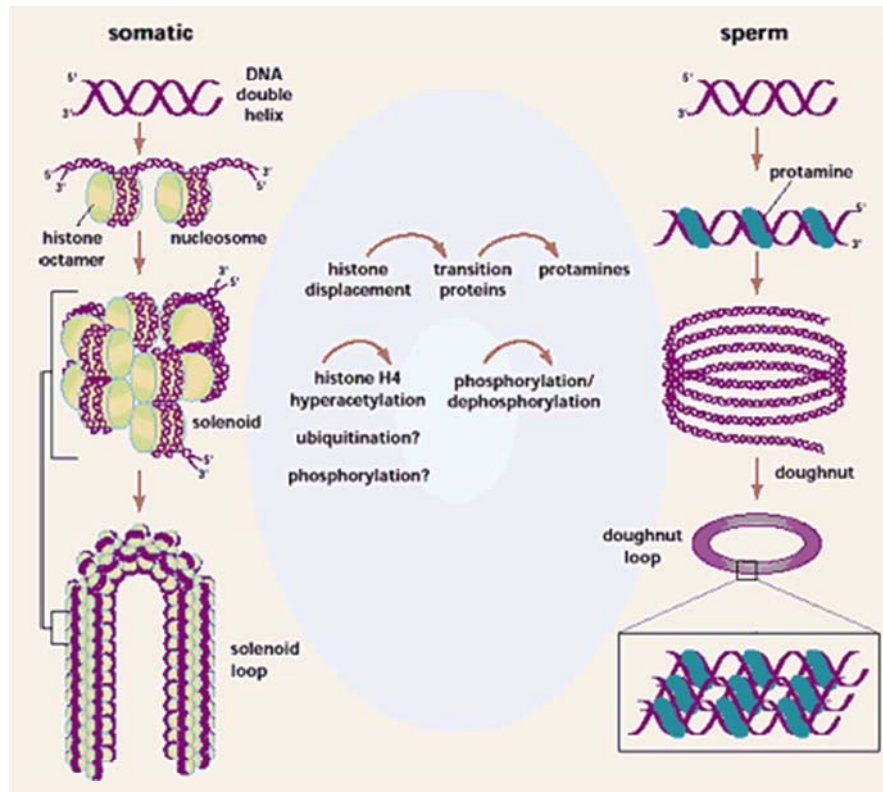


Abbildung 7: Gegenüberstellung des Chromatinaufbaus in somatischen Zellen (links) und Spermatozoen (rechts).

In somatischen Zellen ist die DNA zweifach um Histone gewickelt und wird in einem zweiten Schritt zu Spulen, den sogenannten Solenoiden gewunden. Diese bilden wiederum Schleifen und führen hierdurch zu einer deutlichen Kondensation der DNA. Eine höhere Kondensationsstufe wird in haploiden Spermatozoen erreicht durch den Ersatz von Histonen durch andere Kernbindungsproteine, den Protaminen. Hierdurch entsteht eine Spiralstruktur, welche auch einem Donut ähnelt. *[mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: [Nature Genetics] (Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. Nat. Genet. 2001 Mai;28(1):10-12.), copyright (2001)]*

2.3.2 Mitochondriale DNA

Zwei Membranen umhüllen das Mitochondrium, eine innere und eine äußere. Letztere ist durchlässig für größere Moleküle durch unspezifische Porin-Kanäle. Im Gegensatz hierzu ist die vielfach gefaltete innere Membran in ihrer Durchlässigkeit viel selektiver. Dies ist die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials, das für die regelrechte Funktion der Enzyme der Atmungskette unabdingbar ist (O'Connell et al, 2002a). Die wichtigste Funktion der Mitochondrien im Spermium ist die Bereitstellung des Energieträgers ATP, welches u.a. für die Vorwärtsbewegung gebraucht wird.

Das Mitochondrium verfügt über eine eigene DNA (mtDNA), welches sich im Falle von Spermatozoen in den Mitochondrien im Mittelstück des Spermatozoon befindet. Die mitochondriale DNA liegt in kreisförmiger, doppelsträngiger Form vor und besteht aus etwa 16500 Basenpaaren (Kao et al., 1998). Es kodiert zwei ribosomale RNA's, 22 Transfer-RNA und 13 Polypeptide der Atemkette (Abbildung 8).

Anders als bei nukleärer DNA ist es nicht durch die Windung und Verdichtung durch Histone bzw. Protamine geschützt. Außerdem kann jede Mutation durch das Fehlen von Intron-Bereichen zu Funktionsausfällen und Defekten führen. Weiterhin fehlt der mitochondrialen Transkription ein Reparatursystem und die Replikation findet viel schneller als in der nukleären DNA statt. Hierdurch liegt die Mutationsrate etwa 10-20 Mal höher als in nukleärer DNA.

2.3.2.1 Relevanz der mitochondrialen DNA für Spermatozoen

Deletionen des mitochondrialen Genoms als Ursache für mitochondriale Dysfunktion treten zunehmend in den Vordergrund, dabei insbesondere ihre Beziehung zur Spermatozoenmotilität. Mitochondriale Deletionen beeinträchtigen vor allem die Fähigkeit der Spermien den Energieträger ATP über die Atmungskette zu synthetisieren. Negative Korrelationen zwischen einem hohen Anteil von mitochondrialen Deletionen und der Spermatozoenmotilität sind beschrieben (Ruiz-Pesini et al., 1998; O'Connell et al.; 2002b).

Sechs Komplexe der Atmungskette werden für die einwandfreie Funktion der Atmungskette benötigt (Ruiz-Pesini et al, 1998). Alle außer Komplex II werden durch das mitochondriale Genom kodiert, Komplex II wird durch das nukleäre Genom kodiert und nach der Synthese in die innere Membran des Mitochondriums eingebaut (O'Connell et al, 2003). Damit sind Funktionseinschränkungen der Atmungskette in erster Linie auf Deletionen des mitochondrialen Genoms zurückzuführen.

Zwei Arten von Deletionen sind bekannt: von größerem und von geringerem Ausmaß. Deletionen großen Ausmaßes werden auch bei fertilen Männern gefunden und sind häufig mit einer erniedrigten Spermatozoenmotilität assoziiert (Kao et al, 1998; St John et al, 2000b; St John et al, 2001; O'Connell et al, 2002b).

Deletionen von geringerem Ausmaß sind imstande ebenfalls weitreichende negative Konsequenzen für die Funktionsfähigkeit der Atmungskette zu bewirken. So können beispielsweise Deletionen von nur zwei Basenpaaren zu einer Entstehung eines Stop-Codons führen und hierdurch die Produktion von wichtigen Proteinen der Atmungskette abbrechen

lassen (Thangaraj et al, 2003). Dennoch ist bisher keine mitochondriale Deletion als Kennzeichen von eingeschränkter Spermienqualität gefunden worden (St John et al, 2001).

Spermatozoen mit einem hohen Anteil an mitochondrialen Deletionen können die Meiose nicht abschließen und werden durch Apoptose entfernt. Da auch bei mitochondrialen Deletionen ein Teil der Spermatozoen weniger Deletionen aufweist als andere, bleiben diese in der Lage ihre Reifung zu Spermien abzuschließen (Nakada et al., 2001). Oligospermie und Asthenozoospermie können also durch Defekte der Atmungskette sowie durch meiotische Arretierung und gesteigerte Apoptose während der Spermatogenese bedingt sein (Nakada et al., 2006). Die Akkumulation von Deletionen mitochondrialer DNA in Spermatiden führt zu einer Funktionseinschränkung der Atmungskette. Dies wiederum resultiert in einer reduzierten Bereitstellung von Energieträgern und dadurch zu einem meiotischen Arrest während der Spermatogenese. Hayashida et al. (2009) wiesen eine Erhöhung von Spermatozoen im pachytänen und diplotänen Stadium und eine Reduktion in zygotänen Nuklei mit fragmentierten und degenerierten Chromosomen nach.

Untersuchungen an Spermatozoen infertiler Männer ergaben einen erhöhten Anteil von Deletionen der mitochondrialen DNA im Gegensatz zu denen fertiler Männer (St John et al, 2000b; Kao et al, 1998).

Im Blickpunkt des Interesses befindet sich auch die Kopienzahl von mitochondrialer DNA, welche durch einen von nukleärer DNA kodierten mitochondrialen Transkriptionsfaktor A reguliert wird (May-Panloup et al, 2003). Eine erhöhte mtDNA Kopienzahl korreliert mit einer erniedrigten Spermienqualität, was auf die mögliche Rolle der mtDNA-Kopienzahl in der Pathogenese der männlichen Infertilität hinweisen könnte (May-Panloup et al, 2003).

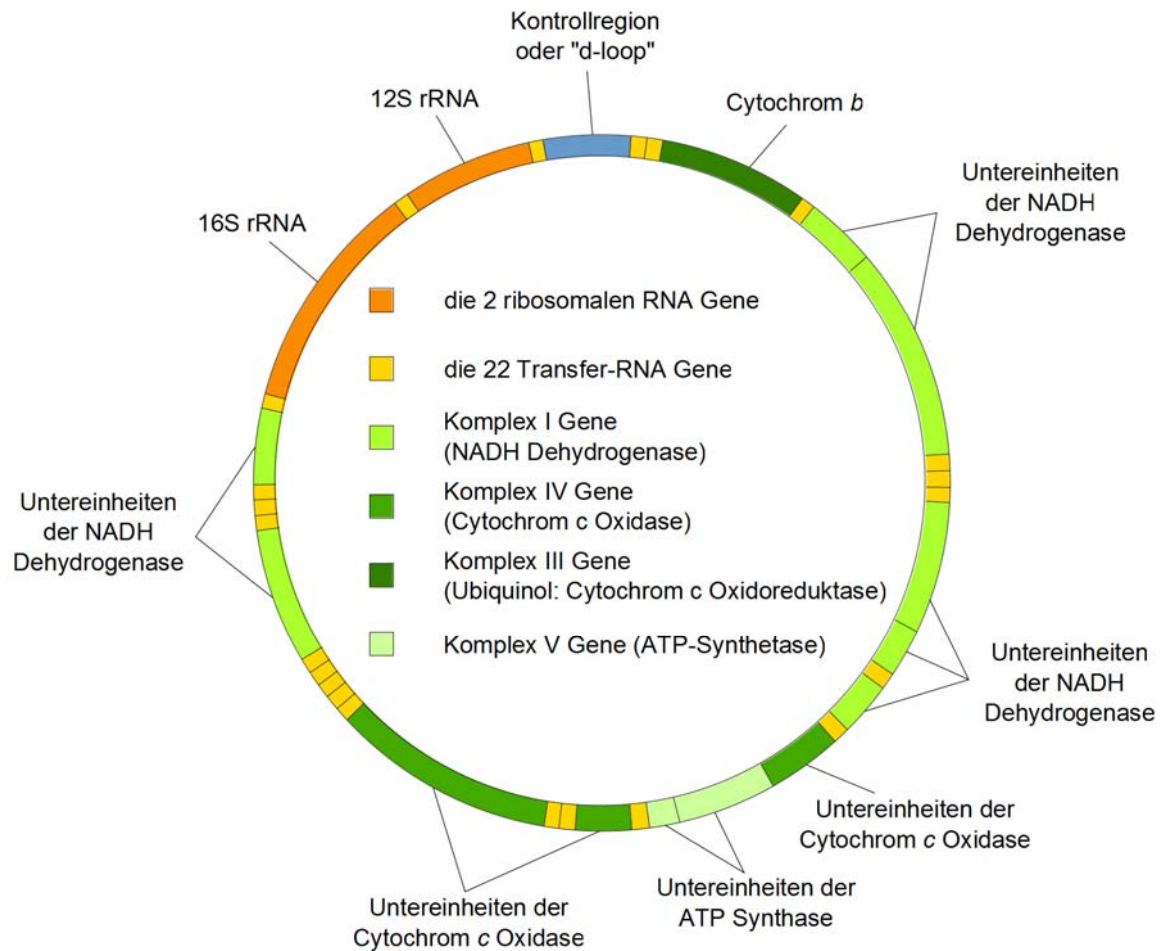


Abbildung 8: Grafische Darstellung des mitochondrialen Genoms und seiner kodierenden Proteine. (Modifiziert nach von Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D.C. 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue):D823-D828.URL: <http://www.mitomap.org> und http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Mitochondrial_DNA_it.png.)

2.2 Die Bedeutung der Apoptose in Spermatozoen

In der Spermatogenese kommt der Apoptose eine wichtige Rolle in der Homöostase der Gametogenese zu. Überschüssige Germinalzellen werden durch Apoptose beseitigt, um einen relativen Überschuss von Germinal- zu Sertolizellen zu verhindern (De Rooij und Lok, 1987; Rodriguez et al, 1997; Blanco-Rodriguez, 1998). Die Apoptose wird hierbei über den Todesrezeptor Fas übermittelt (Lee et al, 1997).

Viele Untersuchungen sind über Art und Weise der Ausprägung verschiedenster Parameter der Apoptose in ejakulierten Spermatozoen unternommen worden. Hierbei konnten alle Merkmale der Apoptose, wie sie für somatische Zellen beschrieben worden sind, auch für das

ejakulierte Spermatozoon charakterisiert werden. Zu nennen wären DNA-Fragmentation (Sun et al., 1997), Schrumpfung der zellulären Organellen und Phosphatidylserinexternalisation, sowie ein Zerfall der Zelle in membranumschlossene Vesikel (Zeiose) (Baccetti et al., 1996). Zudem sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, in denen Caspasen in ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen wurden. Ihre Verteilung liegt kompartimentspezifisch vor. So finden sich Caspase-8, -1 und -3 vor allem in der postakrosomalen Region, während Caspase-9 ausschließlich im mitochondrienreichen Mittelstück zu finden ist (Weng et al., 2002; Paasch et al., 2004; Taylor et al., 2004; Wang et al., 2003; Wuendrich et al., 2006).

In menschlichen ejakulierten Spermatozoen wird das Vorliegen des Fas-vermittelten Signalweges (Typ-I Apoptose) kontrovers diskutiert. So bestätigte sich in einer aktuellen Studie (Perticarari et al., 2008) der frühere Nachweis von Fas-Rezeptoren auf der Oberfläche von Spermatozoen nicht (Grunewald et al., 2001; Sakkas et al., 1999). Selbst bei Vorliegen des Fas-Rezeptors wird seine Funktionsfähigkeit in Frage gestellt. Die Inkubation von Spermatozoen mit einem Fas-Liganden hatte keine signifikante Caspasenaktivierung zur Folge (Grunewald et al., 2005c). Dies deutet darauf hin, dass die rezeptorvermittelte Apoptose in Spermatozoen keine relevante Funktionsfähigkeit aufweist. Der Nachweis von Fas-Rezeptoren auf ejakulierten Spermatozoen könnte hinweisend auf die sogenannte „abortive Apoptose“ sein (Sakkas et al., 1999b).

Sakkas et al. (1999b) prägten den Begriff einer „abortiven Apoptose“. Sie postulierten, dass einige Spermatozoen mit dem Todesrezeptor Fas für Apoptose markiert werden, diese jedoch nicht vollständig ausgeführt wird, also eine abortive Form der Apoptose vorliegt. Möglicherweise wurden zu viele markiert, als dass der Ligand an die Rezeptoren binden kann, oder es liegt eine Störung der Signalüberleitung vor.

Von der Apoptose ist eigentlich bekannt, dass bei Auslösung des Signals mit Aktivierung von Effektorcaspasen ein unwiderruflicher Prozess eingesetzt hat, der nicht aufzuhalten ist. Abweichungen in ejakulierten Spermatozoen von diesem Prozess können zwei Ursachen haben: Infertile Männer könnten primär nicht genügend Spermatozoen produzieren, um die Sertolizellen zu einer Fas-Produktion zu aktivieren oder es liegt ein Defekt in der Aktivierung des Fas-vermittelten Signalweges vor, so dass nur eine Teilaktivierung zustande kommt (Agarwal und Said, 2003).

Eine weitere Hypothese schlagen Blanco-Rodriguez und Martinez-Garcia (1999) vor. Sie beobachteten, dass in der Spermatogenese von Ratten Apoptoseproteine, wie Caspase-1, p53

und andere auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt sind. Möglicherweise liegt dem Nachweis von Markern der Apoptose in ejakulierten Spermatozoen ebenfalls ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde. Daher postulierten sie, dass sich in morphologisch auffälligen Spermatozoen durch Entwicklungsfehler Apoptoseproteine in zytoplasmatischen Droplets angereichert haben könnten.

Der mitochondrial vermittelte apoptotischen Signalweg ist im Gegensatz zu dem rezeptorvermittelten Weg gut dokumentiert und in seiner Relevanz bei ejakulierten Spermatozoen etabliert. Nach Einwirkung von zellulärem Stress durch Kryokonservierung, oxidativem Stress, Schäden an mitochondrialer DNA wird der programmierte Zelltod ausgelöst (Oehninger et al., 2003; Paasch et al., 2003).

Der Typ-II Induktor Betulinsäure vermochte einen signifikanten Anstieg von Caspase-9 und -3 bewirken (Grunewald et al., 2005c; Paasch et al., 2004b). Perticarari et al. (2008) untersuchten das Potential von Mitochondrien in Spermatozoen eine Typ-II Apoptose zu induzieren und kamen zum Schluss, dass sie außergewöhnlich sensibel auf spezifische Agonisten der mitochondrial vermittelten Apoptose reagieren.

2.3 Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermatozoen

Die Kryokonservierung von Spermatozoen führt zu Schäden an der Zellmembran (Alvarez und Storey, 1993, Hammadeh et al., 1999), Schädigung der Akrosomenstruktur (Hammadeh et al., 2001) und Abnahme der Motilität (Critser et al., 1988).

Der Hauptgrund für das Auftreten zellulärer Schäden ist die Bildung von Eiskristallen im Zytoplasma. Dadurch wird dem umgebenden Plasma Flüssigkeit entzogen, wodurch eine hyperosmolare Lösung entsteht. Durch diesen osmotischen Stress kann es letztendlich zur Ruptur der Plasmamembran und Zellyse führen (Muldrew et al., 1990; Watson et al., 1995).

In mehreren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Kryokonservierung Einfluss nimmt auf das Ausmaß der Apoptoseparameter, wie beispielsweise die Phosphatidylserinexternalisation (Glander et al., 1999) oder die DNA-Fragmentierung (Donnelly et al., 2001; Zribi et al., 2008). In der Arbeit von Wündrich wurde auch eine Aktivierung von Caspasen in Spermatozoen nach Kryokonservierung beschrieben (Wündrich et al., 2006). Die Bedeutung dieser Veränderungen ist noch nicht abschließend geklärt.

2.4 Eigene Fragestellungen

Die vorliegende Dissertation untersucht die Zusammenhänge zwischen Kryokonservierung und Apoptoseparameter von Spermatozoen sowie Parameter des klassischen Spermogramms. Es sollen die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Apoptoseparameter identifiziert werden. Weiterhin sollen geeignete Parameter zur Vorhersage der Qualität von Spermatozoen nach Kryokonservierung gefunden werden.

Zur Beurteilung einer möglichen Apoptose wurden Strangbrüche nukleärer DNA (nDNA) mittels TUNEL-Test sowie das Vorhandensein von Caspase 3, als Indikator einer möglichen mitochondrial vermittelten Apoptose mittels indirekter Immunhistochemie untersucht.

Folgende Fragen fassen die Fragestellung zusammen:

1. Welchen Gehalt an Strangbrüchen nukleärer DNA und an Caspase-3 weisen Spermatozoen auf?
2. Welche Einflüsse haben die Aufbereitung und die Kryokonservierung auf nukleäre DNA gemessen am Gehalt an DNA-Fragmentation?
3. Was sind die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Integrität des Mitochondriums, gemessen an der Induktion der Apoptose mit Nachweis von Caspase-3?
4. Welche Parameter eignen sich zur Vorhersage der Qualität von Spermatozoen nach Kryokonservierung?
5. Gibt es in oben genannten Fragestellungen Unterschiede zwischen Spermatozoen von Proben normaler Samenqualität („fertile“ Proben) und Proben reduzierter Samenqualität („subfertile“ Proben)?

3. Material und Methodik

3.1 Gewinnung der Proben

Für diese Studie wurden im Zeitraum von Mai 2003 bis Oktober 2004 Samenproben von insgesamt 50 Personen verwendet, allesamt Patienten der Kinderwunschsprechstunde der Uniklinik des Saarlandes am Institut für Reproduktionsmedizin.

Die Samenproben wurden nach zwei bis fünftägiger Karenz durch Masturbation in ein steriles Kunststoffgefäß in einer abschließbaren, dafür eingerichteten Räumlichkeit des Labors der Frauenklinik Homburg gewonnen.

3.2. Klassische Samenanalyse

Nach einer Liquefizienzzeit von etwa 30 Minuten wurden die Spermaproben durch Laborassistentinnen makro- und mikroskopisch beurteilt. Dabei wurden Vitalitäts- und Funktionsteste (nach WHO) durchgeführt und die Ergebnisse auf dafür vorgesehenen Bögen (Spermiogrammbogen) notiert. Die erhobenen Parameter dienen der Beurteilung von Volumen und Konzentration der Samenflüssigkeit, der pH-Wert Bestimmung, der Bestimmung von Vitalität und Motilität der Spermatozoen sowie der Beurteilung der Morphologie.

3.2.1 Bestimmung von Viskosität und Volumen

Nach Beurteilung der Verflüssigungstendenz der Probe und deren Einstufung als normal oder nicht normal wurden Viskosität beurteilt und das Volumen gemessen. Dazu wurde die Probe in eine sterile Konustube (Falkon, Plymouth, England) gegeben und das Volumen abgelesen. Gemäß WHO-Standard sollte das Volumen zwischen 2 und 6 ml betragen (WHO, 1999).

3.2.2 Bestimmung des pH-Wertes

Für die Bestimmung des pH-Wertes werden spezielle Indikatorpapierstreifen verwendet (Bereich zwischen 6,6 – 10,0; Merck). Dafür wurden 5 µl des liquefizierten Spermas auf den Indikatorstreifen gegeben und das Auftreten eines Farbumschlags anhand einer mitgelieferten pH-Wert Skala abgelesen. Ein pH-Wert zwischen 7,2 und 8,0 ist als normal zu werten (WHO, 1999).

3.2.3 Cyturtest

Der Cyturtest dient dem Nachweis von Leukozyten in der Spermaprobe. Auf einen Teststreifen (Roche Diagnostics GmbH) wurden 5 µl der nativen Spermaprobe gegeben und der Farbumschlag bewertet, wobei dem Test eine Farbskala beigegefügt ist zur semiquantitativen Bestimmung der Leukozytenzahl. Der Test vermag drei Ergebnisse anzugeben: Ein negatives Ergebnis entspricht einem Leukozytengehalt von $<10/\mu\text{l}$ Leukozyten. Weiterhin unterscheidet der Test zwischen einfach positivem Leukozytengehalt ($\geq 10/\mu\text{l}$) und zweifach positivem Leukozytengehalt ($\geq 25/\mu\text{l}$). Eine Leukozytospemie $>10/\mu\text{l}$ sollte in einer normalen Spermaprobe nicht vorkommen (WHO, 1999) und könnte ein Hinweis auf eine bestehende Infektion sein.

3.2.4 Eosin-Test

Dieser Test hat seine Bedeutung in der Vitalitätsbestimmung von Spermatozoen erlangt und wurde vor und nach Aufbereitung durchgeführt. Der rote Farbstoff Eosin kann nur bei abgestorbenen Zellen die Membran durchdringen und die Zellen rötlich färben. Diese Eigenschaft wird beim Eosin-Test ausgenutzt, um den Anteil vitaler Spermatozoen bestimmen zu können. Dafür wurden 5 µl des Spermas auf einen Objektträger mittels Pipette gegeben sowie ebenfalls 5 µl einer Eosinlösung (Eosinlösung 1%, Apotheke der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg) und mit einem kleinen Deckgläschen abgedeckt. Nach fünf Minuten konnte die Auswertung mikroskopisch (OLYMPUS BH2-RFCA) erfolgen. Standardmäßig wurden insgesamt 100 Zellen ausgezählt und der Anteil nicht gefärbter, im Mikroskop weiß erscheinender Zellen, bestimmt. Eine normwertige Spermienprobe sollte mindestens 50% vitale Spermien aufweisen (WHO, 1999).

3.2.5 Hypoosmotischer Spermischwelltest (HOS-Test)

Der HOS-Test dient ebenfalls wie der Eosin-Test der Vitalitätsbestimmung und wurde vor und nach Aufbereitung durchgeführt. Nach Inkubation von Sperma einer hypoosmotischen Lösung kommt es bei vitalen Spermatozoen durch den Einstrom dieser Lösung zu einem Anschwellen der Spermischwänze. Avitale Spermatozoen zeigen wegen dem aufgehobenen Membranpotential keinerlei Reaktion. Die hypoosmotische Lösung besteht zur einen Hälfte aus D-Fructose (13,75 g/500 ml A. bidest., 150 mOsmol/kg; Sigma, Deutschland) und zur anderen Hälfte aus tri-Natriumcitrat-Dihydrat z.A. (7,35g/500 ml A. bidest., 150mOsmol/kg; Sigma, Deutschland). 1 ml der Lösung wurde in Eppendorf-Hütchen abgefüllt und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Bei Bedarf wurde die Lösung aufgetaut, jeweils 0,1 ml

einer Spermaprobe hinzugefügt und für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde daraufhin der Anteil der geschwollenen Spermien ermittelt. Ein Anteil geschwollener Spermien von über 60% ist als normwertig zu beurteilen.

3.2.6 Gemischter Antiglobulin-Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test, MAR-Test)

Dem Nachweis von IgG-Spermatozoen-Antikörpern (ASA), welche auf der Oberfläche der Spermien gebunden sind, diente der gemischte Antiglobulin-Test, wie er von der WHO empfohlen wird. Dabei binden Latex-Partikel, welche mit IgG-Antikörpern beschichtet sind an die mit Spermatozoen-Antikörpern beladenen Spermien. Durch diese Bindung kommt es zu einer Agglutination, welche mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Nicht mit Antikörpern beladene Spermien können sich weiterhin frei bewegen und können daher anteilmäßig ausgezählt werden. 5 µl des Nativspermas wurden zusammen mit 5µl IgG-beschichteten Latexpartikel sowie 5µl Antihuman-IgG-Antiserum (FertiPro, Beemen, Belgien) auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Auszählung erfolgte danach unter dem Mikroskop. Normwertig gilt ein Befund von weniger als 10 % agglutiniertes Spermatozoen.

3.2.7 Spermatozoendichte

Mittels einer Zählkammer (Makler, 1980) wurde die Spermatozoendichte beurteilt. Dazu pipettierte man 5 µl des verflüssigten Nativspermas in die Vertiefung der Zählkammer, welche daraufhin mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde. Die Zählkammer wurde unter das Mikroskop gelegt und die Probe mit dem Objektiv mit der 20fachen Vergrößerung betrachtet. In der Zählkammer befindet sich ein Raster mit 100 Quadraten, von denen 3 x 10 ausgezählt wurden. Der Mittelwert aus diesen Auszählungen entspricht der Spermatozoendichte in Millionen pro Milliliter ($10^6/\text{ml}$). Diese Auszählung erfolgte vor und nach Aufbereitung der Probe.

Eine Spermatozoendichte über 20 Millionen Spermatozoen pro Milliliter gilt als normwertig (WHO, 1999), bei 20 Millionen Spermatozoen pro Milliliter oder weniger spricht man von Oligospermie, Azoospermie liegt dann vor, wenn keine Spermien im Ejakulat nachweisbar sind.

Für diese Studie wurden die Proben in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine subfertile Gruppe (Gruppe A) mit einer Spermatozoendichte von 20 Millionen pro Milliliter oder weniger

(n=14) und eine fertile Gruppe (Gruppe B) mit einer Spermatozoendichte über 20 Millionen pro Milliliter (n= 29)

3.2.8 Spermienmotilität

Gemäß WHO-Kriterien unterscheidet man progressive, globale, statische Motilität und Immotilität. Für diese Studie wurden die progressive und globale Motilität anteilmäßig bestimmt und in einer Zählkammer nach Makler ausgezählt. Etwa 10 µl einer Spermaprobe jeweils vor und nach Aufbereitung sowie nach dem Auftauen wurden dafür in die Zählkammer gegeben und bei einer 20fachen Vergrößerung 100 Spermien zweifach ausgezählt und jeweils der Mittelwert bestimmt. Normwertig sind eine globale Motilität von über 40% sowie eine progressive Motilität von über 25% (WHO, 1999).

3.2.9 Spermienmorphologie

Die Objektträger wurden zur Beurteilung der Spermienmorphologie mit einer modifizierten Färbung nach Papanicolaou (WHO, 1999) (Tabelle 1) maschinell gefärbt (SHANDON, Cheshire, Großbritannien). Die Auswertung erfolgte anhand der „strikten Kriterien“ nach Krüger et al. (1986; 1988). Pro Objektträger wurden jeweils 100 Spermien ausgezählt und eingeteilt in „vollständig normal“ geformte Spermien und nicht normale Spermien mit Spermienkopfdefekten, Hals- und Mittelstückdefekten oder Schwanzdefekten. Als Richtwert sollten mehr als 15 % normale Spermien vorhanden sein (Kruger et al., 1988).

Tabelle 1: Modifizierte Papanicolaou-Färbung

Schritt	Vorgehen	Zeit
1	Ethanol 80%	2 min spülen
2	Ethanol 80%	2 min spülen
3	Aqua dest.	2 min spülen
4	Hämatoxylin (Rezeptur 1)	3 min färben
5	Aqua dest.	2 min spülen
6	Aqua dest.	2 min spülen
7	Aqua	5 min. fließend wässern
8	Aqua dest.	2 min spülen
9	Ethanol 70 %	2 min spülen
10	Ethanol 95 %	2 min spülen
11	Ethanol 95 %	2 min spülen
12	Orange G Lösung (Rezeptur 2)	2 min. färben
13	Ethanol 95 %	2 min spülen
14	Ethanol 95 %	2 min spülen
15	Ethanol 95 %	2 min spülen
16	EA 50-Lösung (Rezeptur 3)	2 min. färben
17	Ethanol 95 %	2 min spülen
18	Ethanol 100 %	2 min spülen
19	Ethanol 100 %	2 min spülen
20	Ethanol 100 %	2 min spülen
21	Xylol	1,5 min. spülen
22	Xylol	1,5 min. spülen
23	Xylol	1,5 min. spülen
24	Xylol	1,5 min. spülen
25	Eindecken mit Entellan (MERCK, Deutschland)	

Rezeptur 1: Hämatoxylin nach Harris

Hämatoxylin 8 g

Ethanol 95 % 80ml

Aluminium-Ammonium-Sulfat $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ 160 g

Quecksilberoxid HgO 6 g In 1600 ml destilliertem Wasser auflösen

Rezeptur 2: Orange G6

Orange G-Kristalle 10 g

destilliertes Wasser 100 ml

Ethanol 95 % 1000 ml

Phosphorwolframsäure 0,15 g

Rezeptur 3: EA-50

Eosin Y 10g

Bismarckbraun Y 10 g

Lichtgrün SF 10 g

destilliertes Wasser 300 ml

Äthanol 95 % 2000 ml

Phosphorwolframsäure 4g

gesättigte Lithiumkarbonatlösung 0,5 ml

3.3 Aufbereitung der Proben

Die native Spermaprobe wurde nach Durchführung der klassischen Samenanalyse zur weiteren Reinigung und zur Selektion vitaler und motiler Spermatozoen für die anschließende in-vitro-Fertilisation (IVF) bzw. der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) einer Aufbereitung mittels zwei Techniken unterzogen: der swim up®-Methode sowie der pure sperm®-Methode (WHO, 1999).

Aufbereitung mit der Swim-Up-Methode:

Das Ejakulat wurde mit einem Verhältnis von 1:1 bis 1:4 mit Kulturmedium vermischt und danach bei 500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Spermien anschließend wieder mit 1ml Kulturmedium überschichtet und zwei bis drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die motilen Spermatozoen schwimmen dann hoch und können abpipettiert und resuspendiert werden.

Aufbereitung mit der Pure-sperm-Methode:

Bei der Pure-sperm-Methode dient ein Dichtegradient dazu, motile und vitale Spermatozoen von nicht vitalen Spermatozoen zu trennen. Pure-Sperm-Lösungen (PureSperm 100®, NIDACON International AB, Schweden) unterschiedlicher Dichte werden mit abnehmender Dichte (80 % - 40%) übereinander geschichtet, wobei dies in zwei Reagenzgläsern gleichzeitig durchgeführt wird. Dann wird eine Schicht liquefzierter Spermaprobe hinzugegeben und bei 300 U/min für zwanzig Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, das Pellet aus beiden Gläsern aspiriert, mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und bei 500 U/min für zehn Minuten erneut zentrifugiert. Der dann verbleibende Überstand wird wiederum verworfen, und das Pellet nochmals mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Spermien erneut bezüglich Vitalität und Motilität beurteilt.

3.4 Anfertigung der Proben und Einfrieren

Von jeder Spermienprobe wurden Nativausstriche vor und nach Aufbereitung angefertigt und der Rest der Probe eingefroren. Die Nativausstriche wurden in noch feuchtem Zustand mit Merckofix-Fixationsspray (Ethanol-Polyglykolen-Mischung; Merck, Deutschland) sprühfixiert und schließlich bis zur Färbung in einem Kasten für Objektträger aufbewahrt.

Für das Einfrieren wurde die Probe in ein Eppendorf-Hütchen gegeben und 1:1 mit einem Kryoprotektionsmedium Human Sperm Preservation Medium (HSPM) (Rezeptur 4) vermischt und mit einer Einwegspritze mit aufgesetzter langer Spinalnadel aufgezogen sowie in Samenröhrchen (Fassungsvermögen 0,5 ml) („french straws“; nach Hahn und Cassou, 1969), aufgezogen (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland). Auf beide Enden wurde jeweils ein Silberkügelchen aufgedrückt und somit das Röhrchen verschlossen. Die Röhrchen wurden in Klarsichtkassetten (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gegeben, diese verschlossen und mit der Probennummer beschriftet.

Am Institut für Reproduktionsmedizin der Uniklinik Homburg können prinzipiell zwei Methoden der Kryokonservierung zur Anwendung kommen, das Einfrieren mit Stickstoffdampf sowie mittels einer biologischen Friermaschine. Die Spermaqualität hinsichtlich klassischer Samenanalyseparameter fällt bei fertilen wie auch bei nicht fertilen Spermaproben signifikant ab, unabhängig von der Einfrieremethode (Hammadeh et al., 2002), deswegen wurde aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit die Stickstoffdampfmethode verwendet. Dabei wurden die Klarsichtkassetten mit den „french straws“ horizontal gelegen in stehendem Stickstoffdampf in einer Höhe von etwa 15 cm über der Stickstoffoberfläche für

45 Minuten gehalten. Danach erfolgte die Entnahme und das sofortige Eintauchen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -180°C , wo sie bis zur Entnahme gelagert wurden.

Rezeptur 4: HSPM

Lösung 1:

NaCl	2,9 g
KCl	0,2g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,05g
Natriumlactat	1,44g
NaH ₂ PO ₄	0,025g
NaHCO ₃	1,3g
Hepes	2,383g

In 100 ml Aqua dest. lösen

Lösung 2:

Saccharose	1,711g
Glucose	0,0059g

In 57,46 ml Aqua dest. lösen

20 ml von Lösung 1 zu Lösung 2 geben, dazu

Glyzerin	15,8g
Streptomycin	0,005g
Humanalbumin	2,0g

Steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

3.5 Auftauen

Die gewünschten Proben wurden durch Entnahme aus der Tonne mit flüssigem Stickstoff bei Zimmertemperatur aufgetaut.

3.5.1 Supravitaltests und Beurteilung der Spermienmotilität

Die aufgetauten Proben wurden folgenden Tests der klassischen Samenanalyse unterzogen: Eosin- und HOS-Test sowie Beurteilung der Spermienmotilität.

3.5.2 Anfertigung der Proben

Aus der aufgetauten Spermaprobe wurden Objektträgerausstriche angefertigt. Auch hier erfolgte eine Sprühfixierung in noch feuchtem Zustand mittels Merckofix-Fixations spray (Ethanol-Polyglykolen-Mischung; Merck, Deutschland) und die Aufbewahrung nicht verwendeter Ausstrichpräparate in speziellen Objektträgerkästen.

3.6 TUNEL-Färbung

3.6.1 Prinzip

Im Rahmen der Apoptose treten internukleosomale DNA-Doppelstrangbrüche auf. An die entstandenen freien 3'-OH Enden (sogenannte „nicks“) können in einer enzymatischen Reaktion modifizierte Nukleotide (dUTP) gekoppelt werden. Sind diese Nukleotide mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, so können nach erfolgreicher Bindung die Doppelstrangbrüche in einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Die Bindung der Nukleotide erfolgt durch die Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT). Die Abkürzung TUNEL steht für „TdT-mediated X-dUTP nick end labeling“ (Bortner et al., 1995; Gold et al., Gold et al., 1994). In der Arbeit von Gorczyca (1993) konnte bestätigt werden, dass sich diese Methode auch zum Nachweis von DNA-Fragmentierung in Spermatozoen eignet.

Wir verwendeten den „*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

In der vorliegenden Arbeit wurde alle Spermienproben vor und nach Aufbereitung sowie nach dem Auftauen nach der TUNEL-Methode gefärbt und ausgewertet.

3.6.2 Vorbereitung

Vor Versuchsbeginn wurden frisch angesetzt eine Fixierungslösung (Rezeptur 5) bestehend aus 4% Paraformaldehyd (Apotheke, Uniklinik Homburg) in PBS (Rezeptur 6) sowie eine Permeabilisierungslösung (Rezeptur 7) bestehend aus 0.1% Triton X-100 (Sigma, Deutschland) in 0.1% Natriumcitrat (Apotheke, Uniklinik Homburg).

Nach Abschluss der Färbung wurden die Objektträger mit einer Anti-Fading Lösung (Rezeptur 8) eingedeckt.

Das Kit enthielt zwei Ampullen (Ampulle 1 und Ampulle 2):

Ampulle 1 (blauer Deckel):
Enzymlösung

- Terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus (EC 2.7.7.31), recombinant in E. coli, in storage buffer
- 10× conc.
- 5 × 50 µl

Ampulle 2 (violetter Deckel):
Label Solution

- Nucleotide mixture in reaction buffer
- 1× conc.
- 5 × 550 µl

Tabelle 2: Herstellung der TUNEL-Reagenz

Schritt	Vorgehen
1	Entfernen von 100 µl der Label Solution (Ampulle 2) für zwei negative Kontrollen.
2	Hinzufügen von 50 µl der Enzymlösung (Ampulle 1) zu den verbleibenden 450 µl Label Solution in Ampulle 2, um 500 µl der TUNEL Reagenz zu erhalten.
3	Die Lösung gut mischen.

Bei jedem Färbedurchgang wurden zudem eine negative und eine positive Kontrolle nach folgendem Schema angefertigt:

Tabelle 3: Herstellung einer negativen und positiven Kontrolle

Herstellen einer negativen Kontrolle:	Eine fixierte und permeabilisierte Probe wurde anstelle des TUNEL Reagenz mit 50 µl Label Solution inkubiert.
Herstellen einer positiven Kontrolle	Induktion der Apoptose in einer Probe mittels micrococcaler Nuklease oder rekombinanter DNase I (3000 U/ml– 3 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mg/ml BSA) für 10 min bei 15 – 25°C um DNA Strangbrüche zu induzieren, weiteres Prozedere gemäß Normalprotokoll.

Rezeptur 5: Fixierungslösung

1000 ml PBS-Elektrolytlösung + 40 ml Paraformaldehyd (Apotheke, Uniklinik Homburg)
Einstellen auf pH 7,4 mittels NaOH oder 1% HCl

Rezeptur 6: PBS-Elektrolytlösung

Lösung 1:

CaCl₂ · H₂O 1, 32g + Aqua dest.

Lösung 2:

MgSO₄ 1,21g
NaCl 80g
KCl 2g
Na₂HPO₄ 11,5g
KH₂PO₄ 2g

Chemikalien in 500 ml Aqua dest. Lösen, dann auf exakt 900 ml auffüllen.

Herstellung der PBS-Gebrauchslösung:

10ml Lösung 1 + 90ml Lösung 2 = 100 ml

Hinzufügen von 900ml Aqua dest. ergibt 1000 ml Gebrauchslösung.

Rezeptur 7: Permeabilisierungslösung

250 ml 0,1 % Natriumcitrat-Lösung + 250 µl Triton X-100 (Sigma, Deutschland)

Rezeptur 8: Antifading-Lösung (Propyl Gallate Mountant)

5 % (w/v, etwa 250 mM) n-Propylgallate (Sigma PB130) in Glycerin auf pH-Wert 8,0 mit einem Karbonat Puffer (Rezeptur 9) einstellen.

Rezeptur 9: Karbonat Puffer

Na₂CO₃ 53 g/l

NaHCO₃ 42 g/l

Chemikalien in Aqua dest. Auflösen.

3.6.3 Durchführung

Nach Abschluss aller vorbereitenden Maßnahmen wurde nach folgendem Schema die Färbung durchgeführt:

Tabelle 4: TUNEL-Färbung

Schritt	Vorgehen
1	Fixierung der Objektträger in Fixierungslösung (Rezeptur 5) für 20 Minuten bei 15 - 25°C.
2	30 Minuten mit PBS waschen.
3	Inkubieren der Objektträger in Permeabilisierungslösung (Rezeptur 7) für 2 min auf Eis (2 – 8°C).
4	Zweimalig Objektträger mit PBS spülen.
5	Objektträger trocknen lassen.
6	Hinzufügen von 50 µl TUNEL Reagenz auf Objektträger. Für die negative Kontrolle werden jeweils nur 50 µl der Label Solution hinzugefügt. Abdecken der Objektträger mit Deckglas.
7	Inkubieren der Objektträger in einer feuchten Kammer für 60 Minuten im Dunkeln bei 37 °C.
8	Dreimalig Objektträger mit PBS spülen.
9	Antifade (Rezeptur 8) auf Objektträger geben, mit Deckglas bedecken und unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Die Lichtemission sollte eine Wellenlänge von 450-500 nm und einen Barrierefilter bei 515-565 nm aufweisen.

3.6.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte zügig innerhalb weniger Tage, um ein Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern, bis dahin wurden die gefärbten Objektträger im Dunkeln bei -22°C aufbewahrt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) mit einem 460-480nm Exzitationsfilter und einem 495-540nm Barrierefilter bei 60facher Vergrößerung mit Immersions-Öl (Merck, Darmstadt) wurden pro Objektträger 100 Spermien ausgezählt. Unterschieden wurde zwischen grün leuchtenden Spermien, an deren DNA die fluoreszenzmarkierten Nukleotide gebunden hatten und somit DNA-Strangbrüche aufwiesen, sowie nicht gefärbten Spermien, also ohne relevante DNA-Strangbrüche (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).

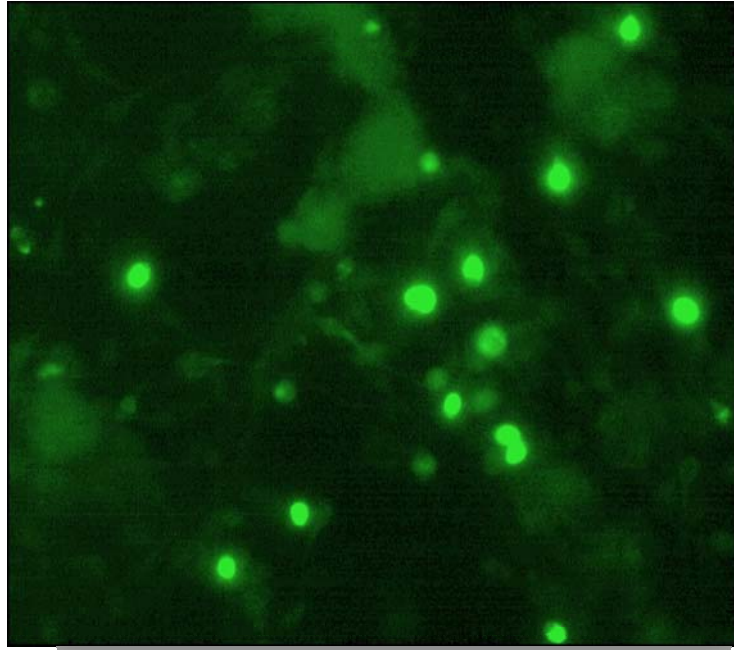


Abbildung 9: Spermien nach TUNEL-Färbung: Spermatozoen mit relevanter DNA-Fragmentation leuchten hell grün fluoreszierend. Im Hintergrund schwach angefärbte Spermatozoen mit negativem Färberegebnis.

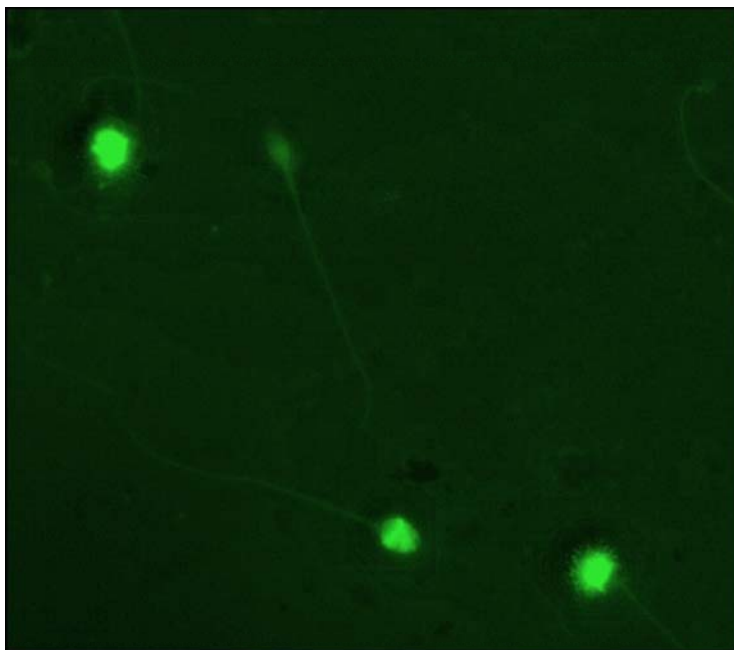


Abbildung 10: Spermatozoen nach TUNEL-Färbung: Spermatozoen mit relevanter DNA-Fragmentation leuchten hell grün fluoreszierend. Im Hintergrund schwach angefärbte Spermatozoen mit negativem Färberegebnis.

3.7 Caspase 3-Test

3.7.1 Prinzip

Der Test funktioniert nach dem Prinzip der indirekten Immunhistochemie. Zum Einsatz kommt ein primärer Antikörper, welcher gegen die Aminosäuren 163-175 der Caspase 3 gerichtet ist. Dieser bindet bei fixierten und permeabilisierten Zellen, welche gerade die Apoptose durchlaufen, an Caspase 3 und lässt sich nun durch die Hinzugabe eines sekundären FITC-markierten Antikörpers durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen.

Für diese Studie wurde zum Nachweis der Caspase 3 das APO Active 3™ FITC - Antibody Specific Active Caspase-3 FITC Detection Kit (Bachem, San Carlos, CA, USA) verwendet. Wir untersuchten das Vorhandensein von Caspase 3 an den Samenproben vor und nach Aufbereitung sowie nach dem Auftauen.

3.7.2 Vorbereitung

Das Kit enthält 1 Ampulle mit 55 µl gereinigtem polyklonalem Anti-Caspase 3-Antikörper aus Kaninchenserum, eine Ampulle mit gereinigtem polyklonalem FITC-markiertem Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziegenserum sowie eine zehnfach konzentrierte Fixierungslösung. Für die Durchführung des Tests war weiterhin eine PBS+2% BSA-Lösung anzusetzen (Rezeptur 10).

Vor Beginn sollte jeweils eine 1:10 fach konzentrierte Verdünnung („working dilution“) von jedem Antikörper und der Fixierungslösung hergestellt werden.

Die 1:10fach konzentrierte Verdünnung des Anti-Caspase 3-Antikörpers aus Kaninchenserum wurde durch Hinzugabe von 1045 µl PBS+2% BSA Puffer (Rezeptur 10) hergestellt.

Für die Verdünnung des sekundären FITC-markierten Antikörpers wurde die mitgelieferte Antikörperlösung 1:10 fach mit PBS+2% BSA Puffer (Rezeptur 10) verdünnt.

Die Verdünnung der Fixierungslösung erhielt man ebenfalls durch 1:10 fache Verdünnung mit PBS. Alle hergestellten Lösungen wurden bis zum Verbrauch bei 4°C gelagert.

Das Färbeprotokoll sah eine weitere 1:10-1:20fache Verdünnung der Lösungen des Anti-Caspase 3-Antikörpers sowie des FITC-markierten Antikörpers vor, so dass für die Ermittlung der besten Antikörperverdünnung eine Versuchsreihe mit einer Verdünnung von 1:10, 1:15 und 1:20 durchgeführt wurde. In unseren Experimenten stellte sich bei einer Verdünnung von 1:10 das Verhältnis zwischen Hintergrundanfärbung und Markierung positiver Zellen am Günstigsten dar.

3.7.3 Durchführung

Tabelle 5: Protokoll der 1:10fachen Verdünnung der „working dilution“ des Anti-Caspase3-Antikörpers für 10 Objektträger

Schritt	Vorgehen
1	Entnahme von 50 µl der „working dilution“ des Anti-Caspase3-Antikörpers und Hinzufügen von 950 µl PBS + 2% BSA Puffer, Mischen in einem Eppendorf-Hütchen
2	Hinzugabe von 10 µl Ziegen Serum (für die Reduktion der Hintergrundfärbung)
Schritt	Vorgehen
1	Entnahme von 50 µl der „working dilution“ des FITC-markierten Anti-Caspase3-Antikörpers und Hinzufügen von 950 µl PBS + 2% BSA Puffer, Mischen in einem Eppendorf-Hütchen in Dunkelheit
2	Hinzugabe von 10 µl Ziegen Serum (für die Reduktion der Hintergrundfärbung)

Rezeptur 10: PBS + 2% BSA-Puffer

PBS (pH 7,4) + 1% BSA (Sigma, Deutschland) + 0,05% NaN₃

Tabelle 6: Protokoll der 1:10fachen Verdünnung der „working dilution“ des FITC-markierten Anti-Caspase3-Antikörpers für 10 Objektträger

Schritt	Vorgehen
1	Fixieren der Objektträger mit einfach konzentrierter Fixierungslösung über Nacht für 4°C.
2	Waschen der fixierten Objektträger drei Mal jeweils 5 Minuten in PBS + 0,1 % Triton X-100 (Rezeptur 11).
3	Inkubation der Objektträger mit der 1:10fachen Verdünnung der „working dilution“ des Anti-Caspase3-Antikörper aus Kaninchenserum für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur.
4	Waschen der Objektträger drei Mal jeweils für 10 Minuten in PBS + 1% Triton X-100 (Rezeptur 11).
5	Inkubation der Objektträger mit einer 1:10fachen Verdünnung der „working dilution“ des sekundären FITC-markierten Antikörpers für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln.
6	Waschen der Objektträger drei Mal in PBS + 0,1% Triton X-100.
7	Antifade (Rezeptur 8) auf Objektträger geben, mit Deckglas bedecken und unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Die Lichtemission sollte eine Wellenlänge von 490 nm und einen Barrierefilter bei 520 nm aufweisen.

Rezeptur 11: PBS + 0,1 % Triton X-100

100 ml Triton X-100 (Sigma, Deutschland) + 1000 ml PBS Elektrolytlösung

3.7.4 Auswertung

Wie beim TUNEL-Test erfolgte auch hier die Auswertung zügig innerhalb weniger Tage, um ein Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern, bis dahin wurden die gefärbten Objektträger im Dunkeln bei -22°C aufbewahrt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) mit einem 460-480nm Exzitationsfilter und einem 495-540nm Barrierefilter bei 60facher Vergrößerung mit Immersions-Öl (Merck, Darmstadt) wurden pro Objektträger 100 Spermien ausgezählt. Unterschieden wurde zwischen grün leuchtenden Spermien, an welche die fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden hatten und somit positiv für Caspase 3 waren, sowie nicht gefärbten Spermien, welche keine relevanten Mengen Caspase 3 aufwiesen (siehe Abbildung 11).

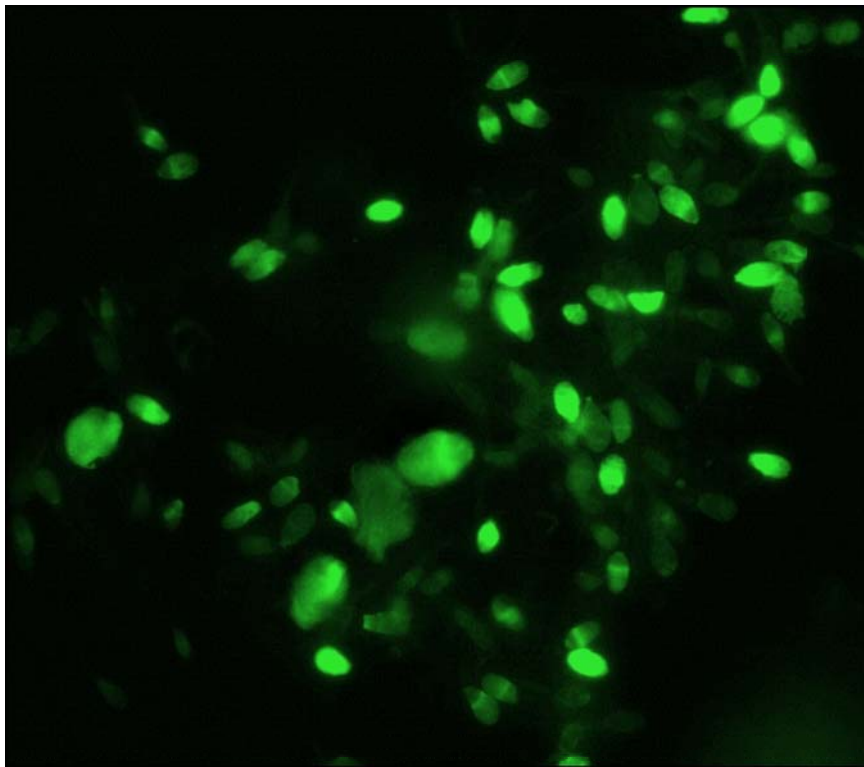


Abbildung 11: Spermatozoen nach Caspase 3 Färbung. Hell grün fluoreszierende Spermienköpfe sind Caspase 3 positiv.

3.8 Statistische Auswertungen

Statistische Berechnungen, Auswertung und Graphiken wurden mit Hilfe des SPSS-Programms, Version 14.0 für Windows durchgeführt.

Für alle Parameter erfolgte die Bestimmung der deskriptiven Statistik mit Darstellung von Medianen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

Wenn die Werte der Variablen einer Normalverteilung entsprachen, wandten wir den T-Test für gepaarte oder unabhängige Stichproben an. Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test nachgewiesen. Ansonsten erfolgte die Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test für verbundene bzw. unabhängige Stichproben.

Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen festgelegt: Ein p-Wert < 0.05 galt als signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Die Parameter der klassischen Samenanalyse

4.1.1 Vergleich beider Gruppen

Die fertile Gruppe zeigte im Vergleich für die Parameter der klassischen Samenanalyse durchweg bessere Werte.

Erwartungsgemäß betraf dies ebenfalls die **Spermiendichte**, welche als Unterscheidungsmerkmal zwischen fertiler und subfertiler Gruppe fungierte. Während der Mittelwert der Spermiendichte in der **fertilen** Gruppe $74,21 \pm 24,62 \times 10^6/\text{ml}$ betrug, lag er in der **subfertilen** Gruppe mit $16,71 \pm 6,37 \times 10^6/\text{ml}$ deutlich darunter ($p=0,0001$) (Tabelle 9).

Gleichermaßen traf dies auf die **Vitalität (Eosin-Test)** zu. In der Tendenz waren die Mittelwerte der **fertilen** Gruppe in den nativen (Abbildung 5), den aufbereiteten und den eingefrorenen Proben höher, das Signifikanzniveau wurde allerdings nur für die Gruppe der **aufbereiteten Proben** erreicht. Der Mittelwert der **fertilen** aufbereiteten Proben betrug $64,64 \pm 25,42\%$, der Mittelwert der subfertilen aufbereiteten Proben betrug im Gegensatz hierzu $42,86 \pm 34,12\%$, der p-Wert lag bei 0,033 (Tabelle 9).

Verglich man die **Membranstabilität (HOS-Test)** der fertilen Gruppe mit der subfertilen Gruppe, so zeigte sich ebenfalls eine positive Tendenz zugunsten der fertilen Gruppe, allerdings war der statistische Tests nicht signifikant (Tabelle 9).

In der **fertilen** Gruppe lag ein höherer Anteil **globalmotiler Spermien** als in der **subfertilen** Gruppe vor. Auch hier galt, dass nur für die Proben **nach Aufbereitung** auch das Signifikanzniveau erreicht wurde: $67,38 \pm 22,84\%$ vs. $38,5 \pm 30,19\%$, $p=0,014$ (Tabelle 9).

Ähnliches traf auch auf den Anteil **progressiver Spermatozoen** zu. In den Proben der **fertilen** Gruppe konnte ein höherer Anteil von progressiven Spermatozoen als in der **subfertilen** Gruppe nachgewiesen werden. Das Signifikanzniveau wurde allerdings nur für die Gruppe **nach dem Auftauen** erreicht: $5,52 \pm 09,57\%$ (fertile Gruppe) vs. $0,42 \pm 01,18\%$ (subfertile Gruppe), der p-Wert betrug 0,041 (Tabelle 9).

Wie bereits für die anderen Parameter der klassischen Samenanalyse erhoben, zeigte sich auch in der Beurteilung der **Morphologie** ein höherer Anteil von Normalformen in der **fertilen** Gruppe als in der **subfertilen** Gruppe. Dieser Unterschied war hier nur in den nativen Proben signifikant: $5,84 \pm 04,49\%$ (fertile Gruppe) vs. $2,33 \pm 02,50\%$ (subfertile Gruppe) ($p=0,016$) (Tabelle 9).

4.1.2 Einfluss der Aufbereitung

Die Aufbereitung hatte sowohl in der **Gesamtgruppe** ($43,02 \pm 22,73\%$ vs. $57,38 \pm 30,05\%$; $p=0,001$) als auch in der **fertilen** Gruppe ($45,86 \pm 21,51\%$ vs. $64,64 \pm 25,42\%$; $p=0,001$) einen signifikant positiven Effekt für die **Vitalität (Eosin-Test)** zur Folge. In der **subfertilen** Gruppe lag zwar eine positive Tendenz vor, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($37,14 \pm 24,86\%$ vs. $42,86 \pm 34,12\%$, $p=0,582$) (Tabelle 8 und 9).

Die **Globalmotilität** verbesserte sich nach Aufbereitung sowohl in der Gesamtgruppe ($31,63 \pm 18,15\%$ vs. $58,06 \pm 28,45\%$, $p=0,0001$) als auch in der **fertilen** Gruppe ($32,07 \pm 16,98\%$ vs. $67,38 \pm 22,84\%$, $p=0,0001$) ebenfalls signifikant, in der **subfertilen** Gruppe erreichte die Verbesserung ($30,71 \pm 21,02\%$ vs. $38,50 \pm 30,19\%$) nicht das Signifikanzniveau (Tabelle 8 und 9).

Ebenso stieg der Anteil **membranstabiler Spermatozoen (HOS-Test)** in der **Gesamtgruppe** ($51,55 \pm 24,82\%$ vs. $58,50 \pm 24,55\%$, $p=0,018$) signifikant an. In den beiden Untergruppen war die beobachtete positive Tendenz nicht signifikant (Tabelle 8 und 9).

Gleiches galt für den Anteil **von Spermatozoen mit normaler Morphologie**. Während die Verbesserung in der **Gesamtgruppe** signifikant war ($5,00 \pm 4,33\%$ vs. $8,00 \pm 4,09\%$, $p=0,043$), so blieb es in den beiden Subgruppen bei der positiven Tendenz, welche das Signifikanzniveau nicht erreichte (Tabelle 8 und 9).

4.1.3 Einfluss der Kryokonservierung

Die Kryokonservierung hatte eine Abnahme der Vitalität, der Membranstabilität sowie der Globalmotilität in der Gesamtgruppe wie auch in den Untergruppen (fertile und subfertile Gruppe) zur Folge (Tabelle 8 und 9).

Durch den Einfrier-Auftau-Prozess verringerte sich sowohl in der **Gesamtgruppe** ($43,02 \pm 22,73\%$ vs. $22,71 \pm 17,3\%$, $p=0,001$), wie auch in der **fertilen** Gruppe ($45,86 \pm 21,51\%$

vs. $24,62 \pm 18,22$ %, $p=0,0001$) und der **subfertilen** Gruppe ($37,14 \pm 24,86$ % vs. $17,22 \pm 13,7$ %, $p=0,042$) der Prozentsatz der **vitalen Spermien (Eosin-Test)** (Tabelle 8 und 9).

Ebenso verhielt es sich mit der Globalmotilität und der Membranstabilität: In der Gesamtgruppe nahm der Anteil **globalmotiler Spermatozoen** von $31,63 \pm 18,15$ % auf $6,61 \pm 9,21$ % ($p=0,0001$) ab. In der fertilen Gruppe war die Abnahme ebenso deutlich von $32,07 \pm 16,98$ % auf $6,52 \pm 6,87$ % ($p=0,001$). Die globalmotilen Spermien fielen in der subfertilen Gruppe von $30,71 \pm 21,02$ % auf $6,76 \pm 12,7$ % ab ($p=0,12$) (Tabelle 8 und 9).

Die **Membranstabilität (HOS-Test)** nahm in der Gesamtgruppe signifikant ab, von $51,5 \pm 24,82$ % auf $34,64 \pm 19,92$ % ($p=0,0001$). Dies traf auch auf die **fertile** Gruppe (Abnahme von $53,2 \pm 26,0$ % auf $36,25 \pm 20,58$ %, $p=0,0001$) und auf die subfertile Gruppe zu (Abnahme von $45,71 \pm 24,37$ % auf $31,43 \pm 18,86$ %, $p=0,033$) (Tabelle 8 und 9).

Die **progressive Motilität** ist im nativen Sperma aller Gruppen schon sehr erniedrigt, daher ist wohl aufgrund der in Relation hierzu zu geringen Probenanzahl keine signifikante Änderung zu verzeichnen (Tabelle 8 und 9).

Tabelle 7: Darstellung der deskriptiven Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, Perzentilen) für die Gesamtgruppe

Gesamtgruppe (n = 43)					
		M±SD	25. Perzentile	Median	75. Perzentile
Volumen (ml)		4,54±1,66	3,500	4,0	5,500
pH		8,74±0,40	8,500	8,70	9,000
Spermiedichte (Millionen/ml)		55,49±34,05	20,00	46,0	100,00
Vitalität (Eosin-Test) (%)	Nativ	43,02±22,73	30,00	40,0	60,00
	Aufbereitet	57,38±30,05 ¹ (*)	37,50	65,00	85,00
	Aufgetaut	22,71±17,3 ² (*)	10,00	20,00	30,00
Globalmotilität (%)	Nativ	31,63±18,15	20,00	30,0	50,00
	Aufbereitet	58,06±28,45 ³ (*)	30,00	60,00	80,00
	Aufgetaut	6,61±9,21 ⁴ (*)	0	1,69	11,43
Progressive Motilität (%)	Nativ	3,21±9,09	0	0	1,25
	Aufbereitet	--		--	
	Aufgetaut	3,58±7,87 ⁵	0	0	2,88
Membranstabilität (HOS-Test) (%)	Nativ	51,5±24,82	25,00	60,0	70,00
	Aufbereitet	58,50±24,55 ⁶ (*)	40,00	60,00	80,00
	Aufgetaut	34,64±19,92 ⁷ (*)	13,75	30,00	55,00
Morphologie mit Normalformen (%)	Nativ	5,00±4,33	2,50	4,0	6,00
	Aufbereitet	8,00±4,09 ⁸ (*)	5,00	7,00	11,75
	Aufgetaut	--		--	

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe. * =signifikant

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,001 (*)	² p = 0,001 (*)
³ p = 0,0001 (*)	⁴ p = 0,0001 (*)
⁵ p = 0,477	⁷ p = 0,0001 (*)
⁶ p = 0,018 (*)	
⁸ p = 0,043 (*)	

Tabelle 8: Darstellung der deskriptiven Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, Perzentilen) für die fertile und die subfertile Gruppe.

		Fertile Gruppe (n = 29)				Subfertile Gruppe (n = 14)				p-Wert
		M±SD	25. P.	Median	75. P.	M±SD	25. P.	Median	75. P.	
Volumen (ml)		4,53± 1,45	3,750	4,500	5,50	4,54±2,1	3,000	3,750	6,125	0,374
pH		8,693± 0,33	8,400	8,700	9,00	8,82 ±0,52	8,450	8,700	9,125	0,700
Spermien- dichte (10 ⁶ /ml)		74,21 ±24,62	45,50	80,00	100,0	16,71 ±6,37	15,25	20,00	20,00	0,0001(*)
Vitalität (Eosin- Test) (%)	Nativ	45,86 ±21,51	30,00	45,00	60,00	37,14 ±24,86	10,00	35,00	62,50	0,261
	Auf- bereitet	64,64 ±25,42 ¹ (*)	46,25	75,00	85,00	42,86 ±34,12 ⁹	10,00	42,50	80,00	0,033(*)
	Auf- getaut	24,62 ±18,22 ² (*)	10,00	25,00	31,25	17,22 ±13,7 ¹⁰ (*)	10,00	10,00	22,50	0,197
Global- motilität (%)	Nativ	32,07 ±16,98	20,00	30,00	47,50	30,71 ±21,02	10,00	27,50	50,00	0,601
	Auf- bereitet	67,38 ±22,84 ³ (*)	50,00	70,00	90,00	38,50 ±30,19 ¹¹	20,00	22,50	80,00	0,014(*)
	Auf- getaut	6,52 ±6,87 ⁴ (*)	0,50	4,84	15,04	6,76 ±12,7 ¹² (*)	0	0	8,90	0,314
Pro- gressive Motilität (%)	Nativ	4,46 ±10,83	0	0	5,00	0,71 ±02,67	0	0	0	0,089
	Auf- bereitet	--	--	--	--	00,42 ±01,18		0	--	--
	Auf- getaut	5,52 ±9,57 ⁵	0	1,47	08,04	0,42 ±01,18 ¹³	0	0	0	0,041(*)
Mem- bran- stabilität (HOS-Test) (%)	Nativ	53,62 ±26,0	30,00	60,00	80,00	45,71 ±24,37	23,75	50,00	65,00	0,240
	Auf- bereitet	63,27 ±23,75 ⁶	43,75	65,00	90,00	49,64 ±23,43 ¹⁴	27,50	55,00	70,00	0,095
	Auf- getaut	36,25 ±20,58 ⁷ (*)	15,00	35,00	58,75	31,43 ±18,86 ¹⁵ (*)	10,00	30,00	50,00	0,433
Morpho- logie mit Normal- formen (%)	Nativ	5,84 ±04,49	4,00	4,00	6,00	2,33 ±02,50	0,75	1,50	4,00	0,016(*)
	Auf- bereitet	8,00 ±04,27 ⁸	4,75	7,00	12,25	8,00 ±02,83 ¹⁶	6,00	8,00	10,00	0,899
	Auf- getaut	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe. * =signifikant

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,001(*)	² p = 0,0001(*)
³ p = 0,0001(*)	⁴ p = 0,001(*)
⁵ p = 0,575	⁶ p = 0,107
⁷ p = 0,0001(*)	⁸ p = 0,111
⁹ p = 0,582	¹⁰ p = 0,042 (*)
¹¹ p = 0,341	¹² p = 0,012 (*)
¹³ p = 0,317	¹⁴ p = 0,103
¹⁵ p = 0,033 (*)	¹⁶ p = 0,180

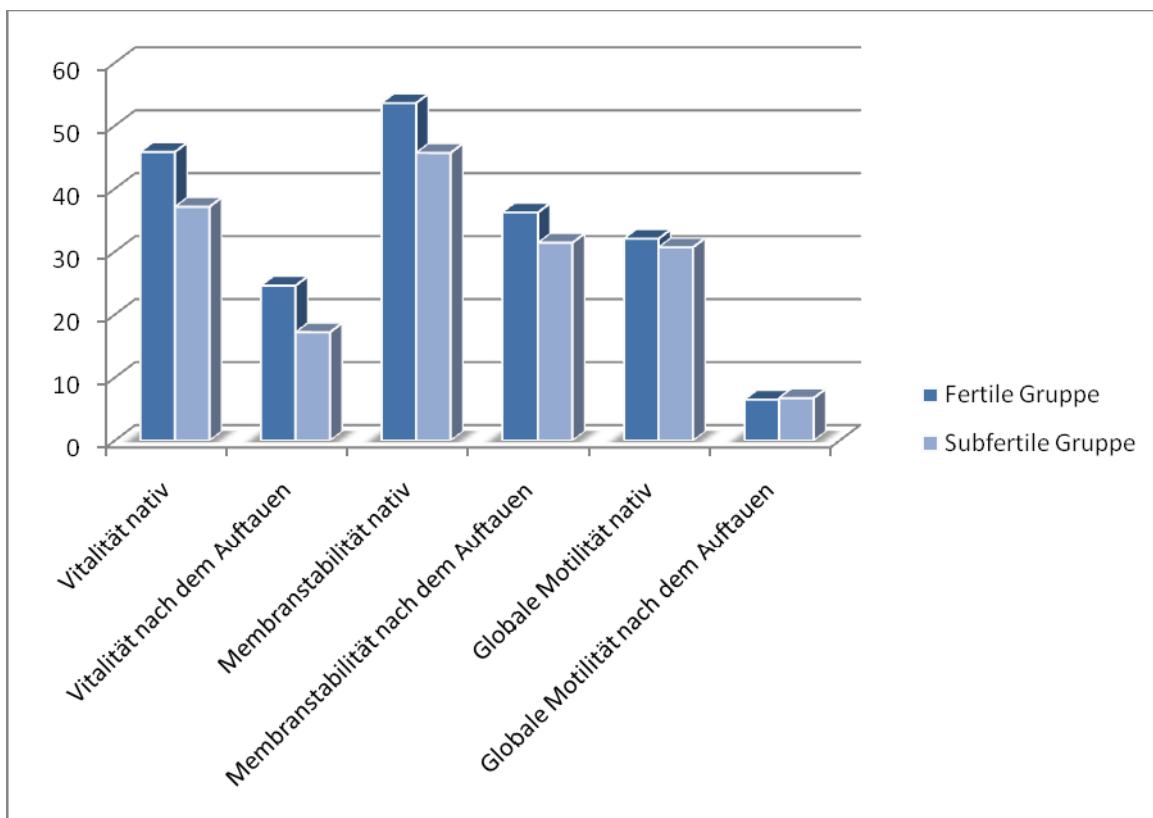


Abbildung 12: Vergleich der Mittelwerte von Vitalität (Eosin-Test), Membranstabilität und globaler Motilität im Nativpräparat und nach dem Auftauen für fertile vs. subfertile Gruppe.

4.1.4 Leukozytengehalt der Proben

Abbildung 13 zeigt die prozentuale Verteilung des Leukozytengehalts in der Gesamtgruppe und der fertilen und der subfertilen Gruppe. Daraus wird ersichtlich, dass alle Proben entsprechend dem Cyturtest einen einfach positiven (10-25 Leukozyten/ μ l) bzw. zweifach positiven Leukozytengehalt aufwiesen ($\geq 25/\mu$ l). In der Gesamtgruppe lagen etwas mehr Proben mit zweifach positivem Leukozytengehalt vor (55,8% vs. 44,2%). Dies galt auch für die fertile (44,5% vs. 55,2%) und die subfertile Gruppe (42,9% vs. 57,1%) (Abbildung 13).

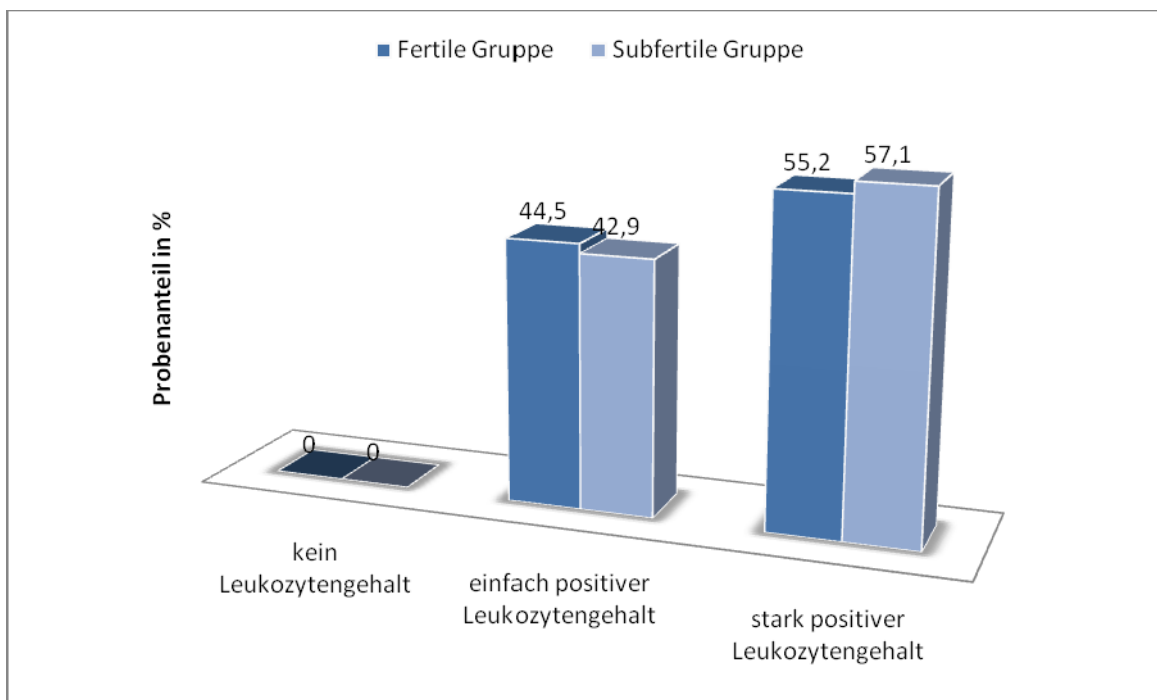


Abbildung 13: Leukozytengehalt (Cytur-Test) (negativ, positiv, stark positiv) der Proben im Vergleich für fertile und subfertile Gruppe.

4.2 Ergebnisse des TUNEL-Tests in der Gesamtgruppe und der fertilen und subfertilen Gruppe

4.2.1 Vergleich beider Gruppen

Im Vergleich des Anteils positiver Zellen nach TUNEL-Färbung war sich ein erniedrigter Anteil von TUNEL positiven Zellen in der fertilen Gruppe im Vergleich zu der subfertilen Gruppe nachweisbar, wenn auch diese Differenz nicht das Signifikanzniveau erreichte (Abbildung 14).

4.2.2 Auswirkung der Aufbereitung

Die Aufbereitung hatte in der subfertilen Gruppe keine signifikanten Auswirkungen auf den Anteil TUNEL-positiver Zellen. Dies galt auch für die subfertile Gruppe.

4.2.3 Auswirkung der Kryokonservierung

Der Einfrier-Auftau-Prozess bewirkte eine Zunahme der DNA-Fragmentation (TUNEL-Test) in der **fertilen Gruppe** (von $14,85 \pm 17,64$ % auf $27,54 \pm 19,74$ %, p-Wert = 0,004) (Tabelle 10).

In der **subfertilen Gruppe** führte die Kryokonservierung zu keinen signifikanten Veränderungen in der DNA-Fragmentation (TUNEL-Test) ($19,84 \pm 17,52$ % vs. $29,48 \pm 16,97$ %, p-Wert=0,530), wenn auch ein Trend zur Zunahme der DNA-Fragmentation zu sehen war (Tabelle 10).

Tabelle 9: Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf Rate TUNEL-positiver Spermatozoen für fertile und subfertile Gruppe.

	TUNEL vor Aufbereitung (%)	TUNEL nach Aufbereitung (%)	TUNEL nach Einfrieren (%)
	M±SD Median	M±SD Median	M±SD Median
Fertile Gruppe (n=29)	$14,85 \pm 17,64$ 9,09	$19,74 \pm 23,16$ ¹ 11,00	$27,54 \pm 19,74$ ^{2(*)} 22,68
Subfertile Gruppe (n=13)	$19,84 \pm 17,52$ 22,22	$27,73 \pm 25,84$ ³ 28,00	$29,48 \pm 16,97$ ⁴ 32,69
p-Wert	0,493	0,424	0,435

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe. ***= signifikant**

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,790	² p = 0,004(*)
³ p = 0,308	⁴ p = 0,530

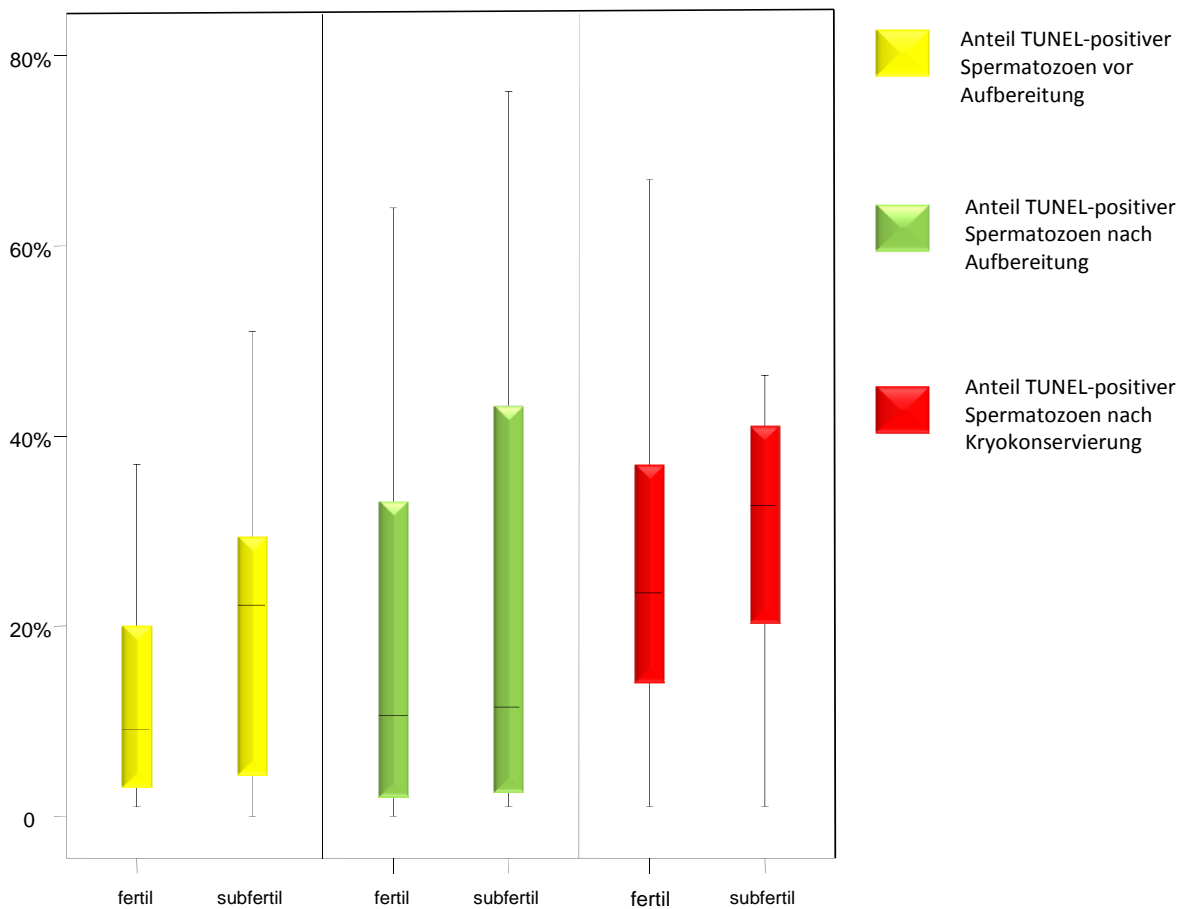


Abbildung 14: TUNEL-positive Spermatozoen im Vergleich zwischen fertiler und subfertiler Gruppe.

4.2.4 Auswirkung des Leukozytengehalts auf DNA-Fragmentierung

Es erfolgte die Untersuchung des Effekts des Leukozytengehalts auf die DNA-Fragmentierung. Hierzu wurden beiden Hauptgruppen jeweils in eine Gruppe mit einfach positivem Leukozytengehalt (10-25 Leukozyten/ μ l) und in eine Gruppe mit zweifach positivem Leukozytengehalt ($\geq 25/\mu$ l) unterteilt.

Im Vergleich beider Gruppen zeigte die Gruppe „zweifach positiver Leukozytengehalt“ einen signifikant niedrigeren Anteil von Spermatozoen mit positivem TUNEL-Test nach Aufbereitung sowohl in der fertilen Gruppe, als auch in der subfertilen Gruppe ($9,94 \pm 12,67\%$ vs. $31,62 \pm 25,49\%$, p-Wert=0,016).

Die Kryokonservierung führte in der subfertilen Gruppe zu mehr DNA-Strangbrüchen, als in der fertilen Gruppe ($33,69 \pm 10,52\%$ vs. $22,39 \pm 15,79\%$, p-Wert=0,03).

Der Leukozytengehalt erwies sich auch als entscheidendes Merkmal, ob die Kryokonservierung eine Zunahme der DNA-Fragmentation zur Folge hatte. So bewirkte der Einfrier-Auftau-Vorgang in beiden Untergruppen nur in Proben mit zweifachem Leukozytengehalt eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung. In der **fertilen Gruppe** nahm der Anteil TUNEL-positiver Spermatozoen nach Kryokonservierung signifikant in Proben mit zweifachem Leukozytengehalt zu ($8,70 \pm 9,78\%$ vs. $22,39 \pm 15,79\%$, p-Wert = 0,008). In der Gruppe mit nur einfach positivem Leukozytengehalt bzw. fehlendem Leukozytengehalt war kein signifikanter Effekt nachweisbar.

Gleichermaßen traf dies auch auf die **subfertile Gruppe** zu. Während die Proben mit zweifach positivem Leukozytengehalt eine signifikante Zunahme nach Kryokonservierung des Anteils TUNEL-positiver Spermatozoen aufwiesen ($12,24 \pm 12,16\%$ auf $33,69 \pm 10,52\%$, p=0,043), so war keine signifikante Veränderung für die Proben mit einfach positivem Leukozytengehalt zu sehen.

Die Aufbereitung hatte in beiden Untergruppen keinen signifikanten Effekt zur Folge (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der TUNEL-Färbung für fertile Gruppe, unterteilt nach Leukozytengehalt.

		Fertile Gruppe (n=29)	Subfertile Gruppe (n=13)	p-Wert
		M±SD Median	M±SD Median	
Leukozytengehalt einfach positiv (10-25 Leukozyten/µl)	TUNEL nativ (%)	21,47±21,88 11,0	32,0±19,01 36,0	0,289
	TUNEL nach Aufbereitung (%)	30,30±27,48 ¹ 28,0	32,0±19,01 ⁵ 01,0	0,208
	TUNEL nach Einfrieren (%)	33,87±22,78 ² 30,0	24,56±22,47 ⁶ 23,29	0,521
Leukozytengehalt zweifach positiv (≥25 Leukozyten/µl)	TUNEL nativ (%)	8,70±9,78 5,64	12,24±12,16 8,42	0,764
	TUNEL nach Aufbereitung (%)	9,94±12,67 ³ 7,0	31,62±25,49 ⁷ 29,25	0,016(*)
	TUNEL nach Einfrieren (%)	22,39±15,79 ^{4(*)} 20,89	33,69±10,52 ^{8(*)} 36,84	0,033(*)

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe. ***= signifikant**

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,727	² p = 0,116
³ p = 0,834	⁴ p = 0,008 (*)
⁵ p = 0,273	⁶ p = 0,225
⁷ p = 0,05	⁸ p = 0,043 (*)

4.3 Auswirkungen der Kryokonservierung auf den Nachweis von Caspase 3 (indirekte Fluoreszenzimmunhistochemie) in der fertilen und in der subfertilen Gruppe

4.3.1 Vergleich beider Gruppen

Im Vergleich des Anteils positiver Zellen nach Caspase3-Färbung zeigte sich ein niedrigerer Anteil in der fertilen Gruppe, wenn auch diese Differenz nicht das Signifikanzniveau erreichte (Tabelle 12).

4.3.2 Auswirkung der Aufbereitung

Die Aufbereitung hatte in der **fertilen Gruppe** keine signifikanten Auswirkungen auf den Anteil Caspase3-positiver Zellen. Dies galt auch für die **subfertile Gruppe** (Tabelle 12).

4.3.3 Auswirkung der Kryokonservierung

In der **fertilen Gruppe** führte der Einfrier-Auftau-Prozess zu einer signifikanten Zunahme des Anteils von Spermatozoen mit positivem Nachweis von Caspase 3 ($5,80 \pm 11,59\%$ vs. $7,33 \pm 6,13\%$), der p-Wert betrug 0,014 (Tabelle 12).

In der **subfertilen Gruppe** konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden, wenn auch hier eine Tendenz zur Zunahme des Anteils Caspase 3 positiver Zellen durch die Kryokonservierung nachzuweisen ist. Der Anteil Caspase 3 positiver nativer Spermatozoen nahm von $7,53\% \pm 8,56$ auf $10,21 \pm 11,73\%$ zu (p-Wert = 0,638) (Tabelle 12).

Möglicherweise war eine größere Probenanzahl erforderlich, um signifikante Veränderungen zu sehen.

4.3.4 Einfluss des Leukozytengehalts

Der Leukozytengehalt hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil an Caspase 3 positiven Spermatozoen (Tabelle 13).

Tabelle 11: Darstellung der Ergebnisse der Caspase3-Färbung im Vergleich für fertile und subfertile Gruppe.

	Caspase 3 vor Aufbereitung (%)	Caspase 3 nach Aufbereitung (%)	Caspase 3 nach Einfrieren (%)
	M±SD Median	M±SD Median	M±SD Median
Fertile Gruppe (n=29)	5,80±11,59 2,0	9,59± 15,88 ¹ 2,0	7,33±6,13 ² (*) 5,50
Subfertile Gruppe (n=13)	7,53±8,56 3,61	10,19±11,52 ³ 4,03	10,21±11,73 ⁴ 6,25
p-Wert	0,129	0,348	0,588

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe. *= **signifikant**

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,626	² p = 0,014*
³ p = 0,917	⁴ p = 0,638

Tabelle 12: Ergebnisse der Caspase3-Färbung für fertile Gruppe, unterteilt nach Leukozytengehalt.

		Fertile Gruppe (n=29)	Subfertile Gruppe (n=13)	p-Wert
		M±SD Median	M±SD Median	
Leukozytengehalt einfach positiv (10-25 Leukozyten/µl) (n=24)	Caspase 3 nativ (%)	2,61±2,48 2,0	10,68±11,55 7,81	0,059
	Caspase 3 nach Aufbereitung (%)	13,50±18,35 ¹ 3,0	11,35±14,46 ⁵ 3,36	0,966
	Caspase 3 nach Einfrieren (%)	6,72±6,37 ² 4,76	11,81±16,91 ⁶ 4,99	0,831
Leukozytengehalt zweifach positiv (≥25 Leukozyten/µl) (n=18)	Caspase 3 nativ (%)	8,39± 15,159 2,0	5,56± 6,17 2,61	0,653
	Caspase 3 nach Aufbereitung (%)	6,20± 13,09 ³ 1,03	9,33± 9,76 ⁷ 6,49	0,149
	Caspase 3 nach Einfrieren (%)	7,89± 6,08 ⁴ 6,27	8,84± 5,67 ⁸ 7,69	0,689

Erläuterung zu p-Werten: Spalte „p-Wert“ bezieht sich auf das Signifikanzniveau zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. Die hochgestellten Zahlen verweisen auf die Signifikanzen innerhalb der gleichen Gruppe.

Signifikanz zwischen nativer und aufbereiteter Probe	Signifikanz zwischen nativer und aufgetauter Probe
¹ p = 0,109	² p = 0,068
³ p = 0,460	⁴ p = 0,152
⁵ p = 0,500	⁶ p = 0,893
⁷ p = 0,575	⁸ p = 0,237

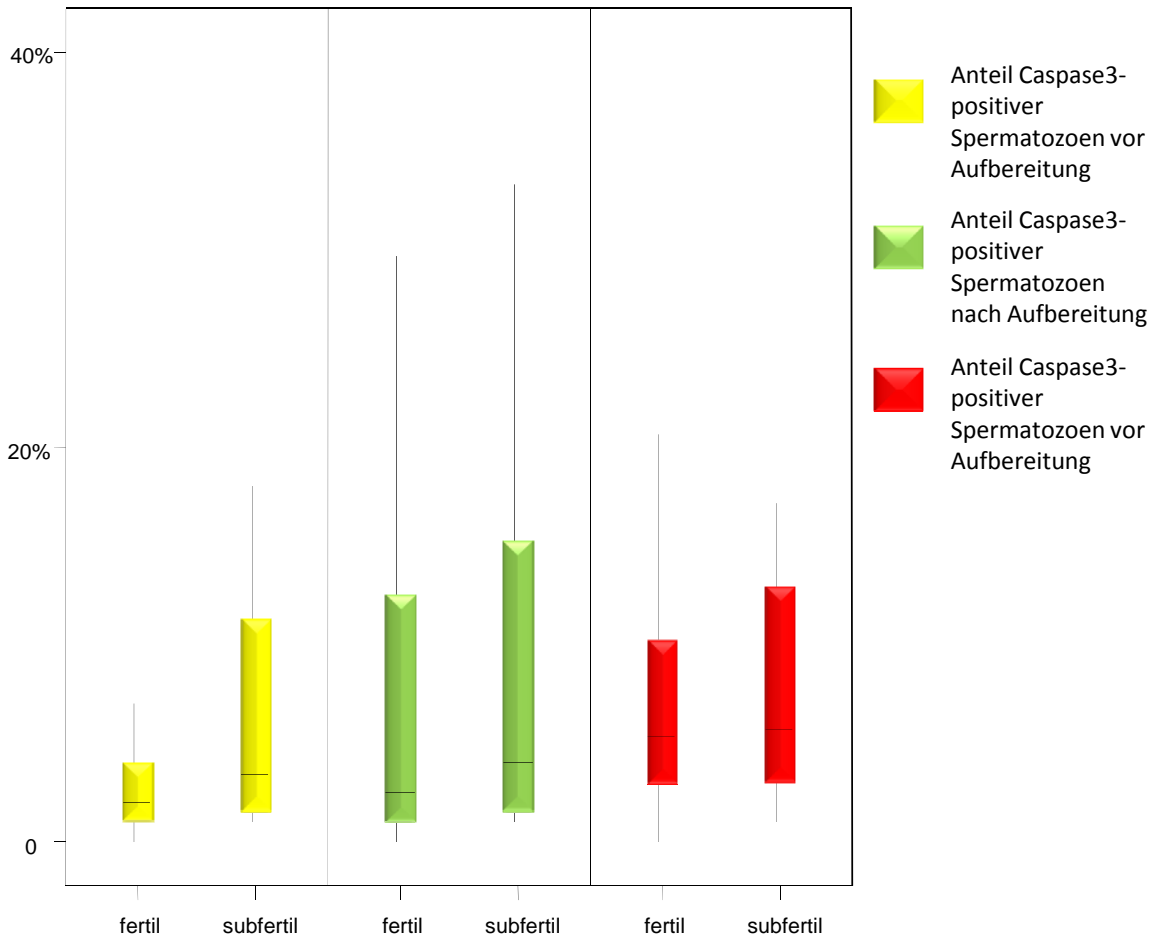


Abbildung 15: Unterschied in den Anteilen Caspase 3 positiver Spermatozoen zwischen fertiler und subfertiler Gruppe

4.4 Korrelationen zwischen TUNEL- und Caspase3-Färbung

Korrelationen zwischen der TUNEL-Färbung und der Caspase3-Färbung ergaben sich weder für die fertile noch für die subfertile Gruppe (Tabelle 16 und 17).

In der **fertilen Gruppe** korrelierte allerdings der Anteil **TUNEL positiver Zellen** vor Aufbereitung mit dem Anteil positiver Zellen **nach Aufbereitung** signifikant positiv mit einem Korrelationsfaktor $r = 0,438$ ($p=0,025$) (Tabelle 16, Abbildung 15).

Tabelle 13: Korrelationen zwischen Caspase und TUNEL für fertile Gruppe

Parameter		Caspase3 vor Aufbereitung	Caspase3 nach Aufbereitung	Caspase3 nach Auftauen	TUNEL vor Aufbereitung	TUNEL nach Aufbereitung	TUNEL nach Einfrieren
Caspase3 vor Aufbereitung	r	1	-0,228	-0,129	-0,218	-0,239	-0,295
	p		0,243	0,523	0,275	0,230	0,121
Caspase3 nach Aufbereitung	r	-0,228	1	-0,142	0,178	0,036	0,156
	p	0,243		0,487	0,376	0,857	0,429
Caspase3 nach Auftauen	r	-0,129	-0,142	1	0,333	0,103	-0,014
	p	0,523	0,487		0,104	0,623	0,943
TUNEL vor Aufbereitung	r	-0,218	0,178	0,333	1	0,438(*)	-0,099
	p	0,275	0,376	0,104		0,025(*)	0,622
TUNEL nach Aufbereitung	r	-0,239	0,036	0,103	0,438(*)	1	0,040
	p	0,230	0,857	0,623	0,025		0,844
TUNEL nach Einfrieren	r	-0,295	0,156	-0,014	-0,099	0,040	1
	p	0,121	0,429	0,943	0,622	0,844	

* **signifikant**

Tabelle 14: Korrelationen zwischen Caspase und TUNEL für subfertile Gruppe.

Parameter		Caspase3 vor Aufbereitung	Caspase3 nach Aufbereitung	Caspase3 nach Auftauen	TUNEL vor Aufbereitung	TUNEL nach Aufbereitung	TUNEL nach Einfrieren
Caspase3 vor Aufbereitung	r	1	-0,355	-0,203	-0,238	-0,366	-0,266
	p		0,234	0,528	0,480	0,243	0,403
Caspase3 nach Aufbereitung	r	-,355	1	-0,178	-0,354	0,197	-0,008
	p	,234		0,560	0,285	0,518	0,979
Caspase3 nach Auftauen	r	-,203	-0,178	1	0,623	0,334	0,220
	p	,528	0,560		0,054	0,288	0,493
TUNEL vor Aufbereitung	r	,138	0,108	0,262	1	-0,127	-0,512
	p	,653	0,724	0,410		0,694	0,130
TUNEL nach Aufbereitung	r	-,366	0,197	0,334	0,083	1	0,465
	p	,243	0,518	0,288	0,809		0,128
TUNEL nach Einfrieren	r	-,266	-0,008	0,220	-0,512	0,465	1
	p	,403	0,979	0,493	0,130	0,128	

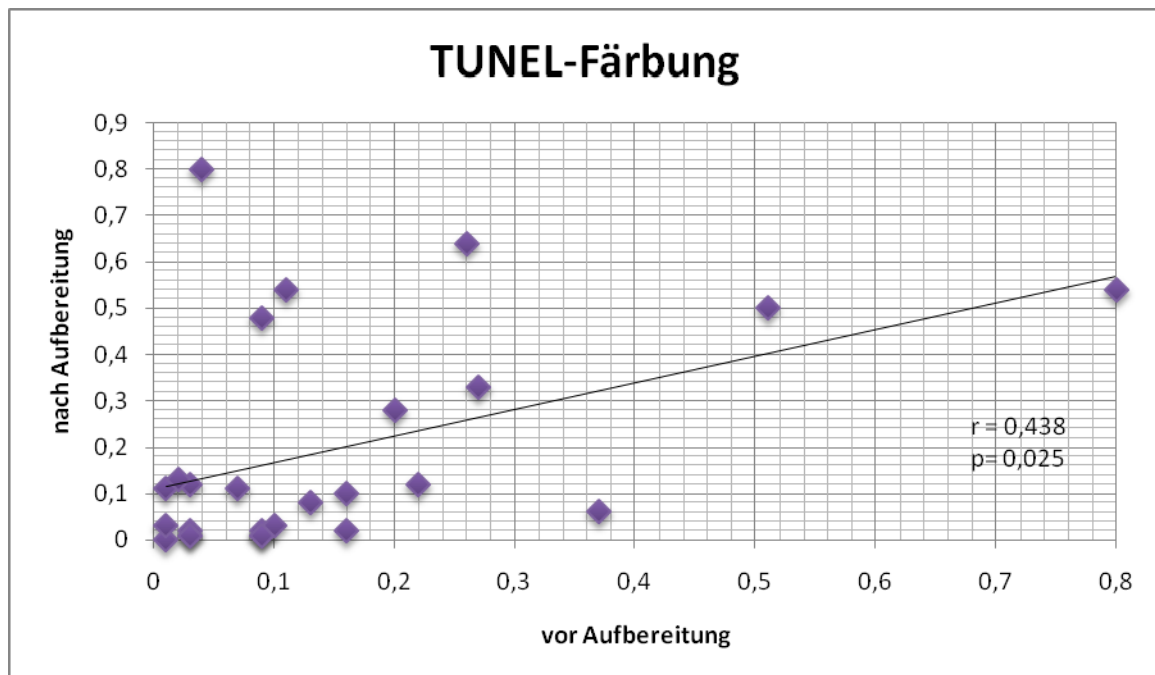


Abbildung 15: Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen vor Aufbereitung mit TUNEL-positiven Zellen nach Aufbereitung für fertile Gruppe

4.5 Korrelation zwischen den Apoptoseparametern (TUNEL und Caspase-3) und den Parametern der klassischen Samenanalyse

4.5.1 Korrelation zwischen der TUNEL-Färbung und den Parametern der klassischen Samenanalyse

In der **fertilen Gruppe** zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen nativen Spermatozoen und den Parametern der klassischen Samenanalyse.

In der **subfertilen Gruppe** korrelierte die TUNEL-Färbung **im nativen Sperma vor Aufbereitung** signifikant **positiv** mit dem **Volumen** ($r=0,661$, $p=0,014$) sowie signifikant negativ mit der **Globalmotilität nach Aufbereitung** ($r=-0,866$, $p=0,003$) (Tabelle 18, Abbildung 23).

Der Anteil positiver Spermatozoen in der TUNEL-Färbung **nach Aufbereitung** korrelierte in der **fertilen Gruppe** signifikant **negativ** mit der **Globalmotilität nach Aufbereitung** ($r=-0,425$, $p=0,012$) (Tabelle 17, Abbildung 19).

Der Anteil TUNEL-positiver Spermatozoen **nach Aufbereitung** korrelierte in der **subfertilen Gruppe** signifikant **negativ** mit dem **pH-Wert** ($r=-0,563$; $p=0,045$) (Tabelle 18).

Die TUNEL-Färbung in den **fertilen Proben nach dem Einfrieren** korrelierte signifikant **negativ** mit der **Vitalität (Eosin-Test) vor Aufbereitung** ($r=-0,304$, $p=0,027$) (Tabelle 17, Abbildung 18).

4.5.2 Korrelation zwischen der Caspase3-Färbung und den Parametern der klassischen Samenanalyse

In der **subfertilen Gruppe** korrelierte die Caspase3-Färbung **vor Aufbereitung** signifikant **negativ** mit der **Spermatozoendichte** ($r=-0,865$, $p=0,0001$) (Tabelle 19, Abbildung 22).

Nach Aufbereitung korrelierte in der **fertilen Gruppe** die Caspase3-Färbung **negativ** mit der **Vitalität** (Eosin-Test) vor Aufbereitung ($r=-0,460$, $p=0,014$) und nach Aufbereitung ($r=-0,479$; $p=0,011$) (Tabelle 18).

In der **subfertilen Gruppe** korrelierte die Caspase3-Färbung **nach Aufbereitung** signifikant negativ mit dem pH-Wert ($-0,558$, $p=0,038$) (Tabelle 19).

Tabelle 15: Korrelationen zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und der Caspase3 Färbung sowie der TUNEL-Färbung für fertile Gruppe

		Caspase3 vor Aufbereitung	Caspase3 nach Aufbereitung	Caspase3 nach Auftauen	TUNEL vor Aufbereitung	TUNEL nach Aufbereitung	TUNEL nach Einfrieren
HOS vor Aufbereitung	r	0,045	0,023	0,024	-0,155	-0,130	-0,052
	p	0,756	0,871	0,866	0,279	0,363	0,703
HOS nach Aufbereitung	r	-0,195	-0,041	-0,027	0,057	-0,063	-0,039
	p	0,202	0,786	0,860	0,704	0,670	0,788
HOS nach Auftauen	r	0,103	-0,003	0,133	-0,247	-0,277	-0,118
	p	0,486	0,983	0,369	0,215	0,060	0,400
Volumen	r	0,036	0,126	0,057	0,122	0,087	0,057
	p	0,801	0,376	0,688	0,388	0,540	0,677
pH-Wert	r	-0,182	0,148	-0,184	0,103	0,253	0,042
	p	0,226	0,323	0,222	0,489	0,091	0,770
Spermatozoendichte in Millionen/ml	r	0,055	0,167	-0,009	-0,003	-0,120	-0,114
	p	0,707	0,255	0,948	0,983	0,412	0,415
Eosin vor Aufbereitung	r	0,202	-0,460 (*)	0,121	-0,344	-0,273	-0,304(*)
	p	0,303	0,014	0,398	0,079	0,059	0,027
Eosin nach Aufbereitung	r	0,227	-0,479 (*)	-0,039	-0,246	-0,158	-0,053
	p	0,255	0,011	0,789	0,090	0,275	0,704
Eosin nach Auftauen	r	0,056	-0,141	0,142	-0,176	-0,208	-0,158
	p	0,714	0,362	0,360	0,243	0,178	0,281
Motilität progressiv vor Aufbereitung	r	0,194	0,000	0,210	-0,239	-0,219	-0,011
	p	0,229	1,000	0,191	0,134	0,173	0,942
Motilität progressiv nach Einfrieren	r	0,015	0,029	-0,041	0,028	-0,350	0,028
	p	0,948	0,898	0,869	0,899	0,113	0,899
Globalmotilität vor Aufbereitung	r	0,140	-0,178	0,104	-0,172	-0,138	0,063
	p	0,333	0,218	0,472	0,229	0,340	0,649
Globalmotilität nach Aufbereitung	r	0,276	-0,153	0,151	-0,297	-0,652(*)	-0,096
	p	0,109	0,367	0,391	0,080	0,002	0,560
Globalmotilität nach Einfrieren	r	-0,186	-0,138	0,549	0,080	-0,148	0,080
	p	0,407	0,532	0,080	0,711	0,496	0,711
Morphologie normal vor Aufbereitung	r	-0,222	-0,241	-0,066	0,120	-0,269	0,127
	p	0,241	0,202	0,722	0,524	0,145	0,470
Morphologie normal nach Aufbereitung	r	-0,068	-0,055	0,214	0,026	-0,206	0,013
	p	0,717	0,769	0,244	0,892	0,261	0,939

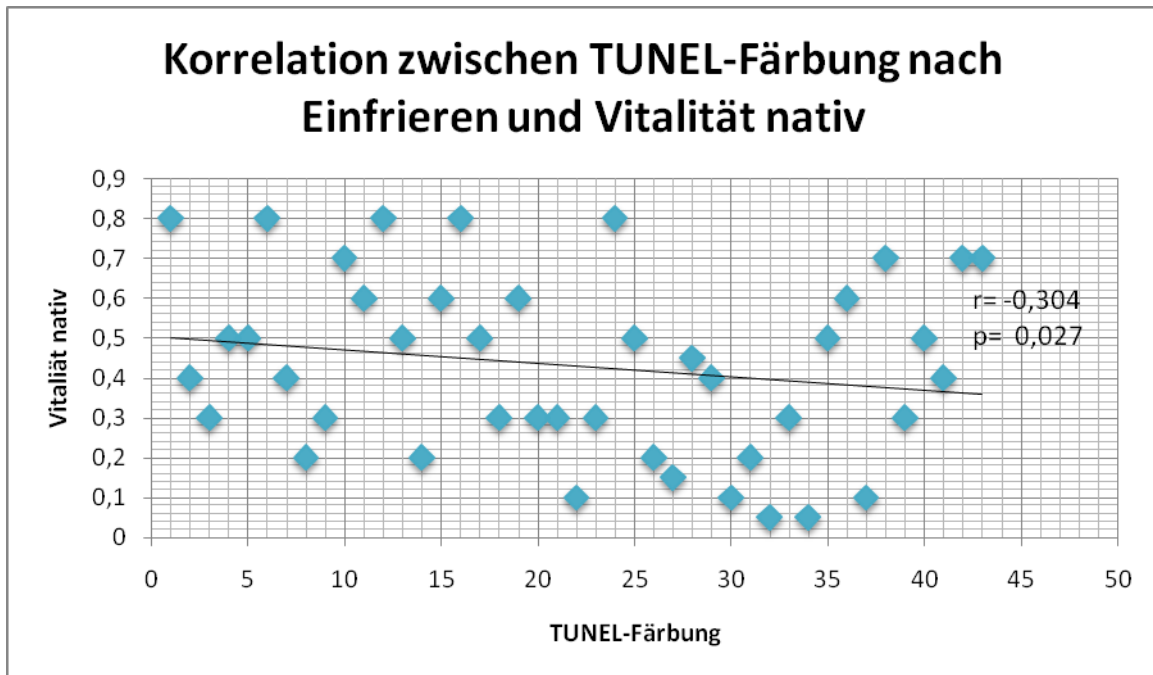


Abbildung 16: Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen nach Einfrieren mit der Globalmotilität vor Aufbereitung für fertile Gruppe

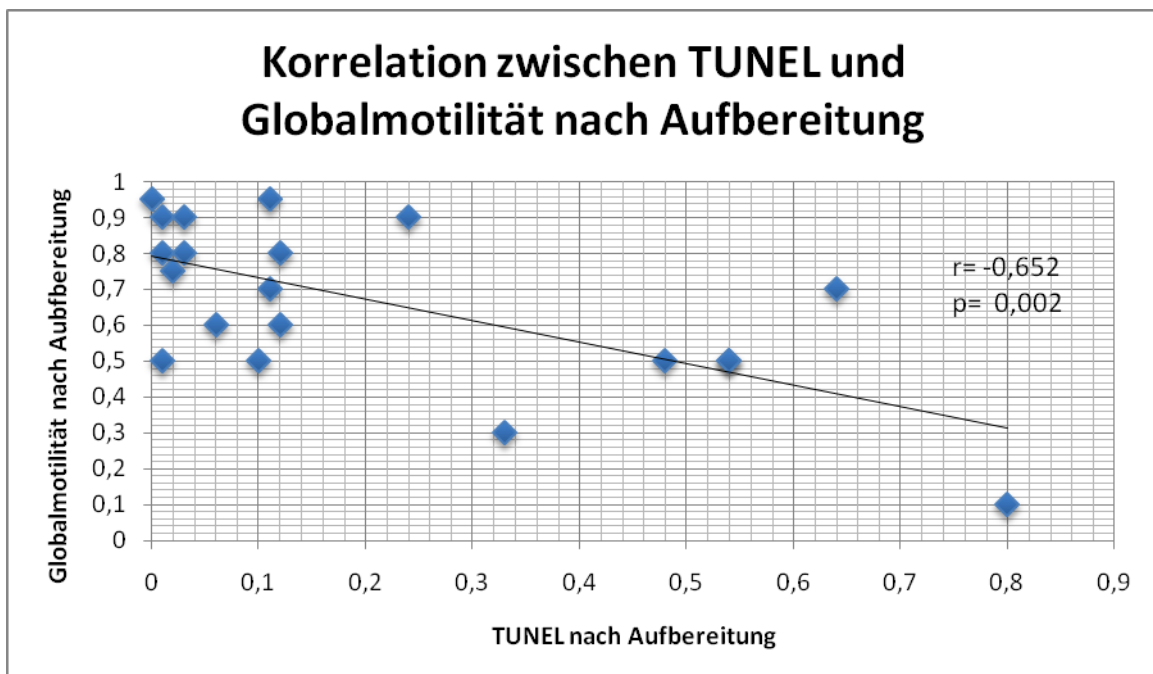


Abbildung 17: Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen nach Aufbereitung mit der Globalmotilität nach Aufbereitung für fertile Gruppe

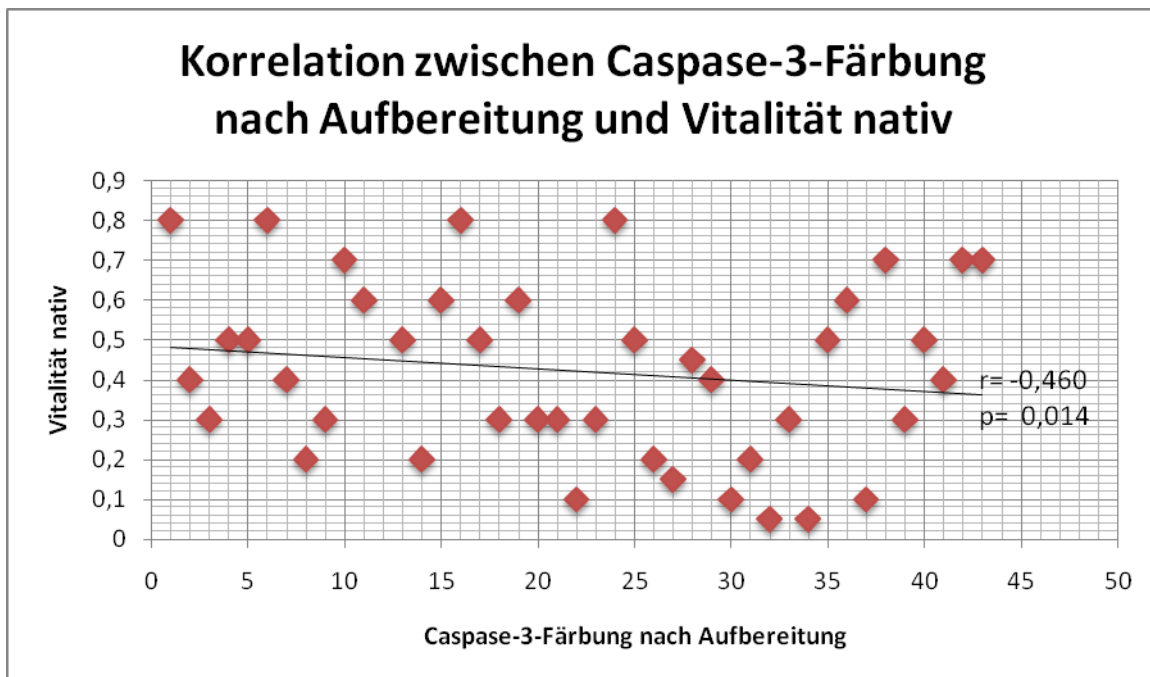


Abbildung 18: Korrelation zwischen Caspase-3-Färbung nach Aufbereitung und Vitalität (Eosin-Test) nativ für fertile Gruppe

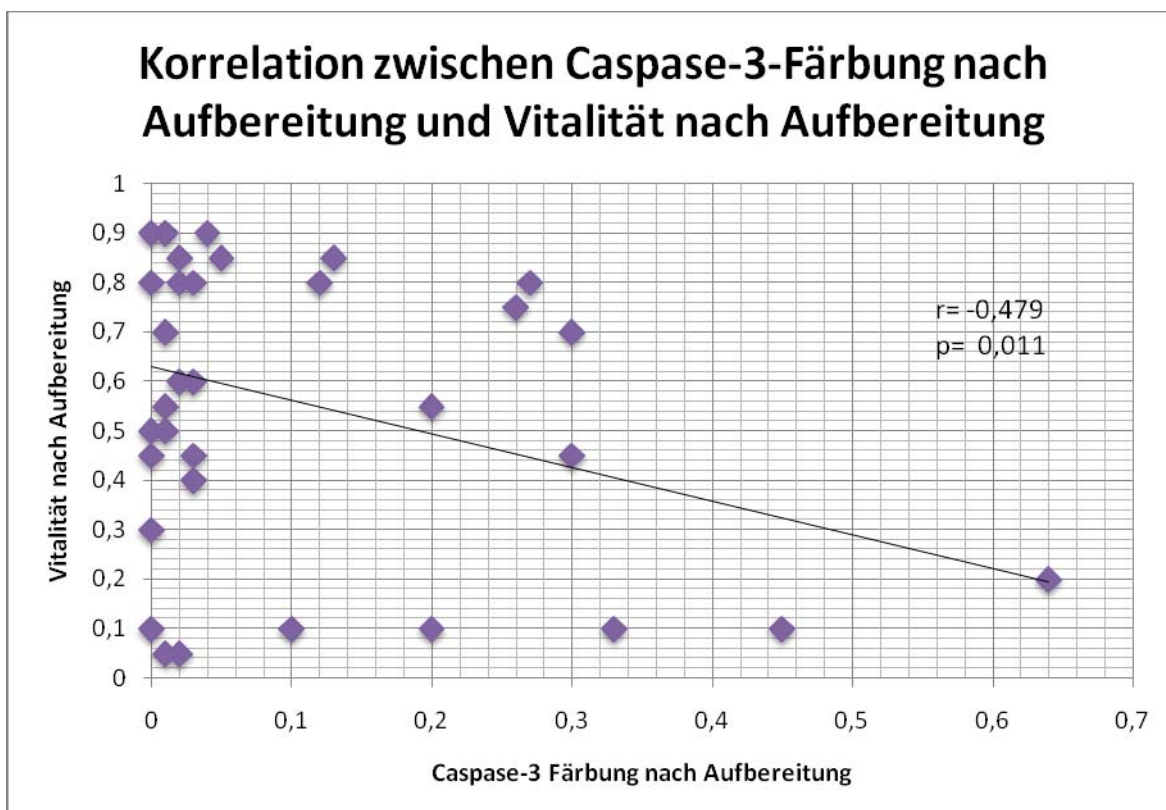


Abbildung 19: Korrelation zwischen Caspase-3-Färbung nach Aufbereitung und Vitalität nach Aufbereitung für fertile Gruppe

Tabelle 16: Korrelationen zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und der Caspase3 Färbung sowie der TUNEL-Färbung für subfertile Gruppe

		Caspase3 vor Auf- bereitung	Caspase3 nach Auf- bereitung	Caspase3 nach Auftauen	TUNEL vor Auf- bereitung	TUNEL nach Aufbereitung	TUNEL nach Einfrieren
HOS vor Aufbereitung	r	0,063	0,295	0,361	0,308	-0,191	-0,037
	p	0,837	0,306	0,226	0,306	0,531	0,905
HOS nach Aufbereitung	r	-0,044	0,376	0,318	0,359	-0,085	-0,044
	p	0,886	0,186	0,290	0,228	0,783	0,886
HOS nach Auftauen	r	-0,233	0,270	0,146	-0,145	-0,066	0,275
	p	0,444	0,351	0,635	0,635	0,831	0,363
Volumen	r	-0,197	0,071	0,061	0,661(*)	-0,380	-0,412
	p	0,518	0,809	0,842	0,014	0,200	0,161
pH-Wert	r	0,500	-0,558(*)	-0,235	0,184	-0,563(*)	-0,357
	p	0,082	0,038	0,440	0,547	0,045	0,232
Spermatozoen- dichte in 10 ⁶ /ml	r	-0,865(*)	0,151	0,090	-0,231	0,027	0,214
	p	0,0001	0,606	0,770	0,448	0,931	0,483
Eosin vor Aufbereitung	r	-0,316	-0,094	-0,118	-0,313	-0,177	0,305
	p	0,292	0,748	0,700	0,298	0,564	0,310
Eosin nach Aufbereitung	r	-0,163	-0,083	-0,324	-0,464	-0,528	0,292
	p	0,596	0,779	0,281	0,110	0,064	0,333
Eosin nach Auftauen	r	-0,268	0,085	0,137	-0,290	0,030	0,134
	p	0,520	0,829	0,746	0,487	0,938	0,751
Motilität progressiv vor Aufbereitung	r	-0,194	0,425	-0,129	-0,323	0,003	--
	p	0,525	0,130	0,674	0,282	0,992	0,0001
Motilität progressiv nach Einfrieren	r	-0,122	-0,338	-0,070	0,217	-0,315	0,154
	p	0,774	0,413	0,870	0,606	0,447	0,716
Motilität global vor Aufbereitung	r	-0,162	0,205	0,048	-0,386	-0,089	0,415
	p	0,597	0,481	0,877	0,193	0,773	0,158
Motilität global nach Aufbereitung	r	-0,145	-0,044	-0,367	-0,866(*)	0,093	0,659
	p	0,709	0,904	0,297	0,003	0,813	0,054
Motilität global nach Einfrieren	r	-0,195	-0,492	0,172	0,313	-0,250	0,086
	p	0,643	0,216	0,683	0,450	0,550	0,840
Morpho Histo normal vor Aufbereitung	r	0,420	-0,583	-0,157	-0,052	-0,209	-0,157
	p	0,407	0,225	0,801	0,922	0,691	0,767

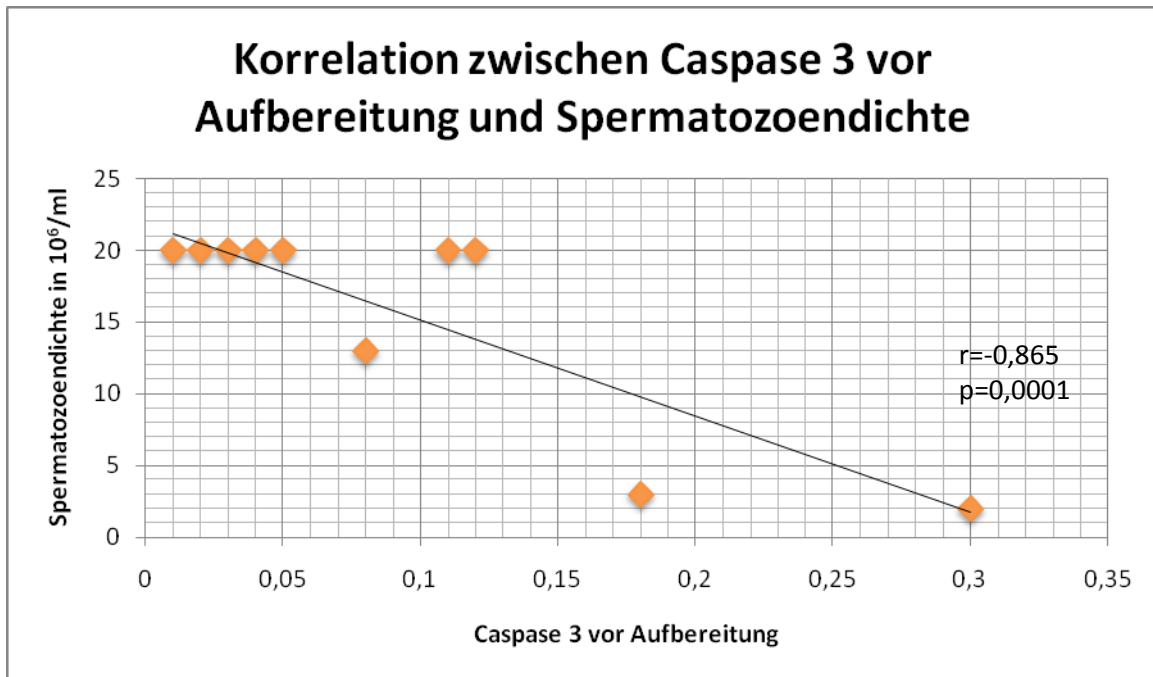


Abbildung 20: Korrelation zwischen Caspase3-positiven Zellen vor Aufbereitung mit der Spermatozoendichte für subfertile Gruppe

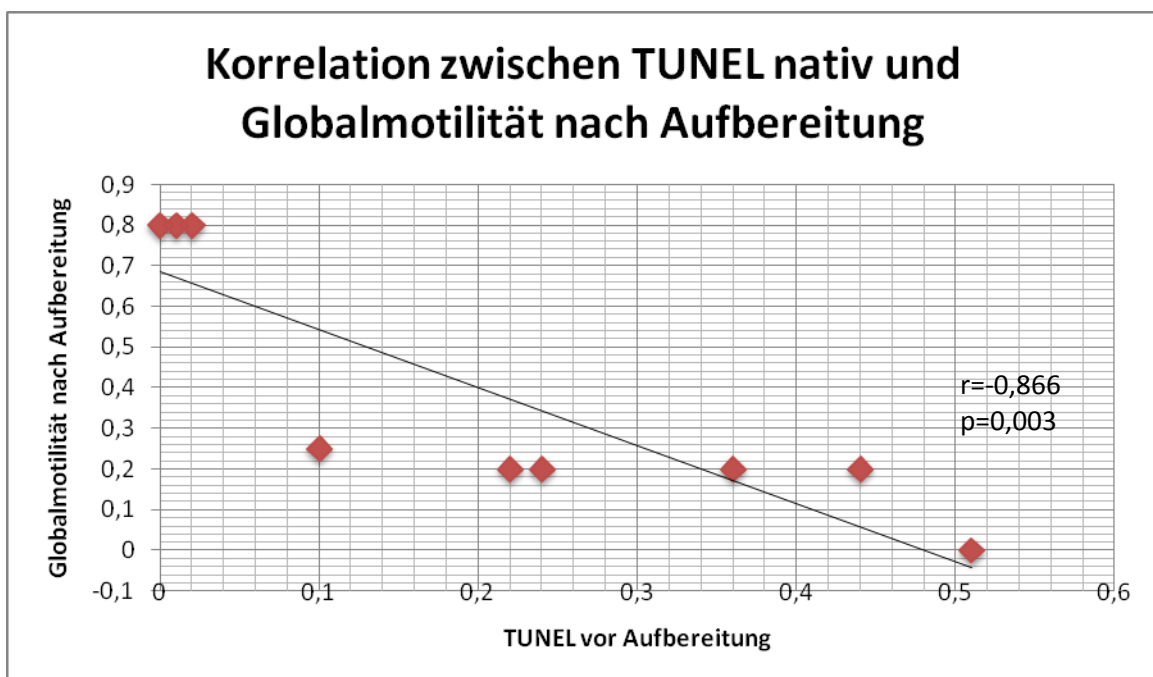


Abbildung 21: Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen vor Aufbereitung mit der Globalmotilität nach Aufbereitung für subfertile Gruppe

4.6. Vergleich der Auswirkungen der Kryokonservierung zwischen fertiler und subfertiler Gruppe

Der Einfrier-Auftau-Prozess hatte eine Zunahme des Anteils von Caspase-3 bzw. TUNEL-positiven Spermatozoen zur Folge. Vergleicht man das Ausmaß der Zunahme zwischen fertiler und subfertiler Gruppe, so ist kein signifikanter Unterschied zwischen fertiler und subfertiler Gruppe zu beobachten. So nahm der Mittelwert von TUNEL-positiven Spermatozoen der fertilen Gruppe nach Kryokonservierung um $17,44 \pm 25,73$ Prozentpunkte zu, im Vergleich zu einer Zunahme von $6,17 \pm 30,75$ Prozentpunkten in der subfertilen Gruppe ($p=0,358$).

Gleichermaßen traf dies auch auf die Caspase3-Färbung zu: In der fertilen Gruppe war eine Zunahme nach Kryokonservierung von $1,85 \pm 13,89$ Prozentpunkten im Vergleich zu einer Zunahme von $2,25 \pm 16,41$ Prozentpunkten in der subfertilen Gruppe zu beobachten ($p=0,578$) (Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleich der Zunahme der Anteile positiver Zellen nach Kryokonservierung für TUNEL- und Caspase3-Färbung im Vergleich für fertile und subfertile Gruppe

	Fertile Gruppe (n=25)	Subfertile Gruppe (n=11)	p-Wert
	M±SD	M±SD	
	Median	Median	
TUNEL-Färbung: Differenz der Mittelwerte Nativ vs. nach Kryokonservierung (%)	$17,44 \pm 25,73$ 16,0	$6,17 \pm 30,75$ 6,5	0,358
Caspase3-Färbung: Differenz der Mittelwerte Nativ vs. nach Kryokonservierung (%)	$1,85 \pm 13,89$ 3,0	$2,25 \pm 16,41$ 2,5	0,578

5. Diskussion

5.1 Die Parameter der klassischen Samenanalyse

Die Parameter der klassischen Samenanalyse, insbesondere die Beurteilung der Vitalität (Eosin-Test), die Beurteilung der Membranstabilität (HOS-Test) und die Beurteilung der Motilität (progressiv und global) sind eine schnelle und effektive Methode zur Erfassung des Status von Spermatozoen.

In gewissem Ausmaß scheinen sie den Erfolg einer künstlichen Befruchtung vorhersagen zu können. Dies wurde am häufigsten für die Morphologie (Coetzee et al., 1998; Van Waart et al., 2001) beschrieben. Auch für die Motilität liegen Daten vor, dass eine gewisse Vorhersagekraft für den Ausgang einer künstlichen Befruchtung besteht (Robinson et al., 1994).

Die Gruppen wurden gemäß ihrer Spermatozoendichte voneinander abgegrenzt. Es zeigten sich durchweg bessere Werte der nativen ejakulierten Spermatozoen in der fertilen Gruppe im Vergleich zu der subfertilen Gruppe, das Signifikanzniveau wurde allerdings nur für die Morphologie erreicht (Tabelle 9). Die besseren Werte der Parameter der klassischen Samenanalyse in Proben der Gruppe „fertile Spermatozoen“ zeigt, dass das Unterscheidungsmerkmal Spermatozoendichte in der Lage ist, zwei gut definierte Qualitätsgruppen voneinander abzugrenzen.

Bis auf die Spermiedichte wurde in vorliegender Studie in allen Parametern eine Abweichung gegenüber den Normwerten der WHO (1999) in der Gesamtgruppe festgestellt. Der Grund für diese Abweichung liegt darin, dass alle Proben von Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch stammten und daher von einer schlechteren Samenqualität im Vergleich zu der Normalpopulation auszugehen ist. In der Gesamtgruppe lagen die Mittelwerte die Vitalität (Eosin-Test) mit 43% unterhalb des Normwertes von 50%, die Membranstabilität (HOS-Test) ebenfalls mit 51% unterhalb des Normwertes von 60%. Weiterhin sahen wir eine Abweichung für die Globalmotilität (Mittelwert 31%, Normwert > 40%) und die progressive Motilität (Mittelwert 3,2%, Normwert > 25%). Auch die Morphologie wich von den definierten Normwerten mit 15% Normalformen ab (Mittelwert 5%) (Tabelle 8). In der fertilen Gruppe waren bis auf die Spermienkonzentration ebenfalls viele Parameter unterhalb der definierten Normalgrenzen. Dies traf für die Vitalität (Eosin-Test), Globalmotilität, progressive Motilität, Membranstabilität (HOS-Test) und Morphologie zu (Tabelle 9).

Erwartungsgemäß betraf die Abweichung von den Normwerten auch die subfertile Gruppe. Diese bezog sich neben der Spermiedichte auf die Vitalität (Eosin-Test) (Abweichung um fünf Prozentpunkte), Globalmotilität (Abweichung um acht Prozentpunkte), progressive Motilität (Mittelwert 4,5%, Normwert >25%), Membranstabilität (HOS-Test) (Abweichung um sechs Prozentpunkte) und Morphologie (Mittelwert 5,8%, Normwert > 25%) (Tabelle 9).

Die Aufbereitung mittels der Methoden swim up® und Dichtegradientenzentrifugation hatte in beiden Gruppen einen positiven Effekt auf die Qualität der Spermatozoen. Vitalität und Globalmotilität verbesserten sich signifikant (Tabelle 9). Dies verdeutlicht den Stellenwert dieser Methodik, welche heutzutage zu den Standards jedes IVF-Labors gehört.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in Einklang mit einer Vielzahl an Veröffentlichungen, welche den positiven Effekt der Aufbereitung mittels swim up® und Dichtegradientenzentrifugation nachweisen (Akerlöf et al., 1987; Purvis und Egdetveit, 1993; Agida und Kumar, 2001).

Auch nach Aufbereitung zeigten die Spermatozoen der fertilen Gruppe eine signifikant höhere Vitalität (Eosin-Test) und eine signifikant bessere Globalmotilität. Diese Beobachtung veröffentlichten auch Purvis und Egdetveit (1993).

Spermatozoen mit reduzierter Qualität sind besonders empfindlich gegenüber den freien Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species/ROS), welche auch im Rahmen der Zentrifugation entstehen. Diese könnten mitochondriale Defekte induzieren und eine Verschlechterung von Motilität und Vitalität nach der Aufbereitung bewirken (Aitken und Clarkson, 1988). Dass einerseits geschädigte Spermatozoen durch die Aufbereitung entfernt werden und andererseits neue Schäden gesetzt werden, könnte den fehlenden signifikanten Effekt der Aufbereitung auf die Spermien der subfertilen Gruppe erklären.

Die Kryokonservierung ist ein wichtiger Bestandteil der assistierten Reproduktionsmedizin und ermöglicht die Konservierung von Spermatozoen und Oozyten vor fertilitätsschädigender Therapie, wie beispielsweise vor Chemotherapie bei malignen Erkrankungen. Nach Abschluss der therapeutischen Maßnahmen können aufgetaute Gameten im Rahmen der künstlichen Befruchtung zum Kinderwunsch verhelfen.

Die Probleme mit denen die Kryokonservierung zu kämpfen hat, sind die Induktion vielfältiger Schäden an Spermatozoen und die hierdurch reduzierte Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen künstlichen Befruchtung.

Einer der wichtigen Gründe für das Auftreten zellulärer Schäden ist die Bildung von Eiskristallen im Zytoplasma. Dadurch wird dem umgebenden Plasma Flüssigkeit entzogen, wodurch eine hyperosmolare Lösung entsteht. Durch osmotischen Druck hereinströmender Flüssigkeit ist letztendlich eine Ruptur der Plasmamembran möglich (Muldrew et al., 1990; Watson et al., 1995). Schnelle Änderungen in der Osmolarität treten insbesondere häufig im Rahmen des Einfrier-Auftau-Vorgangs auf und können dadurch zu einer Zellmembranschädigung und zu Schäden an den Zellorganellen führen. Dies bedingt das Absterben des Spermatozoons (Ozkavukcu et al., 2008).

In der vorliegenden Studie zeigten sich eine Reihe negativer Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Parameter der klassischen Samenanalyse. Nach dem Auftauen traten eine signifikante Abnahme der Vitalität (Eosin-Test), der Membranstabilität (HOS-Test) sowie der Globalmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe auf (Tabelle 9).

Eine Reihe von Publikationen wiesen ebenfalls die negativen Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermatozoen nach. Ozkavukcu et al. (2008) beobachteten eine Abnahme der Vitalität und der Motilität nach dem Auftauen. Sie wiesen eine starke negative Korrelation zwischen Vitalität und Motilität nach. Daher führten sie die Abnahme der Motilität nach Kryokonservierung auf die Abnahme der Vitalität zurück.

O'Connell et al. (2002) beschrieben eine Abnahme der Vitalität und Motilität nach Kryokonservierung. Sie demonstrierten ferner, dass der Einfrier-Auftau-Vorgang zu mitochondrialen Schäden führt. Daraus zogen sie den Schluss, dass die Abnahme der Motilität nach Kryokonservierung durch mitochondriale Schäden mit bedingt sein könnte. Unsere Ergebnisse sind weiterhin in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hauser et al. (1992) sowie den Ergebnisse von Hammadeh et al. (1999), welche ebenfalls eine deutliche Abnahme der Membranstabilität (HOS-Test) nach dem Auftauen nachweisen konnten.

In der Publikation von Thomson et al. (2009) wurde gezeigt, dass durch Hinzugabe eines Antioxidativums die Vitalität und Motilität nach Kryokonservierung verbessert werden konnte. Daher führten sie die Ursache für die Abnahme der Vitalität und Motilität unter anderem auf die Entstehung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS) während des Einfrier-Auftau-Vorgangs zurück.

Für die Einführung verbesserter kryoprotektiver Maßnahmen ist es notwendig, abseits der Schäden, welche durch Standardmethoden festgestellt werden können, biochemische Schäden

zu erkennen und ihre Genese zu verstehen. Möglicherweise spielt auch die Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle.

5.2 DNA-Fragmentation (TUNEL-Test)

Mehrere Methoden zur Erfassung von DNA-Fragmentation sind beschrieben. Zur Anwendung kommen TUNEL-Test, SCSA-Test („sperm chromatin structure assay“) und der Comet-Test.

Die Anwendung des TUNEL-Tests an Spermatozoen zur Erfassung von DNA-Fragmentation wurde durch Gorczykra (1993) implementiert und gehört heute zu den häufiger angewandten Tests. Das Prinzip des Tests wurde bereits in Kapitel 3 eingehend dargestellt.

Im SCSA-Test macht man sich die Eigenschaft des Fluorochroms Acridin Orange (AO) zu Nutze, nach Bindung an native (doppelsträngige) DNA grün zu fluoreszieren, aber nach Bindung an denaturierte DNA rot zu fluoreszieren (Ichimura et al., 1971; Evenson et al., 1991, 2000, 2002).

Der Comet-Test untersucht DNA mittels Elektrophorese. Geschädigte DNA wandert dabei aus dem Zellkern, dies wird unter dem Mikroskop visualisiert (Ostling und Johanson, 1984; Santos und Singh, 1997). Da hierfür die Proben in flüssiger Form vorliegen müssen und die Proben der vorliegenden Studie teilweise in fixierter Form auf Objektträgern vorlagen, kam diese Untersuchungsmethode nicht in Betracht.

Die vorliegende Studie wies im Nativsperma der fertilen Gruppe einen geringeren Anteil von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Test) im Vergleich zu der subfertilen Gruppe nach, wenn auch dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau erreichte ($14,85 \pm 17,64\%$ vs. $19,84 \pm 17,52\%$; p-Wert 0,493) (Tabelle 10). In der fertilen Gruppe lagen $5,80 \pm 11,59\%$ Spermatozoen mit Caspasenaktivität und in der subfertilen Gruppe nur $7,53 \pm 8,56\%$ Spermatozoen mit Caspasenaktivität vor, d.h. weniger als die Hälfte. Da eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Strangbrüchen und Nachweis von Caspase-3 in nativen Spermatozoen weder für die fertile noch für die subfertile Gruppe nachzuweisen war (Tabelle 16), muss davon ausgegangen werden, dass noch weitaus weniger als die Hälfte aller Spermatozoen mit Strangbrüchen gleichzeitig eine Caspasenaktivierung aufweisen. In der Mehrheit aller Spermatozoen mit DNA-Strangbrüchen ist die Caspase-3 nicht mit aktiviert.

Sakkas et al. (2002) zeigten, dass in subfertilen Samenproben eine große Population mit ausschließlicher DNA-Fragmentation ohne weitere Expression anderer Apoptosemarker wie

Fas oder Bcl-x existiert. Zudem veröffentlichten Paasch et al. (2003) eine Studie, in der sie eine Population von Spermatozoen beschreiben, welche ohne erhöhte Caspasenaktivität eine DNA-Fragmentierung aufweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die Beobachtungen von McPherson et al. (1993b) sein, dass Strangbrüche in bestimmten Abschnitten der Spermatogenese von Ratten physiologisch vorkommen. Marcon et al. (2004) konnten nachweisen, dass sich die DNA-Strangbrüche fast ausschließlich auf die Abschnitte der Spermatogenese beschränken, in denen physiologischerweise der Austausch von Histonen durch Protamine stattfindet. Anders als in somatischen Zellen, ist das Chromatin in Spermatozoen hochgradig kondensiert, um die DNA vor äußeren Einflüssen und Schäden bis zur Penetration in die Oozyte zu bewahren. In den späteren Stadien der Spermatogenese werden Histone durch Protamine ersetzt. Dies ermöglicht der DNA Ringformen zu bilden und somit den hohen Kondensationsgrad zu erreichen (Balhom, 1982). Der Grund für das passagere Auftreten der DNA-Fragmentation könnte sein, dass im Rahmen des Austauschs Supercoilings entstehen (Risley et al., 1986; Boissonneault, 2002), welche durch das Setzen von DNA-Strangbrüchen wieder entlastet werden müssen. Marcon et al. (2004) zeigten ferner, dass diese DNA-Strangbrüche nach Abschluss des Histon-Protamin-Austauschs wieder repariert werden. Leduc et al. (2007) wiesen in weiteren Studien an Mäuse-Testi nach, dass eine Unterform der Topoisomerase Typ II insbesondere in den Abschnitten der Spermatogenese vorkommt, in denen der Histon-Protamin-Austausch stattfindet. Topoisomerase II ist das Enzym, welches für die Entstehung und Reparatur von Strangbrüchen innerhalb der nukleären DNA verantwortlich ist. (Sakkas et al, 1999; Henkel et al, 2004). Jeder Defekt dieses Enzymes hat negative Auswirkungen auf den Schutz und den Inhalt der genetischen Informationen und trägt zur männlichen Infertilität bei. Die Zugabe von Topoisomerase-Inhibitoren führte in einer experimentellen Studie, zu einem Anstieg von Strangbrüchen der nukleären DNA (Lewis und Aitken, 2005) und unterstützt damit die Vorstellung, dass bei Defekten dieses Enzyms Strangbrüche nicht mehr repariert werden könnten und hierdurch einzel- und doppelsträngige DNA-Brüche entstehen, welche letztendlich in ejakulierten Spermatozoen persistieren, wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen konnten.

In somatischen Zellen führt das apoptotische Signal in einem bestimmten Stadium zu einer unumkehrbaren Signalkaskade („point of no return“). Die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen deutet regelhaft auf die komplette Ausführung des Signals hin. Die Beobachtung, dass ein isoliertes Auftreten von DNA-Strangbrüchen in offensichtlich nicht die

Apoptose durchlaufenden, vitalen Spermatozoen möglich ist, hat durch Sakkas et al. (1999) zu der Prägung des Begriffs der „abortiven Apoptose“ geführt. In ihrer Publikation postulieren Sakkas et al. (1999), dass die abortive Apoptose in Spermatischen vor der Ausreifung zum Spermium ausgelöst wird, wenn die Transkription noch aktiv ist und zu DNA-Schäden führen kann. Wieso es hierzu kommt, versuchten hauptsächlich zwei Theorien zu erklären: Infertile Männer könnten nicht genügend Spermatozoen produzieren, um Sertoli-Zellen zur Produktion von Fas zu animieren oder die Fortleitung des Fas-Signals zur Ausführung der Rezeptor-vermittelten Apoptose am Spermatozoon könnte gestört sein (Agarwal und Said, 2003, Lewis und Aitken, 2005). Isolierte DNA-Strangbrüche in nativen ejakulierten Spermatozoen ohne weiteren Nachweis von Markern der Apoptose, wie sie zum Teil auch in unserer Studie nachzuweisen waren, könnten also Ausdruck eines defekten DNA-Reparatursystems während der Gametogenese sein.

Die Aufbereitung hatte für beide Gruppen keinen signifikanten Effekt (fertile Gruppe $14,85 \pm 17,64\%$ vs. $19,74 \pm 23,16\%$, p-Wert=0,790; subfertile Gruppe $19,84 \pm 17,52\%$ vs. $27,73 \pm 25,84\%$, p-Wert=0,308 (Tabelle 10)). Auch Stevanato et al. (2008) konnten keinen Effekt der Aufbereitungsmethode mittels Dichtegradient auf die Rate von DNA-Strangbrüchen an Spermatozoen von 35 Samenproben nachweisen. Zwei Studien kamen allerdings zu hierzu widersprüchlichen Ergebnissen (Donnelly et al., 2000 und Morrell et al., 2004). Donnelly et al. (2000) sahen an 25 Proben von Patienten einer Infertilitätsambulanz nach Aufbereitung mittels „Percoll-Gradienten“ eine signifikante Reduktion der DNA-Fragmentierung (TUNEL-Test) (p-Wert<0,05). Eine direkte Übertragung auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie ist allerdings nicht möglich, da hier nicht die Aufbereitungsmethode „Percoll-Gradient“, sondern swim up® und pure sperm® eingesetzt wurden. Ng et al. (1992) verglichen „Percoll“ mit swim up® und gelangten zu dem Schluss, dass nach Aufbereitung mittels „Percoll-Gradient“ eine höhere Rate an progressiven Spermatozoen erhalten bleibt, während für die übrigen Parameter mit der Aufbereitungsmethode swim up® die besseren Ergebnisse erzielt werden. Die Diskrepanz von Donnelly et al. (2000) zu der vorliegenden Studie könnte darin begründet sein, dass durch den höheren Anteil an progressiven Spermatozoen auch anteilig mehr Spermatozoen ohne DNA-Schäden erhalten bleiben und hierdurch eine Reduktion von DNA-Schäden nach Aufbereitung mittels „Percoll-Gradient“ eintritt.

Morrell et al. (2004) untersuchten anhand 9 Proben unbekanntem Fertilitätsstatus den Effekt der Aufbereitung mittels pure sperm® auf die DNA-Fragmentation. Es sind keine

Informationen bezüglich der Samenqualität angegeben, wahrscheinlich stammen die Proben allesamt von fertilen Männern. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen vorliegender Studie könnte darin liegen, dass Spermatozoen mit reduzierter Qualität besonders empfindlich gegenüber ROS sind, welche auch im Rahmen der Zentrifugation entstehen. Somit halten sich möglicherweise hier Nutzen und Schaden auf die DNA-Integrität die Waage, während in fertilen Samenproben der Nutzen überwiegt und deswegen eine signifikante Reduktion der DNA-Strangbrüche nach Aufbereitung zu sehen ist.

Möglicherweise lag aber auch in einigen Proben der vorliegenden Studie ein erhöhter Anteil an avitalen Spermatozoen ohne DNA-Strangbrüche vor, so dass deren Entfernung im Rahmen der Aufbereitung zu keiner Verbesserung des prozentualen Anteils von Spermatozoen mit nukleären DNA-Schäden führte. Ein weiterer Hinweis darauf, dass in der subfertilen Gruppe ein hoher Anteil an avitalen oder stark motilitätsgestörten Spermatozoen vorliegt, welcher nach Aufbereitung stark reduziert wird, findet sich in der Beobachtung, dass eine signifikant negative Korrelation zwischen DNA-Strangbrüchen vor Aufbereitung und der Globalmotilität nach Aufbereitung besteht (Tabelle 18). Diese Erklärung findet eine gewisse Unterstützung in den Ergebnissen mehrerer Studien, wonach in normal globalmotilen Spermatozoen ein hoher Gehalt an DNA-Strangbrüchen besteht (Seli et al., 2004; Huang et al., 2005; Benchaib et al., 2007).

Der Interessenschwerpunkt dieser Studie lag auf dem Effekt der Kryokonservierung mittels Stickstoffdampfmethod auf DNA-Strangbrüche und Aktivierung von Caspase-3. Der Einfrier-Auftau-Vorgang führte in der fertilen Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der DNA-Strangbrüche von $14,85 \pm 17,64\%$ auf $27,54 \pm 19,74\%$ (Tabelle 10). In der subfertilen Gruppe erreichte die Änderung nicht das Signifikanzniveau, wenn auch eine gleichgerichtete Tendenz zu beobachten war mit Anstieg der Mittelwerte von $19,84 \pm 17,52\%$ auf $29,48 \pm 16,97\%$, $p\text{-Wert}=0,530$. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht nachzuweisen (Tabelle 10).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit den Ergebnissen von Zribri et al. (2009) überein, welche ebenfalls nach Kryokonservierung eine Zunahme von DNA-Fragmentation in fertilen und subfertilen Samenproben (insgesamt 15 Proben) beobachteten. Darüber hinaus konnten auch De Paula et al. (2006) eine Zunahme der DNA-Fragmentierung durch Kryokonservierung in fertilen (30 Proben) und subfertilen Samenproben (47 Proben) feststellen. Auch Thomson et al. (2009) sahen eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentation, untersuchten allerdings nur subfertile Proben. Ähnliche Ergebnisse erzielten

Donnelly et al. (2001) und gelangten zu dem Schluss, dass die Kryokonservierung zu einer Zunahme von DNA-Schäden führt. Allerdings benutzten sie den Comet-Test, um DNA-Schäden zu erfassen und konnten diese nur in subfertilen Proben nachweisen. Thompson-Cree et al. (2003) sahen ebenfalls eine Verschlechterung der DNA-Integrität nach Kryokonservierung, welche sie mittels Comet-Tests untersucht hatten.

Mehrere Publikationen sind kontrovers zu den Ergebnissen vorliegender Studie, so beobachteten Paasch et al. (2004) an gepoolten Proben keinen Effekt der Kryokonservierung auf DNA-Strangbrüche. Duru et al. (2001) untersuchten insgesamt 15 Proben (10 subfertile und 5 fertile) und kamen zu einem ähnlichen Ergebnis.

Somit ist diese Studie die zweite, welche an einem größeren Kollektiv (n=43) mittels TUNEL-Test eine Zunahme der DNA-Fragmentierung in fertilen Samenproben nach Kryokonservierung mittels Stickstoffdampfmethodem zeigt.

Sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe war der Leukozytengehalt das ausschlaggebende Merkmal, welches über Ausmaß und Zunahme der DNA-Fragmentierung entschied (Tabelle 11). Die Hälfte der fertilen und der subfertilen Proben wies einen einfach positiven Leukozytengehalt (10-25/ μ l) (44,5% bzw. 42,9%) auf, der Rest war zweifach positiv (\geq 25/ μ l) (55,2% bzw. 57,1%). Es lagen keine Proben mit weniger als 10 Leukozyten/ μ l vor (Abbildung 13). Betrachtete man die Gruppe mit zweifachem Leukozytengehalt, so ließ sich im Vergleich der fertilen Untergruppe mit der subfertilen Untergruppe ein signifikant niedrigerer Anteil an Spermatozoen in der fertilen Gruppe als in der subfertilen Gruppe vor Aufbereitung nachweisen (Tabelle 11). Dies ist bemerkenswert, als kein signifikanter Unterschied zu beobachten war, wenn man die gesamte fertile und subfertile Gruppe miteinander verglich (Tabelle 10).

Nur in Proben mit zweifach positivem Leukozytengehalt trat in der fertilen und in der subfertilen Gruppe eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung auf. Die entsprechenden Untergruppen mit fehlendem oder nur leicht erhöhtem Leukozytengehalt zeigten keine Veränderungen (Tabelle 10).

Anhand der subfertilen Gruppe ist der entscheidende Einfluss des Leukozytengehalts gut darstellbar. Während in der Gruppe der subfertilen Spermatozoen nach Kryokonservierung kein signifikanter Anstieg der DNA-Strangbrüche auftrat (32,0 \pm 19,01% vs. 24,56 \pm 22,47%, p=0,225) (Tabelle 9), konnte für die Subgruppe mit zweifach positivem Leukozytengehalt eine signifikante Zunahme nachgewiesen werden (12,24 \pm 12,16% vs. 33,69 \pm 10,52%, p=0,043) (Tabelle 10).

Im Rahmen der Spermatogenese werden die DNA-Bindungsproteine Histone durch Protamine ausgetauscht. Dieser Vorgang gehört zu den wichtigen Mechanismen, um eine hochgradige Kondensation des Spermatozoenchromatins zu erreichen und die genetische Information vor äußeren Einflüssen zu schützen. Protamine sind DNA-Bindungsproteine, welche für die Chromatinkondensation essentiell ist (Vogt, 2004). Während des epididymalen Transportes werden Histone zunächst durch Übergangproteine ersetzt und im zweiten Schritt durch Protamine (Oliva, 2006). Durch Disulfid-Bindungen zwischen den Cystein-reichen Protaminen kann die DNA auf ein Sechstel des Volumens der DNA von somatischen Zellen reduziert werden (Lewis und Aitken, 2005; Zini und Libman, 2006). Nach abgeschlossenem Histon-Protamin-Austausch weist die DNA von menschlichen Spermatozoen noch etwa 15% Histone auf (Erenpreiss et al, 2006) und erreicht nicht die Kompaktheit tierischer Spermatozoen. Möglicherweise ist dies notwendig, um DNA-Reparaturmechanismen der Eizelle Zugang zu verschaffen. Der hohe Kondensationsgrad bietet der nukleären DNA des Spermatozoon einen hohen Schutz gegen äußere Einflüsse. Die eingeschränkte Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden kann dadurch ausgeglichen werden.

Menschliche Spermatozoen weisen zwei verschiedene Formen von Protaminen auf, welche in fertilen Männern zu gleichen Anteilen vorliegen: Protamin 1 (P1) und Protamin 2 (P2) (Carrell et al, 2007). Anhand experimenteller Studien konnte gezeigt werden, dass die Ratio von P1 zu P2 entscheidend für die Fertilität ist (Erenpreiss et al, 2006; Oliva, 2006; Carrell et al, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass P2 Vorläuferproteine essentiell sind für die Aufrechterhaltung der P1:P2 Ratio. Eine fehlerhafte Translation des Vorläuferproteins führt zu abnormen Kopfformen, reduzierter Spermatozoenmotilität und männlichen Infertilität (Tseden et al, 2007). Torregrosa et al (2006) zeigten, dass eine erniedrigte Ratio zwischen P2-Vorläuferprotein und P2 zu einer eingeschränkten DNA-Integrität und einer schlechteren Samenqualität führt.

Spermatozoen sind oxidativen Stress ausgesetzt durch die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche sich in der Samenflüssigkeit befinden (Tesarik et al, 2006). Aufgrund der limitierten Menge an antioxidativen Enzymen Katalase, Superoxid Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GPx) und Substanzen wie Zink, Selen, Vitamin C und Vitamin E sind sie besonders für oxidativen Stress empfänglich (Baker und Aitken, 2005; Ball, 2008; Hammadeh et al., 2009).

Leukozyten finden sich bis zu einem Gehalt von 10/ μ l in jeder normalen Spermienprobe (WHO, 1999). Eine Leukozytospemie kommt bei Infektionen des männlichen Genitaltraktes vor, kann aber auch Folge einer Immunreaktion sein (Ludwig et al., 1994). Die Aktivierung der Leukozyten bei urogenitalen Infektionen oder durch Kryokonservierung führt zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Wang et al., 1997 a und b). Hierdurch könnten sich die im Seminalplasma vorhandenen antioxidativen Systeme (total antioxidant capacity, TAC) erschöpfen und reaktive Sauerstoffspezies übrig bleiben, die eine Schädigung der Spermatozoen und ihrer DNA bewirken (Sharma et al., 1999).

Die physiologische Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies liegt in der Modulation von Genen und Proteinaktivitäten (Erenpreiss et al, 2006). Unter physiologischen Bedingungen benötigen Spermatozoen freie Sauerstoffradikale (ROS), um die Redox-regulierte Signaltransduktionskaskade aufrechtzuerhalten, welche die Kapazitation vorantreibt (de Lamirande und Gagnon, 1993; Aitken et al., 1998).

In fertilen Männern halten ausreichende Mengen an Antioxidantien in der Samenflüssigkeit das Gleichgewicht und verhindern ein Überwiegen der schädlichen Einflüsse.

Weitere Produzenten von ROS sind Organophosphorpestizide, welche das endokrine System stören können. Durch ihre östrogenen Eigenschaften, stimulieren sie Germinalzellen zur Produktion von freien Sauerstoffradikalen (Sanchez-Pena et al, 2004; Baker und Aitken, 2005).

Zigarettenrauchen erhöht ebenfalls, über eine erhöhte Leukozytenproduktion, die Konzentration von freien Sauerstoffradikalen. Agarwal und Said (2005) zeigten, dass infertile Raucher mehr oxidativen Stress aufweisen, als nichtrauchende Infertile. Dieser Anstieg war mit einer erhöhten Leukozytenkonzentration im Samenplasma assoziiert.

Spermatozoen sind nicht nur äußeren Verursachern, sondern auch einer intrazellulären Produktion von freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt. Vernet et al (2001) wiesen zwei Produktionsstätten von ROS im Spermatozoon nach. Sie identifizierten ursächlich die in der Plasmamembran lokalisierte NAD(P)H Oxidase sowie die mitochondriale Atmungskette. Entsprechend ihren Ergebnissen führt der Austritt von Elektronen aus Komplex I und II der Atmungskette zu der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen (O_2^-).

Auch Kryokonservierung führt zu einer Zunahme der Marker oxidativen Stress (ROS) (Mazzili et al., 1995; Wang et al., 1997). Diese könnten wiederum in anfälligen Spermatozoen (unzureichende Protaminisation, Fehler während der Spermatogenese und mitochondriale

Defekte) vermehrt zu DNA-Schäden und DNA-Fragmentation führen (Saleh et al., 2003). Thomson et al. (2009) ermittelten eine positive Korrelation zwischen einem Biomarker oxidativen Stress und DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung. Weiterhin wies eine Studie an Pferdespermatozoen die Zunahme der DNA-Fragmentation nach Inkubation mit reaktiven Sauerstoffspezies nach (Baumber et al., 2003b). Da nur die Hinzugabe von Katalase einen protektiven Effekt auf die DNA hatte, aber nicht die von Glutathion, schlussfolgerten die Autoren, dass insbesondere Wasserstoffperoxid zu DNA Fragmentation an Spermatozoen führt. In einer Folgestudie konnte allerdings weder für die Zugabe von Katalase noch von anderen Radikalfängern oder Antioxidantien ein protektiver Effekt für das Auftreten von DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung gezeigt werden (Baumber et al., 2005). Dies spricht dafür, dass neben oxidativem Stress auch Apoptose ursächlich für das Auftreten von DNA-Strangbrüchen nach Kryokonservierung ist. Von Interesse wäre die Untersuchung, ob die simultane Hinzugabe von Antioxidantien und von Caspasen-Inhibitoren DNA-Schäden nach dem Einfrier-Auftau-Prozess reduzieren könnte.

Osmotischer Stress gehört zu den wichtigen Schädigungsmechanismen der Kryokonservierung (Watson et al., 1995). Durch das Gefrieren von Wasser verbleibt das Spermatozoon in einer hyperosmolaren Glycerol-Lösung (Ball und Vo, 2001; Pommer et al., 2002). Übersteigt die daraus resultierende Volumenänderung des Spermiums durch Austritt von Wasser eine gewisse Grenze, führt dies zur Lyse. Weiterhin scheint osmotischer Stress über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus auch oxidativen Stress zu induzieren. Burnaugh et al. (2010) veröffentlichten eine Studie wonach die Inkubation von Pferdespermatozoen in hypo-, oder hyperosmotischen Lösungen zu Freisetzung von Hydroperoxydperoxyd durch Spermatozoen führt. McCarthy et al. (2010) bestätigten diese Beobachtungen an Spermatozoen von Rhesusaffen und sahen eine Zunahme von Hydroperoxydperoxyd ($O_2^{\cdot-}$) und Lipidperoxidation nach Inkubation mit hypo-, oder hyperosmolaren Lösungen. Alpha-Tocopherol vermochte diese Zunahme signifikant zu reduzieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie favorisieren die Theorie einer nukleären DNA-Schädigung mittels leukozytärer reaktiver Sauerstoffspezies. Durch Kryokonservierung aktivierte Leukozyten produzieren vermehrt ROS, welche insbesondere die DNA von subfertilen Spermatozoen schädigt. Diese ist aufgrund Störungen des Histon-Protamin-Austausches vermehrt vulnerabel gegenüber den reaktiven Sauerstoffspezies. Die reaktiven

Sauerstoffspezies können die nukleäre DNA angreifen und vermehrt zu DNA-Strangbrüchen führen (Duru et al., 2000; Baumber et al., 2003; Peris et al., 2007; Thomson et al., 2009).

Während in der subfertilen Gesamtgruppe keine signifikante DNA-Schädigung nach Kryokonservierung nachzuweisen war (Tabelle 9), wiesen wir in leukozytenreichen subfertilen Spermatozoen einen signifikanten Anstieg von DNA-Strangbrüchen nach Kryokonservierung nach (Tabelle 10). Dieses Ergebnis liefert eine mögliche Erklärung, wieso mehrere Publikationen zu Ergebnissen gelangten, welche kontrovers zu unseren waren. So konnten Paasch et al. (2004) an gepoolten Proben keinen Effekt der Kryokonservierung auf DNA-Strangbrüche zeigen, Duru et al. (2001) untersuchten insgesamt 15 Proben (10 subfertile und 5 fertile) und kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Paasch et al. (2004) vermuten, dass dies möglicherweise mit der kurzen Zeitspanne zwischen Auftauen und Untersuchung der Parameter nach dem Auftauen zusammenhänge oder mit dem besonders kondensierten Chromatin der Spermatozoen.

In der Arbeit von Paasch et al. (2004) wurden allerdings gepoolte Proben mit einem hohen Volumen an Seminalplasma verwendet, welches durch seinen hohen Gehalt an antioxidativen Substanzen und Enzymen Schutz vor den reaktiven Sauerstoffspezies der Leukozyten bietet (van Overveld et al., 2000). Seminalplasma zeigt zudem einen suppressiven Effekt auf Lymphozyten. Das darin vorkommende Zytokin TGF- β supprimiert zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Mulé et al, 1988; Su et al, 1991; Lucas et al, 1990). Eine Betrachtung von Untergruppen mit hoher Leukozytenzahl erfolgte nicht oder war aufgrund des Poolings wohl nicht möglich. In der Studie von Duru et al. (2004) wurden jegliche Proben ausgeschlossen, welche eine erhöhte Leukozytenzahl aufwiesen ($>0,5 \times 10^6/\text{ml}$).

Möglicherweise führte das Fehlen der Leukozyten bzw. das Vorhandensein einer großen Menge an Seminalplasma in der Studie von Paasch (2004) und Duru (2001) zu einer geringeren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies oder einer ausreichenden Neutralisation von reaktiven Sauerstoffspezies und hierdurch zu einer geringeren Schädigung der Spermatozoen durch die Kryokonservierung. Dies könnte sich letztendlich in der nicht signifikanten Veränderung des Anteils von DNA-Strangbrüchen niedergeschlagen haben.

In der Gruppe mit einem Leukozytengehalt $>25/\mu\text{l}$ wiesen Spermatozoen der subfertilen Gruppe signifikant mehr DNA-Strangbrüche auf als Spermatozoen der fertilen Gruppe. Dies traf auf die Spermien nach Aufbereitung ($9,94 \pm 12,67\%$ vs. $31,62 \pm 25,49\%$, p-Wert=0,016)

sowie nach Kryokonservierung zu ($22,39 \pm 15,79\%$ vs. $33,69 \pm 10,52\%$, p-Wert=0,033) (Tabelle 10).

Spermatozoen mit reduzierter Samenqualität könnten aufgrund eines gestörten Histon-Protamin-Austausches oder aufgrund mitochondrialer Defekte besonders anfällig für die von Leukozyten produzierten reaktiven Sauerstoffspezies sein und daher vermehrt Schäden ihrer nukleären DNA erleiden. Diese Überlegung wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie bestätigt, wonach Spermatozoen mit pathologischen Parametern der klassischen Samenanalyse mehr DNA-Strangbrüche aufweisen. Ferner liegen mehr reaktive Sauerstoffspezies in ihren Proben vor (Thomson et al., 2009).

Deletionen mitochondrialer DNA führen im Spermatozoon über eine defekte Atmungskette zu einer vermehrten Produktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies mit konsekutiver Energiedepletion, weiterer Schädigung der mitochondrialen DNA und Schädigung der Zelle. Extrazellulär produzierte reaktive Sauerstoffspezies durch Leukozyten können latente mitochondriale DNA-Defekte potenzieren und den obigen Prozess anstoßen bzw. unterhalten (Ozawa, 1995). Nach Erreichen eines kritischen Punktes, wird die mitochondrial vermittelte Apoptose induziert (Kao et al., 1998).

Die Schädigung der nukleären DNA in Spermatozoen durch reaktive Sauerstoffspezies wird durch direkte Interaktion vermittelt. Durch substantielle oxidative Modifikation entstehen pro 105 Desoxyguanosine etwa 2-4 oxidierte Desoxynukleoside (8-oxodG sowie 8-OHdG), welche als Marker für oxidativen Stress gelten (Shen und Ong, 2000; Nakabeppu et al., 2006). Spermatozoen mit reduzierter Motilität weisen einen höheren Gehalt an 8-OHdG auf (Kao et al., 2008). Bei ausbleibender Reparatur führt das Auftreten der oxidierten Desoxynukleoside zu mutagenen Veränderungen und Abort, kindlichen Malignomen oder Fehlbildungen (Aitken und Baker, 2006).

Nakada et al. (2001, 2006) befassten sich mit einer weiteren Ursache von DNA-Strangbrüchen im Spermatozoon. Sie untersuchten, ob Deletionen mitochondrialer DNA mit einer erhöhten Rate an DNA-Strangbrüchen einhergehen. In ihrer Studie wiesen sie nach, dass Spermatozoen von Mäusen mit einer erhöhten Rate an mitochondrialen Deletionen mehr DNA-Strangbrüche aufweisen, als Spermatozoen von Mäusen mit normalem Anteil.

In Spermatozoen mit einem besonders hohen Anteil an mitochondrialen Deletionen beobachteten sie weiterhin eine Überexpression von Caspase 3. Möglicherweise werden

Spermatiden, welche aufgrund schwerer mitochondrialer Deletionen ihre Reifung nicht vervollständigen können, durch Apoptose entfernt.

Eine weitere mögliche Erklärung für das isolierte Vorkommen von DNA-Strangbrüchen ohne weitere Marker der Apoptose, liefert das Modell des AIF-abhängigen Apoptosesignalwegs. Mehrere Publikationen gehen davon aus, dass dieser Signalweg Caspase-unabhängig existiert (Susin et al., 1999, Daugas et al., 2000, Loeffler et al., 2001). Das apoptotische Signal wird ausgeführt und es kommt zur Ausbildung der klassischen Morphologie sowie von DNA-Fragmentation ohne Caspasenaktivierung. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei das AIF (apoptosis inducing factor). Unter Ruhebedingungen findet es sich an der inneren Mitochondrienmembran. Seine Funktion als NADH Oxidase wird für die oxidative Phosphorylierung (Vahsen, et al., 2004) und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Strukturen (Cheung et al., 2006) benötigt. Induzieren Stressfaktoren den apoptotischen Signalweg, wird AIF aus dem Mitochondrium (Otera et al., 2005; Uren et al., 2005; Polster et al., 2005) freigesetzt und transloziert in den Nukleus. Entsprechend dem Ergebnis einer veröffentlichten Studie führt es unabhängig von Caspasen den programmierten Zelltod aus (Ye et al., 2002). Nach der Chromatinkondensation (Ye et al., 2002) wird die Endonuklease G freigesetzt und bewirkt die Fragmentierung der DNA (Wang et al., 2002; Gurbuxani et al., 2003).

AIF liegt in menschlichen ejakulierten Spermatozoen vor (Taylor et al., 2004; Tesarik et al., 2002) und in einer tierexperimentellen Studie an Mäusegerminalzellen fanden sich Hinweise darauf, dass bestimmte Stimuli bevorzugt eine AIF-vermittelte Apoptose auslösen. So induzierte die Bestrahlung von Mäusen und nachfolgende Gabe von Oxaliplatin, einem Chemotherapeutikum, den Anstieg von AIF ohne Aktivierung von Caspase-3 (Chater et al., 2007).

Es finden sich Hinweise darauf, dass bestimmte Medikamente die Apoptose entscheidend über AIF vermitteln (Daugas et al., 2000). Joza et al. (2001) zeigten in Zellen ohne AIF-Expression, dass beispielsweise der Entzug von Wachstumshormon zu einer AIF-vermittelten Apoptose führt. Wohingegen Etoposid und UV-Strahlen für die Auslösung des apoptotischen Signalweges nicht auf AIF angewiesen sind.

Yuste et al. (2005) löste eine Kontroverse aus, ob dieser Signalweg tatsächlich komplett caspasenunabhängig funktioniert mit seiner Beobachtung, dass die DNA-Fragmentierung doch von Caspasen abhängig zu sein schien. Übereinstimmung existiert nun lediglich darin, dass die Chromatinkondensation caspasenunabhängig abläuft. Möglicherweise werden die

frühen Schritte im AIF-vermittelten Signalweg ohne Aktivierung von Caspasen ausgelöst, während erst die späteren Stadien caspasenvermittelt ablaufen.

Während der Fetalzeit besteht in Kardiomyozyten ein caspasenabhängiger apoptotischer Signalweg. Die Aktivität der Caspasen wird nach der Geburt herunterreguliert und die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Caspase-vermittelten Apoptose. Es bleibt ihnen nur einen von Caspasen und AIF unabhängigen mitochondrial vermittelten apoptotischen Signalweg mit Aktivierung von Endonuklease G und konsekutiver DNA-Fragmentation übrig (Bahi et al., 2006). Eine Analogie zu Spermatozoen ist sicherlich rein spekulativ, aber möglicherweise deutet die niedrige Caspasenaktivität im Vergleich zu dem Gehalt an nukleären DNA-Strangbrüchen auf das Vorliegen einer Inaktivierung des während der Gametogenese gut dokumentierten caspasenabhängigen apoptotischen Signalweges nach Ejakulation hin.

Der Ausgang einer IVF oder ICSI Behandlung ist von vielen Faktoren abhängig. Auf die Identifizierung der Spermienmorphologie als wichtigen prognostischen Parameter (Morgentaler et al., 1995; Yang et al., 1995; Coetzee et al., 1998; Obara et al., 2001) folgte die Beobachtung, dass der Grad der Chromatinkondensation ebenfalls mit dem Erfolg (d.h. Befruchtung und Austragung einer Schwangerschaft) korrelierte, wenn eine Chromomycin A 3 Färbung durchgeführt wurde (Claassens et al., 1992; Razavi et al. 2003). Die Erfassung der Chromatinkondensation mit der Acridin Orange Färbung konnte den Ausgang einer künstlichen Befruchtung nicht vorhersagen (Hammadeh et al., 2001). Die Auswirkungen von DNA-Schäden und -Fragmentation auf die Schwangerschaftsrate nach IVF oder ICSI sind zurzeit weiterhin Gegenstand der Erforschung. Im Review von Agarwal und Allamaneni (2004) konnte unter Berücksichtigung aller relevanten Veröffentlichungen insgesamt eine Korrelation zur Fertilisationsrate und/oder Schwangerschaftsrate nach künstlicher Befruchtung festgestellt werden. Dies wurde auch in dem Review von Collins et al. (2008) bestätigt. Darin wird hervorgehoben, dass häufig die Fertilisationsrate in der ICSI-Behandlung nicht vom DNA-Status des Spermatozoons abhängig ist, wohl aber die Rate an erfolgreichen Schwangerschaften (Collins et al., 2008). Einige Veröffentlichungen beschreiben sogar einen gewissen Cutoff-Wert der DNA-Fragmentation für das Gelingen einer ICSI-Behandlung von 10 % (Ozmen et al., 2007) beziehungsweise 20% (Benchaib et al., 2003).

Weiterhin scheint das Ausmaß der DNA-Schäden mit der Aborthäufigkeit zu korrelieren. Carrell et al. (2003) und Lin et al. (2008) wiesen eine erhöhte Abortrate nach, wenn

Spermatozoen mit einem großen Anteil an DNA-Schäden verwandt wurden. DNA-Schäden in Spermatozoen wurden zudem mit späteren Fehlbildungen (Fraga et al., 1991) und der Induktion von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Sorahan et al., 1997b).

Die konsequente Erkennung von Spermatozoen mit DNA-Schäden und die Verhinderung deren Entstehung ist zu fordern. Da keine Therapieoptionen bei Vorliegen von Schäden an mitochondrialer DNA vorhanden sind, fokussieren sich die Bemühungen darauf Spermatozoen mit intaktem Status der nukleären DNA positiv zu selektionieren.

Der erste Schritt ist das Beenden aller Aktivitäten, von denen eine Schädigung von Spermatozoen bekannt ist, wie Rauchen und eine Exposition gegenüber Umweltöstrogenen, beispielsweise Pestiziden (Agarwal und Said, 2003). Möglicherweise führt zudem eine zweimonatige Behandlung mit oralen Antioxidantien zu einer Reduktion oxidativen Stress (Tesarik et al, 2006) und Reduktion von Strangbrüchen nukleärer DNA (Thomson et al., 2009). Auch die konsequente Behandlung von Infektionen des männlichen Urogenitaltraktes (Lackner et al., 2006; Tremellen, 2008) sowie eine Leukozytendepletion des Seminalplasmas resultierten in einer Verminderung der Rate an DNA-Strangbrüchen. Die Glaswollfiltration im Rahmen assistierter Reproduktionsmaßnahmen scheint hierzu eine geeignete Methode zu sein. Durch die Leukozytenreduktion verringert sich der Umfang der reaktiven Sauerstoffspezies sowie der Gehalt an DNA-Fragmentation, so dass sich dadurch die Erfolgchancen einer künstlichen Befruchtung verbessern (Berlau et al., 2000; Nani und Jeyendran, 2001). Exzessive Wasch- und Zentrifugationsprozeduren sind zu vermeiden, da eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies hierdurch beschrieben wurde (Agarwal et al., 1994).

Eine Aussortierung von ejakulierten Spermatozoen, welche apoptotische Merkmale aufweisen könnte zu einer Qualitätsverbesserung beitragen. Im MACS-System (Magnetic Activated Cell Sorting) werden magnetisch markierte Annexin-V mit Spermatozoen inkubiert. Annexin-V bindet an Zellen mit Phosphatidylserinexternalisation und markiert somit in Apoptose befindliche Spermatozoen. Diese Spermien binden an Annexin und können schließlich über eine magnetische Säule entfernt werden. Hierdurch wird auch der Anteil von Spermatozoen mit DNA-Fragmentierung reduziert (Winkle et al., 2007). MACS vermag in subfertilen Samenproben die Implantations- und Schwangerschaftsrate im Vergleich zu konventioneller Aufbereitung zu verbessern, so dass dies eine sinnvolle Erweiterung der klassischen Aufbereitungsmethoden ist (Dirican et al., 2008).

5.3 Caspase- 3

In der Erfassung und Klassifizierung der männlichen Infertilität leisten die Parameter der klassischen Samenanalyse einen wichtigen Beitrag. Mit deren Hilfe lassen sich anatomisch bedingte, immunologisch bedingte und infektiologisch bedingte Infertilität erfassen und behandeln. Darüber hinaus gibt es Belege über ihre Korrelation mit dem Erfolg einer assistierten Reproduktion, insbesondere Motilität und Morphologie (Kruger et al., 1988; Coetzee et al., 1998).

Allerdings stoßen diese Parameter in ihrer Aussage über die Pathogenese der Infertilität bei einem Teil der Patienten an ihre Grenzen. Viele Arbeiten beschäftigen sich daher derzeit mit der Relevanz von Apoptose in ejakulierten Spermatozoen. Während die Ursachen der Apoptose im Rahmen der Spermatogenese gut untersucht und verstanden sind, besteht weiterhin Unklarheit über das Vorkommen und die Relevanz der Apoptose in ejakulierten Spermatozoen (Oehninger et al., 2003).

Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in den Vorgängen des programmierten Zelltodes und werden als Signalmarker einer ablaufenden Apoptose angesehen. Zwar ist ihr Vorliegen in ejakulierten Spermatozoen gut belegt (Paasch et al., 2004), existiert jedoch über ihre Funktionen und ihre Relevanz, wie in der Einleitung dargestellt, noch keine abschließende wissenschaftliche Meinung. In vorliegender Studie wurden das Vorhandensein von Caspase-3 sowie die Auswirkungen der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf ihren Gehalt hin untersucht.

Es konnte mittels indirektem immunhistochemischen Verfahren Caspase-3 sowohl in fertilen (n=29) wie auch subfertilen Samenproben (n=13) nachgewiesen werden. In der Tendenz lag in der subfertilen Gruppe ein höherer Anteil von Caspase-3 als in der fertilen Gruppe vor, das Signifikanzniveau wurde allerdings nicht erreicht (Tabelle 12).

Der Anteil von Caspase-3 positiven Spermatozoen lag in nativen ejakulierten Spermatozoen der fertilen Gruppe bei $5,80 \pm 11,59\%$ und in der subfertilen Gruppe bei $7,53 \pm 8,56\%$ (Tabelle 12).

Das Vorkommen von Caspasen im Allgemeinen und von Caspase-3 im Speziellen in ejakulierten Spermatozoen ist hinreichend gut dokumentiert und die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit einer Mehrzahl an Publikationen überein (Paasch et al., 2003; Wang et al., 2003a, b; Weng et al., 2002).

Weiterhin wurde der Effekt des Leukozytengehalts auf den Aktivitätsgrad von Caspase-3 bei nativen ejakulierten Spermatozoen sowie nach Aufbereitung und Kryokonservierung untersucht. Anders als bei DNA-Strangbrüchen war der Leukozytengehalt nicht entscheidend für Gehalt und Zunahme von Caspase-3.

In der Gruppe mit einem zweifach positiven Leukozytengehalt (≥ 25 Leukozyten/ μl) lag im Vergleich zu der Gruppe mit einfach positiven Leukozytengehalt (10-25 Leukozyten/ μl) kein erhöhter Caspasengehalt vor (Tabelle 13). Da bei einer urogenitalen Infektion von einer ausgeprägten Leukozytospermie auszugehen ist, fanden sich somit in Diskrepanz zu Eley et al. (2005) aus vorliegender Studie keine Hinweise, dass urogenitalen Infektionen zu einer vermehrten Caspasen-Aktivierung und Auslösung vornehmlich des mitochondrialen Signalweges sein könnten.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inklusive H_2O_2 induzieren in somatischen Zellen den apoptotischen Signalweg und aktivieren Caspasen (Stridh et al., 1998; Chiaramonte et al., 2001). In ejakulierten Spermatozoen ist weiterhin unklar, ob reaktive Sauerstoffspezies tatsächlich zu einer Induktion der Apoptose führen können. Die Inkubation von ejakulierten Spermatozoen mit H_2O_2 hatte zwar eine Externalisation von Phosphatidylserinen (Gottlieb, 2001) und DNA-Fragmentation (Duru et al., 2000) zur Folge, eine Caspasenaktivierung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Taylor et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse zeigt vorliegende Studie, welche keinen Zusammenhang zwischen Leukozytengehalt und Caspasenaktivität nachweisen konnte. Leukozyten gehören im Ejakulat zu den Hauptproduzenten von reaktiven Sauerstoffspezies (Wang et al., 1997 a und b).

Die Ursache des Vorliegens von Markern der Apoptose in ejakulierten Spermatozoen wird weiterhin kontrovers diskutiert. Möglicherweise liegt eine abortive Form der Apoptose vor (Sakkas et al., 1999) oder Defekte während der Spermatogenese haben zu der Anreicherung von apoptotischen Signalproteinen in zytoplasmatischen Droplets geführt (Blanco-Rodriguez und Martinez-Garcia, 1999).

Die Aufbereitung mittels Dichtegradient („pure-sperm“) sowie Zentrifugation (swim up®) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Caspasenaktivität (Tabelle 12). Diese Ergebnisse sind in Widerspruch mit der Publikation von Thomson et al. (2009), welche eine signifikante Reduktion der Caspasenaktivierung nach Aufbereitung mittels Dichtegradienten auf die Caspasenaktivität beschrieben. Eine Reduktion der Caspasenaktivität wurde auch für eine

serielle Anwendung der Aufbereitung durch „swim-up“ und anschließender Dichtegradientenzentrifugation beschrieben (Grunewald et al., 2010). Möglicherweise weisen einige Patienten im Probenkollektiv der vorliegenden Studie einen erhöhten Anteil an avitalen Spermatozoen ohne Caspasenaktivierung auf, so dass deren Entfernung im Rahmen der Aufbereitung zu keiner Verbesserung des prozentualen Anteils von Spermatozoen mit Caspasenaktivierung führte.

Die Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen ist eines der wichtigsten Methoden zu Erhaltung der männlichen Fortpflanzungskapazität, beispielsweise nach einer fertilitätsschädigenden Tumorthherapie. Der Einfrier-Auftauprozess hat eine Schädigung von Spermatozoen und möglicherweise die Aktivierung des apoptotischen Signalweges zur Folge. Es wurden die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Aktivität von Caspase-3 anhand 42 Proben untersucht. Nach Kryokonservierung trat in der fertilen Gruppe eine signifikante Zunahme der Aktivität von Caspase-3 auf. Der prozentuale Anteil von Caspasen-positiven Spermatozoen ging von $5,80 \pm 11,59\%$ aus und stieg nach dem Einfrier-Auftauvorgang auf $7,33 \pm 6,13\%$ an (Tabelle 12). In der subfertilen Gruppe stieg der Anteil von Spermatozoen mit Caspase-3 Nachweis von $7,53 \pm 8,56\%$ auf $10,21 \pm 11,73\%$ an, das Signifikanzniveau wurde möglicherweise aufgrund der geringen Probenanzahl allerdings nicht erreicht. Im Mittel war der prozentuale Anteil von Caspase-3 positiven Spermatozoen in der subfertilen Gruppe höher als in der fertilen, allerdings wurde auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht ($5,80 \pm 11,59\%$ versus $7,53 \pm 8,56\%$, Tabelle 12).

Grunewald et al. (2001) gelangten zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Studie: Sie untersuchten die Gesamtaktivität der Caspasen 1-9 an gesunden (fertilen) Spendern mittels Pancaspaseninhibitor in nativen ejakulierten Spermatozoen und nach Kryokonservierung und wiesen eine Zunahme der Caspasenaktivität nach dem Einfrier-Auftau-Vorgang nach. Die Caspasenaktivität nahm von 21,8% der Spermatozoen auf 47,7% signifikant zu. Sie korrelierte in kryokonservierten Spermatozoen zu der Externalisierung von Phosphatidylserinen. Da von somatischen Zellen eine Phosphatidylserinexternalisation als eines der Marker der Apoptose bekannt ist, könnte daraus geschlossen werden, dass die Kryokonservierung möglicherweise neben einer direkten Schädigung zu einer Induktion der Apoptose in empfänglichen Spermatozoen führt.

In einer weiteren Studie untersuchten Paasch et al. (2004) die Aktivität der Caspasen-3, -8, -9 und -1. Der Einfrier-Auftau-Prozesse führte zu einem signifikanten Anstieg der Aktivitäten

von Caspase-3, -8 und -9. Die größte Zunahme wies die Aktivität der Caspase-3 auf, mit einem Zuwachs von 20,3% (native ejakulierte Spermatozoen) auf 38,1% (Spermatozoen nach Kryokonservierung).

Ebenso wiesen auch Duru et al. (2001) nach, dass der Einfrier-Auftau-Prozess in ejakulierten Spermatozoen zu einer Aktivierung von Caspase 3 führt. Sie beobachteten weiterhin eine Zunahme der Externalisation von Phosphatidylserinen nach Kryokonservierung.

Der durchweg höhere Anteil an Spermatozoen oben genannter Studien mit Caspase-3-Nachweis im Vergleich zu vorliegender Studie liegt am ehesten in der Verwendung der Fluoreszenzdurchflusszytometrie begründet. Hierdurch konnte eine größere Anzahl an Spermatozoen ausgewertet werden und auch Proben mit sehr niedriger Spermienkonzentration untersucht werden. Möglicherweise gelang aber auch keine einwandfreie Identifikation und Abgrenzung der Spermatozoen von Artefakten sowie Leukozyten und Epithelzellen, so dass diese mit ausgewertet wurden. In vorliegender Studie kam das Verfahren der indirekten Immunhistochemie zur Anwendung. Dieses schränkt zwar quantitativ die Anzahl der ausgewerteten Spermatozoen ein, erlaubt allerdings eine einwandfreie mikroskopische Identifikation der Zelle.

Im Vergleich zwischen fertiler und subfertiler Gruppe lag zwar eine höhere Caspasenaktivität in der subfertilen Gruppe vor, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Auch Thomson et al. (2009) beobachteten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Caspasenaktivität von Spermatozoen normaler und erniedrigter Qualität. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen wiesen Grunewald et al. (2005) eine stärkere Zunahme der Caspasenaktivität in Spermatozoen von subfertilen Fertilitätspatienten nach. Sie untersuchten allerdings nur die Aktivitäten von Caspase-1, -8 und -9 und nicht von Caspase-3. Ein direkter Vergleich zu dieser Studie ist daher nicht möglich. Wüdrich et al. (2006) untersuchten mittels Westernblot die Aktivitäten der Caspasen 1-, -2, -3, -8 und -9 vor und nach Kryokonservierung. Ferner untersuchten sie den Effekt einer Kryokonservierung mit 7% bzw. 14% Glycerollösung. Spermatozoen, die sich in 14% Glycerollösung befanden, wiesen eine stärkere Aktivierung von Caspase-1 und -9 nach Kryokonservierung auf. In Proben von subfertilen Patienten war diese Aktivierung signifikant stärker ausgeprägt als in Proben von fertilen Probanden. Einen generellen Unterschied zwischen subfertilen und fertilen Proben wiesen sie nicht nach, insbesondere nicht für Caspase-3.

In einigen Arbeiten wurde berichtet, dass ejakulierte Spermatozoen auf äußere Einflüsse und Noxen mit einer den somatischen Zellen vergleichbaren apoptotischen Reaktion reagieren. Während der rezeptorvermittelte Signalweg dabei keine besondere Rolle zu spielen scheint (Grunewald et al., 2005c), konnte Betulinsäure, ein Trigger der mitochondrial vermittelten Apoptose eine starke apoptotische Reaktion auslösen mit Auftreten von Caspase 9, Caspase 3 und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Paasch et al., 2004; Wang et al., 2003). Der Typ-II Induktor Betulinsäure vermochte weiterhin einen signifikanten Anstieg von Caspase-9 und -3 zu bewirken (Grunewald et al., 2005c; Paasch et al., 2004b). Perticarari et al. (2008) untersuchten das Potential von Mitochondrien in Spermien, eine Typ-II Apoptose zu induzieren und kamen zum Schluss, dass sie außergewöhnlich sensibel auf spezifische Agonisten der mitochondrial vermittelten Apoptose reagieren.

Kryokonservierung von Spermatozoen führt zu verschiedenen strukturellen und funktionellen Veränderungen der Spermienmembran (Glander und Schaller, 1999; Donnelly et al., 2001; Duru et al., 2001) mit Störung der Lipidmembranstabilität (Glander et al., 2002) und einem subletalen Kryoschaden von Spermatozoen (Alvarez und Storey, 1993). Der Hauptgrund für das Auftreten zellulärer Schäden ist die Bildung von Eiskristallen im Zytoplasma. Dadurch wird dem umgebenden Plasma Flüssigkeit entzogen, wodurch eine hyperosmolare Lösung entsteht, was letztendlich zu Ruptur der Plasmamembran führen kann (Muldrew et al., 1990; Watson et al., 1995). Auch kürzlich veröffentlichte Studien an Mäusespermatozoen bestätigten, dass intrazelluläre Eiskristallbildung, neben hypertonem Stress, zu den wichtigen Schädigungsmechanismen von Spermatozoen im Rahmen der Kryokonservierung gehört (Jin et al., 2008). Da nach Kryokonservierung keine signifikante Zunahme von Caspase-3 in dieser Studie nachzuweisen war, ist die Hauptursache der Spermatozoenschädigung nach Kryokonservierung eher in einer direkten Zell- und DNA-Schädigung als in einer Induktion der mitochondrial vermittelten Apoptose zu sehen. Diese Überlegungen werden durch folgenden tierexperimentellen Versuch weiter gestützt: Nach Hinzugabe von Caspaseninhibitoren zur Gefrierlösung konnte die Qualität und Überlebensrate von Kaninchenspermatozoen nach Kryokonservierung nicht verbessert werden (Peter und Lindforsberg, 2003). Die Apoptoseinduktion in Kaninchenspermatozoen ist im Umkehrschluss nicht für die Verschlechterung der Qualität und Vitalität von Spermatozoen nach Kryokonservierung verantwortlich. Eine vorangegangene Studie an Mäusespermatozoen kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Hinzugabe eines Caspaseinhibitors vermochte den Tod der Spermatozoen nicht zu verzögern (Weil et al., 1998).

Diese Einsicht findet weitere Bestätigung durch eine kürzlich veröffentlichte Studie an menschlichen Spermatozoen, welche eine positive Korrelation zwischen einem Biomarker oxidativen Stress und DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung nachwies. 8OHdG korrelierte signifikant positiv mit dem Gehalt an DNA-Strangbrüchen ($r = 0,528$, p -Wert $< 0,05$) (Thomson et al., 2009). Der Zusatz des Pancaspaseinhibitors Z-VAD(OMe)-FMK hatte keine Verbesserung der Motilität, der Vitalität oder des Ausmaßes der DNA-Fragmentation zur Folge. Vorliegende Studie kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Kryokonservierung hauptsächlich nicht über eine Caspasenaktivierung und Apoptoseinduktion zu DNA-Strangbrüchen führt. Vielmehr führt oxidativer Stress zu den Schäden an nukleärer DNA.

In zwei Studien konnte trotz Anstieg der Caspasenaktivität keine Zunahme der DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden (Duru et al., 2001 und Paasch et al., 2004). Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist wohl von einer vornehmlich direkten DNA-Schädigung durch oxidativen Stress im Rahmen des Einfrier-Auftau-Vorgangs auszugehen. Wenn die Zunahme der Caspasenaktivität in oben zitierten Studien allerdings Ausdruck einer ablaufenden Apoptose ist, bleibt unklar, warum oxidativer Stress in Spermatozoen eine DNA-Fragmentierung bewirken kann, die apoptotische Signalkaskade in ejakulierten und kryokonservierten Spermatozoen hierzu allerdings nur eingeschränkt in der Lage ist. Möglicherweise hängt das Vorhandensein von Caspasen in nativen ejakulierten Spermatozoen und ihre Zunahme nach Kryokonservierung mit nicht-apoptotischen Funktionen zusammen. Neben ihrer Funktion als Induktoren und Effektoren der Apoptose sind inzwischen weitere Funktionsbereiche bekannt, wie Muskelzelldifferenzierung (Fernando et al., 2002; Murray et al., 2008), T-Zell Proliferation (Kennedy et al., 1999) und T-Zell Funktion (Alam et al., 1999). In zwei kürzlich veröffentlichten Studien wurde auch über die nicht-apoptotische Funktion von Caspase-3 im Rahmen der Differenzierung von embryonalen und von hämatopoetischen Stammzellen berichtet (Fujita et al., 2008; Janzen et al., 2008).

In *Drosophila* ist die Caspasenabhängigkeit eines Stadiums der Spermatogenese bereits bekannt und Gegenstand intensiver Erforschung. Zur Individualisation von Spermatiden aus einer gemeinsamen Zyste wird die Aktivierung von Caspase-3 benötigt (Huh et al., 2004). Durch ein dichtes Netz an Regulatoren und Inhibitoren gelingt den Spermatiden von *Drosophila* die Wanderung auf dem schmalen Grat zwischen Aktivierung der Caspasen im Rahmen der Apoptose und konsekutivem Zelltod und der Caspasenaktivierung zur Zelldifferenzierung und Zellumbau. Merkmal dieser strengen Regulation ist eine

Caspasenaktivität auf niedrigem Level, unterhalb der apoptotischen Schwelle (Arama et al., 2007).

In Analogie hierzu müsste im Rahmen dieser regulatorischer Funktionen die Aktivität der Caspasen auf niedrigem Niveau oder in subzellulären Kompartimenten gehalten werden, um keine akzidentelle Apoptoseinduktion auszulösen (Blanco-Rodriguez, 1998; Tesarik et al., 2002; Abdul-Ghani und Megeney, 2008). Möglicherweise könnten die in dieser Studie eher niedrigen Caspasenaktivitäten und die niedrige Aktivitätszunahme während der Kryokonservierung Ausdruck einer regulatorischen/differenzierenden Funktion der Caspase-3 sein.

Die menschliche Spermatogenese beinhaltet analog zu der Spermatogenese in *Drosophila* den Schritt des Zellplasmaverlustes. Nach Entstehung der Spermatiden werden nicht mehr benötigtes Zytoplasma und Organellen entfernt. Das überschüssige Zytoplasma, auch Residualkörperchen genannt, wird von umgebenden Sertoli-Zellen phagozytiert.

Die niedrige Aktivität von Caspasen direkt nach Ejakulation könnte also Ausdruck dieser abgeschlossenen Differenzierung sein. Diese Ansicht findet in der Beobachtung, dass nicht komplett ausgereifte ejakulierte Spermatozoen einen höheren Gehalt an Initiator- und Effektorcaspasen aufweisen, weitere Bestätigung (Paasche et al., 2003). Nach abgeschlossener Ausreifung unterdrückt der hochregulierte antiapoptotische Regulator bcl-xL eine anhaltende Aktivierung von Caspase-3 (Cayli et al., 2004). Sollten Caspasen tatsächlich eine wichtige Rolle in der Regulation aufweisen, so könnte eine zu frühe Aktivierung zu verminderter Samenqualität und -funktion führen (Taylor et al., 2004).

5.3 Korrelationen zwischen Parametern der Apoptose und der klassischen Samenanalyse

Wenn auch ihre Aussagekraft in der Beurteilung pathophysiologischer Vorgänge beschränkt ist, so stellen die Parameter der klassischen Samenanalyse weiterhin den Standard eines jeden Spermioграмms, daher wurden die Korrelationen zwischen Strangbrüchen nukleärer DNA, Caspase-3 und den Parametern der klassischen Samenanalyse untersucht.

In der vorliegenden Studie korrelierte in der fertilen Gruppe der Anteil von Spermatozoen mit DNA-Fragmentierung nach Kryokonservierung signifikant negativ mit der Vitalität (Eosin-Test) vor Aufbereitung ($r=-0,304$, $p\text{-Wert}=0,027$; Tabelle 15). Daraus ist zu schlussfolgern, dass Spermienproben, welche initial eine hohe Vitalität aufweisen, den Einfrier-Auftau-Vorgang mit weniger DNA-Schäden überstehen.

Weiterhin korrelierte in der fertilen Gruppe der Anteil von Spermatozoen mit DNA-Fragmentation nach Aufbereitung signifikant negativ mit der Globalmotilität nach Aufbereitung ($r=-0,652$, $p=0,002$; Tabelle 15). Spermatozoen, welche nach Aufbereitung einen erhöhten Gehalt an DNA-Schäden aufweisen, zeigen somit gleichzeitig eine reduzierte Globalmotilität. Es fand sich keine vergleichbare Korrelation mit der Globalmotilität in der Caspase-3-Färbung. Die DNA-Schädigung ist somit am ehesten Ausdruck eines direkten Schädigungsmechanismus, als ein Merkmal der Apoptose in diesem Fall. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), beispielsweise leukozytären Ursprungs, schädigen sowohl DNA als auch Mitochondrium und reduzieren die zur Fortbewegung notwendige Energiebereitstellung (Aitken und Clarkson, 1988; Kao et al., 2008).

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Sun et al. (1997), welche eine negative Korrelation zwischen TUNEL-positiven Spermatozoen und der Globalmotilität an Proben von Patienten einer Infertilitätsklinik nachweisen konnten. In ihrer Publikation beschreiben auch Lopes et al. (1998) eine negative Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und Motilität nach Aufbereitung mittels swim up®-Aufbereitung. Irvine et al. (2000) untersuchten den Zusammenhang zwischen Samenqualität und DNA-Fragmentation an fertilen und subfertilen Spermienproben und gelangten zu dem Ergebnis, dass eine negative Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und Spermienmotilität besteht.

In der subfertilen Gruppe korrelierte die TUNEL-Färbung in nativen Spermatozoen signifikant negativ mit der Globalmotilität nach Aufbereitung ($r=-0,866$, $p=0,003$) (Tabelle 16). Native Spermatozoen mit einem hohen Gehalt an DNA-Strangbrüchen weisen gehäuft nach Aufbereitung eine reduzierte Globalmotilität auf. Durch die Aufbereitung tritt in bereits geschädigten Spermatozoen eine zusätzliche Schädigung auf, welche in einer Reduktion der Motilität resultiert. Eine Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies, welche in hohem Ausmaß für das Auftreten von Strangbrüchen nukleärer DNA verantwortlich sind, wurde bereits im Rahmen der Aufbereitung beschrieben (Agarwal et al., 1994).

Der Anteil Caspase-3 positiver Spermatozoen nach Aufbereitung korrelierte in der fertilen Gruppe negativ mit der Vitalität (Eosin-Test) der Spermatozoen vor Aufbereitung ($r=-0,460$, $p=0,014$) und nach Aufbereitung ($r=-0,479$, $p=0,011$) (Tabelle 15, Abbildung 20 und 21). Caspase-3 ist eine Effektorcaspase und ihr Nachweis deutet auf die bereits ablaufende Ausführung des apoptotischen Signals hin. Dieses mündet schließlich in den programmierten Zelltod. Daher ist die negative Korrelation zwischen Vitalität und Caspase-3 ein Hinweis auf eine ablaufende Apoptose mit konsekutivem Absterben des Spermiums. In diesen Zusammenhang passt auch, dass in der subfertilen Gruppe der Anteil von Caspase-3 positiven nativen Spermatozoen negativ korreliert war mit der Spermatozoendichte ($r=-0,865$, $p=0,0001$) (Tabelle 16, Abbildung 20).

Die Apoptose könnte durch zwei Gründe eingeleitet worden sein: Einerseits ist es möglich, dass in Proben mit niedriger Spermiendichte ein hoher Anteil an defekten Spermatozoen vorliegt, welche durch Apoptose entfernt werden. Andererseits kommt auch eine übersteigerte Apoptose in Frage, die dadurch zu einer reduzierten Spermienkonzentration führt.

Recherchen ergaben keine Studie, welche Bezug nahm auf Vitalität und Caspase-3, daher ist ein direkter Vergleich nicht möglich. In der Studie von Wang et al. (2001) wurde beispielsweise nur Motilität, Spermiendichte und Morphologie mit Caspase-3 korreliert. Dies traf auch auf die Studie von Weng et al. (2002) zu.

Eine negative Korrelation zwischen Spermiendichte und Aktivierung von Caspase-3 konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Wang et al. (2001) wiesen in vorwiegend subfertilen Samenproben eine negative Korrelation zwischen Spermienkonzentration, Motilität und Morphologie nach, gaben allerdings keine genauen Korrelationskoeffizienten an. Weng et al. (2002) beschrieben in hochmotilen Spermienproben eine negative Korrelation zwischen der Aktivität von Caspase-3 und der Globalmotilität ($r = -0,54$, $p\text{-Wert} < 0.05$). In geringmotilen Spermienproben sahen sie keinen Zusammenhang zwischen Motilität und Caspasenaktivität,

allerdings können die Ergebnisse auf vorliegende Studie nicht direkt übertragen werden, da die Proben bei Weng et al. (2002) nach Motilität und nicht nach Dichte eingeteilt wurden.

Marchetti et al. (2004) veröffentlichten eine negative Korrelation zwischen aktivierter Caspase-3 und Spermatozoendichte, untersucht an Proben von Patienten eines Kinderwunschzentrums ($r=-0,39$, $p\text{-Wert}<0,0001$).

Hervorzuheben ist, dass die vorliegende Studie den niedrigsten Korrelationskoeffizienten zwischen Globalmotilität und Aktivität von Caspase-3 aufweist.

Eine signifikante Korrelation zwischen Morphologie und Caspase-3 konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Wenn auch Tendenzen zu negativen Korrelationen bestanden, so wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Aziz et al. (2007) untersuchten an Proben von 50 gesunden Männern unter anderem die Korrelation zwischen Caspase-3 Aktivierung und Morphologie. Sie wiesen zwar eine signifikant negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von Spermatozoen mit Caspasenaktivierung und normaler Morphologie nach, allerdings war der Korrelationsfaktor mit $r=-0.37$ eher geringfügig negativ.

Andererseits konnte auch Weng et al. (2002) keine Korrelation zwischen Morphologie und Caspasenaktivierung nachweisen. Sie untersuchten vorwiegend fertile Proben und führten den fehlenden Nachweis darauf zurück, dass in den Proben keine schwere Teratozoospermie vorlag.

Weiterhin war keine signifikante Korrelation zwischen Morphologie und TUNEL-Färbung erkennbar. Im Gegensatz hierzu existieren eine Reihe von Publikationen, welche eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und Morphologie nachweisen konnten (Gandini et al., 2000; Ricci et al., 2002; Sakkas et al., 2002; Shen et al., 2002; Siddighi et al., 2004). Shen et al. (2002) beispielsweise untersuchten anhand 60 Proben von Patienten einer Fertilitätsklinik unter anderem die Zusammenhänge zwischen DNA-Fragmentation und Morphologie. Sie wiesen eine positive Korrelation zwischen abnormer Morphologie und dem Gehalt an DNA-Fragmentation nach ($r=0,586$, $p<0,01$). Möglicherweise war die Anzahl der Proben in unserer Studie nicht ausreichend, um das Signifikanzniveau zu erreichen.

5.4 Fazit der Diskussion

Zusammenfassend soll die folgende Abbildung die Gedankengänge der vorherigen Kapitel veranschaulichen.

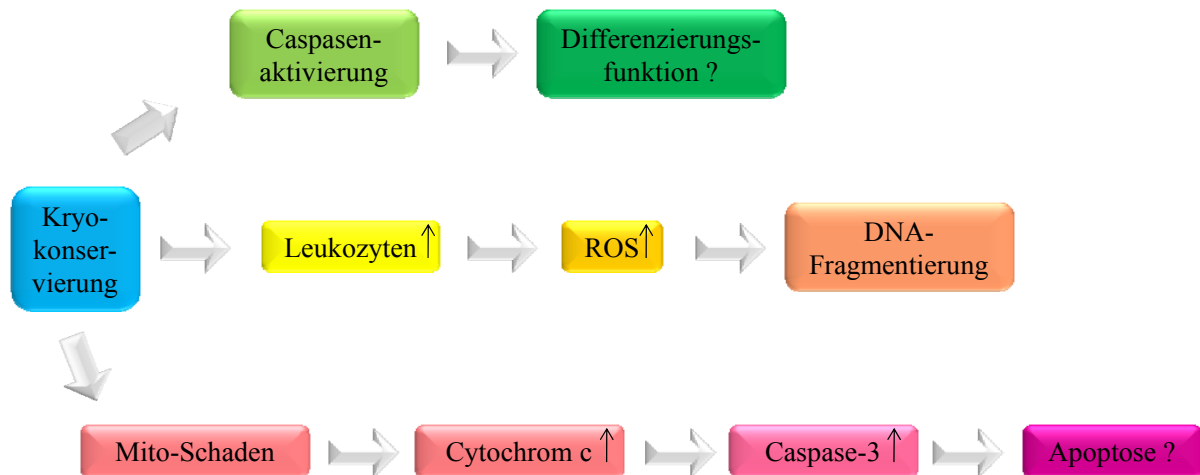


Abbildung 22: Postulierte Mechanismen der Spermatozoenschädigung durch Kryokonservierung. Einzelheiten siehe Text.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdul-Ghani M, Megeney LA. Rehabilitation of a Contract Killer: Caspase-3 Directs Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008 Juni 5;2(6):515-516.
2. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Molecular Cell*. 2002 Feb;9(2):423-432.
3. Adiga S, Kumar P. ANDROLOGY: Influence of Swim-Up Method on the Recovery of Spermatozoa from Different Types of Semen Samples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2001 März 1;18(3):160-164.
4. Agarwal A, Allamaneni S. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes: A review. *Minerva Ginecologica*. 2004 ;56(3):235-245.
5. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch. Androl*. 1994 Dez;33(3):157-162.
6. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003 Juli 1;9(4):331-345.
7. Ahmadi A, Ng S. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum. Reprod*. 1999 Sep 1;14(9):2279-2285.
8. Aitken R, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine D. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*. 1998 März 1;111(5):645-656.
9. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006 Mai 16;250(1-2):66-69.
10. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988 Nov 1;9(6):367-376.
11. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl*. 2009 Feb ;32(1):46-56.

12. Akerlöf E, Fredricson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl.* 1987 Oct;10(5):663-9.
13. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sékaly R. Early Activation of Caspases during T Lymphocyte Stimulation Results in Selective Substrate Cleavage in Nonapoptotic Cells. *J Exp Med.* 1999 Dez 20;190(12):1879-1890.
14. Alnemri E, Livingston D, Nicholson D, Salvesen G, Thornberry N, Wong W, u. a. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87(2):171.
15. Alvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl.* 1993 Mai 1;14(3):199-209.
16. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 2003;22(17):4385-4399.
17. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305–8.
18. Ayala-Grosso CA. P2-023: Caspase-3 and calpain cleavage of spectrin in corticolimbic areas induced by MK-801: Potential mechanism of corticocortical disconnection in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia.* 2006 Juli ;2(3, Supplement 1):S238-S239.
19. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum. Reprod.* 2007 Mai 1;22(5):1413-1419.
20. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1996 Okt ;28(4):587-96.
21. Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(32):22943-22952.

22. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1):67.
23. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 2008 Sep;107(3-4):257-267.
24. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 1982 Mai 1;93(2):298-305.
25. Bao Q, Riedl S, Shi Y. Structure of Apaf-1 in the auto-inhibited form - A critical role for ADP. *CELL CYCLE*. 2005 Aug;4(8):1001-1003.
26. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *J Androl.* 2003 Juli 1;24(4):621-628.
27. Baumber J, Ball B, Linfor J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*. 2005;66(5):772-779.
28. Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, u. a. Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil. Steril.* 2008 Okt ;90(4 Suppl):1340-1347.
29. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, u. a. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 2003 Mai ;18(5):1023-1028.
30. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*. 2007 Jan;87(1):93-100.
31. Berlau J, Hipler UC, Schreiber G. [Efficiency of conventional glass wool and SpermFertil columns with respect to ROS-reduction, leukocyte reduction, and CASA-generated sperm counts in semen]. *Zentralbl Gynakol.* 2000;122(8):428-432.
32. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DWC, Zwaal RFA. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999 Aug 18;1439(3):317-330.

33. Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. Apoptosis Is Physiologically Restricted to a Specialized Cytoplasmic Compartment in Rat Spermatids. *Biology of Reproduction*. 1999 ;61(6):1541-1547.
34. Blanco-Rodríguez. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *International Journal of Andrology*. 1998 ;21(5):236-248.
35. Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett*. 2002 März 13;514(2-3):111-114.
36. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidrowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1995 Jan ;5(1):21-26.
37. Bratton SB, Cohen GM. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol. Sci*. 2001 Juni;22(6):306-315
38. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):27-33.
39. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, u. a. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J*. 2001 März 1;20(5):998-1009.
40. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet*. 2001 Mai;28(1):10-12.
41. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 305(6854):609–613.
42. Carrell D, Liu L, Peterson C, Jones K, Hatasaka H, Erickson L, u. a. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Archives of Andrology*. 2003 ;49(1):49-55.
43. Carrell DT. The Clinical Implementation of Sperm Chromosome Aneuploidy Testing: Pitfalls and Promises. *J Androl*. 2007 Sep 19;;jandrol.107.003699.
44. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol. Hum. Reprod*. 2004 Mai 1;10(5):365-372.

45. Chater S[, Amara S[, Moussata D[, Bozec A[, Omezzine A[, Romestaing P[, u. a. Differential effects of ionizing radiation and platinum-derivative chemotherapy on apoptotic pathways in testicular germ cells. *International Journal of Radiation Biology*. 2007;83:269-278.
46. Cheung ECC, Joza N, Steenaart NAE, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, u. a. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J*. 2006 Sep 6;25(17):4061-4073.
47. Chiaramonte R, Bartolini E, Riso P, Calzavara E, Erba D, Testolin G, u. a. Oxidative stress signalling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;82(3):437-444.
48. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases -- An update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2008 Sep ;151(1):10-27.
49. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, u. a. The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum. Reprod*. 1992 Feb ;7(2):242-247.
50. Coetzee K, Kruge TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod. Update*. 1998 Feb ;4(1):73-82.
51. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil. Steril*. 2008 Apr ;89(4):823-831.
52. Craig A. Smith, Terry Farrah, Raymond G. Goodwin, The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death, *Cell*, Volume 76, Issue 6, 25 March 1994, Pages 95 962, ISSN 0092-8674
53. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril*. 1988 Aug ;50(2):314-320.
54. DAUGAS E, SUSIN SA, ZAMZAMI N, FERRI KF, IRINOPOULOU T, LAROCLETTE N, u. a. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*. 2000 Apr 1;14(5):729-739.
55. de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl*. 1993 Feb;16(1):21-25.

56. de Paula T, Bertolla R, Spaine D, Cunha M, Schor N, Cedenho A. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*. 2006 ;86(3):597-600.
57. De Rooij DG, Lok D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat Rec*. 1987 Feb ;217(2):131-6.
58. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenaabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 356–70.
59. Deveraux Q, Reed J. IAP family proteins - Suppressors of apoptosis. *Genes and Development*. 1999;13(3):239-252.
60. Deveraux Q, Roy N, Stennicke H, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula S, u. a. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal*. 1998;17(8):2215-2223.
61. Deveraux Q, Takahashi R, Salvesen G, Reed J. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 1997;388(6639):300-304.
62. Dive, C., Gregory. C. D., Phipps, D. J., Evans. D. L., Milner, A. E. and Wyllie, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1133: 275-285, 1992.
63. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril*. 2001 Nov;76(5):892-900.
64. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum. Reprod*. 2000 Juli 1;15(7):1552-1561.
65. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S 1998 A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50
66. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum. Reprod*. 2006 Aug;21(8):2061-2064.

67. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J. Androl.* 2006 Jan;8(1):11-29.
68. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 2000 Feb;20(3):929-935.
69. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 2002 Feb;23(1):25-43.
70. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Toxicology.* 1991;5(2):115-125.
71. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science.* 2000 Juni 1;22(2):169-189.
72. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages(1992) *Journal of Immunology*, 148 (7), pp. 2207-2216.
73. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7464-9.
74. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(17):11025-11030.
75. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991 Dez 15;88(24):11003-11006.
76. Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, u. a. Caspase Activity Mediates the Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Juni 5;2(6):595-601.

77. Glander H, J.Schaller. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod.* 1999 Feb 1;5(2):109-115.
78. Glander H, Schiller J, Süß R, Paasch U, Grunewald S, Arnhold J. Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lysophosphatidylcholines. *Andrologia.* 2002;34(6):360-366.
79. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, u. a. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 1994 Aug ;71(2):219-225.
80. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 1993 Juli ;207(1):202-205.
81. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* 2001;2(3):127-33.
82. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander H, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil. Steril.* 2005 Apr ;83 Suppl 11106-1112.
83. Grunewald S, Paasch U, Wuendrich K, Glander H. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Arch. Androl.* 2005 Dez;51(6):449-460.
84. Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Hmeidan AF, Glander H, Paasch U. Effects of post-density gradient swim-up on apoptosis signalling in human spermatozoa. *Andrologia.* 2010 4;42(2):127-131.
85. Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander H, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl.* 2008 6;31(3):325-330.
86. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, u. a. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene.* 2003 Okt 2;22(43):6669-6678.

87. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, u. a. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1388-1393.
88. Bayir H,, B. Fadeel, M.J. Palladino, E. Witasp, I.V. Kurnikov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, A.A. Amoscato, J. Jiang, P.M. Kochanek, S.T. DeKosky, J.S. Greenberger, A.A. Shvedova, V.E. Kagan, Apoptotic interactions of cytochrome c: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1757, Issues 5-6, 14th European Bioenergetics Conference, May-June 2006, Pages 648-659
89. Hahn R, Cassou B, Eibl K. [Comparative studies of semen freezing technics using French straws and ampoules]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1969 Juli 1;76(13):346-350.
90. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int. J. Androl.* 1999 Juni ;22(3):155-162.
91. Hammadeh ME, Bernardi A, Zeginiadou T, Amer A, Schmidt W. Relationship between nuclear chromatin decondensation (NCD) in vitro and other sperm parameters and their predictive value on fertilization rate in IVF program. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2005 Aug ;22(7-8):301-305.
92. Hammadeh ME, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. *Andrologia.* 2001 Nov ;33(6):331-336.
93. Hammadeh ME, Strehler E, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Schmidt W. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Arch. Androl.* 2001 Juni ;47(2):83-87.
94. Hammadeh ME; Fischer-Hammadeh C; Rosenbaum P; Schmidt W. Zusammenhang zwischen Kryokonservierungstechnik und Spermienmorphologie, sowie Chromatinintegrität von fertilen und subfertilen Männern. *Journal für Fertilität und Reproduktion.* 2002; 12 (1):7-14
95. Hauser R, Yavetz H, Paz GF, Homonnai ZT, Amit A, Lessing JB, u. a. The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1992 Juni ;9(3):265-270.
96. Hayashida K, Kohno S. Hybrid male sterility is caused by mitochondrial DNA deletion. *Molecular Biology Reports.* 2009 Juli 1;36(6):1365-1369.

97. Hotz, M. A., Trãiganos, F., and Darzynkiewicz. Z. Changes in nuclear chromatin related to apoptosis or necrosis induced by DNA topoisomerase II inhibitor fostriecin in MOLT-4 and HL-60 cells are revealed by altered DNA sensitivity to denaturation. *Exp. Cell Res.* 201: 184-191. 1992.
98. Huang C, Lin DP, Tsao H, Cheng T, Liu C, Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 2005 Juli;84(1):130-140.
99. Hud NV, Downing KH, Balhorn R. A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3581-3585.
100. Huh JR, Vernooy SY, Yu H, Yan N, Shi Y, Guo M, u. a. Multiple Apoptotic Caspase Cascades Are Required in Nonapoptotic Roles for Drosophila Spermatid Individualization. *PLoS Biol*. 2003 Dez 15;2(1):e15.
101. Ichimura S, Zama M, Fujita H. Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochim. Biophys. Acta*. 1971 Juli 29;240(4):485-495.
102. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000 Jan 1;21(1):33-44.
103. Janzen V, Fleming HE, Riedt T, Karlsson G, Riese MJ, Lo Celso C, u. a. Hematopoietic Stem Cell Responsiveness to Exogenous Signals Is Limited by Caspase-3. *Cell Stem Cell*. 2008 Juni 5;2(6):584-594.
104. Jin B, Yamasaki C, Yamada N, Seki S, Valdez DM, Kasai M, u. a. The mechanism by which mouse spermatozoa are injured during freezing. *J. Reprod. Dev*. 2008 Aug;54(4):265-269.
105. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, u. a. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001 März 29;410(6828):549-554.
106. Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci*. 2009 Aug;114(1-3):125-134.

107. Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, u. a. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.* 2000 Juli 14; 477 (1-2):1-7.
108. Kao S, Chao H, Chen H, Hwang TI, Liao T, Wei Y. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility.* 2008 Mai;89(5):1183-1190.
109. Kao S, Chao H, Wei Y. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1998 Juli 1;4(7):657-666.
110. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 2002;110: 1389–1398
111. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2000 Dez ;74(6):1200-1207.
112. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase Activation Is Required for T Cell Proliferation. *J Exp Med.* 1999 Dez 20;190(12):1891-1896.
113. Kerr J.F., Wyllie A.H., & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.
114. Köhn F, Haidl G. Andrologische Diagnostik. *Gynäkologische Endokrinologie.* 2006 5;4(2):97-112.
115. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619–42.
116. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000 Mai;6(5):513-519.
117. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1988 Jan;49(1):112-117.
118. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1986 Dec;46(6):1118-23.

119. Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.* 1996 Okt;55(4):789-795.
120. Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, Kratzik C, Marberger M. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. *Fertil. Steril.* 2006 Sep ;86(3):601-605.
121. Lagarkova MA, Iarovaia OV, Razin SV. Large-scale Fragmentation of Mammalian DNA in the Course of Apoptosis Proceeds via Excision of Chromosomal DNA Loops and Their Oligomers. *J. Biol. Chem.* 1995 Sep 1;270(35):20239-20241.
122. Lawen A, (2003) Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 25(9):888-96.
123. Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G. DNA Damage Response During Chromatin Remodeling in Elongating Spermatids of Mice. *Biology of Reproduction.* 2008 ;78(2):324-332.
124. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas System Is a Key Regulator of Germ Cell Apoptosis in the Testis. *Endocrinology.* 1997 Mai 1;138(5):2081-2088.
125. Leridon H, Slama R. The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum. Reprod.* 2008 Juni 1;23(6):1312-1319.
126. Lewis SEM, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2008 Juni;54(3):111-125.
127. Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005 Okt;322(1):33-41.
128. Li H., Zhu H., Xu C. J. and Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491–501
129. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001 Juli 5;412(6842):95-99.

130. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479–489
131. Lin M, Kuo-Kuang Lee R, Li S, Lu C, Sun F, Hwu Y. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility*. 2008 ;90(2):352-359.
132. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, u. a. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Juli 21;95(15):8461-8466.
133. LOEFFLER M, DAUGAS E, SUSIN SA, ZAMZAMI N, METIVIER D, NIEMINEN A, u. a. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*. 2001 März 1;15(3):758-767.
134. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993 Sep 10;74(5):845-853.
135. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril*. 1998 März;69(3):528-532.
136. Lucas C, Bald LN, Fendly BM, Mora-Worms M, Figari IS, Patzer EJ, u. a. The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J. Immunol*. 1990 Sep 1;145(5):1415-1422.
137. Ludwig M, Kümmel C, Diemer T, Ringert RH (1994) Ejakulatinfektionen durch sexuell übertragbare Erreger. *Urologe A* 33: 203–210
138. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1998) Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481–490
139. Ma Y and Hendershot LM. The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress Chaperones* 2002;7: 222–229

140. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995 Jan ;146(1):3-15.
141. Marchetti C, Gallego M, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum. Reprod.* 2004 Mai 1;19(5):1127-1134.
142. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biology of Reproduction.* 2004 Apr ;70(4):910-918.
143. Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 1998;52: 334–41.
144. Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, u. a. Proteolysis of Fodrin (Non-erythroid Spectrin) during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1995 März 24;270(12):6425-6428.
145. Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene.* 1997 März 6;14(9):1007-1012
146. Matura T, Togawa A, Kai M, Nishida T, Nakada J, Ishibe Y, u. a. The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2005 Okt 1;1736(3):181-188.
147. May-Panloup P, Chrétien M, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthiery Y, u. a. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum. Reprod.* 2003 März;18(3):550-556.
148. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, u. a. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur. Fertil.* 1995 Aug ;26(4):145-148.
149. McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2010 März;82(3):644-651.
150. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 1993;37(2):109-128.

151. McPherson S.M.G., Longo F.J. Nicking of Rat Spermatid and Spermatozoa DNA: Possible Involvement of DNA Topoisomerase II. *Developmental Biology*. 1993 Juli ;158:122-130.
152. Menken, J., Trussell, U., Larsen, U., (1986) Age and infertility, *Science*. 26;233(4771):1389-94.
153. Morgentaler A, Fung MY, Harris DH, Powers RD, Alper MM. Sperm morphology and in vitro fertilization outcome: a direct comparison of World Health Organization and strict criteria methodologies. *Fertil. Steril*. 1995 Dez ;64(6):1177-1182.
154. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome-c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):34287-94
155. Morrell JM, Moffatt O, Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D, Tomlinson M, u. a. Reduced Senescence and Retained Nuclear DNA Integrity in Human Spermatozoa Prepared by Density Gradient Centrifugation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2004 Juni 1;21(6):217-222.
156. Mossad H, Morshedi M, Toner JP, Oehninger S. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination. *Arch. Androl*. 1994 Aug ;33(1):51-57.
157. Muldrew K, McGann L. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical Journal*. 1990 März ;57(3):525-532.
158. Mulé JJ, Schwarz SL, Roberts AB, Sporn MB, Rosenberg SA. Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 1988;26(2):95-100.
159. Murtatori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, u. a. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000 Nov 1;21(6):903-912.
160. Murray TVA, McMahon JM, Howley BA, Stanley A, Ritter T, Mohr A, u. a. A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(22):3786-3793.

161. Nakabeppu Y., K. Sakumi, K. Sakamoto, D. Tsuchimoto, T. Tsuzuki and Y. Nakatsu, Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids, *Biol Chem* 387 (2006), pp. 373–379.
162. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S, u. a. Mitochondria-related male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Okt 10;103(41):15148-15153.
163. Nakada K, Inoue K, Hayashi J. Mito-mice: animal models for mitochondrial DNA-based diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2001 Dez;12(6):459-465.
164. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A. and Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403, 98-103 (6 January 2000)
165. Nani JM, Jeyendran RS. Sperm processing: glass wool column filtration. *Arch. Androl*. 2001 Aug;47(1):15-21.
166. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997 Aug;22(8):299-306.
167. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999 Nov;6(11):1028-1042.
168. Ng FL, Liu DY, Baker H. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum. Reprod*. 1992 Feb 1;7(2):261-266.
169. Obara H, Shibahara H, Tsunoda H, Taneichi A, Fujiwara H, Takamizawa S, u. a. Prediction of unexpectedly poor fertilization and pregnancy outcome using the strict criteria for sperm morphology before and after sperm separation in IVF-ET. *Int. J. Androl*. 2001 Apr ;24(2):102-108.
170. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, u. a. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*. 1993 Sep ;12(9):3679–3684.
171. O'Connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod*. 2002 März 1;17(3):704-709.

172. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* 2002 Juni;17(6):1571-1577.
173. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Hum. Reprod.* 2002 Juni;17(6):1565-1570.
174. O'Connell M, McClure N, Powell LA, Steele EK, Lewis SEM. Differences in mitochondrial and nuclear DNA status of high-density and low-density sperm fractions after density centrifugation preparation. *Fertil. Steril.* 2003 März;79 Suppl 1:754-762.
175. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006 Juli 1;12(4):417-435.
176. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984 Aug 30;123(1):291-298.
177. Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 2005 Apr 6;24(7):1375-1386.
178. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008 Aug ;25(8):403-411.
179. Ozmen B, Caglar G, Koster F, Schopper B, Diedrich K, Al-Hasani S. Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients. *Reproductive BioMedicine Online.* 2007 Aug ;15208-214.
180. Paasch U et al, (2008) Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. *Int J Androl.* Apr;31(2):93-102.
181. Paasch U, Agarwal A, Gupta AK, Sharma RK, Grunewald S, JR AJT, u. a. Apoptosis Signal Transduction and the Maturity Status of Human Spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2003; 1010 (Apoptosis from Signaling Pathways to Therapeutic Tools):486-488.

182. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera H. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 2004 März;81 Suppl 1:802-809.
183. Paasch U, Grunewald S, Dathe S, Glander H. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004 Dez ;1030403-409.
184. Paasch U, Thieme C, Glander H. Men born in the region of Leipzig (Saxony, Germany) between 1960 and 1970 showed a significantly decreased sperm count (examination of 3432 individuals). *Andrologia.* 2003;35(6):375-377.
185. Paasch, S. Grunewald, H.-J. Glander. Aktivierung von Apoptose-Signalkaskaden in ejakulierten Spermatozoen: ein biologischer Faktor der männlichen Infertilität. 2005
186. Peris SI, Bilodeau J, Dufour M, Bailey JL. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 2007 Juli ;74(7):878-892.
187. Peter A.T.[1], Linde-Forsberg C. Efficacy of the anticaspase agent zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa. *Theriogenology.* 2003 Apr 1;591525-1532.
188. Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* 1995 Juli;130(1):157-167.
189. Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-inducing Factor from Isolated Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 2005 Feb 25;280(8):6447-6454.
190. Pöttsch O. Unterschiedliche Facetten der Geburtenentwicklung in Deutschland. Differenzierte Betrachtung der Geburtenstatistik als Grundlage für die Annahmen zu Bevölkerungsvorausrechnungen In: *Wirtschaft und Statistik.* Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 6/2005, pp. 569-581.
191. Purvis K, Egdetveit I. Factors affecting sperm yield during swim-up. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 1993 Feb 1;10(2):145-150.
192. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21836-42.

193. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*. 2003 Aug ;35(4):238-243.
194. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*. 2000 Nov 1;157(5):1415-1430
195. Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA. Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma*. 1986 ;94(3):217-227.
196. Robinson JN, Lockwood GM, Dokras A, Egan DM, Nicholson SC, Ross C, u. a. Does isolated teratozoospermia affect performance in in-vitro fertilization and embryo transfer? *Hum. Reprod*. 1994 Mai 1;9(5):870-874.
197. Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*. 1997 Mai 1;16(9):2262-2270.
198. Roy N, Deveraux Q, Takahashi R, Salvesen G, Reed J. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO Journal*. 1997;16(23):6914-6925.
199. Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, u. a. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin. Chem*. 1998 Aug;44(8 Pt 1):1616-1620.
200. S Nagata, Apoptosis by death factor, *Cell* **88** (1997), pp. 355–365 97191304.
201. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 1999 Sep 9;401(6749):168-173.
202. Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, u. a. Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod*. 2006 März 1;74(3):530-537.
203. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander H, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J. Androl*. 2008 Apr ;29(2):134-142.
204. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):96-99.

205. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* 2002 Apr ;66(4):1061-1067.
206. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 2003 Nov ;7(4):428-432.
207. Sakkas D. [1] [2], Mariethoz E. [2], St. John J.C. [1]. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Experimental Cell Research.* 1999 Sep ;251350-355.
208. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(20):10964-10967.
209. Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, Recio R, Morán-Martínez J, Cebrián ME, u. a. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004 Apr 1;196(1):108-113.
210. Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* 1997 Mai 1;232(2):407-411.
211. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439–59.
212. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility.* 2004 Aug;82(2):378-383.
213. Sergio Oehninger[1], Mahmood Morshedi[1], S-L. Weng[2], Steve Taylor[2], Hakan Duran[2], Stephen Beebe[3]. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online.* 2003 Okt 31;7:469-476.
214. Shafik A, Shafik AA, Shafik I, El Sibai O. Molecular andrology as related to sperm DNA fragmentation/sperm chromatin biotechnology. *Arch. Androl.* 2006 Aug;52(4):299-310.

215. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The reactive oxygen species total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* 1999 Nov 1;14(11):2801-2807.
216. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Androl.* 2004 Juni;6(2):139-148.
217. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000 Feb 15;28(4):529-536.
218. Shen H, Dai J, Chia S, Lim A, Ong C. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod.* 2002 Mai 1;17(5):1266-1273.
219. Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D. et al. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144: 281–292
220. Sorahan T, Prior P, Lancashire RJ, Faux SP, Hultén MA, Peck IM, u. a. Childhood cancer and parental use of tobacco: deaths from 1971 to 1976. *Br. J. Cancer.* 1997 ;76(11):1525-1531.
221. St John JC, Jokhi RP, Barratt CL. Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol. Hum. Reprod.* 2001 Jan;7(1):103-111.
222. St John JC, Sakkas D, Barratt CL. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl.* 2000 Mar-Apr;21(2):189-99.
223. Stein ZA. *Am J Epidemiol.* 1985;121:327–42.
224. Stevanato J, Bertolla RP, Barradas V, Spaine DM, Cedenho AP, Ortiz V. Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates. *Fertility and Sterility.* 2008 Sep;90(3):889-890.
225. Su HC, Leite-Morris KA, Braun L, Biron CA. A role for transforming growth factor-beta 1 in regulating natural killer cell and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Immunol.* 1991 Okt 15;147(8):2717-2727.

226. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997 März ;56(3):602-7.
227. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, u. a. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):441-446.
228. Taylor S, Weng S, Fox P, Duran E, Morshedi M, Oehninger S, u. a. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol. Hum. Reprod.* 2004 Nov 1;10(11):825-834.
229. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, u. a. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum. Reprod.* 2002 Juli 1;17(7):1811-1819.
230. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online.* 2006 Juni;12(6):715-721.
231. Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Rasalkar AA, Singh L. Sperm Mitochondrial Mutations as a Cause of Low Sperm Motility. *J Androl.* 2003 Mai 1;24(3):388-392.
232. Thompson-Cree MEM, McClure N, Donnelly ET, Steele KE, Lewis SEM. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online.* 2003 Nov ;7(4):449-455.
233. Thomson L, Fleming S, Aitken R, De Iuliis G, Zieschang J, Clark A. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum. Reprod.* 2009 Sep 1;24(9):2061-2070.
234. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1312-1316.
235. Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, u. a. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* 2006 Aug;21(8):2084-2089.

236. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008 Mai 1;14(3):243-258.
237. Tseden K, Topaloglu O, Meinhardt A, Dev A, Adham I, Müller C, u. a. Premature translation of transition protein 2 mRNA causes sperm abnormalities and male infertility. *Mol. Reprod. Dev*. 2007 März;74(3):273-279.
238. Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD, Kluck RM. Mitochondrial Release of Pro-apoptotic Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jan 21;280(3):2266-2274.
239. Vahsen N, Candé C, Brière J, Bénit P, Joza N, Larochette N, u. a. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*. 2004 Nov 24;23(23):4679-4689.
240. van Overveld FW, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden JP, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem. Biol. Interact*. 2000 Juli 3;127(2):151-161.
241. Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum. Reprod. Update*. 2001 Okt ;7(5):495-500.
242. Vassalli, The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol* **10** (1992), pp. 411–452 92273149
243. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1995 Nov 1;182(5):1597-1601.
244. Vernet P, Fulton N, Wallace C, Aitken RJ. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2001 Okt;65(4):1102-1113.
245. Wang A, Fanning L, Anderson DJ, Loughlin KR. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch. Androl*. 1997 Aug ;39(1):11-17.
246. Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 1997 Juni ;49(6):921-925.

247. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2003 Sep ;80(3):531-535.
248. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-Mediated Apoptotic DNA Degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2002 Nov 22;298(5598):1587-1592.
249. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction.* 1991 Apr;44(4):569-574.
250. Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 1989 Sep;98(3):153-159.
251. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* 2010 Jan 1;16(1):30-36.
252. Watson P. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995 Jan 1;7(4):871-891.
253. Weil M, Jacobson M, Raff M. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci.* 1998 Sep 1;111(18):2707-2715.
254. Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* 1999;7(4-6):293-300.
255. Weng S, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, u. a. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol. Hum. Reprod.* 2002 Nov ;8(11):984-991.
256. Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of Recombinant Human Apoptotic Endonuclease G on Naked DNA and Chromatin Substrates. COOPERATION WITH EXONUCLEASE AND DNase I. *J. Biol. Chem.* 2001 Dez 14;276(51):48404-48409.
257. Winkle T, Gagsteiger F, Ditzel N. Reduktion von apoptotischen Spermien im Ejakulat mittels MACS-System. *Journal für Fertilität und Reproduktion* 2007; 17 (1)

258. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 Is the Primary Activator of Apoptotic DNA Fragmentation via DNA Fragmentation Factor-45/Inhibitor of Caspase-activated DNase Inactivation. *J. Biol. Chem.* 1999 Okt 22;274(43):30651-30656.
259. World Health Organization (1999): WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4. Auflage. Springer, Berlin - Heidelberg - New York
260. Wünderlich K, Paasch U, Leicht M, Glander H. Activation of Caspases in Human Spermatozoa during Cryopreservation – An Immunoblot Study. *Cell and Tissue Banking.* 2006 Juni 27;7(2):81-90.
261. Wyllie AH (1997) Apoptosis: An overview. *Br Med Bull* 53:451-465.
262. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980 Apr 10;284(5756):555-556.
263. Xu G, Cirilli M, Huang Y, Rich R, Myszka D, Wu H. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature.* 2001;410(6827):494-497.
264. Yang YS, Chen SU, Ho HN, Chen HF, Chao KH, Lin HR, u. a. Correlation between sperm morphology using strict criteria in original semen and swim-up inseminate and human in vitro fertilization. *Arch. Androl.* 1995 Apr ;34(2):105-113.
265. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, u. a. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 2002 Sep;9(9):680-684.
266. Yuste VJ, Sánchez-López I, Solé C, Moubarak RS, Bayascas JR, Dolcet X, u. a. The Contribution of Apoptosis-inducing Factor, Caspase-activated DNase, and Inhibitor of Caspase-activated DNase to the Nuclear Phenotype and DNA Degradation during Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2005 Okt 21;280(42):35670-35683.
267. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, u. a. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1241-1247

268. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*. 2006 Aug 29;175(5):495-500.
269. Zini A, Phillips S, Courchesne A, Boman J, Baazeem A, Bissonnette F, u. a. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*. 2009 ;91(6):2495-2500.
270. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Apr 23;274(17):11549-11556.
271. Zribi N, Chakroun NF, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Keskes LA. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil. Steril*. 2008 Nov 20

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hammadeh danke ich sehr für die Vergabe des spannenden Themas. Ihm gebührt der Dank als meinem Betreuer und Ansprechpartner in allen Phasen der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Al-Hasani danke ich ganz besonders für seine großzügige Unterstützung und zur Verfügungsstellung von wichtigen Reagenzien, welche zum Gelingen der Doktorarbeit unabdingbar waren.

Den Mitarbeiterinnen des IVF-Labors danke ich sehr für ihre Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Laboratoriums der HNO-Klinik danke ich sehr für die zur Verfügungsstellung ihres Fluoreszenzmikroskops und die Einführung in seine Bedienung.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Ong, Dipl. Mathemaiker des Institutes für Medizinische Informatik und Biometrie bedanken für ihre Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Meinen Eltern, Dr. med. Fowaz Fouz und Moumina Houbbi, die mir liebevoll, verständnisvoll und in jeder Hinsicht und in jeder Lebensphase unterstützend zur Seite stehen, gebührt mein größter Dank.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 28.09.1982 in Trier

Schulbildung

August 1988 – Juli 2001

Grundschule und Gymnasium, Homburg/Saar

Juli 2001

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife - Gesamtnote 1,0

Hochschulausbildung

Oktober 2001- Nov. 2007

Beginn des Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

August 2003

Ärztliche Vorprüfung

November 2007

Abschluss des Medizinstudiums - Examensnote „sehr gut“

Praktisches Jahr

August 2006 - Juli 2007

Universitätsklinikum Homburg, Wahlfach Pädiatrie

Facharztausbildung

Seit dem 01.01.2008 an der Universitätskinderklinik Düsseldorf, Abteilung für pädiatrische Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie