

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

**Spermienqualitätsveränderungen nach
Einfrier-Auftau-Prozess mit computergesteuertem
Einfriergerät und Vitrifikationsmethode**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2010

Vorgelegt von: Eva Caroline Müller
Geboren am 19.09.1982 in Saarlouis

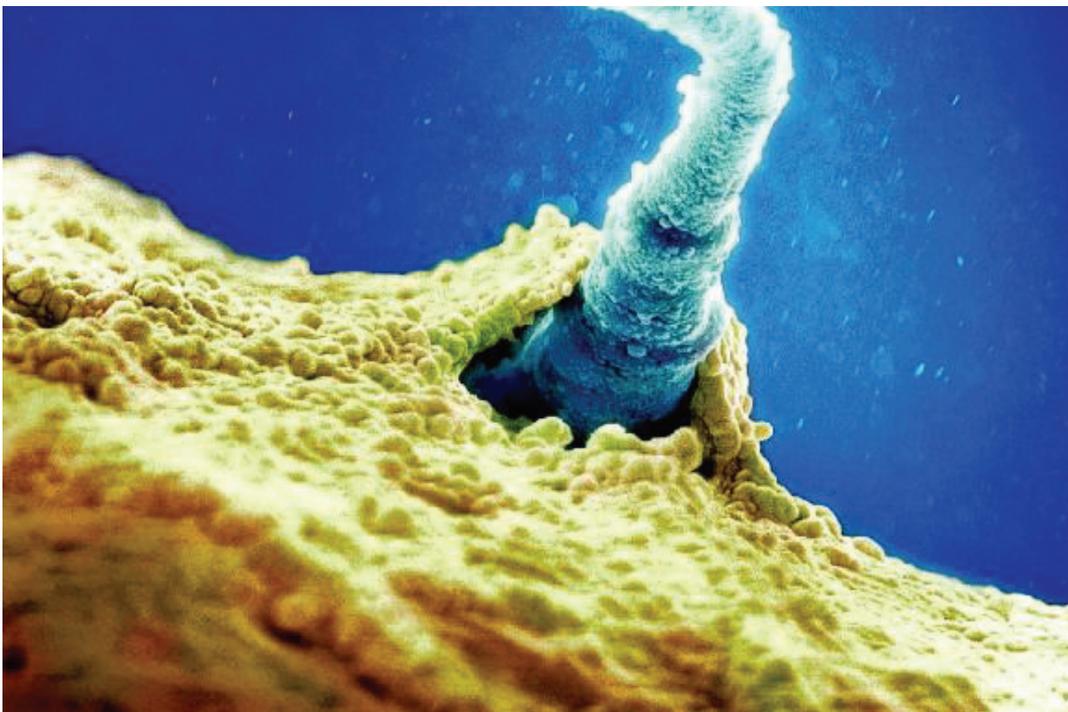
Meinen Eltern,
meinen Großeltern,
meiner Schwester Bettina
und
meinem Freund Sascha
gewidmet.

*„Es kommt nicht darauf an, dem Leben mehr Jahre zu geben,
sondern den Jahren mehr Leben zu geben.“*

Alexis Carrel

(1873 – 1944)

Französischer Chirurg und Nobelpreisträger (Medizin)



Für alle, die mir etwas bedeuten.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
<i>1.1.</i>	<i>Deutsche Zusammenfassung</i>	<i>1</i>
<i>1.2.</i>	<i>Summary</i>	<i>3</i>
2.	EINLEITUNG	5
<i>2.1.</i>	<i>Ungewollte Kinderlosigkeit</i>	<i>5</i>
2.1.1.	Was bedeutet Infertilität?	6
2.1.1.1.	Definition der Subfertilität nach WHO	7
2.1.2.	Ursachen der Unfruchtbarkeit der Frau	8
2.1.3.	Ursachen der Unfruchtbarkeit des Mannes	10
2.1.3.1.	Physiologische Spermatogenese	10
2.1.3.2.	Spermatogenetische Störungen	12
<i>2.2.</i>	<i>Methoden der assistierten Reproduktion</i>	<i>15</i>
2.2.1.	IUI	15
2.2.2.	IVF	16
2.2.3.	ICSI	18
2.2.4.	MESA/TESE	21
2.2.5.	AH	23
2.2.6.	PGD	24
<i>2.3.</i>	<i>Bedeutung der Kryokonservierungstechnik</i>	<i>26</i>
<i>2.4.</i>	<i>Grundlagen des Einfrierens und Auftauens</i>	<i>27</i>
2.4.1.	Einfluss der Temperatur	27
2.4.2.	Einfluss der kryoprotektiven Stoffe	28
<i>2.5.</i>	<i>Verfahren der Kryokonservierung von Spermien</i>	<i>31</i>
2.5.1.	Einfrieren mit Stickstoffdampf	31
2.5.2.	Einfrieren mit computergesteuertem Einfriergerät	31
2.5.3.	Einfrieren eines einzelnen Spermiums in Zona pellucida	32
2.5.4.	Gefriertrocknung (Freeze Drying)	33
2.5.5.	Vitrifikation	34

2.6.	<i>Die Vitrifikationsmethode</i>	35
2.6.1.	Definition	35
2.6.1.1.	Vitrifikation ohne kryoprotektive Stoffe	36
2.6.1.2.	Vitrifikation mit kryoprotektiven Stoffen	38
2.6.2.	Historischer Überblick	39
2.6.3.	Methoden der Vitrififikation	40
2.6.3.1.	Cryoloop und Cryotop	41
2.6.3.2.	Open Pulled Straws (OPS) und Closed Pulled Straws (CPS), Hemi Straws und Mini Straws	43
2.6.3.3.	VitMaster®	45
2.6.3.4.	Einfluss des Volumens auf den Erfolg der Vitrififikation	46
2.6.4.	Anwendungsgebiete der Vitrifikationsmethode	46
2.6.4.1.	Spermien	47
2.6.4.2.	Eizellen	47
2.6.4.3.	Embryonen/Blastozysten	48
2.6.4.4.	Andere Gewebezellen/Organe am Beispiel von Ovargewebe	50
2.6.5.	Vorteile der Vitrifikationsmethode	51
2.6.5.1.	Vermeidung von Eiskristallbildung	52
2.6.5.2.	Zeitvorteil	52
2.6.5.3.	Einfachheit	53
2.6.5.4.	Kostenfaktor	53
2.7.	<i>Eigene Fragestellung</i>	54
3.	MATERIAL UND METHODEN	55
3.1.	<i>Beobachtungsgut/Material</i>	55
3.2.	<i>Gewinnung der Samenproben</i>	55
3.3.	<i>Das Spermogramm nach WHO-Kriterien</i>	55
3.3.1.	Beurteilung der Viskosität und Volumenbestimmung	57
3.3.2.	Bestimmung des pH-Wertes	57
3.3.3.	Cyturtest	58
3.3.4.	Spermatozoendichte	58
3.3.5.	Spermienmotilität	59
3.3.6.	Vitalitätstests: Eosin-Test und Hypoosmotischer Spermienschwelltest (HOS-Test)	60
3.3.7.	Mixed Antiglobulin Reaction Test, MAR-Test (Gemischter Antiglobulin-Test)	62
3.3.8.	Spermienmorphologiebeurteilung mittels Papanicolaou-Färbung	62

3.4.	<i>Aufbereitung der Proben und Einfrieren</i>	65
3.4.1.	Human Sperm Preservation Medium (HSPM)	65
3.4.2.	Gefrierzubehör	66
3.4.3.	Verwendete Friermethoden	67
3.4.3.1.	Computergesteuertes Einfriergerät	67
3.4.3.2.	Vitrifikation mit zwei verschiedenen Straw-Arten	69
3.4.4.	Aufbewahrung der eingefrorenen Proben	70
3.5.	<i>Auftauen der Proben</i>	71
3.6.	<i>Spezifische Tests</i>	72
3.6.1.	Die Chromatinkondensation	73
3.6.1.1.	Beurteilung der Chromatinkondensation der Spermien-DNA mittels Chromomycin A3 (CMA3)-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung	73
3.6.2.	Die DNA-Fragmentierung	75
3.6.2.1.	Beurteilung der Doppelstrangbrüche in der Spermien-DNA mittels TUNEL-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung	75
3.6.3.	Die Akrosomreaktion	77
3.6.3.1.	Beurteilung des Spermienakrosoms mittels Concanavalin A-Lectin (CON A)-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung	77
3.7.	<i>Statistische Analyse</i>	79
4.	ERGEBNISSE	80
4.1.	<i>Vergleich der Parameter in der Gesamtgruppe (fertil + subfertil) vor und nach dem Einfrieren unter Berücksichtigung der Kryokonservierungsmethode</i>	80
4.2.	<i>Veränderung der Parameter für die Gesamtgruppe nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d</i>	85
4.3.	<i>Vergleich der unterschiedlichen Vitrifikationsmethoden im Bezug auf die untersuchten Parameter der Gesamtgruppe</i>	89
4.4.	<i>Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe vor und nach dem Einfrieren unter Berücksichtigung der Kryokonservierungsmethode</i>	93
4.5.	<i>Veränderung der Parameter nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d für die fertile Gruppe</i>	99
4.6.	<i>Veränderung der Parameter nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d für die subfertile Gruppe</i>	103
4.7.	<i>Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät</i>	106

4.8.	<i>Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe nach dem Einfrieren mit Vitrifikation d</i>	108
4.9.	<i>Korrelationen und Streudiagramme</i>	110
5.	DISKUSSION	122
5.1.	<i>Bedeutung der Spermienmorphologie</i>	122
5.2.	<i>Bedeutung der Spermienmotilität</i>	125
5.3.	<i>Bedeutung der Vitalität und der Membranintegrität</i>	127
5.4.	<i>Bedeutung der Chromatinkondensation</i>	130
5.5.	<i>Bedeutung der DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit</i>	135
5.6.	<i>Bedeutung der Akrosomreaktion</i>	140
5.7.	<i>Bedeutung der Straw-Art bzw. des Straw-Volumens</i>	142
5.8.	<i>Bedeutung des Friermediums/Verwendung von Kryoprotektiva bei der Vitrifikation: Ja oder Nein?</i>	144
6.	LITERATURVERZEICHNIS	149
7.	DANKSAGUNG	174
8.	LEBENS LAUF	175

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGS	Adrenogenitales Syndrom
AH	Assisted Hatching
AOT	Acridine Orange Test
CASA	Computerassistierte Samenanalyse
CF-Gen	Cystic Fibrosis-Gen
CMA3	Chromomycin A3
CON A	Concanavalin A-Lectin
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CPS	Closed Pulled Straw
DFI	DNA-Fragmentierungs-Index
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EAP	Einfrier-Auftau-Prozeß
FDP	Flexipet Denuding Pipette
FISH	Fluorescence In-Situ Hybridisation
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA	Human Leucocyte Antigens
HMG	Humanes Menopausales Gonadotropin
HOS-Test	Hypoosmotischer Spermischwelltest
HSA	Human Serum Albumin
HSPM	Human Sperm Preservation Medium
HSS	Hemi Straw-System
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In vitro-Fertilisation
KHK	Koronare Herzkrankheit
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mittelwert

MAR-Test	Mixed Antiglobulin Reaction Test
MESA	Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
OPS	Open Pulled Straw
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCO	Polycystic Ovary
PGD	Preimplatation Genetic Diagnosis
PID	Pelvic Inflammatory Disease
RNA	Ribonucleinacid
ROS	Reactive Oxygen Species
SCSA	Spermien-Chromatin-Struktur-Assay
SSV	Solid Surface Vitrification
SD	Standardabweichung
TAS	Total Antioxidant Status
TdT	Terminal desoxynucleotidyl-Transferase
TEM	Transmission Electron Microscopy
TESE	Testicular Sperm Extraction
Tg	Glass transition temperature
TUNEL	Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
TYBG	Test-Yolk-Buffer mit Glycerol
Vitrifikation D (VD)	Vitrifikation mit normalen Straws (0,5 ml; 50 mm)
Vitrifikation d (Vd)	Vitrifikation mit dünnen Straws (0,25 ml; 133 mm)
WHO	World Health Organisation

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Spermatogenesestadien	11
Abbildung 2:	Ausreifung der Keimzellen zum Lumen hin	12
Abbildung 3:	Einbringen von Spermien intrauterin	15
Abbildung 4:	IVF (In-Vitro-Fertilisation)	16
Abbildung 5:	Vorgang der ICSI (Intracytoplasmatische Spermieninjektion)	19
Abbildung 6:	AH (Assisted Hatching)	23
Abbildung 7:	PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)	24
Abbildung 8:	Cryoloop und Cryovial für die Vitrifikation von Oocyten	41
Abbildung 9:	Geladener Cryoloop	41
Abbildung 10:	Cryotop-Methode	43
Abbildung 11:	OPS-Vitrifikation	44
Abbildung 12:	Das Hemi Straw-System	44
Abbildung 13:	Anzahl der fertilen und subfertilen Proben	55
Abbildung 14:	Das Spermogramm	56
Abbildung 15:	Die Zählkammer nach MAKLER	58
Abbildung 16:	Aufbau eines Spermiums	59
Abbildung 17:	Verschiedene Formen der geschwollenen Spermien	61
Abbildung 18:	Prinzip des MAR-Tests	62
Abbildung 19:	Das Kryoprotokoll	69
Abbildung 20:	Das Einfriergerät	69
Abbildung 21:	Einfriervorgang: Haltevorrichtung für die Kassetten	69
Abbildung 22:	French Straws und Verschlusskugeln	70
Abbildung 23:	Mini Straw mit Verschlusskappen	70

Abbildung 24:	Aufbewahrung der Kassetten in Köchern im Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff	70
Abbildung 25 und 26:	Fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Spermien (CMA3-Test)	74
Abbildung 27:	Fluoreszierendes Spermium (TUNEL-Test)	76
Abbildung 28:	Fluoreszierendes und nicht-fluoreszierendes Spermium (TUNEL-Test)	76

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	WHO (1999) Referenzwerte der Samenanalyse	7
Tabelle 2:	Ursachen der Sterilität der Frau	8
Tabelle 3:	Methoden der assistierten Reproduktion	15
Tabelle 4:	Für Spermien modifizierte Papanicolaou-Färbung	64
Tabelle 5:	Ablauf des Einfrierens mit dem computergesteuerten Einfriergerät	68
Tabelle 6:	Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung der Gesamtgruppe in „Nativ“ und „Einfriergerät“; jeweilige Signifikanz nach EAP (p-Werte)	80
Tabelle 7:	Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung der Gesamtgruppe in „Nativ“ und „Vitrifikation d“; jeweilige Signifikanz nach EAP (p-Werte)	81
Tabelle 8:	Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der Gesamtgruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)	85
Tabelle 9:	Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in Vitrifikation d- und Vitrifikation D-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)	89
Tabelle 10:	Fertile Gruppe (n = 21)	93
Tabelle 11:	Subfertile Gruppe (n = 20)	94
Tabelle 12:	Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der fertilen Gruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)	99
Tabelle 13:	Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der subfertilen Gruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)	103
Tabelle 14:	Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in fertile und subfertile Gruppe nach dem Einfrieren mit der Einfriergerät (Darstellung in Prozent des Nativwertes nach EAP)	106
Tabelle 15:	Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in fertile und subfertile Gruppe nach dem Einfrieren mit Vitrifikation d (Darstellung in Prozent des Nativwertes nach EAP)	108
Tabelle 16 a:	Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der Gesamtgruppe	110
Tabelle 16 b:	Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der fertilen Gruppe	111

Tabelle 16 c:	Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der subfertilen Gruppe	112
Tabelle 17 a:	Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der Gesamtgruppe	113
Tabelle 17 b:	Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der fertilen Gruppe	114
Tabelle 17 c:	Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der subfertilen Gruppe	116
Tabelle 18 a:	Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät: Korrelationen in der Gesamtgruppe	118
Tabelle 18 b:	Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät: Korrelationen in der fertilen Gruppe	120
Tabelle 18 c:	Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät: Korrelationen in der subfertilen Gruppe	121

DIAGRAMME

Diagramm 1:	Die untersuchten Einfriermethoden	67
Streudiagramm 1:	Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit im Nativsperma der Gesamtgruppe	110
Streudiagramm 2:	Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und normaler Spermienmorphologie im Nativsperma der fertilen Gruppe	111
Streudiagramm 3:	Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit im Nativsperma der subfertilen Gruppe	112
Streudiagramm 4:	Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) nach Vitrifikation d in der Gesamtgruppe	113
Streudiagramm 5:	Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und normaler Spermienmorphologie nach Vitrifikation d in der fertilen Gruppe	115
Streudiagramm 6:	Korrelation zwischen Intaktheit des Akrosoms und normaler Spermienmorphologie nach Vitrifikation d in der subfertilen Gruppe	116
Streudiagramm 7:	Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit nach Vitrifikation d in der subfertilen Gruppe	117
Streudiagramm 8:	Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) nach Einfrieren mit Einfriergerät in der Gesamtgruppe	118
Streudiagramm 9:	Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit nach Einfrieren mit Einfriergerät in der Gesamtgruppe	119
Streudiagramm 10:	Korrelation zwischen normaler Spermienmorphologie und vollständiger DNA-Kondensation nach Einfrieren mit Einfriergerät in der fertilen Gruppe	120

BOXPLOT

Boxplot 1:	DNA-Kondensation (CMA3)	86
Boxplot 2:	Akrosomintaktheit (CON A)	87
Boxplot 3:	Spermien ohne DNA-Strangbruch (TUNEL)	87

HISTOGRAMME

Histogramm 1:	Spermiendichte	82
Histogramm 2:	Progressivmotilität (a)	82
Histogramm 3:	Globalmotilität (a+b)	82
Histogramm 4:	Morphologie (Normalform)	82
Histogramm 5:	Eosin-Test (vitale Spermien)	83
Histogramm 6:	HOS-Test (intakte Membran)	83
Histogramm 7:	Chromomycin A3 (vollständige Kondensation)	83
Histogramm 8:	Concanavalin A-Lectin (Akrosomintegrität)	83
Histogramm 9:	TUNEL (ohne DNA-Strangbruch)	84
Histogramm 10:	Darstellung der Spermiendichte und der normalen Morphologie der Gesamtgruppe nach EAP	91
Histogramm 11:	Darstellung der Progressiv- und der Globalmotilität der Gesamtgruppe nach EAP	91
Histogramm 12:	Darstellung der Vitalität (Eosin-Test) und der Membranintegrität (HOS-Test) der Gesamtgruppe nach EAP	92
Histogramm 13:	Darstellung der DNA-Kondensation (CMA3), der Akrosomintegrität (CON A) und der Anzahl der Spermien ohne Strangbruch (TUNEL) der Gesamtgruppe nach EAP	92
Histogramm 14:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Spermiendichte in der fertilen und subfertilen Gruppe	95
Histogramm 15:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Progressiv- und Globalmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe	96
Histogramm 16:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Vitalität der Spermien (Eosin-Test) in der fertilen und subfertilen Gruppe	96
Histogramm 17:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Membranintegrität der Spermien (HOS-Test) in der fertilen und subfertilen Gruppe	97
Histogramm 18:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die DNA-Kondensation der Spermien (CMA3) in der fertilen und subfertilen Gruppe	97
Histogramm 19:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Intaktheit des Akrosoms der Spermien (CON A) in der fertilen und subfertilen Gruppe	98

Histogramm 20:	Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen der Spermien (TUNEL) in der fertilen und subfertilen Gruppe	98
Histogramm 21:	Spermiendichte, Progressiv- und Globalmotilität sowie normale Morphologie der fertilen Gruppe nach EAP	100
Histogramm 22:	Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) der fertilen Gruppe nach EAP	101
Histogramm 23:	DNA-Kondensation (CMA3), Akrosomintegrität (CON A) und Anzahl der Spermien ohne Strangbruch (TUNEL) der fertilen Gruppe nach EAP	101
Histogramm 24:	Spermiendichte, Progressiv- und Globalmotilität sowie normale Morphologie der subfertilen Gruppe nach EAP	104
Histogramm 25:	Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) der subfertilen Gruppe nach EAP	105
Histogramm 26:	DNA-Kondensation (CMA3), Akrosomintegrität (CON A) und Anzahl der Spermien ohne Strangbruch (TUNEL) der subfertilen Gruppe nach EAP	105

REZEPTURVERZEICHNIS

Rezeptur 1:	Human Sperm Preservation Medium (HSPM)	65
Rezeptur 2:	Phosphate Buffered Saline (PBS)	72

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Einen bedeutsamen Faktor in der Reproduktionsmedizin stellt die Kryokonservierung von befruchteten Eizellen und von Spermien dar. Diese Studie befasst sich mit verschiedenen Methoden zur Kryokonservierung von Spermien subfertiler und fertiler Männer. Darüber hinaus untersucht sie wichtige Parameter, die für den erfolgreichen Eintritt einer Schwangerschaft von Bedeutung sind, aber noch nicht zur Routineuntersuchung gehören. Im Rahmen einer Gegenüberstellung werden die Auswirkungen der angewendeten Friermethoden auf die Chromatinkondensation, die Häufigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen und die Akrosomintegrität der Spermien betrachtet. Dabei soll herausgefunden werden, ob die hier durchgeführte Vitrifikationsmethode einen adäquaten Ersatz zu konventionellen computergesteuerten Friermethoden darstellt, die weit teurer und zeitintensiver sind und derzeit als etablierte Methoden in der Reproduktionsmedizin gelten.

Im Rahmen des Einfrier- und Auftauprozesses wurden die möglichen Schädigungen im Hinblick auf Vitalität, Morphologie, Chromatinkondensation, Akrosomreaktion und DNA-Doppelstrangbruchverhalten von menschlichen Spermien untersucht und dabei auch zwischen fertilen und subfertilen Männern unterschieden. Die Untersuchungen umfassten insgesamt 41 Proben fertiler ($n = 21$) und subfertiler ($n = 20$) Männer. Die Spermien wurden nach der Samenanalyse mittels eines programmierbaren Einfriergeräts sowie durch sofortiges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff (Vitrifikation) kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut. Als Frierlösung wurde in beiden Fällen „Human Sperm Preservation Medium“ (HSPM) im Verhältnis 1:1 (Frierlösung/Ejakulat) verwendet. Die Vitalität wurde anhand des Eosin-Tests und des hypoosmotischen Spermischwelltests (HOS-Test) bewertet. Die Morphologie wurde nach strict criteria beurteilt, während die Chromatinkondensation mittels CMA3-Färbung, die Akrosomreaktion nach CON A-Färbung und die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche anhand des TUNEL-Tests ausgewertet wurden. Nach Kryokonservierung mittels Einfriergerät wurde in der fertilen Gruppe ein signifikanter Abfall der Nativwerte der Spermiovitalität (Eosin- und HOS-Test), der vollständigen Chromatinkondensation, der intakten Akrosomen und der fehlenden DNA-Doppelstrangbrüche nach dem Einfrier-Auftau-Prozess (EAP) festgestellt.

Diese Veränderungen der Ausgangswerte konnten auch nach der Kryokonservierung durch Vitrifikation d mit ähnlichen Ergebnissen gezeigt werden. Allein die Morphologie

verzeichnete bei beiden Kryokonservierungsmethoden keine signifikante Änderung der Werte in der fertilen Gruppe nach dem EAP. Die p-Werte im Vergleich der beiden Methoden waren nur für die Vitalität (Eosin-Test; $p = 0,001$) und die Membranintegrität (HOS-Test; $p = 0,036$) signifikant. Bei allen weiteren untersuchten Parametern konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

In der subfertilen Gruppe zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie in der fertilen Gruppe. Die Werte der Spermiovitalität, der vollständiger Chromatinkondensation, der intakten Akrosomen und der fehlenden DNA-Doppelstrangbrüche sanken nach dem EAP sowohl unter Anwendung des Einfriergeräts als auch nach der Vitrifikation d signifikant ab. Die Morphologie wurde als einziger Parameter nur wenig beeinflusst. Beim direkten Vergleich der beiden untersuchten Kryokonservierungsmethoden wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

In der Gesamtgruppe wurde die Vitrifikationsmethode im Hinblick auf die Auswirkungen der Oberfläche/des Volumens des verwendeten Strawsystems untersucht. Dabei zeigte sich, dass größere Volumina/Oberflächen im Hinblick auf die in dieser Studie untersuchten Parameter – mit Ausnahme der Morphologie ($p = 0,993$) – signifikant schlechtere Ergebnisse zeigen. Nur die Spermiedichte ist bei größeren Volumina/Oberflächen signifikant höher ($p = 0,034$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vitrifikationsmethode im Vergleich zum konventionellen Einfrieren mittels Einfriergerät keine schlechteren Ergebnisse in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe im Bezug auf die untersuchten Parameter aufweist.

Beide Kryokonservierungsmethoden können sowohl für fertile als auch für subfertile Probandenkollektive in Betracht gezogen werden. Die Wahl des angewendeten Kryogefäßes ist hierbei für den Erfolg der Vitrifikation von Bedeutung. Schlussfolgernd ist die Vitrifikationsmethode eine adäquate Alternative zum konventionellen computergesteuerten Einfriergerät, mit der eine erfolgreiche Kryokonservierung von menschlichen Spermien durchgeführt werden kann.

1.2. Summary

The cryopreservation of inseminated ova and sperm plays a considerable role in reproductive medicine. This study deals with different methods of cryopreservation of sperms from fertile and subfertile men and analyses important parameters, which are relevant to succeed in a regular pregnancy, but do not yet belong to routine examination. The chromatin condensation, the frequency of DNA double-strand breaks and the integrity of the acrosomes of the semen are considered, when comparing the effects of the different used freezing methods to find out, if vitrification can be an adequate replacement of the conventionally used controlled rate freezer, which is quite expensive and time-consuming, but at present the established cryopreservation method in reproductive medicine.

The possible damages caused by freezing and thawing process with regard to vitality, morphology, chromatin condensation, acrosome reaction and DNA double-strand molecule reaction of human sperm were analysed and as well also distinguished between fertile and subfertile men.

The examinations comprised altogether 41 samples of fertile (n = 21) and subfertile (n = 20) persons. After the semen analysis the sperms were cryopreserved through controlled rate freezer or vitrification and thawed at a later date. The Human Sperm Preservation Medium (HSPM) was used for freezing solution in both cases in a 1:1 relation of freezing solution and ejaculate. The vitality was measured by eosin test and hypoosmotic swelling test (HOS test). Morphology was judged by strict criteria, the chromatin condensation by CMA3 staining, the acrosome reaction by CON A staining and the numbers of DNA double-strand breaks were analyzed by TUNEL staining.

When freezing with controlled rate freezer in the fertile group there can be shown a significant decrease of the values for sperm vitality, complete chromatin condensation, intact acrosomes and absent DNA double-strand molecule breaks after thawing.

These changes of values also appear after cryopreservation by vitrification and with similar results. Only morphology does not present significant changes in both cryopreservation methods after freeze-thawing procedure in the fertile group.

The p-values in comparison of both methods were significant only for vitality (eosine test; $p = 0,001$) and integrity of the membrane (HOS test; $p = 0,036$). In all the other analysed parameters there were no significant differences.

In the subfertile group was shown a similar result like in the fertile group. The values of sperm vitality, complete chromatin condensation, intact acrosomes and absent DNA double-strand

molecule breaks decreased significantly after thawing by using the controlled rate freezer and the vitrification d. Only morphology was less influenced.

In comparison of both cryopreservation methods there were no significant differences.

In the entire group the vitrification method was analysed in regard of effects of surface/volume of the used straw. Thereby was shown, that bigger volume/surface has significant worse results – except for morphology ($p = 0,993$). Only sperm density is significant higher in bigger volume/surface ($p = 0,034$).

To sum it up it can be said, that the vitrification method in comparison with the controlled rate freezing does not point out worse results in fertile or subfertile population concerning the measured values.

This observation allows saying that both methods done can be taken into consideration to cryopreserve fertile and subfertile samples. The choice of the used cryo vial is important for the success of the vitrification.

Deductive the vitrification method represents an adequate way to conventional controlled rate freezer to arrange successful cryopreservation of human sperms.

2. EINLEITUNG

2.1. Ungewollte Kinderlosigkeit

In Industrieländern sind schätzungsweise 10 - 15 Prozent aller Partnerschaften ungewollt kinderlos. Ohne Empfängnisverhütung tritt bei 50 - 60 Prozent aller gesunden Paare innerhalb von 3 Monaten eine Schwangerschaft ein, nach einem halben Jahr liegt die Wahrscheinlichkeit für eine Gravidität schon bei 60 - 80 Prozent, nach einem Jahr bei 80 - 85 Prozent. In den letzten Jahrzehnten ist die Zahl der kinderlosen Paare stark angestiegen. Allein in Deutschland sind 1,4 Millionen Paare ungewollt kinderlos (Stand: 2010). Das bestmögliche Zeitfenster für eine Schwangerschaft beinhaltet die sechs Tage vor dem Eisprung, mit dem sechsten Tag als eigentlichem Tag des Eisprungs (WILCOX, WEINBERG und BAIRD 1995). Das Abstimmen des Zeitpunkts des Geschlechtsverkehrs mit dem Zeitpunkt des Eisprungs kann zu einer deutlich erhöhten Chance für eine Schwangerschaft führen. Deshalb sollte bei der Anamnese auch gezielt nach der sexuellen Aktivität während dieser Zeitspanne gefragt werden (QUALLICH 2006). Nach der World Health Organisation (WHO) bedeutet „ungewollte Kinderlosigkeit“ das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach mehr als zwölf Monaten, in denen regelmäßiger, ungeschützter Geschlechtsverkehr stattfand. 1967 wurde die ungewollte Kinderlosigkeit als Krankheit anerkannt. Es wird geschätzt, dass drei Prozent aller Paare dauerhaft ungewollt kinderlos bleiben. In Deutschland werden derzeit in einem Jahr circa 60.000 reproduktionsmedizinische Behandlungen durchgeführt (Stand: 2010).

Die Veränderung der individuellen Lebensgestaltung durch die Zunahme nichtehelicher Lebensgemeinschaften und dem Trend zu Singlehaushalten sind Beispiele für neue Formen des partnerschaftlichen und familiären Zusammenlebens. Motive dafür, gewollt kinderlos zu bleiben, sind ökonomische Überlegungen, Sorgen um die erwartete Zukunft der Kinder, sowie die Ansicht, durch Elternschaft deutliche – persönliche als auch berufliche – Einbußen in Kauf nehmen zu müssen. Im internationalen Vergleich nimmt Deutschland bezüglich der Kinderlosigkeit einen vorderen Rang ein. Gewollt oder ungewollt?

Bei ungewollt kinderlosen Paaren ist davon auszugehen, dass sowohl 40 Prozent Fertilitätsstörungen beim Mann als auch 40 Prozent bei der Frau vorliegen. Wenn Paare reproduktionstechnische Maßnahmen in Anspruch nehmen, liegen bei der Frau sehr häufig Tubenpathologien sowie ein gestörter Menstruationszyklus vor, beim Mann überwiegt die eingeschränkte Spermienqualität.

Es gibt mehrere Theorien bezüglich des Anstiegs der Infertilität: Die reproduktive Phase wird – bedingt durch lange Ausbildungszeiten und Schwierigkeiten mit der Vereinbarkeit von Familie und Beruf – zunehmend ins höhere Lebensalter verschoben. Damit ist das Risiko der sinkenden Fruchtbarkeit verbunden. Als weitere Ursachen werden die Zunahme der Anzahl der Sexualpartner und damit erhöhtes Infektionsrisiko mit sexuell übertragbaren Krankheiten, sowie die Zunahme entzündlicher Erkrankungen der Ovarien und veränderte Lebensgewohnheiten (u.a. Genussmittel, Übergewicht) diskutiert. Auch von äußeren Schadstoffeinflüssen ist anzunehmen, dass sie insbesondere die Spermienqualität negativ beeinflussen. Die Reproduktionsmedizin versucht trotz dieser Probleme durch verschiedene Methoden ungewollt kinderlosen Paaren zu einer Schwangerschaft zu verhelfen.

2.1.1. Was bedeutet Infertilität?

Eine allgemeine Definition von Subfertilität und Infertilität ist sehr wichtig für das geeignete Management der Infertilität. Infertilität kann mit Sterilität – d.h. mit nur sporadisch auftretenden, spontanen Schwangerschaften – gleichgesetzt werden (GNOTH et al. 2005).

Gegenwärtig ist der Begriff definiert als ungewolltes Ausbleiben einer Schwangerschaft während eines Jahres trotz ungeschütztem Geschlechtsverkehr in der fruchtbaren Phase des Menstruationszyklus (EVERS 2002). Infertilität betrifft ungefähr 15 Prozent der Paare im zeugungsfähigen Alter (SHARLIP et al. 2002). In 20 Prozent der Fälle ist sie allein auf eine männliche Problematik zurückzuführen, in weiteren 30 - 40 Prozent ist diese ein assoziierter Faktor (THONNEAU et al. 1991). Die Spermienanalyse ist die Basis der Laboruntersuchungen: Sie testet nicht die Fruchtbarkeit, sondern vielmehr das Fruchtbarkeitspotential, wobei die Chance einer möglichen Schwangerschaft mit der Anzahl der motilen Spermien korreliert (SCHOYSMAN und GERRIS 1983).

Schwangerschaften können auch bei subnormalen Werten entstehen, was die Wichtigkeit des weiblichen Fertilitätspotentials verdeutlicht und zeigt, dass abnormale Spermienanalysen nicht mit Subfertilität gleichgesetzt werden können (KOLETTIS 2003).

2.1.1.1. Definition der Subfertilität nach WHO

Subfertilität beschreibt normalerweise jede Form von reduzierter Fruchtbarkeit mit verlängerter Zeit von ungewolltem Ausbleiben einer Schwangerschaft (GNOTH et al. 2005).

Tabelle 1: WHO (1999) Referenzwerte der Samenanalyse

Volumen	> 2 ml
pH	> 7,2
Spermiendichte	> 20 x 10 ⁶ /ml
Motilität	> 40 % Globalmotilität (a+b) oder > 25 % Progressivmotilität (a)
Morphologie	> 15 % normale Spermien
MAR-Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test)	< 10 % Agglutination
Leukozyten	< 1 x 10 ⁶ /ml

Jedoch wurden die so genannten normalen Werte, die von der WHO für die grundlegenden Spermienparameter vorgeschrieben werden, größtenteils durch Studien an fertilen Gruppen gewonnen oder an diese angelehnt (WHO 1999).

Da Samenanalysen meistens verwendet werden, um das Fruchtbarkeitspotential von Männern mit Subfertilitätsproblemen zu untersuchen und zu etablieren, sollte der Bezugspunkt für Standards bei Fruchtbarkeitsuntersuchungen nicht auf Durchschnittswerten der Normalbevölkerung basieren. Er sollte vielmehr den minimalen Werten der Analyseparameter entsprechen, die erforderlich sind, um noch eine Chance auf Empfängnis zu gewährleisten (MENKVELD et al. 2001). Diese Werte werden viel geringer sein, als die Werte für die Normalbevölkerung mit bestätigter Fertilität – wie bereits von MacLEOD (1950) gezeigt wurde. Es wurden überarbeitete Werte für die Spermienbeurteilung definiert, um eine bessere Diagnose und Prognose für Männer zu erstellen, die nach Hilfe für ihr Fertilitätsproblem suchen. Deshalb ist es einleuchtend, dass auch die WHO-Kriterien für die Samenanalyse erneut beurteilt werden sollten (MENKVELD und KRUGER 1996; OMBELET et al. 1997). Die Referenzwerte, die von der WHO vorgeschlagen werden, bieten keine deutlichen Grenzen, um fertile von infertilen Männern zu unterscheiden (NALLELLA et al. 2006). Da es keine standardisierten Normalwerte gibt, besteht das Risiko, Personen mit normalen Spermienwerten als Patienten mit abweichenden Parametern zu klassifizieren

(GUZICK et al. 2001). In der neusten Ausgabe der WHO-Kriterien zur Beurteilung der Ejakulatqualität (WHO 1999) wurde auf die Definition eines unteren Grenzwertes für die Spermienmorphologie verzichtet, da man sich außer Stande sah, einen solchen Grenzwert zu definieren. Auch dies lässt erkennen, dass sich aus den klassischen Ejakulatparametern nicht automatisch auch der tatsächliche Fertilitätsstatus des Mannes ableiten lässt (HANCKE et al. 2006).

2.1.2. Ursachen der Unfruchtbarkeit der Frau

Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Ursachen der weiblichen Unfruchtbarkeit tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 2: Ursachen der Sterilität der Frau

Hormonelle Störungen	<ul style="list-style-type: none"> - Hypophysenstörung - verfrühte Menopause (premature ovarian failure). - Polyzystische Ovarien - Insulinresistenz - erhöhte Androgene - AGS (= adrenogenitales Syndrom) - Lutealinsuffizienz - erhöhtes Prolaktin - Hypothyreose
Organische Störungen	<ul style="list-style-type: none"> - Tubenpathologien - Myome - Endometriose - Zysten - Uterusfehlbildungen
Infektionen	<ul style="list-style-type: none"> - Chlamydien - Gonorrhoe - Pilze

Die akute oder chronische Infektion des Uterus, der Tuben, der Ovarien oder des umgebenden Gewebes (PID = pelvic inflammatory disease) durch Keime, die besonders beim Geschlechtsverkehr eindringen, ist die häufigste Ursache für tubare Subfertilität

(KHALAF 2003). Das Ausmaß der Subfertilität hängt dabei von der Anzahl und Schwere der durchlebten Erkrankungen ab (COLLINS et al. 1983). Heutzutage werden durch den Keim Chlamydia trachomatis die am häufigsten vorkommenden Geschlechtskrankheiten in den Industrieländern verursacht. Bei der Mehrzahl der weiblichen Patienten verlaufen die Infektionen asymptomatisch, können aber eventuell die Tubenfunktion beeinträchtigen und das Risiko einer tubaren Subfertilität erhöhen (GIJSEN et al. 2001). Die Keime können bei der Frau eine Urethritis, Zervizitis, Endometritis oder Salpingitis verursachen, die zu Adhäsionen im Bereich der Eileiter führen können. Diese Adhäsionen können Subfertilität, ektope/extrauterine Schwangerschaften und chronische Schmerzen bedingen. Die Gonorrhoe tritt besonders bei jungen Frauen in niedrigen sozialen Schichten und bei Menschen mit häufigem Wechsel des Sexualpartners auf. Infektionen mit Chlamydien treten in 30 - 50 Prozent zusammen mit den Gonokokken-Infektionen auf (KHALAF 2003). Eine weitere Ursache – die Endometriose – lässt sich bei 20 - 40 Prozent der Frauen nachweisen, welche über Subfertilität klagen, obwohl auch fünf Prozent der fertilen Frauen an Endometriose leiden. Sie ist charakterisiert durch Auftreten und Wachstum von Endometriumgewebe außerhalb des Uterus und ist häufig auch mit Symptomen wie Dysmenorrhoe, Dyspareunie, abdominellen Schmerzen verbunden. Die Diagnose wird üblicherweise durch eine diagnostische Laparoskopie bestätigt. Fibromyome (Leiomyome) sind gutartige Tumore des Myometriums, welche bei bis zu 30 Prozent der Frauen auftreten. Nur selten werden sie von den Patientinnen bemerkt, weil diese eine Geschwulst spüren; viel häufiger treten sie durch Menorrhagien oder Subfertilität in Erscheinung. Myome verringern wahrscheinlich die Chance der Embryoeinnistung, wenn sie intrakavitär wachsen (HART 2003). Es wird geschätzt, dass sie in bis zu zehn Prozent der Fälle eine nachteilige Wirkung auf die Fruchtbarkeit haben. Sie sind auch assoziiert mit einem erhöhten Fehlgeburtsrisiko bei schwangeren Frauen und halbieren die Rate der Lebendgeburten in In-Vitro-Fertilisations-Zyklen (HART et al. 2001). Eine weitere Schwierigkeit stellt das PCO-Syndrom dar (**P**oly**C**ystic**O**vary), welches erstmals durch STEIN und LEVENTHAL (1935) beschrieben wurde und 4 - 12 Prozent der Frauen im gebärfähigen Alter betrifft (KNOCHENHAUER et al. 1998). Zur Definition des PCO-Syndroms gehören das Vorhandensein von Hyperandrogenismus (klinisch und/oder biochemisch) und/oder chronische Anovulation ohne Nachweis einer spezifischen Krankheit der Nebenniere und/oder der Epiphyse (DUNAIF und THOMAS 2001). Das Syndrom der polycystischen Ovarien begründet 75 Prozent der anovulatorischen Infertilität. Außerdem beträgt das Fehlgeburtsrisiko, falls eine Schwangerschaft eintritt, im ersten Drittel 30 - 50 Prozent (HOMBURG et al. 1988). Es gibt vier Bereiche, die bei der Therapie des

PCO-Syndroms zu berücksichtigen sind: die Regulation der Menstruation, die Kontrolle des Hirsutismus, das Problem der Infertilität und das Management des Insulinresistenz-Syndroms und den assoziierten Problemen wie Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie und koronare Herzkrankheit (SHEEHAN 2004). Stammbetonte Fettleibigkeit wird als eine Schlüsselkomponente für das Auftreten von Insulinresistenz angesehen. Diese Komponente ist jedoch nicht notwendig, um die Diagnose PCO zu stellen, da nur 35 - 50 Prozent der Betroffenen fettleibig sind (KNOCHENHAUER et al. 1998).

2.1.3. Ursachen der Unfruchtbarkeit des Mannes

Im Falle einer andrologischen Infertilität, die meist mit einer Einschränkung der Ejakulatparameter einhergeht, bleibt in circa 30 Prozent aller Fälle – trotz umfassender Diagnostik – die Ursache der Infertilität unklar und man spricht von der so genannten „idiopathischen Infertilität“ (KAMISCHKE et al. 1998). Im Folgenden sollen die physiologische Spermatogenese und des weiteren die wichtigsten Spermatogenesestörungen ausführlich beschrieben werden.

2.1.3.1. Physiologische Spermatogenese

Die Produktion von Spermien beginnt bei Männern erst in der Pubertät, wenn das Testosteron beginnt, seine Wirkung auf die gesamte männliche Entwicklung und das Wachstum auszuüben. Die Spermatogenese wird durch die Testosteronproduktion in den Leydigzellen gesteuert. Unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH), die beide von der vorderen Hypophyse freigesetzt werden, beginnt der Hoden, Spermien in einem vierstufigen Entwicklungsprozess zu produzieren: Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, Spermatozoen. Dieser Zyklus benötigt rund 74 Tage und beinhaltet bereits die 12 Tage der endgültigen Reifung, in denen das Spermium den Nebenhoden durchwandert (SIGMAN, LIPSHULTZ und HOWARDS 1997). Die Dauer dieses Zyklus ist wichtig, da jede Änderung, die einem medikamentösen oder chirurgischen Eingriff folgt, in der Samenanalyse für mindestens drei Monate nicht widerspiegelt wird. Der Prozess ist durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus geregelt, wobei Testosteron als erste Komponente die LH- und FSH-Sekretion verlangsamt. Inhibin, das während der Spermatogenese freigesetzt wird, hemmt spezifisch die FSH-Aktivität. Dieses Rückkopplungssystem kann durch exogen zugeführtes Testosteron oder

Medikamente wie LH-Releasing-Hormon-Antagonisten beeinflusst werden, die beide die körpereigene Testosteronproduktion und somit die Spermatogenese stoppen (QUALLICH 2006).

Spermatogenese

Die Spermatogenese (Abb. 1 und 2) erfolgt unter Einfluss von FSH und Testosteron in den Tubuli seminiferi des Hodens. Ausreifende Keimzellen gelangen immer weiter lumenwärts, wobei sie folgende Stadien durchlaufen: A-Spermatogonie, B-Spermatogonie, primäre Spermatozyte (Spermatozyte 1. Ordnung), sekundäre Spermatozyte (Spermatozyte 2. Ordnung). Die Stammzellen der Spermatogenese (Spermatogonien) teilen sich zunächst in Spermatozyten 1. Ordnung. Nach der ersten Reifeteilung (Äquationsteilung) gehen aus diesen Spermatozyten 2. Ordnung hervor. Diese Entwicklung nennt man Spermatozytogenese. Im zweiten Abschnitt der Spermatogenese, der so genannte Spermio-genese, erfolgt die Differenzierung. In der zweiten Reifeteilung (Reduktionsteilung) werden Spermatozyten 2. Ordnung über die Spermotide zum Spermium (Spermatozoon).

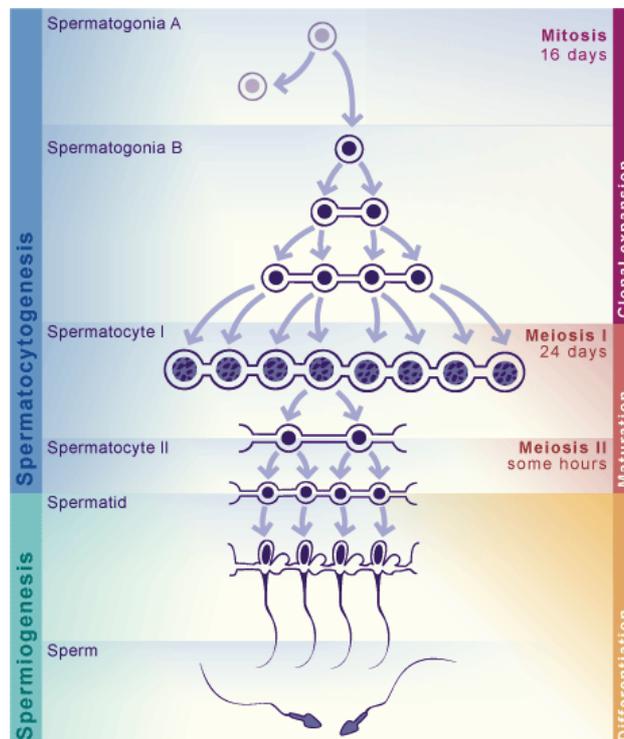


Abbildung 1: Spermatogenesestadien

(<http://www.embryology.ch/allemand/cgametogen/spermato03.html>)

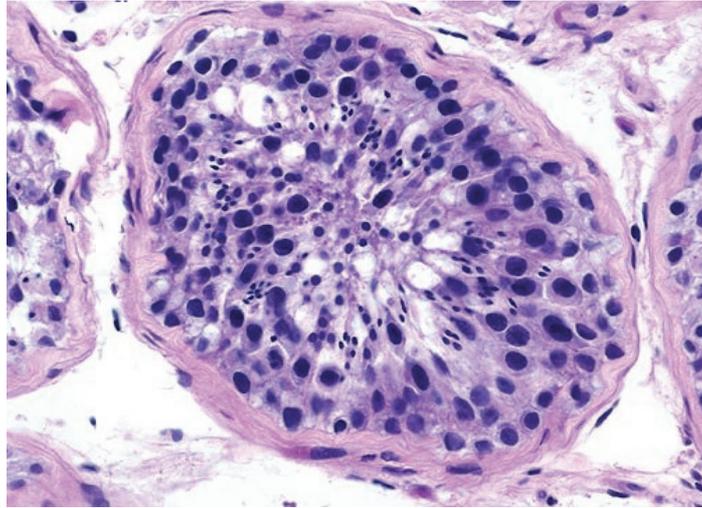


Abbildung 2: Ausreifung der Keimzellen zum Lumen hin

(<http://www.webpathology.com/image.asp?case=27&n=2>)

2.1.3.2. Spermatogenetische Störungen

Beschreibung von Ejakulatbefunden entsprechend WHO-Richtlinien:

Normozoospermie: regelrechte Spermiedichte, Spermienmorphologie und Spermienmotilität

Oligozoospermie: < 20 Mio. Spermatozoen/ml

Asthenozoospermie: < 40 % Spermatozoen mit progressiver Motilität (WHO a+b)

oder < 25 % Spermatozoen mit linear progressiver Motilität (WHO a)

Teratozoospermie: < 15 % Spermatozoen mit normaler Morphologie

Oligoasthenoteratozoospermie (OAT-Syndrom): Kombination der drei o.g. Pathologien

Azoospermie: keine Spermatozoen im Ejakulat

Aspermie: kein Ejakulat

Spermatogenesestörungen, die mit Subfertilität einhergehen, können viele verschiedene Ursachen haben. Die allgemeine Anamnese sollte die Frage nach Kontakten mit Umweltbelastungen vor allem im Beruf oder bei Hobbys beinhalten. Dazu gehören exzessive Hitze, Strahlung, Schwermetalle, glycolische Äther oder andere organische Lösungsmittel. Kürzlich aufgetretene systemische Erkrankungen, insbesondere wenn sie mit Fieber oder Gewichtsveränderungen einhergehen, sollten ebenso wie Beschwerden, welche die Geschlechtsorgane betreffen, erfragt werden (QUALLICH 2006). Diabetes, COPD, Schlafapnoe-Syndrom, Niereninsuffizienz, Hämochromatose und Leberfunktionsstörungen

sind bekannt dafür, dass sie möglicherweise männliche Subfertilität mitverursachen (BURROWS, SCHREPFERMAN und LIPSHULTZ 2002).

Auch durchgeführte Operationen im Genitalbereich können die Fertilität beeinflussen, dazu gehören verschiedene chirurgische Eingriffe wie u.a. die Orchidopexie, operierte inguinale Hernien, korrigierte Hypo- oder Epispadien, Prostata- und Blasenoperationen oder Eingriffe am Hoden. Insbesondere sollte auch spezifisch gefragt werden, ob in der Vorgeschichte eine Vasektomie vorgenommen wurde, da diese mit obstruktiver Azoospermie einhergehen kann (QUALLICH 2006). Manche Antibiotika können zu einer zeitweisen Verschlechterung der Spermienqualität beitragen. Für Calciumkanalblocker und Spironolacton wurde ein negativer Einfluss auf die Spermatogenese nachgewiesen, welcher die Fähigkeit zur Befruchtung herabsetzt (BRUGH, MATSCHKE und LIPSHULTZ 2003). Rauchen, exzessiver Alkoholenuss und Marihuanakonsum sind als Gonadotoxine bekannt (BURROWS, SCHREPFERMAN und LIPSHULTZ 2002). Rauchen kann zu Veränderungen in der Spermienproduktion, -morphologie und -motilität führen, wohingegen chronischer Alkoholmissbrauch zu Feminisierung, erektiler Dysfunktion und Hypogonadismus beiträgt. Marihuana kann nachhaltig die Spermamorphologie negativ beeinflussen (NUDELL, MONOSKI und LIPSHULTZ 2002). Auch einige Hobbys wie das Radfahren über lange Strecken können Druck auf die Perianalregion ausüben und in einer Beeinträchtigung der erektilen Funktion münden. Veränderungen im endokrinen Bereich, welche das Gesamttestosteron, freies Testosteron, LH, FSH und den Prolaktinspiegel umfassen, sowie der veränderte Estradiolwert bei Patienten mit hohem BMI, können auch zu Oligospermie führen (QUALLICH 2006).

Zu den potentiell reversiblen Ursachen einer männlichen Subfertilität gehört die Varikozele, eine Erweiterung der Venen des Plexus pampiniformis im Hodensack, wobei der genaue Mechanismus, durch den die Samenanalyse beeinflusst wird, unklar ist. Es werden die Temperaturerhöhung, der Venenstau oder Veränderungen der testikulären Hormone diskutiert. Die operative Behandlung einer Varikozele kann die Fruchtbarkeit bewahren und verhindern, dass es zur Verschlechterung der Spermaqualität kommt (CHEHVAL und PURCELL 1992). Fettleibigkeit kann zur Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol im Fettgewebe führen, wodurch weniger Testosteron für wichtige Funktionen übrig bleibt. Dies kann zur Reduzierung der Spermienproduktion führen, da die Hoden kein hormonelles Signal mehr zur Produktion erhalten (QUALLICH 2006). Ein weiterer Grund für die Subfertilität bei Männern kann die Chemotherapie sein, wobei die Chancen für eine sich wieder normalisierende Spermatogenese vom jeweiligen Medikament abhängen. Die Schäden

betreffen direkt das Keimepithel und die Sertolizellen, welche die Spermatogenese unterstützen. Die stärksten Gonadotoxine sind Alkylantien, Antimetabolite und Vincaalkaloide. Andere Substanzen wie Methotrexat, Cisplatin und 6-Mercaptopurine bieten eine bessere Chance auf das Wiedereintreten der Spermaproduktion nach einer Chemotherapie (NUDELL, MONOSKI und LIPSHULTZ 2002).

Bei Männern mit Klinefelter-Syndrom sind ein oder mehrere zusätzliche X-Chromosome zu finden. Ihr Genotyp ist XXY oder seltener XXXY bzw. XXXXY. Diese Veränderung führt zu einer weiblichen Körperform, Brustvergrößerung und wenig Körperbehaarung. Außerdem sind kleine Geschlechtsorgane und Infertilität typisch. Manche Männer mit Subfertilität besitzen auch Antikörper gegen die eigenen Spermien, deren Präsenz die Befruchtungsfähigkeit des Spermiums verhindert. Die Ursache für die Bildung solcher Antikörper ist unklar, diskutiert werden die Vasektomie, Verletzungen oder Infektionen des Hodens oder Hodenkrebs; die Antikörper können aber auch idiopathisch auftreten (QUALLICH 2006).

2.2. Methoden der assistierten Reproduktion

Tabelle 3: Methoden der assistierten Reproduktion

Hormonstimulation und Insemination	Durch Hormonstimulation wird bei der Frau ein Eisprung ausgelöst und das aufbereitete Spermia des Mannes in einer Kappe vor die Portio der Frau gelegt oder direkt in den Portiokanal, den Uterus oder die Tuben eingebracht.
IVF In-Vitro-Fertilisation	Aus dem Ovar werden reife Eizellen entnommen und außerhalb des Körpers mit dem aufbereiteten Spermia des Mannes zusammengebracht. Erfolgt eine Befruchtung und Zellteilung werden maximal drei Eizellen zurück in den Uterus der Frau transferiert.
ICSI Intracytoplasmatische Spermieninjektion	Reife Eizellen werden nach Hormonstimulation aus dem Ovar entnommen. Ein Spermium wird dann mit einer Injektionspipette in die Eizelle injiziert. Nach der Zellteilung werden maximal drei Eizellen in den Uterus zurückgegeben.

2.2.1. IUI

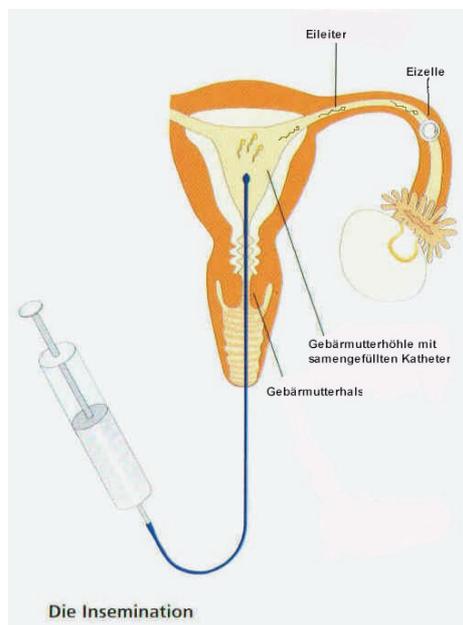


Abbildung 3: Einbringen von Spermien intrauterin

(www.villarsgyn.ch/sterilit2.htm)

Die intrauterine Insemination (IUI, Abb. 3) ist eine gängige Methode zur Behandlung von männlich bedingter Infertilität. Sie lässt sich einfacher durchführen und ist weniger invasiv

und kostspielig als andere Verfahren der assistierten Reproduktionsmedizin wie In-Vitro-Fertilisation (IVF) und Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (PETERSON et al. 1994; COMHAIRE et al. 1995; CROSIGNANI et al. 1994). IUI ist ein Vorgehen, bei dem Spermien möglichst zum Zeitpunkt des Eisprungs über einen Katheter direkt in die Gebärmutterhöhle transferiert werden (CHAFFKIN et al. 1991). Diese Methode wird bei Paaren angewendet, die eine Vielzahl von Ursachen für eine Subfertilität aufweisen, wie z.B. geringe Anzahl und Beweglichkeit von Spermien oder Unverträglichkeit zwischen dem Spermium und dem Zervikalschleim (FRANCAVILLA et al. 1990; GUZICK et al. 1998). Die Erfolgsquote für eine Schwangerschaft nach IUI beträgt 3 - 6 Prozent pro Behandlungszyklus, ist aber abhängig von der Art und Schwere der Unfruchtbarkeit. Die Stimulation der Ovarien zur Gewinnung mehrerer Eizellen erhöht die Schwangerschaftsraten auf 9 - 20 Prozent (MEHRAFZA et al. 2003). Kontrollierte Hyperstimulation der Ovarien zusammen mit der IUI ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Behandlung der Subfertilität, besonders bei Paaren mit ungeklärter Unfruchtbarkeit, Infertilität ausgehend vom Mann oder leicht ausgeprägter Endometriose bei der Frau (CHAFFKIN et al. 1991; BRZECHFFA et al. 1998). Ein zu kurzes oder zu langes Abstinenzintervall spielt eine wesentliche Rolle für den Erfolg der IUI, da es eine negative Wirkung auf die Spermienqualität hat und die Schwangerschaftsrate beeinflusst. Idealerweise sollte bei IUI-Behandlung die Zeit zwischen zwei Ejakulationen drei Tage nicht überschreiten (MEHRAFZA et al. 2003; JUREMA et al. 2005). Die Anzahl der Spermien spielt für den Erfolg einer IUI auch eine Rolle: Die Möglichkeit einer Schwangerschaft steigt dabei mit zunehmender Anzahl an vorhandenen Spermien (HAMMADEH et al. 2005).

2.2.2. IVF

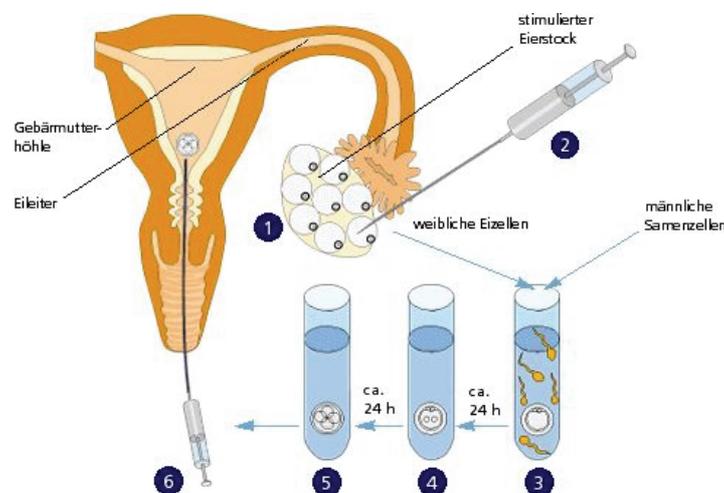


Abbildung 4: IVF (In-Vitro-Fertilisation)

(<http://www.frauenklinik-salzburg.at/ivf/ivf.htm>)

In-Vitro-Fertilisation (lat. „Befruchtung im Glas“)

Die Bezeichnung „im Glas“ (in vitro) ist historisch bedingt. Die ersten Befruchtungsversuche fanden noch in gläsernen Teströhrchen statt (daher auch engl. „test tube baby“).

Das Verfahren (Abb. 4): Dem Ovar der Frau werden mehrere Eizellen entnommen und in einer Petrischale mit männlichem Spermia vermischt. Einen Tag später haben die befruchteten Eizellen das Vorkernstadium (Pronuclei) erreicht. Nach weiteren 24 Stunden teilt sich der so entstandene Embryo und wird an diesem oder dem folgenden Tag in den Uterus der Frau transferiert. Die IVF bildet die Grundlage der ICSI.

Die Methode wurde erstmals erfolgreich von den Briten STEPTOE und EDWARDS (1978) praktiziert. Louise Brown kam 1978 als erstes Retortenbaby (Retorte = Laborgefäß) auf die Welt. Seitdem wurden weltweit circa 4,5 Millionen Kinder mit Hilfe des In-Vitro-Fertilisation-Verfahrens geboren (Stand: 2010). Die ICSI wurde in Deutschland im Jahr 1981 das erste Mal von Frauenarzt und Reproduktionsmediziner Prof. Dr. Siegfried Trotnow in Erlangen erfolgreich eingesetzt. Dort kam am 16. April 1982 das erste deutsche Retortenbaby in der Universitätsklinik zur Welt. Es wurden in Deutschland bislang circa 100.000 Kinder mithilfe der assistierten Reproduktionsmedizin „gezeugt“ und fast jedes 80. Kind, das in Deutschland geboren wird, ist auf diese Weise entstanden (Stand: 2007). Die Erfolgsquote der In-Vitro-Fertilisation liegt bei bis zu 40 Prozent.

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird die Methode als „Künstliche Befruchtung“ bezeichnet. Dies ist allerdings nicht ganz richtig, da die eigentliche Befruchtung zwischen Spermium und Eizelle genauso abläuft wie bei einer Spontanschwangerschaft im Eileiter. Nur der Ort ist künstlich.

In Gesetzen sind verschiedene Aspekte dieser Therapie geregelt. Dazu gehören das Embryonenschutzgesetz und die Richtlinien der Bundesärztekammer, welche sich auf das Sozialgesetzbuch V beziehen und die Voraussetzungen auf ärztlicher Seite sowie die Kostenübernahme durch die Krankenkassen regeln. Als Arzt muss man eine spezielle Zulassung für die Behandlungsmaßnahmen der IVF vorweisen, seit 1998 ist eine Zusatzausbildung mit der Bezeichnung „Arzt für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie“ vorgeschrieben.

Das Paar, welches sich für diese Methode entscheidet, muss folgende Voraussetzungen erfüllen:

- es muss verheiratet sein;
- Eizellen und Spermien dürfen nur dem behandelten Paar zur Verfügung stehen;

- ein Aufklärungsgespräch über medizinische, psychische und soziale Aspekte der IVF-Behandlung muss durch einen unabhängigen Arzt erfolgt sein;
- Durchführung der Behandlung durch ermächtigte Ärzte oder unter deren Aufsicht;
- möglichst ambulante Durchführung des Eingriffes;
- negativer HIV-Status beider Partner;
- Rötelnimmunität der Frau;
- die Frau muss jünger als 40 Jahre, der Mann darf nicht älter als 50 Jahre sein und beide müssen das 25. Lebensjahr vollendet haben.

Konventionelle IVF wird in Fällen von Tubenerkrankungen, Anovulation, ungeklärter Infertilität oder bei vorherigem Versagen anderer Methoden durchgeführt. Die Spermienkonzentration bei der Insemination liegt normalerweise bei 50.000 motilen Spermien pro Eizelle, es existieren aber auch Berichte über die Verwendung höherer Spermienkonzentrationen in ausgewählten Patientengruppen, um die Anwendung von ICSI zu vermeiden (KASTROP et al. 1999; FISHEL et al. 2000). Im Vergleich zur ICSI bewahrt IVF die natürliche Auswahl des Spermiums, das während der Penetration der „Eizelhüllen“ an der Eizell-Spermium-Schnittstelle interagiert (BOLARINDE et al. 2001).

IVF ist eine gut etablierte Behandlung für verschiedene Arten der Infertilität geworden, einschließlich einer seit langer Zeit bestehenden Infertilität, infolge von Eileitererkrankungen, Endometriose, ungeklärter Infertilität oder männlicher Infertilität. Bald wurde aber klar, dass manchen Paaren mit schwerer Infertilität von Seiten des Mannes nicht mit konventioneller IVF geholfen werden kann. Eine extrem geringe Anzahl von Spermien, eine beeinträchtigte Spermienmotilität und/oder eine abnormale Morphologie stellen die Hauptursachen für das Versagen der IVF dar (DE VOS 2000).

2.2.3. ICSI

Die Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI, Abb. 5) ist eine Zusatzmaßnahme im Rahmen der IVF bei schlechter Samenqualität mit geringer Spermienanzahl und schlechter Spermienmotilität. Eine weitere Indikation ist die Azoospermie, bei der die Spermien durch MESA oder TESE gewonnen werden müssen (siehe 2.2.4.). Die Befruchtung wird mit Hilfe spezieller Mikromanipulatoren durchgeführt. Die Eizelle wird unter dem Mikroskop mit einer Glaskanüle fixiert. Nun wird ein einziges Spermium in eine dünne Injektionspipette

aufgezogen und direkt in die Eizelle injiziert. Die ICSI, auch Mikroinjektion genannt, ist – im Gegensatz zur IVF – in der Tat eine künstliche Befruchtung.

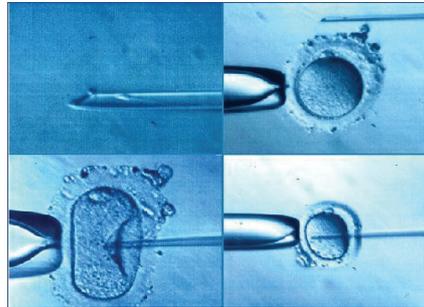


Abbildung 5: Vorgang der ICSI (Intracytoplasmatische Spermieninjektion)

(<http://www.sterilitaet.at/typo3/index.php?id=616>)

Sie stellt also die Injektion eines einzelnen Spermiums direkt in das Plasma der Eizelle dar, bei der sowohl Zona pellucida als auch die Plasmamembran der Eizelle durchdrungen werden (DE VOS 2000).

Seit ihrer Einführung 1992, hat die intracytoplasmatische Spermieninjektion die assistierten Reproduktionstechniken revolutioniert und ist zu einer populären Befruchtungsmethode geworden (SCHWARZER et al. 2003). ICSI mit Spermien aus dem Ejakulat von Männern mit verminderter Samenqualität erzielt eine Erfolgsrate von bis zu 39 Prozent pro Zyklus (PALERMO et al. 2000). Die ICSI-Therapie hat die Behandlung männlicher Infertilität entscheidend verändert, denn sie ist nicht nur bei schwerer Oligozoospermie effektiv, sondern auch bei Azoospermie. In Fällen von nicht rekonstruierbarer Obstruktion der Samenwege können die Spermien vom Nebenhoden (mittels MESA) oder Hoden (mittels TESE) gewonnen und zur ICSI verwendet werden (SCHWARZER et al. 2003).

Die Indikation zur Durchführung der ICSI war früher die Infertilität des Mannes. Mittlerweile gehören das Befruchtungsversagen nach konventioneller IVF, die ejakulatorische Dysfunktion, die immunologische Infertilität und die Behandlung von Krebspatienten mit Chemo- oder Radiotherapie dazu (KASTROP et al. 1999; FISHEL et al. 2000; NAYSMITH et al. 1998; HORNE et al. 2001).

Eine erfolgreiche ICSI hängt von der ovariellen Stimulation ab, die im Wesentlichen derjenigen der konventionellen IVF-Therapie ähnelt. Die Kombination aus GnRH-Agonisten, humanem menopausalen Gonadotropin (HMG) und humanem Choriongonadotropin (HCG) bewirkt das Entstehen von Eizellkomplexen, das HCG induziert die Ovulation. Bei der konventionellen IVF sind die Eizellen befruchtet worden, während sie sich in einem solchen

Komplex befanden. Vor der Befruchtung durch Mikromanipulation werden die Eizellen von dem umgebenden Kumulus und den Hofzellen (Corona cells) befreit, was sowohl die präzise Injektion in die Eizelle, als auch eine Beurteilung ihrer Reife erlaubt. Der Kumulus und die umgebenden Hofzellen werden mit einer Kombination aus enzymatischen und mechanischen Verfahren entfernt. Freiliegende Eizellen können unter dem Auflichtmikroskop (200fache Vergrößerung) angesehen werden, um die Kernreife zu bestimmen. Die Beurteilungen umfassen auch die Zona pellucida, die Eizelle an sich und das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Keimbläschens oder eines ersten Polkörperchens. Da physiologischerweise nur Eizellen der Metaphase II befruchtet werden können, wird ICSI ausschließlich an solchen Eizellen durchgeführt (DE VOS 2000).

Vorteile der ICSI-Therapie im Vergleich zur IVF:

- Verbesserung der Fertilisationsrate im Vergleich zur Standard-IVF (Erfolgsrate 10 - 40 %)
- bei Optimierung der Technik wird eine Fertilisationsrate von 60 - 70 % pro Zyklus erreicht
- in Fällen von schwerem OAT-Syndrom (Oligoasthenoteratozoospermie) effizienter als IVF
- Erfolg versprechender Einsatz von ICSI in Kombination mit aus Hoden oder Nebenhoden gewonnenen Spermatozoen

Mögliche Ursachen ausbleibender Fertilisation nach ICSI:

- Mikroinjektion in eine Eizelle von ungenügender Reife
- nur immobiles Sperma stand zur Injektion zur Verfügung
- fehl- oder missgebildete Eizellen
- Eizellen wurden beim Injektionsvorgang beschädigt

Die Spermien, welche durch epididymale Aspiration gewonnen wurden und vermutlich weniger reif waren, sowie solche, die während ihrer Gewinnung schlechten Bedingungen durch Elektroejakulation ausgesetzt waren oder die nach Kryokonservierung verwendet wurden, führen im Vergleich zu Spermien, welche durch Masturbation gewonnen wurden, zu einem gleichwertigen Ergebnis bei der ICSI-Therapie (PALERMO et al. 1995).

Das Ergebnis der Schwangerschaftsrate nach ICSI ist demjenigen nach IVF ähnlich. Es tritt keine bedeutendere Fehlgeburtsrate, Totgeburtensziffer oder perinatale Todesrate unter den

Schwangerschaften nach ICSI auf. Die Gesundheit der ICSI-Kinder und die Rate der bedeutenden Missbildungen sind vergleichbar mit denen von IVF-Kindern. Die Spermienqualität oder der Spermienursprung scheinen keine Rolle für das Ergebnis bei ICSI zu spielen (BONDUELLE et al. 2002). Die Kryokonservierung von Embryos, die nach Befruchtung durch ICSI-Technik entstanden, beeinträchtigt die Entwicklung des Embryos nicht, was bei den durch IVF entstandenen Embryos der Fall ist. Dennoch gibt es trotz der signifikant höheren Überlebensrate von eingefrorenen und wieder aufgetauten ICSI-Embryos bei den Schwangerschaftsraten pro Zyklus bei IVF- und ICSI-Gruppen keinen Unterschied (EMILIANI et al. 1999).

2.2.4. MESA/TESE

Eine Azoospermie bedeutet, dass im Ejakulat keine Spermien nachzuweisen sind. Man unterscheidet eine obstruktive und eine nicht-obstruktive Azoospermie. Bei der obstruktiven Form findet man zum einen eine normale Spermatogenese, normal große Hoden, ausreichend FSH im Serum und eine regelrechte Ausprägung des männlichen Phänotyps. Bei beidseits nicht tastbarem Vas deferens wird ein angeborenes Fehlen diagnostiziert, was chirurgisch nicht zu beheben ist und bei zwei Drittel der Fälle mit einer Mutation im CF-Gen (Cystic Fibrosis-Gen) einhergeht. In diesem Fall ist ein Screening beider Partner erforderlich. Zum andern tritt die obstruktive Azoospermie in Zusammenhang nach einer Vasektomie auf oder wird durch epididymale Verschlüsse nach Chlamydieninfektion oder Gonorrhoe verursacht. Die nicht-obstruktive Form der Azoospermie kann durch Hodenhochstand (Kryptorchismus), Klinefelter-Syndrom (47, XXY) oder Deletionen des Y-Chromosoms nach Chemotherapie oder Bestrahlung verursacht sein. In vielen Fällen ist die nicht-obstruktive Azoospermie idiopathisch bedingt (HIRSH 2003).

Wird bei Masturbation des Mannes eine Azoospermie im Ejakulat nachgewiesen, existieren zwei weitere Methoden, befruchtungsfähige Spermien zu erhalten: MESA und TESE.

1. MESA (= microsurgical epididymal sperm aspiration)

Bei Verschluss des Samenleiters, der zur Azoospermie im Ejakulat führt, müssen die Spermien direkt aus dem Epididymis (Nebenhoden) gewonnen werden. Unter örtlicher Betäubung werden die Samenwege freigelegt und es werden mit einer feinen Kanüle darin enthaltene Spermien aspiriert.

Indikationen:

- kongenitales bilaterales Fehlen des Vas deferens
- nicht operable infektiöse obstruktive Azoospermie
- erfolglose Vasoepididymostomie bzw. Vasostomie
- retrograde Ejakulation
- erektile Dysfunktion nach Rückenmarksverletzung oder anderer Ursachen
- obstruktive Samenleiter oder Fehlen der Samenleiter
- Impotenz

Da die gewonnene Menge meist gering ausfällt, wird oftmals eine ICSI-Therapie notwendig, um eine Befruchtung der Eizelle zu gewährleisten.

2. TESE (= testicular sperm extraction)

Werden auch im Nebenhoden bei MESA keine Spermien gefunden, muss eine Hodenbiopsie, d.h. eine Entfernung von Hodengewebe, erfolgen. Durch bestimmte Substanzen lassen sich die darin enthaltenen Spermien isolieren. Diese sind häufig noch unreif, führen aber bei einer ICSI-Behandlung meist zur Befruchtung.

Indikationen:

- alle Indikationen für MESA
- Nekrozoospermie im Nebenhoden
- Spermiogenesestörung bis zur fokalen Spermiogenesehemmung (Sertoli-only-cell-syndrom)
- Hypospermatogenese
- Reifestörungen
- unreife Hoden
- ausgeprägte Narbenbildung im Nebenhoden

Ein großer Vorteil der MESA-ICSI-Technik ist die Möglichkeit zur Kryokonservierung der aus dem Nebenhoden gewonnenen Spermien, so dass nur ein Eingriff nötig ist, um die Spermien zu erhalten. Die eingefrorenen Spermien können dann nach dem Auftauen für viele IVF-ICSI-Zyklen verwendet werden (SILBER et al. 1995). Die Verletzung durch MESA ist gering, weil es ein minimal invasives, mikrochirurgisches Verfahren ist (SCHWARZER et al. 2003). Eine wichtige zusätzliche Feststellung ist, dass für die Durchführung einer ICSI die Vitalität und nicht die Motilität des Spermiums zählt. Die TESE stellt eine Methode dar, bei

der so genannte „frische“ Spermien für die ICSI erhalten werden können, wenn das Ejakulat absolut keine Spermienmotilität zeigt. Bei den meisten Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie, welche scheinbar keine Spermienproduktion haben, gibt es in Wirklichkeit einige wenige Bereiche im Hoden, in denen Spermien entstehen (SILBER et al. 1995). Seit der Einführung der ICSI sind beide Methoden, die TESE und die MESA erfolgreich eingesetzt worden, um Schwangerschaften zu ermöglichen. Bei Patienten, die aus diagnostischen Gründen noch keine gründliche medizinische Untersuchung oder nur eine unvollständige Untersuchung erhalten haben, ist MESA die bevorzugte Methode, weil eine vollständige skrotale Beurteilung durchgeführt, und wann immer nötig eine Vasoepididymostomie – also eine Verbindung zwischen dem Vas deferens und dem Nebenhoden – geschaffen werden kann.

Die operative Gewinnung von Spermien aus dem Hoden (mittels TESE) durch offene Biopsien mit nachfolgender Kryokonservierung und Wiederauftauen kann die Methode der Wahl bei histopathologisch gesichertem Vorhandensein von Spermien sein. Dabei ist es wichtig, wiederholte Operationen und sinnlose ovarielle Stimulation der Partnerin zu vermeiden (TOURNAYE 1999). Die TESE-ICSI-Methode ermöglicht es sogar bei Männern mit langbestehender Azoospermie und fehlender Spermienproduktion als Folge einer durchgeführten Chemotherapie Spermien zu akquirieren, welche zu Schwangerschaft und Geburt von gesunden Kindern führen können. Männer mit Azoospermie nach Chemotherapie sollten ohne weitere Untersuchung nicht länger als steril betrachtet werden (CHAN et al. 2001).

2.2.5. AH



Abbildung 6: AH (Assisted Hatching)

(http://www.brighamandwomens.org/reproductivemedicine/treatments/crm_IVF.aspx)

Der Erfolg der assistierten Reproduktion hängt vom komplizierten Zusammenspiel des übertragenen Embryos und des Endometriums der Gebärmutter ab (BALABAN et al. 2002).

Ein erfolgreiches Resultat in der assistierten Reproduktion ist immer von vielen Faktoren abhängig gewesen, einschließlich der Fähigkeit des Embryos aus seiner Zona pellucida zu schlüpfen (PLACHOT et al. 1992; COHEN et al. 1994). Ein verlängerter Aufenthalt des menschlichen Embryos in In-Vitro-Kultur kann zum Verlust der Elastizität der Zona pellucida führen und zu deren Erhärtung, was die Fähigkeit des Embryos zu schlüpfen beeinträchtigt (DROBNIS et al. 1988). Seit COHEN 1988 über die erste Schwangerschaft nach Assisted Hatching (= unterstütztes Ausschlüpfen, Abb. 6) berichtete, wurden einige Techniken entwickelt, die dem Embryo das Schlüpfen aus der Zona pellucida erleichtern sollten und auf eine verbesserte Schwangerschaftsrate abzielten (COHEN et al. 1988; AL-NUAIM und JENKINS 2002). Jedoch bleiben die Meinungen über das Assisted Hatching geteilt und der Sinn der Methode wird oft in Frage gestellt (LANZENDORF et al. 1998; EDI-OSAGIE et al. 2003). Assisted Hatching kann durch Zerreißen, Durchbohren oder Ausdünnen der Zona pellucida erreicht werden, wobei saure Lösungen, Proteinase, vibrierende Manipulatoren und Laser verwendet werden (AL-NUAIM und JENKINS 2002). Alles deutet darauf hin, dass es bezüglich der Ergebnisse bei Anwendung der unterschiedlichen Methoden keine Unterschiede gibt, wenn das Assisted Hatching bei einer Population mit schlechter Prognose angewendet wird (BALABAN et al. 2002).

2.2.6. PGD

Die Präimplantationsdiagnostik (engl. PGD = Preimplantation Genetic Diagnosis, Abb. 7) wird bei Patienten mit mehrfachem IVF-Versagen, fortgeschrittenem Alter der Mutter oder bei positiver Familienanamnese mit Vorkommen von chromosomalen Abnormitäten empfohlen. Um die Probe für die Untersuchung auf genetische Krankheiten vorzubereiten, wird die Hülle des Embryos eröffnet.



Abbildung 7: PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

(http://www.brighamandwomens.org/reproductivemedicine/treatments/crm_IVF.aspx)

Dies geschieht während des dritten Entwicklungstages, wenn der Embryo aus 8 - 10 Zellen besteht. Ein Blastomer, eine Zelle des Embryos, wird durch Aspiration mit einer Pipette entnommen.

PGD ist die Testung einer Zelle eines Embryos vor dem Transfer in den Uterus. Die biopsierten Zellen werden mittels einer Technik analysiert, die man FISH (Fluorescence In-Situ Hybridisation) nennt. Sie verwendet Sonden – kleine Teile der DNA – welche ein Ebenbild der Chromosomen sind, die man untersuchen will. Jede Sonde ist mit einem anderen fluoreszierenden Farbstoff versehen. Diese fluoreszierenden Sonden werden an die biopsierten Zellen gebracht und „heften“ sich an die Chromosome an. Unter einem Fluoreszenzmikroskop zählt man dann die Anzahl der verschieden farbigen Chromosomen dieser Zellen aus.

PGD ist ein Verfahren, welches dazu verwendet wird, spezifische genetische Störungen eines Embryos zu diagnostizieren. Paare mit überdurchschnittlichem Risiko für eine genetische Krankheit unterziehen sich einer IVF-Behandlung, bei der die entstehenden Embryos getestet werden. Nur die Embryos, die keine genetische Disposition für eine Erkrankung zeigen, werden in den Uterus implantiert (MEISTER et al. 2005). Über eine rechtskräftige PGD wurde zum ersten Mal 1989 berichtet und die Technik wurde erstmals in England durchgeführt, um das Geschlecht eines Embryos festzustellen. Grund für die Anwendung war eine Erkrankung, welche durch das X-Chromosom übertragen wird (HANDYSIDE et al. 1989). Die Idee hinter der PGD entstand schon zwei Jahrzehnte früher (EDWARDS 1965). PGD wird am häufigsten für das Screening auf Aneuploidie angewendet, um die Schwangerschaftsrate bei IVF zu verbessern (MUNNÉ et al. 1999; KATZ et al. 2002). PGD wird auch zum „social sexing“ angeboten und angewendet: das bedeutet Auswahl des Geschlechts eines Embryos ohne medizinische Indikation (MALPANI 2002; PENNINGS 2002). Die Kombination von PGD und HLA (Human Leucocyte Antigens)-Typisierung kann als Beispiel für neue medizinische Entwicklungen gesehen werden. Bei dieser sehr neuen therapeutischen Anwendung wird PGD nicht nur verwendet, um Paaren ein gesundes Kind zu gewähren, sondern auch um Nachkommen als potentielle Spender für Stammzellentransplantationen auszuwählen. Jedoch ist das Erzeugen eines Kindes mit der Funktion eines Spenders mit vielen ethischen, sozialen und psychologischen Problemen verbunden. In einigen Ländern – wie den USA, Indien, Spanien und Großbritannien – wird die PGD bereits regelmäßig praktiziert. Im Gegensatz dazu ist in Deutschland und Österreich der Einsatz der PGD nicht ausdrücklich geregelt (MEISTER et al. 2005).

2.3. Bedeutung der Kryokonservierungstechnik

Da viele Gewebe und Organe nach Entnahme nur eine begrenzte Dauer verwendbar und lebensfähig sind, ist es wichtig, sie über einen längeren Zeitraum in einem Zustand der Konservierung zu erhalten. Es gibt – unter den aktuell verfügbaren Möglichkeiten – in erster Linie die Kryokonservierung, d.h. ein Haltbarmachen durch Einfrieren, welche eine heute konventionell angewandte Methode in der assistierten Reproduktionsmedizin darstellt. Diese wird für Spermien, Eizellen, Embryonen, sowie Ovar- und Hodengewebe eingesetzt. Eine besondere Rolle spielt diese Möglichkeit im Bezug auf Tumorpatienten, deren Familienplanung noch nicht abgeschlossen ist. Chemotherapie und Bestrahlung bergen die Gefahr einer späteren Infertilität. Die Kryokonservierung von Zellen bzw. Gewebe bietet für Männer, die sich einer geplanten Chemotherapie oder Bestrahlung unterziehen müssen, eine mögliche Option in Fällen, in denen die normale Spermatogenese nach Beendigung der Therapie nicht wieder einsetzt.

Diese Patienten können Gewebe oder Zellen einfrieren lassen, die nach überstandener Krankheit aufgetaut werden und mit Hilfe der Methoden der assistierten Reproduktionsmedizin den Kinderwunsch erfüllen können.

2.4. Grundlagen des Einfrierens und Auftauens

2.4.1. Einfluss der Temperatur

Die Methoden der Kryokonservierung von Zellen erfordern die Verwendung von Techniken, die erforscht wurden, um intrazelluläre Eiskristallbildung zu verhindern oder zu verringern. Während des langsamen Frierprozesses, bei dem die Eiskristallbildung auf extrazelluläre Gebiete beschränkt ist, folgt das intrazelluläre Wasser dem osmotischen Gradienten nach außen, was die Bildung von Kristallen in der Zelle verhindert. Jedoch können die Zellen durch ihre Umgebung geschädigt werden, da dort die Konzentration der Kryoprotektiva durch den extrazellulären Frierprozess des Wassers ansteigt (siehe 2.4.2., solution effect) (McGANN 1978). Der entstandene osmotische Gradient zwischen der intrazellulären, isotonen Lösung und der konzentrierten, extrazellulären Umgebung ruft eine weitere Reaktion hervor: Je nachdem, ob die Gefriertrate „langsam“ oder „schnell“ ist, durchdringt das intrazelluläre Wasser die Zellmembran und verbindet sich mit der extrazellulären Eisphase oder gefriert und bildet Eiskristalle innerhalb der Zelle (THIRUMALA et al. 2003).

Die Zellen, bei denen intrazelluläre Kristallbildung – was zur Zerstörung der Membranintegrität führt (MAZUR 1970) – stattfindet, als auch solche Zellen, die einen zu starken intrazellulären Wasserverlust durchmachen, werden osmotisch inaktiv (LOVELOCK 1953). Intrazelluläre Eiskristallbildung, ebenso wie zu langes Verbleiben in hohen Konzentrationen an chemischen Stoffen, ist tödlich für die Zellen. Demnach können zu langsame oder zu schnelle Gefrierraten Zellen abtöten, was eine Optimierung der Gefriertrate erfordert (MAZUR et al. 1972). Ob eine beschriebene Gefriertrate zu langsam oder zu schnell ist, wird durch die Zellmembrandurchlässigkeit für Wasser und die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass jegliches zurückbleibendes, eingeschlossenes Wasser in der Zelle zu jeder gegebenen Minustemperatur zu Eis kristallisieren kann. Die Unterschiede in der Membrandurchlässigkeit für Wasser und die Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Eiskristallbildung ergeben verschiedene „optimale“ Gefrierraten für unterschiedliche Zelltypen (THIRUMALA et al. 2003).

Es existiert eine Differenz zwischen dem Temperaturbereich für die maximale Kristallbildung (-40 °C bis -80 °C) und der Temperaturspanne für die maximale Tendenz zur Bildung von so genannten „(Eiskristall-)Kernen“, die mit -80 °C bis -120 °C weit niedriger liegt (BEST 1990).

Das Hauptinteresse beim Abkühlen gilt dem maximalen Kernbildungsbereich, der nahe der Glasübergangstemperatur T_g (glass transition temperature, $\sim -130\text{ °C}$, siehe 2.4.2.) zunimmt. Die T_g ist die Temperatur, bei der die Mischung aus Kryoprotektiva und Wasser von einer viskösen Flüssigkeit zu einem glasähnlichen Feststoff erhärtet. Das ideale Ziel ist es, diese Temperatur möglichst schnell zu erreichen, ohne dass „Kerne“ gebildet werden. Falls „Kerne“ entstanden sind, verhindern das schnelle Abkühlen und die niedrige Temperatur ihr Wachstum und vermeiden auf diese Weise, dass die „Kerne“ für die Zelle schädlich werden. Große Kristalle verursachen den meisten Schaden, während kleine Kristalle nur wenig oder überhaupt keinen Schaden anrichten (BEST 1990).

Bei der Vitrifikation spielt der Vorgang der Wiedererwärmung eine große Rolle, da sich hier folgende Schwierigkeit ergibt: Nicht weit über der T_g (-130 °C) muss die Temperatur der maximalen Kernbildung (-80 °C bis -120 °C) wieder überwunden werden. Wenn die Temperatur weiter ansteigt wird der Bereich des maximalen Eiskristallwachstums (-40 °C bis -80 °C) erreicht. Die Entstehung und das Wachstum von Eiskristallen während der Wiedererwärmung einer vitrifizierten Lösung nennt man „Devitrifikation“. Die Tatsache, dass die Bildung und das Wachsen von Eiskristallen beim Wiedererwärmen viel ausgeprägter ist als beim Abkühlen wird als Devitrifikationsproblem bezeichnet (BEST 1990). Eine mögliche Behebung dieses Problems kann durch Wiedererwärmung mit extrem hohen Geschwindigkeiten erzielt werden. Die zweite Variante, die Devitrifikation zu vermeiden, erfolgt durch Einsatz von bestimmten Stoffen wie z.B. Polyvinyl-Alkohol. Der dritte Weg ist die Verwendung von kryoprotektiven Mischungen, deren Konzentrationen so hoch sind, dass niemals Eis entstehen kann (BEST 1990).

Während des Einfrierens mittels Vitrifikation und in Abhängigkeit von den dabei verwendeten Straws kann es während des Frierens zum direkten Kontakt der Vitrifikationslösung mit dem biologischen Objekt und dem flüssigen Stickstoff kommen. Durch Isolierung der vitrifizierten Proben – um den direkten Kontakt zum flüssigen Stickstoff zu vermeiden – wird die Gefrierate gesenkt, was wiederum die Effizienz des Vitrifikationsablaufs reduzieren kann (ISACHENKO et al. 2006).

2.4.2. Einfluss der kryoprotektiven Stoffe

In ungeschützten Zellen entstehen intrazelluläre Eiskristalle, wenn die Zellen ohne Zusatz von kryoprotektiven Stoffen schnell weit unter null Grad (bei -196 °C = Temperatur des flüssigen Stickstoffes) abgekühlt werden. Die Eiskristallbildung findet unkontrolliert statt und es

entstehen große Kristalle, welche die Zelle schädigen und zum Zelltod führen können. Die Verfahren des langsamen Frierens senken die Wahrscheinlichkeit dieses Geschehens, da extrazellulär gebildetes Eis das Wasser aus den Zellen zieht und somit sehr wenig Wasser in der Zelle verbleibt und nur kleine, für die Zelle nicht lebensbedrohliche Kristalle ausbildet. Diese Art der Dehydrierung der Zelle kann nur stattfinden, wenn Eis in der die Zelle umgebenden Lösung gebildet wird und nicht innerhalb der Zelle selbst. Dies wird erreicht, indem man die Temperaturen, bei denen sich innerhalb und außerhalb der Zelle Eiskristalle formen, unterschiedlich wählt. Die Zellen beinhalten mehr gelöste Stoffe und weniger Wasser als die physiologischen Lösungen, in denen sie leben. Eis neigt daher dazu, früher in physiologischen Lösungen zu entstehen als im Zytoplasma (SHAW und JONES 2003). Flüssigkeiten, die gelöste Stoffe enthalten und in gleichmäßiger Geschwindigkeit abgekühlt werden, können aber – wie pures Wasser – flüssig bleiben, auch wenn sie Temperaturen erreichen, bei denen Eis entstehen kann. Dieses Phänomen beschreibt den „supercooled state“ oder wird als „Supercooling“ bezeichnet. Die Bedeutung liegt darin, dass der Gefrierpunkt, der bei den meisten Medien zwischen -3 °C und -5 °C liegt, unterschritten wird und tiefere Temperaturen von ungefähr -12 °C erreicht werden, ohne dass eine Eisbildung einsetzt.

Um sicher zu gehen, dass extrazelluläres Eis immer über der Temperatur entsteht, bei der die Zelle intrazellulär kristallisieren kann und um somit das Supercooling zu vermeiden, wird in den meisten langsamen Frierverfahren das „Seeding“ angewendet, d.h. die Induzierung von Eiskristallen in der Lösung bei Temperaturen um -6 °C bis -9 °C . Das Seeding kann u.a. hervorgerufen werden, indem man den Rand der Lösung mit einem kalten Gegenstand berührt, z.B. einer -196 °C kalten Pinzette.

Gibt man Salze oder andere gelöste Teilchen ins Wasser setzt man damit die Temperatur herab, bei der Eiskristalle entstehen. Es gibt keine Grenze dafür, wie tief der Frier- oder Schmelzpunkt durch gelöste Teilchen gesetzt werden kann. Sehr hohe Teilchenkonzentrationen in der Lösung können somit dazu führen, dass nie Eis entsteht, sondern der Übergang in einen soliden, eisfreien (Glas-) Zustand stattfindet.

Die Bildung und das Wachstum von Eiskristallen kann durch kryoprotektive Stoffe beeinflusst werden (SHAW und JONES 2003).

Die Schmelztemperatur bzw. die Gefriertemperatur von Wasser wird durch die Zugabe von kryoprotektiven Stoffen gesenkt. Wenn genug Kryoprotektiva hinzugefügt werden, wird die Gefriertemperatur so niedrig, dass die T_g (siehe 2.4.1.) erreicht wird, die eher einen glasähnlichen Zustand der Lösung hervorruft als die Bildung von Eiskristallen (FAHY et al.

1984). Der Temperaturwert von T_g liegt – für die in der Kryobiologie verwendeten protektiven Stoffe – typischerweise um die -130 °C (BEST 1990).

Eine weitere Bedeutung der Kryoprotektiva liegt im „solution effect“. Der solution effect stellt eine Veränderung der Zusammensetzung der gelösten Stoffe in einer extrazellulären Lösung dar, die während des Frierprozesses entsteht. Dabei steigt die Konzentration der kryoprotektiven Stoffe außerhalb der Zelle durch den Frierprozess des Wassers in der Lösung an. Beim langsamen Frierprozess wird die Zelle dann durch den nicht gefrorenen Anteil der Lösung geschädigt, d.h. durch die Kryoprotektiva, die dann extrazellulär in erhöhter Konzentration vorliegen und die Zelle toxisch beeinflussen (MAZUR et al. 1972).

2.5. Verfahren der Kryokonservierung von Spermien

Die Spermien können manuell, halbautomatisch oder vollautomatisch kryokonserviert werden.

2.5.1. Einfrieren mit Stickstoffdampf

Das Stickstoffgas sammelt sich an der Oberfläche von flüssigem Stickstoff. Die einzufrierenden Proben werden tief in diese Gasphase eingebracht. Diese Art des Frierens geht wegen der höheren Temperaturen und der geringeren Wärmeübertragung von Stickstoffdampf mit einer weniger starken Gefriertrate einher als das direkte Einbringen in flüssigen Stickstoff. Die Wahrscheinlichkeit physikalischer Schäden wird so verringert. Das Abkühlen kann am besten tief in einer stabilen Schicht von Stickstoffdampf um die -130 °C stattfinden. Um einen solch stabilen kalten Zustand zu erreichen, muss der Spiegel des flüssigen Stickstoffs mindestens 15 cm unter dem Rand des Behälters liegen und für mehr als zehn Minuten so belassen werden, ohne durch Luftverwirbelungen beeinflusst zu werden.

2.5.2. Einfrieren mit computergesteuertem Einfriergerät

Man unterscheidet halbautomatische und vollautomatische Verfahren. Bei den halbautomatischen Geräten (z.B. Nicool LM-10, CFPO, Frankreich) wird in einem Behälter mittels Ventilator eine gleichmäßige Insufflation von Stickstoffdampf erzeugt, in dem die Ejakulatproben gefrieren, bevor sie dann zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Die vollautomatischen Geräte (z.B. Kryoplaner-Serie II, Messer-Griesheim, Krefeld) werden computergesteuert. Dabei werden kontrollierte, stufenweise Gefrierdaten erreicht. Nachteile sind die immensen Anschaffungskosten und der hohe Verbrauch an flüssigem Stickstoff. Der Auftauvorgang kann ebenfalls computergesteuert oder bei Zimmertemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C erfolgen.

Das computergesteuerte Einfrieren dient dem kontrollierten Abkühlen und Wiedererwärmen von Proben. Es gibt verschiedene Varianten:

- a) Abkühlen z.B. auf einer Plattformvorrichtung, wobei die Proben nach und nach in Stickstoffdampf herabgelassen werden;

- b) Steigungsgefriergeräte, welche die Proben schrittweise über eine immer kälter werdende Oberfläche bewegen;
- c) Kammerfriergeräte, bei denen bestimmte Mengen gasförmigen Stickstoffs in die Kammer eingebracht werden, in der sich die Proben befinden;
- d) unkontrollierte oder passive Gefriergeräte die z.B. in ein -80 °C kaltes Gefrierfach oder auf Trockeneis gebracht werden;
- e) Kammerfriergeräte, bei denen die Umgebung der Kammer auf -196 °C abgekühlt ist und die Probentemperatur durch kontrolliertes Wärmen der Kammerwand reguliert wird.

Die Geräte unterscheiden sich in Größe, Tragbarkeit, Haltbarkeit und Flexibilität.

Bei der vorliegenden Studie wurden die Kassetten mit den gefüllten Straws in ein computergesteuertes Einfriergerät gebracht, in dem die Temperatur durch Zufuhr von Stickstoff stufenweise von Raumtemperatur auf ungefähr -170 °C abgesenkt wurde (KRYOPLANER, siehe Kryoprotokoll Abb. 23). Der Vorgang dauerte circa 22 - 30 Minuten. Danach wurden die Kassetten in Köchern in flüssigem Stickstoff bis zum Auftauen aufbewahrt.

2.5.3. Einfrieren eines einzelnen Spermiums in Zona pellucida

Das Isolieren, Einfrieren und Wiederfinden eines einzelnen Spermiums nach dem Auftauen stellt sich als problematisch dar (SCHUSTER et al. 2003). Mit der ICSI ist es theoretisch möglich, dass nur ein einziges Spermium pro Eizelle benötigt wird, um eine Schwangerschaft zu erreichen (OHASHI et al. 2001). COHEN et al. (1997) berichten über einen Fortschritt in der Kryokonservierung von Spermien, welcher das Einfrieren und Wiederfinden eines einzelnen Spermiums ermöglicht. Sie beschreiben die erfolgreiche Kryokonservierung eines einzelnen Spermiums in der Zona pellucida einer Eizelle. Auch HSIEH et al. (2000) beschäftigten sich mit dieser Art der Kryokonservierung von Spermien. Das Problem, Spermien während der konventionellen Zugabe und der Wiederentfernung von relativ großen Mengen an kryoprotektiver Lösung zu verlieren, wird vollständig umgangen, wenn ein Spermium in eine umschlossene, poröse Kapsel gebracht wird, die mikroskopisch vor und nach der Kryokonservierung genau erkannt werden kann und gut zu bearbeiten ist. Als Medium für diesen Zweck wird die Zona pellucida gewählt, aus der man zunächst das Zellmaterial entfernt. Die Durchführbarkeit dieser Technik wird demonstriert, indem man

kleine Zellgruppen oder sogar einzelne Zellen in die ausgeräumte Zona pellucida von Nagetieren oder Menschen zur Kryokonservierung bringt und das Auffinden der Spermien durch erfolgreiche Befruchtung einer Eizelle abschätzt.

Die Gewinnung der leeren Zona pellucida erfolgt über mehrere Quellen. Es werden unreife menschliche Eizellen, Mäuseeizellen und gefrorene Hamstereizellen vor der Befruchtung verwendet oder auch Embryos mit abnormaler Entwicklung, die sich im Stadium nach Befruchtung befinden. Kombinierte Kryoprotektiva, die man im Allgemeinen zum Frieren von Spermien benötigt, z.B. Test-Yolk-Buffer, werden bei dieser Methode nicht angewendet, da die leere Zona pellucida auf viskösen Flüssigkeiten schwimmt.

Die Methode braucht keine Enzyme, Enzyminhibitoren oder Bewegungsverstärker. Die Zona pellucida ist ein ideales steriles Medium zur Aufbewahrung eines einzelnen Spermiums. Sie kann während des gesamten Frier- und Wiederauftauprozesses mikroskopisch aufgespürt werden. Der kryoprotektive Stoff kann hinzu gegeben und entfernt werden, während das Spermium in der Zonakapsel ohne nötige Verdünnung, Zentrifugation oder Behandlung mit Percoll verbleibt (COHEN et al. 1997).

2.5.4. Gefriertrocknung (Freeze Drying)

Lyophilization oder Freeze Drying („Gefriertrocknen“) wurde entwickelt, um bioaktive Moleküle (DNA, Enzyme und Proteine), pharmazeutische Produkte (Antibiotika) und andere empfindliche Materialien zu konservieren (KESKINTEPE et al. 2002). Diese Methode wurde bereits als Alternative zur Kryokonservierung von Säugetiersperma vorgeschlagen (WAKAYAMA et al. 1998; KUSAKABE et al. 2001; KANEKO et al. 2003 a, b).

Die Erhaltung von Spermienzellen ist erreicht worden, indem man mit Hilfe der Sublimierung (Feststoff → Gas) von Eis in einem starken Vakuum Wasser entfernt hat. Obwohl das Freeze Drying von Spermien eine nützliche Technik darstellt, insbesondere für die Konservierung tierischen Materials, verursacht es mehr Schäden als herkömmliche Verfahren der Kryokonservierung von Spermien. Gefriergetrocknete Säugetierspermien verlieren ihre Motilität und sind daher unfähig, Eizellen in vivo und in vitro zu befruchten (LIU et al. 2004). Freeze Drying verursacht signifikante Chromosomenschäden, welche durch zwei Schritte des Gefriertrocknungsverfahrens hervorgerufen werden: schnelles Frieren und nachfolgendes langsames Gefriertrocknen (WARD et al. 2003). Dennoch können diese Spermien verwendet werden, um Eizellen mittels ICSI zu befruchten, insofern ein intakter Kern im Spermium

vorhanden ist. Dies hat bei Mäusen und Kaninchen bereits zu lebenden Nachkommen geführt (KWON et al. 2004).

Nach Konservierung scheint der mittels ICSI injizierte Spermienkopf noch die Fähigkeit zu haben, die Eizelle zu aktivieren (COX et al. 2002; SAUNDERS et al. 2002).

Die genaue Untersuchung des Zustandes der Spermien-DNA ist notwendig, um die Effizienz dieser Methode zu beurteilen, da die Zusammensetzung des Lyophilisationsmediums die Integrität der Spermien-DNA beeinflusst. Die Untersuchung mittels TUNEL (Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling), die eine direkte Methode zur Bewertung der fragmentierten DNA darstellt, misst den Zusammenschluss von dUTP (2'-deoxyuridine 5'-triphosphate) an Bruchstellen der doppelsträngigen DNA in einer Reaktion, welche durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysiert wird. Dieser Test scheint die am besten geeignete Methode zur Feststellung des DNA-Status von gefriergetrockneten Spermien zu sein und somit die Methode der Wahl, um das Befruchtungspotential der Spermien anzuzeigen (MARTINS et al. 2007).

Gefriergetrocknete Proben können in regulären Kühlschränken bei +4 °C aufbewahrt werden und bei Umgebungstemperatur versandt werden, was den Transport zwischen Ländern vereinfacht und Kosten senkt. Bei längeren Transporten wurde keine Erhöhung der chromosomalen Schäden oder Verringerung des Entwicklungspotentials festgestellt (KUSAKABE et al. 2001).

Die gegenwärtigen Nachteile des Gefriertrocknens sind die gefährdete chromosomale Integrität, geringere Anzahl der zur Lagerung verfügbaren Proben „pro Mann“ und teures, spezielles Equipment (WARD et al. 2003).

2.5.5. Vitrifikation

Bei dieser Methode wird ein Gemisch aus Ejakulat und Frierlösung in verschiedene Carrier-Systeme gefüllt, welche dann sofort in flüssigen Stickstoff getaucht werden. Dieses „Schockfrieren“ bewirkt, dass die Probe direkt in einen glasartigen Zustand übergehen kann. Dieser verhindert die Eiskristallbildung, die bei einem langsamen Frieren auftritt und die Spermienintegrität beeinflussen kann.

2.6. Die Vitrifikationsmethode

2.6.1. Definition

Das Wort „Vitrifikation“ leitet sich vom lateinischen „vitrum“ (= Glas) ab. Vitrifikation ist ein Vorgang, bei dem eine Flüssigkeit ohne Entstehung von Eiskristallen in einen Feststoff umgewandelt wird (LUYET und HODAPP 1938). Dabei führt die Erhöhung der Viskosität der Flüssigkeit während des Friervorgangs dazu, dass eine Kristallbildung ausbleibt und ein amorphes Material entsteht. Somit werden Schäden an der Zelle verhindert, welche durch Eiskristalle hervorgerufen werden. Es gibt drei Einflussfaktoren für den Erfolg der Vitrifikation: die Gefriereschwindigkeit, die Zähflüssigkeit (Viskosität) und das Volumen einer Lösung. Die Erhöhung der Viskosität und der Gefriereschwindigkeit und die Verringerung des Volumens erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Vitrifikation (ARAV et al. 2002). Die Vitrifikation tritt auch auf, wenn man zur Flüssigkeit Zusätze hinzugebt, welche die Eiskristallbildung verhindern. Diese Stoffe werden als „Kryoprotektiva“ bezeichnet und man unterscheidet permeable von nicht-permeablen kryoprotektiven Stoffen (siehe 2.6.1.2.).

Die physikalische Definition von Vitrifikation beschreibt die Verfestigung einer Flüssigkeit bei niedrigen Temperaturen, ohne das Auftreten von Eiskristallbildung, aber mit extremer Erhöhung der Viskosität während des Abkühlens (FAHY et al. 1984). FAHY erklärt 1986 den Vorgang so: *„...die Viskosität der Probe wird größer und größer bis die Moleküle unbeweglich werden und die Probe nicht länger eine Flüssigkeit ist, sondern vielmehr die Eigenschaften eines Feststoffes besitzt.“* (FAHY 1986). Die zwei wichtigsten Faktoren für den Erfolg der Vitrifikation, welche Einfluss auf die biologische Probe während des Abkühlens vom physiologischen Zustand bis zum Erreichen der Temperatur des flüssigen Stickstoffes haben, sind zum einen die Schnelligkeit des Abkühlens (d.h. die Gefriertrate) und zum anderen die Wirkungen der gelösten Stoffe (d.h. die Konzentration der Kryoprotektiva). Eine praktische Grenze für die höchste, erreichbare Gefriertrate existiert, da es eine biologische Grenze für die Konzentration an Kryoprotektiva gibt, die von den Zellen während der Vitrifikation toleriert werden kann. Ein Gleichgewicht zwischen der höchsten erreichbaren Gefriertrate und der niedrigsten Konzentration an kryoprotektiven Stoffen ist anzustreben. Die optimale Gefriertrate besteht, wenn das meiste Wasser aus den Zellen austritt und extrazellulär vitrifiziert (LIEBERMANN et al. 2002).

Der direkte und schnelle Kontakt mit flüssigem Stickstoff verbunden mit minimalem Volumen der Vitrifikationslösung erlaubt es, größere Gefrierdaten zu erreichen, weil die Wärmeleitfähigkeit in einer Flüssigkeit viel höher ist als in Dampf. Des Weiteren gibt es einen positiven Effekt der hohen Gefrierdaten: Die schädigenden Auswirkungen der Kryoprotektivkonzentration und die Expositionsdauer werden herabgesetzt. Damit wird auch der toxische Effekt verringert (LIEBERMANN et al. 2003).

2.6.1.1. Vitrifikation ohne kryoprotektive Stoffe

Es gilt die Überzeugung, dass die Vitrifikation von großen Zellen, Geweben und sogar Organen nur erreicht werden kann, wenn hohe Konzentrationen von permeablen und nicht-permeablen Kryoprotektiva angewendet werden (FAHY 1988). Man strebte Konzentrationen von bis zu 50 Prozent bei gleichzeitig relativ geringen Frier- und Auftaugeschwindigkeiten an. Derartige Verhältnisse können für die Zellen sehr schädigend sein und zu späteren biochemischen Veränderungen und tödlichen osmotischen Verletzungen führen (FAHY 1984). Während die Kryoprotektiva sehr erfolgreich bei verschiedenen Arten von reproduktiven Geweben oder Zellen eingesetzt werden, ist diese Methode nicht geeignet, um Sperma von Säugetieren zu kryokonservieren, da dieses eine sehr geringe Toleranzgrenze für permeable Kryoprotektiva besitzt (ISACHENKO et al. 2003). Die Konzentrationen an Kryoprotektiva, die bei der Vitrifikation benötigt werden (30 - 50 % verglichen mit 5 - 7 % bei langsamen Friermethoden), können aufgrund der tödlichen osmotischen Auswirkungen nicht für Säugetiersperma angewendet werden (KATKOV et al. 1998; MAZUR et al. 2000). Die einzige Alternative besteht darin, möglichst hohe Gefrier- und Wärmeraten bei sehr kleinen Probenvolumina ohne Kryoprotektiva anzuwenden. Die Probengröße kann durch den Gebrauch verschiedener Carrier-Systeme minimiert werden (siehe 2.6.3.), so dass die Dauer der Verfestigung der flüssigen Phase während der Vitrifikation verringert wird.

Bei hohen Gefrierdaten, kurzer Gefrierdauer und kleinen Probenvolumina wird angenommen, dass nicht viele Kristallisationskerne während des Abkühlens gebildet werden können und ihre Größe nicht ausreicht, um die Zellen zu schädigen oder ein späteres Schrumpfen auszulösen. Die Wiedererwärmungsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich um einige Größenordnungen höher, weil die Lösung direkt in ein großes Volumen aufkochenden Wassers eingebracht wird. Selbst wenn einige Eiskerne während des Gefrierens entstanden sein sollten, werden diese während des Aufwärmens nicht die Zeit zum Kristallisieren und zum Wachstum haben (ISACHENKO et al. 2003 a, b).

Die Wahrscheinlichkeit einer Devitrifikation (Rekristallisierung) der vitrifizierten Lösung ist aufgrund der hohen Geschwindigkeit und der kurzen Dauer des Wiedererwärmens sowie der geringen Größe der Proben (extrazelluläre Rekristallisierung) bzw. der Zellen (intrazelluläre Rekristallisierung) gering. Die intrazelluläre Kompartimentierung kann ebenfalls zum erfolgreichen Überleben des Spermiums beitragen (ISACHENKO et al. 2003 a, b; 2004 a, b). Ein erfolgreiches Vitrifikationsprotokoll zur Kryokonservierung von Säugetierembryonen ohne Einsatz von konventionellen permeablen Kryoprotektiva konnte bisher nicht erstellt werden. Warum ist die Vitrifikation ohne Kryoprotektiva erfolgreich bei Spermien, aber nicht bei Eizellen, Embryonen und Ovargewebe? Zwei Variablen, welche für den Erfolg oder das Versagen der Vitrifikation diskutiert werden, sind die Größe der Zellen und ihre relative Konzentration an löslichen Makromolekülen (ISACHENKO et al. 2003 a, b).

Die Form und Größe des Spermienkopfes kann die Kryosensitivität der Zelle definieren. Vergleichende Studien (bei den Säugetierarten Eber, Stier, Widder, Kaninchen, Katze, Hund, Pferd, Mensch) (NAUK 1991) haben eine negative Korrelation zwischen der Größe des Spermienkopfes und der Kryostabilität gezeigt, d.h. je kleiner der Kopf, desto größer ist die Kryostabilität. Da dieser bei menschlichen Spermien am kleinsten ist, findet man dort die größte Kryostabilität (GAO et al. 1997).

Die Menge an Makromolekülen mit hohem Molekulargewicht und an – im Zytosol gelösten – Polymeren kann mit dem Prozentanteil von osmotisch inaktivem Volumen abgeschätzt werden. Bei Embryonen und Eizellen liegt es bei 20 - 30 Prozent, wohingegen Spermien einen viel höheren Anteil besitzen, welcher 45 - 77 Prozent beträgt (GAO et al. 1997).

Die Moleküle bewirken eine Erhöhung der Viskosität und der Tg des intrazellulären Zytosols des Spermiums (ISACHENKO et al. 2004 a, b).

Unlängst gemachte Entdeckungen lassen vermuten, dass für optimale Bedingungen zur Kryokonservierung von Spermien ohne kryoprotektive Stoffe nicht unbedingt ein sehr schnelles Abkühlen vor der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff notwendig ist, sondern eine große Spanne an Gefrierarten akzeptabel ist. Die Kombination von langsamem Abkühlen und schnellem Wiedererwärmen scheint eine sehr effiziente Kombination zu sein (ISACHENKO et al. 2004 b). Die Studien von NAWROTH et al. (2002) demonstrierten, dass bei der Vitrifikation von menschlichen Spermien dieselbe Konzentration an Kryoprotektiva, die bei konventionellen Methoden angewendet werden, starke toxische Effekte zeigt. Die Vitrifikation lieferte die besten Ergebnisse mit Swim Up aufbereiteten Spermien ohne Kryoprotektivum. Im Vergleich zum konventionellen Frieren mit Kryoprotektiva (native und aufbereitete Proben) führte die Vitrifikation von aufbereiteten Spermien ohne

Kryoprotektivum zu signifikant höherer Motilität. Die Unterschiede in der Morphologie, Wiederfindungsrate von motilen Spermien, Lebensfähigkeit und Akrosomreaktion der beiden Friermethoden (mit und ohne Kryoprotektivum) waren uneinheitlich, aber in den meisten Fällen nicht signifikant. Spermien, die ohne Kryoprotektiva vitrifiziert wurden, erhielten sich die Fähigkeit auch nach dem Wiedererwärmen menschliche Eizellen zu befruchten, die sich später zu Blastozysten weiterentwickelten.

2.6.1.2. Vitrifikation mit kryoprotektiven Stoffen

Die kryoprotektiven Stoffe bestehen aus zwei verschiedenen Gruppen: „penetrating“ und „non-penetrating“. Es gibt also Stoffe, welche die Zellen durchdringen, und andere, welche dies nicht tun. Die Zusammenarbeit beider Gruppen befähigt die Zelle dazu, die Verringerung des Zellwasservolumens während des Friervorganges zu überstehen und reduziert außerdem das Ausmaß der intrazellulären Eiskristallbildung (McGANN 1978). Durchdringende Stoffe (penetrating agents) schaffen die Umgebung zur Verringerung der Zellwassermenge bei Temperaturen, die ausreichend niedrig sind, um die schädigende Wirkung der konzentrierten Lösungsteilchen auf die Zelle zu reduzieren. Nicht-durchdringende Stoffe (non-penetrating agents) „pressen“ durch den osmotischen Gradienten Wasser aus den Zellen. Dies geschieht vor allem in der Anfangsphase des Friervorganges, bei Temperaturen zwischen -10 °C und -20 °C, wenn die chemischen Zusätze im extrazellulären Bereich konzentriert werden (McGANN 1978). Die Konzentration von penetrierenden Kryoprotektiva mit nachfolgender Erhöhung der Toxizität kann durch den Gebrauch von nicht-durchdringenden Stoffen wie Polymeren mit großem Molekulargewicht (z.B. Polyvinylpyrrolidone oder Polyethylenglykol) oder Saccharose verringert werden. Nicht-durchdringende Kryoprotektiva sind zu groß, um in die Zelle zu diffundieren, helfen aber im Extrazellulärraum bei der Vitrifikation von Wasser und bei der Verhinderung der Devitrifikation mit. Es werden also weniger kryoprotektive Stoffe innerhalb als außerhalb der Zelle gebraucht: Erstens wegen der Dehydrierung der Zelle und zweitens, weil Zellen natürlicherweise mehr Proteine beinhalten, was die Vitrifikationseigenschaften wiederum verbessert (BEST 1990).

1949 entdeckte POLGE, dass Glycerol verwendet werden kann, um Stiersperma vor Frierschäden zu schützen (POLGE et al. 1949). Ein Jahr später wurde diese Technik mit Erfolg bei roten Blutzellen angewandt. 1959 wurde die Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryoprotektivum bekannt. DMSO durchdringt die Zellmembran schneller als Glycerol,

kann aber bei höheren Temperaturen toxischer sein. Die Zellmembran ist die Struktur mit dem größten Risiko für Frierschäden.

Ursächlich für die Toxizität von Kryoprotektiva ist wahrscheinlich die Denaturierung von Proteinen. Bereits gemachte Entdeckungen geben Hinweise darauf, warum die Stoffe, welche die größte Kryoprotektion bei niedrigen Konzentrationen erzielen, diejenigen sind, die am meisten toxisch wirken: Die Stoffe, die am besten vitrifizieren, gehen die stärksten Wasserstoff-Bindungen mit Wasser ein, wodurch sie die Wasserstoffverbindungen zwischen den Wassermolekülen stören, welche die Grundlage der Eisbildung darstellen (FAHY et al. 2004). Gleichzeitig aber können die Kryoprotektiva auch sehr starke Wasserstoffbindungen mit Proteinen eingehen, was Fehlzusammensetzungen und Denaturierungen zur Folge hat.

2.6.2. Historischer Überblick

Das Phänomen der Vitrifikation wurde zum ersten Mal Ende des 19. Jahrhunderts (1898) von TAMMANN erforscht und beschrieben. Der Gründer der Kryobiologie, LUYET, erkannte darin das Potential, einen eiskristallfreien, strukturell arretierten Zustand zu erzielen (LUYET 1937). 1938 schrieb Prof. F. Jahnelt in der Klinischen Wochenschrift: *„Über die Frage worauf die beschriebene Widerstandsfähigkeit der Spermatozoen gegenüber starker Kälte beruht, müssen noch weitere Untersuchungen angestellt werden. Möglicherweise spielt dabei die Schnelligkeit des Einfrierens eine Rolle. Amerikanische Forscher haben nämlich festgestellt, dass das Wasser bei plötzlicher Abkühlung nicht zu Eis erstarrt, sondern in einen anderen, glasartigen Zustand gerät.“* (JAHNEL 1938). LUYET und HODAPP (1938) waren die ersten, die eine erfolgreiche Kryokonservierung von Froschsperma durch Vitrifikation erreichten. Jahre später gelang es SHAFFNER (1942) mit einer Abänderung von LUYETs Protokoll, Geflügelsperma zu vitrifizieren. Dennoch konnte bei keinem Versuch das Sperma von Säugetieren auf diese Art und Weise konserviert werden. HOAGLAND und PINCUS scheiterten an diesem Vorhaben 1942, SMITH auch noch im Jahr 1961. POLGE wollte 1949 die gleichen Ergebnisse wie LUYET erzielen und entdeckte die kryoprotektive Eigenschaft von Glycerol, was dem Gebiet des langsamen Frierens die Türen öffnete (ARAV et al. 2002). Später wurde allgemein anerkannt, dass Vitrifikationslösungen zur Kryokonservierung von Zellen und Gewebe besser wären, als Lösungen die kristallisieren und folglich die Zellen während des Einfrier- und Auftauvorganges schädigen (KULESHOVA und LOPATA 2002). In der Vergangenheit wurde die Vitrifikation durchgeführt, indem man die zu testende Probe in flüssigen Stickstoff bei -196 °C eintauchte (RALL und FAHY 1985). Bei dieser

Verfahrensweise kam es durch die Wärmeübertragung der Probe in den kalten, flüssigen Stickstoff zur Entstehung von Stickstoffdampf um die Probe herum. Diese Stickstoffgasschicht wirkte als Isolator, was die Wärmeübertragung verringerte und es unmöglich machte, einheitlich schnelle Gefrieraten zu erreichen.

Die Wissenschaftler entwarfen optimale Vitrifikationsprotokolle für Eizellen und Embryos, wobei sie darauf achteten, dass die Lösungen eine möglichst große Viskosität besaßen. Dazu waren hohe Konzentrationen an permeablen (Glycerol, DMSO, Propyl-Saccharose, Ethylenglykol) oder nicht-permeablen (Ficoll, Saccharose, Trehalose) Kryoprotektiva nötig. Doch erhöhten diese Stoffe nicht nur die Viskosität, sondern auch die Toxizität und die osmotischen Effekte, was zur Schädigung der Zellen führte. Schließlich fand man heraus, dass die Reduktion des Lösungsvolumens die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Eiskristallen verringert und die erfolgreiche Vitrifikation auch bei geringen und nicht-toxischen Konzentrationen an Kryoprotektiva ermöglicht (ARAV et al. 2002).

Gegenwärtig verwendet man beide Methoden für die Kryokonservierung von Keimzellen: langsames Frieren und Vitrifikation. Langsames Frieren hat den Vorteil, dass nur geringe Mengen an kryoprotektiven Stoffen, die mit chemischer Toxizität und osmotischem Schock verbunden sind, benötigt werden. Der Nachteil dieser Methode ist die Entstehung von schädigenden Eiskristallen. Vitrifikation ist eine schnelle Methode, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Kälteschocks (Schäden durch Kälte/Frieren/Eiskristalle) verringert. Sie stellt eine zeitsparende Verfahrensweise dar. Vitrifikationsprotokolle etablieren sich zunehmend bei den verwendeten Kryoverfahren in der assistierten Reproduktionstechnik (LIEBERMANN et al. 2002).

Man hat inzwischen die hohen Konzentrationen an kryoprotektiven Stoffen reduziert und mittlerweile existieren auch Protokolle, anhand derer die erfolgreiche Vitrifikation ganz ohne Kryoprotektiva durchgeführt wurde (ISACHENKO et al. 2003 a, b; 2004 a, b).

2.6.3. Methoden der Vitrifikation

Bei der Vitrifikation finden verschiedene so genannte spezielle „Carrier-Systeme“ Anwendung, durch die das Volumen der Vitrifikationslösung so klein wie möglich gehalten werden kann. Dazu gehören u.a. Cryoloop, Cryotop, Open Pulled Straws (OPS), Closed Pulled Straws (CPS), Hemi Straws, Mini Straws, French Straws, VitMaster[®], Flexipet Denuding Pipette (FDP), Microdrops und Electronmicroscopic Copper Grids. Im Weiteren sollen einige dieser Verfahren näher vorgestellt werden.

2.6.3.1. Cryoloop und Cryotop

Die Verwendung von Cryoloops ermöglicht eine einfache Handhabung während der Vitrifikation und Wiedererwärmung. Die Technik stammt ursprünglich von einem Verfahren ab, das routinemäßig beim Blitzfrieren von Eiweißkristallen bei niedrigsten Temperaturen zur Datensammlung eingesetzt wurde. Der Cryoloop ist ein ultraschnelles Werkzeug. Cryoloops („Kälteschlingen“, Abb. 8), die bei der Vitrifikation Anwendung finden, bestehen aus einer Nylonschlinge (20 µm weit; 0,5 - 0,7 mm Durchmesser), die an einem rostfreien Stahlröhrchen angebracht ist, welches mit dem Deckel eines Kryofläschchens verbunden ist (LANE et al. 1999 b).

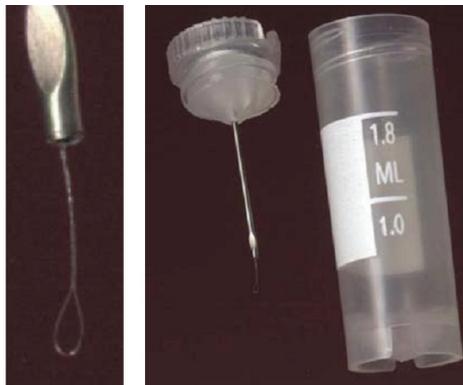


Abbildung 8: Cryoloop und Cryovial für die Vitrifikation von Oocyten

(SAKI et al. 2005)



Abbildung 9: Geladener Cryoloop

(SAKI et al. 2005)

Bei der Vitrifikation werden die Zellen (z.B. die Blastozysten) auf dem Cryoloop platziert, der mit einem dünnen Film aus einer Lösung mit kryoprotektiven Stoffen beschichtet wurde, oder der Cryoloop wird in eine Suspension von Zellen (z.B. Spermien) eingetaucht (Abb.9). Der Cryoloop wird dann direkt in das Fläschchen gesteckt, das mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist oder vorher fünf Minuten in unbewegten Stickstoffdampf gebracht und danach in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das Fläschchen wird verschlossen und in den

konventionellen stickstoffgefüllten Dewar-Gefäßen aufbewahrt (LANE et al. 1999 b; SCHUSTER et al. 2003).

Diese Technik bietet auch die Möglichkeit, eine sehr geringe Anzahl von Spermien zu kryokonservieren, z.B. für die Durchführung der ICSI-Methode, bei der theoretisch nur ein Spermium pro Eizelle notwendig ist. Jedoch sind die Isolierung, das Einfrieren und das Wiederfinden eines einzelnen Spermiums problematisch (SCHUSTER et al. 2003). Die Cryoloop-Technik ist einfach zu handhaben, ist zeiteffizient und bedarf keines Equipments für eine kontrollierte Gefrierate, welches technischen Fehlern oder dem Versagen von anderen Bestandteilen unterliegen kann (REED et al. 2002).

Cryoloops haben aufgrund des extrem kleinen Volumens des Vitrifikationsmediums und des kurzen Eintauchkontaktes mit dem flüssigen Stickstoff die höchsten Gefrieraten. Jedoch erfordern sie sorgsamem Umgang mit den einzufrierenden Zellen und tragen das Risiko einer Kontamination (CREMADES et al. 2004). Der Cryoloop wird auch zur Kryokonservierung von Eizellen verwendet. Die Vitrifikation von Eizellen mit Cryoloop hat Vorteile gegenüber der konventionellen Vitrifikation, weil das offene System – dem jegliche wärmeisolierende Schicht fehlt – verbunden mit dem kleinen Volumen ($< 1 \mu\text{l}$) sowohl schnelles als auch einheitliches Abkühlen während des Friervorganges ermöglicht. Die Eizellen können bei geringen Mengen an Vitrifikationslösung direkt erwärmt und sofort in einem Verdünnungsmedium gelöst werden, was eine geringere Exposition in ungeeigneten Temperaturverhältnissen und hochkonzentrierten Kryoprotektiva-Lösungen mit sich bringt (SAKI und DEZFULY 2005). Vergleicht man das langsame Frieren oder die Vitrifikation unter Gebrauch von Straws mit der ultraschnellen Vitrifikation mittels Cryoloop, erkennt man aber auch, dass dieses Verfahren einen besonders sorgfältigen Umgang mit den Zellen und der Lösung voraussetzt, weil das Volumen der Vitrifikationslösung minimal ist und daher die Konzentrationsverhältnisse der – die Zellen umgebenden – Lösung eventuell variieren (MUKAIDA et al. 2002).

Eine weitere Methode der Vitrifikation ist die Cryotop-Methode (Abb.10):

Sie ist als effizientes Verfahren bei der Kryokonservierung von humanen Eizellen beschrieben worden. Dabei wurden einzelne Eizellen mit einem extrem geringen Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ Vitrifikationslösung zusammengebracht und auf die Oberfläche eines sehr feinen Streifens aus Polypropylen (0,4 mm breit; 20 mm lang; 0,1 mm dick) gesetzt, der an einem Plastikstiel befestigt war. Dann wurde der Cryotop senkrecht in gefilterten flüssigen Stickstoff gebracht und der dünne Streifen mit einem Hartplastiküberzug (3 cm lang) abgedeckt, um ihn während

der Lagerung in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Containern zu schützen (KUWAYAMA et al. 2005 a). Das Cryotop-Verfahren stellt ebenfalls ein offenes Vitrifikationssystem dar (KUWAYAMA et al. 2005 b).

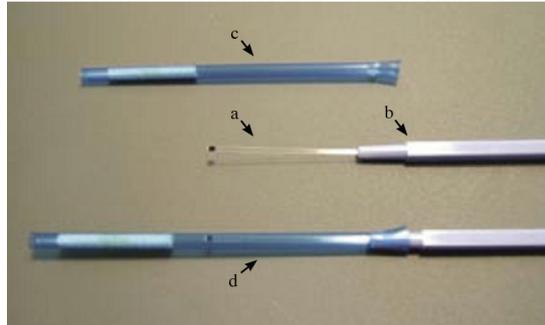


Abbildung 10: Cryotop-Methode:

Der Polypropylenstreifen (a) ist mit einem Hartplastikstiel (b) verbunden. Nach der Vitrifikation wird eine harte Plastikhülle (c/d) daran befestigt, um den Streifen während der Lagerung in flüssigem Stickstoff zu schützen.

(KUWAYAMA et al. 2005 b)

2.6.3.2. Open Pulled Straws (OPS) und Closed Pulled Straws (CPS), Hemi Straws und Mini Straws

Die Open Pulled Straw-Methode ist angewendet worden, um Eizellen und Embryos von Säugetieren zu vitrifizieren (VAJTA et al. 1998; 1999). Bei der OPS-Technik erhöhen der kleine Gefäßinnendurchmesser (0,8 mm vs. 1,7 mm bei French Straws) und das geringe Inhaltsvolumen (1 - 2 μ l vs. 250 μ l bei French Straws) die Gefrierate und ermöglichen die Anwendung geringerer Kryoprotektivkonzentrationen, was die Toxizität reduziert. Der direkte Kontakt mit flüssigem Stickstoff kann durch zusätzliche Luft und kryoprotektive Grenzflächen vermieden werden (CHEN et al. 2001). ISACHENKO et al. (2005) verwendeten verschiedene Methoden des Einfrierens ohne Kryoprotektiva. Bei der Anwendung von OPS (Abb.11) wurden Anteile von 5 μ l der Spermisuspension durch Kapillarkräfte in das Endstück des OPS gezogen (VAJTA et al. 1998). Die Straws wurden in sterile 90 mm-Straws gebracht, luftdicht verschlossen (Medical Technology GmbH) und in flüssigen Stickstoff getaucht. Es bestand keine Berührungsfläche zwischen der Wand des 90 mm-Straws und der Spermisuspension innerhalb des OPS, was durch die Meniskusbildung in der Suspension bedingt war. Die OPS-Methode wurde bevorzugt, weil

sie gute Motilität, das Langzeitüberleben der Spermien und eine maximale Reduktion des Risikos einer mikrobiellen Kontamination vereinte (ISACHENKO et al. 2005).

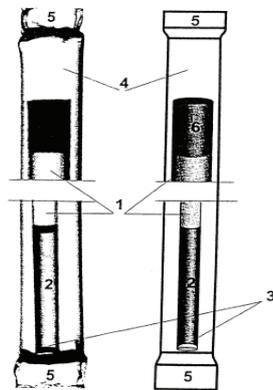
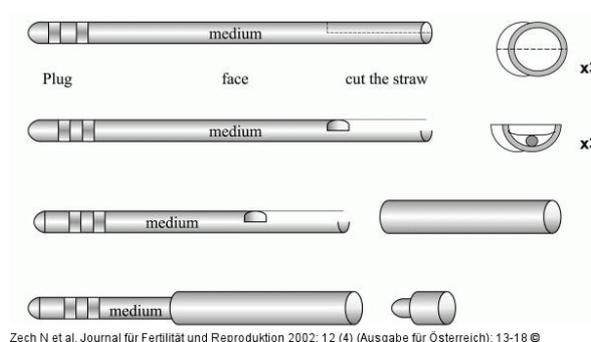


Abbildung 11: OPS-Vitrifikation:

1. Open Pulled Straw; 2. Spermiensuspension; 3. Flüssigkeiten in Glasgefäßen bilden die Oberfläche als Meniskus („Halbmond“) aus. Der Flüssigkeitsspiegel an der Gefäßwand liegt dabei höher oder tiefer als in der Mitte; 4. 90 mm-Straw; 5. hitzeversiegeltes Ende des 90 mm-Straw; 6. markiertes Ende des Open Pulled Straw

(ISACHENKO et al 2005)

Die klassische Vitrifikationstechnik basiert auf dem French Mini Straw (AL-HASANI et al. 1987). Dieses System ist nach Auffassung von ZECH et al. (2002) allerdings nur eingeschränkt für die Vitrifikation anwendbar, da sich die Kälte aufgrund des Systemaufbaus nur sehr inhomogen ausbreiten kann. ZECH et al. (2002) modifizierten einen herkömmlich verwendeten French Mini Straw zum Hemi Straw (Abb.12), der einen intensiveren Kontakt zwischen Eizelle bzw. Embryo und dem flüssigen Stickstoff ermöglicht.



Zech N et al. Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (4) (Ausgabe für Österreich): 13-18 ©

Abbildung 12: Das Hemi Straw-System

(ZECH et al. 2002)

Die Aufbewahrung der Straws erfolgte in konventionellen Kryobehältern, um eine Kontaminationsgefahr des offenen Systems zu vermeiden. Die ungleiche Kälteverteilung wie im konventionellen Straw wird durch das Hemi Straw-System (HSS) vermieden.

Die Anzahl von Zellen, die im HSS gelagert werden können, hängt von den verwendeten Entwicklungsstadien ab: Es können vier bis fünf Eizellen bzw. Embryos oder maximal zwei Blastozysten gleichzeitig kryokonserviert werden. Der 0,25 ml-Straw wird auf folgende Art und Weise vorbereitet: Ein Ende des 0,25 ml-Straws wird mit einem scharfen Skalpell aufgeschnitten, so dass er offen ist und es leicht fällt, einen kleinen Tropfen ($< 1,0 \mu\text{l}$) auf die innenliegende Fläche zu pipettieren. Die Zellen werden mit einer spezifischen Lösung (VS1) vorbehandelt. Danach werden die Zellen in eine weitere Lösung (VS2) gegeben. Nach mehreren Bearbeitungsschritten wird ein kleinstmögliches Volumen der Lösung ($< 1,0 \mu\text{l}$) auf die Innenfläche der aufgeschnittenen Stelle des 0,25 ml-Straws gebracht. Das HSS wird dann direkt in flüssigen Stickstoff und in ein größeres, vorgekühltes und bereits vorbeschriftetes 0,5 ml-Cryo Straw-System (Cryo Bio Systems, Frankreich) oder in ein 5 ml-Kryogefäß, welches in flüssigen Stickstoff gehalten wird, transferiert (LIEBERMANN und TUCKER 2002 a; VANDERZWALMEN et al. 2003). Der Straw wird mit einem Plastikstöpsel, der farblich kodiert ist, oder mittels des o.g. Kryogefäßes zur Aufbewahrung geschlossen (LIEBERMANN et al. 2003).

Es wurde schon über erfolgreiche Schwangerschaften und Entbindungen nach dem Gebrauch von OPS, Cryoloop oder 0,25 ml-French Straws bei Vitrifikationsprotokollen für menschliche Embryos am dritten Entwicklungstag und Blastozysten berichtet (YOKOTA et al. 2000; EL-DANASOURI et al. 2001; MUKAIDA et al. 2001; VANDERZWALMEN et al. 2002).

2.6.3.3. VitMaster[®]

ARAV (1998) entwickelte ein neues Gerät zur Vitrifikation – den VitMaster[®], bei dem die Temperatur des flüssigen Stickstoffs auf bis zu -210 °C abgesenkt wird. Dieser Effekt wird durch die Bildung eines Teilvakuums hervorgerufen, wobei gleichzeitig die Gefriertrate unter Anwendung eines „Schlammes“ aus flüssigem Stickstoff deutlich erhöht wird. Dieser so genannte „supercooled“ flüssige Stickstoff erleichtert die Wärmeübertragung zwischen flüssigem Stickstoff und der Oberfläche der Kryolösung. Diese Art der Vitrifikation wurde auch bereits erfolgreich bei der Vitrifikation von Rinder-, Schaf- und Menscheneizellen angewendet (LIEBERMANN et al. 2002; ARAV et al. 2000).

2.6.3.4. Einfluss des Volumens auf den Erfolg der Vitrifikation

Bei der Vitrifikation spielt das Volumen der verwendeten Probe eine entscheidende Rolle. Je kleiner das Volumen ist, desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Kristallbildung. Des Weiteren werden unter diesen Bedingungen nur geringe und unschädliche Mengen von kryoprotektiven Stoffen in der Vitrifikationslösung benötigt (ARAV et al. 2002). Der flüssige Stickstoff liegt bei -196 °C am seinem Gefrierpunkt. Werden die Zellen darin eingetaucht, wird der flüssige Stickstoff erwärmt und dies ruft eine beträchtliche Dampfbildung hervor: Es entsteht Stickstoffgas. Dieser Dampf umhüllt die Zellen, was eine Isolierung der Zellen bedeutet. Diese behindert den Temperaturtransfer und setzt somit die Gefrierate herab (LIEBERMANN et al. 2002). Höhere Gefrieraten sind jedoch vorteilhafter. Sie werden erreicht, indem man die Wärme durch Flüssigkeit leitet, weil die Wärmeübertragung so schneller stattfindet und der Temperaturgradient schneller ausgeglichen wird. Um zu gewährleisten, dass die Probe mit Flüssigkeit und nicht mit Dampf umgeben wird, sollte ihre Größe so gering wie möglich sein. Dadurch wird die Zeitspanne, in welcher die Probe dem Dampf ausgesetzt ist, verringert und die Gefrierate erhöht. Um die Vitrifikation mit noch höheren Gefrieraten zu beschleunigen, sollte die Menge der Vitrifikationslösung so gering wie möglich sein. Dazu werden verschiedene Carrier-Systeme (siehe 2.6.3.) verwendet (LIEBERMANN et al. 2002). In schnell herabgekühlten Straws wird die Lösung in Randnähe am schnellsten gefroren und wieder erwärmt im Gegensatz zur Strawmitte. Dieser Unterschied kann biologisch bedeutsam sein: Embryos zeigen eine hohe Überlebens- und Entwicklungsrate, wenn sie nah am Rand des Straws lokalisiert sind, da in dieser Region Kristalle nur während des Auftauprozesses gebildet werden. In der Mitte des Straws entstehen Eiskristalle sowohl beim Frieren als auch beim Wiedererwärmen (SHAW et al. 1991 a).

2.6.4. Anwendungsgebiete der Vitrifikationsmethode

Die Vitrifikationstechnik wurde erfolgreich angewendet bei der Kryokonservierung von Eizellen, Embryos im Pronukleus-Stadium, Embryos am dritten Tag und Blastozysten (KULESHOVA et al. 1999 a, b; LANE et al. 1999 b; CHEN et al. 2000 a, b; PARK et al. 2000; SAITO et al. 2000; YOKOTA et al. 2000; 2001 a, b; YOON et al. 2000; 2003; VANDERZWALMEN et al. 2002; 2003; EL-DANASOURI und SELMAN 2001; MUKAIDA et al. 2001; JELINKOVA et al. 2002; LIEBERMANN und TUCKER 2002 a; LIEBERMANN et al. 2002; 2003; REED et al. 2002; ISACHENKO et al. 2003 a;

MUKAIDA et al. 2003; SON et al. 2003), Spermien (ARAV et al. 2002; NAWROTH et al. 2002; ISACHENKO et al. 2003 b), embryonale Stammzellen (REUBINOFF et al. 2001), weibliches Kern-Material (HE et al. 2003), Eierstockgewebe (SHAW et al. 2000; RAHIMI et al. 2001), menschliche Kornea (ARMITAGE et al. 2002; MELTENDORF et al. 2002) und menschliche Haut (FUJITA et al. 2000).

2.6.4.1. Spermien

Die Anwendung der Vitrifikationsmethode bei Spermien wurde in 2.6.1. - 2.6.3. schon ausführlich beschrieben.

2.6.4.2. Eizellen

Die Eizelle ist eine der größten Zellen des menschlichen Körpers. Sie hat aufgrund ihrer kugelförmigen Gestalt den geringsten Oberflächen-Volumen-Quotienten verglichen mit anderen Zelltypen, die auch uneinheitliche Formen haben. (SMITH und SILVA 2004; WRIGHT et al. 2004). Mitte der 80er Jahre wurde bei menschlichen Eizellen eine langsame Friertechnik zur Kryokonservierung durchgeführt (CHEN 1986). 1988 fand man heraus, dass ein längerer Aufenthalt bei Temperaturen, die niedriger als die physiologische Temperatur von humanen Eizellen sind, schädliche Auswirkungen auf die Organisation des Zytoplasmas und die Integrität der meiotischen Spindel hat (SATHANANTHAN et al. 1988). Weitere Entwicklungen von langsamen Frierverfahren Mitte der 90er Jahre schienen viel versprechend für die Kryokonservierung von humanen Eizellen (BERNARD und FULLER 1996).

Man ging davon aus, dass die Vitrifikationsmethode auch eine geeignete Möglichkeit für humane Eizellen darstellen könnte. Es wurde entdeckt, dass ein stufenweiser Prozess effektiv ist: Dabei wird die Menge von penetrierenden Kryoprotektiva schrittweise gesteigert und ein Verdünnungsprozess durchgeführt, womit ungewollte Ausdehnung oder anhaltende Dehydrierung der Eizellen vermieden werden. Als Ergebnis dieser Studien wurde 1999 zum ersten Mal über die Geburt eines gesunden Mädchens berichtet, dass nach dem Transfer eines Embryos, der von vitrifizierten reifen Eizellen abstammte, zur Welt kam (KULESHOVA et al. 1999 a, b; KULESHOVA und LOPATA 2002).

Die Kryokonservierung durch Vitrifikation wurde auch für gereifte humane Eizellen der Metaphase II verwendet, die danach zur Geburt von gesunden Babys führten (KULESHOVA und LOPATA 2002; YOON et al. 2000, 2003; KATAYAMA et al. 2003).

Die Fähigkeit der Kryokonservierung von Eizellen stellt ein wertvolles Hilfsmittel für die assistierten Reproduktionstechniken dar (OKTAY et al. 1998; PORCU et al. 2000; POOL und LEIBO 2004; PAYNTER 2005). Dadurch wird es für Patientinnen mit verschiedenen bösartigen Erkrankungen möglich, ihre Eizellen vor Beginn einer Chemo- oder Strahlentherapie sicher zu verwahren und nach Abschluss der Behandlung zur Befruchtung zu verwenden (MEIROW 2000). CAO et al. (2009) verglichen menschlichen Eizellen nach dem EAP mittels langsamen Einfrierens und Vitrifikation. Sie untersuchten die Überlebensrate, die Befruchtungskapazität, die Entwicklung der Embryos, die Anordnung des meiotischen Spindelapparates und des Chromatins. Die Überlebensrate war beim langsamen Einfrieren signifikant niedriger und die Befruchtungsraten in beiden Gruppen annähernd gleich. Die regelrechte Entwicklung der Blastozysten war in der Vitrifikationsgruppe signifikant höher. Ebenso zeigten sich signifikant höhere Werte bei Abnormalitäten im Bezug auf die meiotische Spindel und die Chromatinanordnung beim langsamen Frieren im Vergleich zur Vitrifikation. Diese scheint in der Studie die bevorzugte Methode der Kryokonservierung zu sein. COBO et al. (2008) zeigten, dass die Vitrifikation mit der Cryotop-Methode sehr gute Ergebnisse in den Überlebensraten von Eizellen erzielt.

SCHOOLCRAFT et al. (2009) zeigten, dass das Befruchtungspotential von Eizellen nach Vitrifikation erhalten wird. Embryos, die nach Befruchtung von vitrifizierten Eizellen entstanden, zeigten eine gute Entwicklung im Blastozystenstadium mit anschließend außergewöhnlich erfolgreichen perinatalen Ergebnissen. FADINI et al. (2009) konnten bei der Kryokonservierung von Eizellen ebenfalls bessere Ergebnisse für die Vitrifikation im Vergleich zum langsamen Einfrieren nachweisen. Es wurden höhere Überlebens-, Befruchtungs-, Schwangerschafts- und Implantationsraten festgestellt.

LIOW et al. (2009) kryokonservierten aus einer Hodenbiopsie gewonnene Spermien und vitrifizierte Eizellen mittels Cryotop-Methode. Nach dem Auftauen wurde eine ICSI-Therapie durchgeführt und der Embryo transferiert. Das β -HCG stieg an, die Schwangerschaft wurde durch Hormongabe für 12 Wochen weiter unterstützt. Ein gesunder Junge wurde in der 38. Schwangerschaftswoche per Sectio entbunden.

2.6.4.3. Embryonen/Blastozysten

1985 zeigten RALL und FAHY zum allerersten Mal, dass Mäuseembryos erfolgreich mit Vitrifikation kryokonserviert werden können. Diese älteren Studien verbanden Elemente des langsamen Frierens und der Vitrifikation miteinander. Somit wurden die Embryos teilweise

vorher in einen Gleichgewichtszustand gebracht und danach bei niedriger Temperatur (+4 °C) in eine Vitrifikationslösung überführt (RALL und FAHY 1985; RALL et al. 1987).

Einer der ersten Fälle einer Lebendgeburt nach Vitrifikation von Embryos in einem fortgeschrittenen Stadium der embryonalen Entwicklung – wie dem Blastozystenstadium – wurde 2001 veröffentlicht. Dieser Erfolg wurde mit herkömmlichen 250 µl-Straws und schnellem Abkühlen in flüssigem Stickstoff erzielt (YOKOTA et al. 2001).

Beim konventionellen langsamen Frieren wurden mehr als 50 % der Embryos physikalisch geschädigt. Sehr häufig wurde dabei die Beschädigung der Zona pellucida beschrieben (RALL und MEYER 1989; TUCKER et al. 1995; VAN DEN ABBEEL und VAN STREITERGHEM 2000; KASAI et al. 2002). YEOMAN et al. (2001) kryokonservierten Rhesusaffenblastozysten und berichteten über gelegentliche Zonabrüche beim langsamen Einfrieren, wohingegen diese nicht bei der Vitrifikationsmethode auftauchten. Außerdem war das Auftreten von physikalischen Schäden beim ultraschnellen Frieren und Wiedererwärmen bedeutend seltener. Die Wirksamkeit der Vitrifikation von humanen Embryos ist in einigen Studien belegt worden (SAITO et al. 2000; YOKOTA et al. 2001 b).

Eine Variante humane Blastozysten zu kryokonservieren ist die ultraschnelle Vitrifikation, zu der auch der Cryoloop gehört. Unter Verwendung von Cryoloops ergaben sich beachtliche Überlebens- und Schwangerschaftsraten (MUKAIDA et al. 2002; 2003). STACHECKI et al. (2008) berichteten über eine neue Methode der Vitrifikation von menschlichen Blastozysten, welche den Einsatz von weniger toxischen Kryoprotektiva als DMSO erlaubt und die auf die Verwendung von Gefäßen verzichtet, welche der Kontamination offen stehen. Schwierigkeiten des alten Verfahrens sind, dass der Umgang mit den Zellen und das Befüllen in sehr kurzer Zeit erfolgen müssen, was zu Fehlern des Anwenders führen kann. KARTBERG et al. (2008) verglichen zwei Vitrifikationsprotokolle für die Kryokonservierung von humanen Embryos miteinander. Es gab keinen Unterschied in den Überlebensraten der Embryos. Bei längerem Einwirken der Vitrifikationslösung auf die Zellen führte die DMSO-enthaltende Lösung seltener zu Schäden der Zellmembran und zum Zelltod als die Lösung ohne DMSO (Dimethylsulphoxid). LOUTRADI et al. (2008) untersuchten die Überlebensrate nach Kryokonservierung von menschlichen Embryos mittels Vitrifikation und langsamen Einfrierens. Dabei konnten sie auch bestätigen, dass durch die Vitrifikation ein besseres Überleben der Zellen erzielt werden konnte.

Der Transfer von Embryos im Blastozystenstadium hat höhere Schwangerschaftsraten ergeben, weil eine verbesserte Auswahl an potentiell lebensfähigen Embryos stattfinden kann. Die Implantationsraten sind höher und es entstehen weniger Mehrlingsschwangerschaften.

LIEBERMANN et al. (2009) zeigten die Vorteile der Vitrifikation im Blastozystenstadium auf: Die Vitrifikation kann flexibler durchgeführt werden und ermöglicht eine individuelle Kryokonservierung zum Zeitpunkt des optimalen Entwicklungsstadiums der Zellen.

2.6.4.4. Andere Gewebezellen/Organe am Beispiel von Ovargewebe

Die Kryokonservierung von Geweben und Organen ist um einiges komplizierter und schwieriger. Es erfordert viel Zeit, bis das Kryoprotektivum das Organ durchdrungen hat und auch bis das gesamte Organ die Temperatur erreicht hat, die zur Kryokonservierung benötigt wird. Gewebe geht zugrunde, wenn es nicht durchblutet wird, auch wenn die Temperatur sehr niedrig ist. Bei sehr niedrigen Temperaturen wird auch die Perfusion des Organs mit kryoprotektiven Lösungen verlangsamt. Außerdem können die Organe schon durch sehr geringe Mengen an Eiskristallbildung Schaden davontragen, was durch die engen Zell-Zell-Verbindungen bedingt ist, die für die Organfunktion erhalten bleiben müssen (BEST 1990).

Ein Beispiel für die mögliche Vitrifikation von Organen stellt das Ovargewebe dar. Normalerweise wird Ovargewebe durch langsames Einfrieren kryokonserviert. Die Vitrifikation, welche eine günstige und schnelle Methode darstellt, ist in der Praxis immer noch schwierig umzusetzen, da Ovargewebe viele verschiedene physische Strukturen und unterschiedliche Zelltypen enthält. Ovargewebe unterscheidet sich von isolierten Zellen. Es besitzt eine spezifizierte Geometrie, verschiedene Zelltypen, eine hohe Zelldichte und ein Gefäßsystem. LI et al. (2007) modifizierten die konventionelle Vitrifikation und erachteten die Vitrifikation von Ovargewebe ohne Carrier als effektiv, einfach und kostengünstig. Nach dem Wiedererwärmen behielten die meisten Follikel ein morphologisch normales Aussehen und das Gewebe war endokrin funktionsfähig. WANG et al. (2008) beschrieben eine neuartige nadel-getränkte Vitrifikation (needle immersed vitrification) als sehr erfolgreich, die ein weniger konzentriertes und minimales Volumen an Vitrifikationslösung bedarf. Im Vergleich zum langsamen Einfrieren zeigten sich bei dieser Vitrifikationsmethode mehr morphologisch normale Primordial- und Sekundärfollikel, eine bessere Erhaltung der Struktur der Bindegewebszellen und ein zufrieden stellendes Ergebnis in den Überlebensraten der Zellen. HUANG et al. (2008) führten die Vitrifikation von Eierstockgewebe mittels SSV (Solid Surface Vitrification) durch, wie ursprünglich von DINNYES et al. (2000) für Eizellen beschrieben. Dabei werden Zellen/Gewebe auf einer vorgekühlten $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten Metalloberfläche vitrifiziert. HUANG et al. (2008) verglichen das langsame Einfrieren und diese Vitrifikationsmethode miteinander. Die Mehrzahl der Primordialfollikel blieb nach EAP

bei beiden Methoden intakt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Schädigung des Genoms der Follikel- oder Bindegewebszellen mittels TUNEL-Test festgestellt werden. Die Kryokonservierung von Eierstockgewebe hat verschiedene Vorteile gegenüber der Kryokonservierung von Eizellen und Embryos, besonders für Patientinnen mit Krebserkrankungen:

- a) das Eierstockgewebe enthält vor der Menopause normalerweise viele Primordialfollikel im „schlafenden“ Stadium;
- b) die Kryokonservierung von Eierstockgewebe kann die endokrinen Funktionen des Eierstocks bewahren, was durch Kryokonservierung von Eizellen oder Embryos nicht erreichbar ist;
- c) Eierstockgewebe kann relativ einfach durch Laparoskopie/Laparotomie und unabhängig vom Zeitpunkt des Menstruationszyklus gewonnen werden;
- d) Primordialfollikel sind theoretisch weniger kryosensitiv als reife Eizellen, weil das Gewebe eine geringere Metabolisierungsrate hat und sich die Eizellen darin in der Prophase I der Meiose – ohne Zona pellucida, aber mit einer geringen Menge an kälteempfindlichen intrazellulären Lipiden – befindet;

SANCHEZ-SERRANO et al. (2010) berichteten über die Geburt von gesunden Zwillingen nach Vitrifikation von Eizellen und Eierstockgewebe einer 36-jährigen an Brustkrebs erkrankten Frau nach einer Chemotherapiebehandlung. Das vor Beginn der Behandlung entnommene Eierstockgewebe wurde nach durchgeführter Therapie autotransplantiert. Es fand eine kontrollierte Stimulation der Eierstöcke statt, wobei einige Eizellen gewonnen wurden. Nach EAP mittels Vitrifikationsmethode wurden die Eizellen für eine IVF verwendet. Die Embryoentwicklung verlief ohne Auffälligkeiten, der intrauterine Transfer wurde durchgeführt und eine Implantation fand statt. Die Studie zeigte, dass die Kryokonservierung von Eierstockgewebe mit nachfolgender Autotransplantation bei Kinderwunsch die Fruchtbarkeit erhalten kann.

2.6.5. Vorteile der Vitrifikationsmethode

Die Methode der Vitrifikation bietet einige Vorteile, die im Folgenden kurz angesprochen werden.

2.6.5.1. Vermeidung von Eiskristallbildung

Dem langsamen Frieren sind Grenzen gesetzt. Manche Zelltypen (z.B. Schweineembryos, menschliche Eizellen der Metaphase II, komplexe Zellsysteme wie Blastozysten mit flüssigkeitsgefüllten Höhlen), die empfindlich auf das Abkühlen reagieren, bis hin zu allen Stadien der Präimplantation – wie humane Embryonen und Eizellen, sind gegenüber Kryokonservierungsverfahren, die mit Eiskristallbildung einhergehen, verletzlicher. Das kann u.a. durch die geringere Permeabilität der Zytoplasmamembranen von Eizellen erklärt werden. Im Allgemeinen sind die klinischen Ergebnisse der Kryokonservierung von Eizellen und Blastozysten nicht beständig gewesen, so dass das kontrollierte langsame Frieren nicht die optimale Technik für die Konservierung dieser Zellen darstellen kann (LIEBERMANN et al. 2002). Die Vitrifikationsmethode verhindert die Eiskristallbildung sowohl in den Zellen, die vitrifiziert werden (intrazellulär), als auch in der umgebenden Lösung (extrazellulär) und vermeidet so die Schädigung der Zellen (LIEBERMANN et al. 2002). Außerdem kann die Dauer des Kälteschocks reduziert und die physiologische Temperatur während des Bilanzierungsprozesses erhalten werden (KULESHOVA und LOPATA 2002).

2.6.5.2. Zeitvorteil

Der Vorgang der Vitrifikation benötigt nur wenige Sekunden (LIEBERMANN et al. 2002). Die Vitrifikationsmethode liefert bei einem geringen Probenvolumen eine deutliche Erhöhung der Gefrierate und reduziert osmotische Schäden sowie die Zeit des Kryokonservierungsprozesses (maximale Dauer von 2 - 10 Minuten). Beim langsamen Frieren mit programmierten Einfriergeräten, dauert der gesamte Frierprozess mit Äquilibration, Abkühlen und Eis-Seeding 30 - 60 Minuten oder länger. Die Vitrifikation ist vorteilhaft im Vergleich zu „langsamen“ Methoden, weil keine teure Ausrüstung benötigt wird und nur wenige Sekunden für die Kryokonservierung und das Aufwärmen erforderlich sind (NAWROTH et al. 2002). Kürzere Protokolle bei der Vitrifikation ermöglichen es dem Laborpersonal, viel flexibler arbeiten zu können und bringen eine große Zeitersparnis mit sich. Außerdem kann optimales Timing bei der Kryokonservierung von Embryonen erfolgen, d.h. individuelle Blastozysten können zum Zeitpunkt eines bestmöglichen Entwicklungsstadiums gefroren werden (LIEBERMANN und TUCKER 2006).

2.6.5.3. Einfachheit

Die Vitrifikation ist ein ultraschnelles Verfahren zum Frieren von Zellen oder Gewebe. Sie basiert auf dem direkten Kontakt zwischen der Vitrifikationslösung – mit oder ohne Kryoprotektiva – und dem flüssigen Stickstoff. Die Anleitungen für die Vitrifikation sind sehr einfach. Das einzufrierende Material wird mit der kryoprotektiven Lösung zusammengebracht und dann direkt in flüssigen Stickstoff getaucht (LIEBERMANN et al. 2002). Die computergesteuerten Einfriergeräte bedürfen im Gegensatz dazu einer komplizierten Programmierung. Der Einfriervorgang wird vollständig durch die Maschine übernommen, was bei falscher Handhabung oder bei fehlerhafter Programmierung Probleme zur Folge hat. Die Vitrifikationsmethode verwendet sehr einfache Protokolle, sie benötigt keine Kryoprotektiva, sie ist schnell und einfach und sie erfordert kein spezielles kryobiologisches Equipment oder Chemikalien. Das Verfahren kann also in jedem standardisiert ausgerüsteten Labor durchgeführt werden (ISACHENKO et al. 2003 a, b).

2.6.5.4. Kostenfaktor

Im Vergleich zum langsamen Frieren mit dem Einfriergerät werden für die Vitrifikation keine Einfriergeräte benötigt, was das Verfahren aus ökonomischer Sicht sehr interessant macht, da es nur geringe Kosten verursacht (LIEBERMANN et al. 2002). Konventionell angewendete Einfriergeräte müssen dagegen regelmäßig gewartet werden, damit sichergestellt ist, dass keine fehlerhaften Prozesse beim Einfrieren stattfinden. Der Vitrifikationsprozess ist damit einfach, zeiteffizient und erfordert kein teures Equipment (OBERSTEIN et al. 2000).

2.7. Eigene Fragestellung

Ziel dieser Untersuchung ist:

- das **Aufzeigen und Vergleichen der Spermienqualitätsveränderungen** nach dem **Einfrier-Auftau-Prozess** mit dem **langsamen computergesteuerten Einfriergerät** und der **schnellen Vitrifikationsmethode** in der **Gesamtgruppe**, der **fertilen und der subfertilen Gruppe**
- die **Darstellung der durch die Kryokonservierungsmethoden verursachten Spermenschäden** unter Anwendung verschiedener **Färbemethoden**, die Auskunft über die **DNA-Kondensation (CMA3)**, die **DNA-Integrität (TUNEL)**, die **Akrosomenintaktheit (CON A)** sowie die **Vitalität (Eosintest)** und die **Membranintegrität (HOS-Test)** geben
- die **Beurteilung der Veränderungen** auf die **Spermienqualität** nach Anwendung der jeweiligen **Kryokonservierungsmethode** und die **vergleichende Betrachtung** dieser **Ergebnisse**

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Beobachtungsgut/Material

Für diese Studie wurden Samenproben von insgesamt 41 Personen im Alter von 22 - 57 Jahren verwendet, davon Proben von 20 subfertilen Patienten des IVF-Labors mit bestehendem Kinderwunsch, sowie Proben von 21 fertilen Männern (Abb. 13).

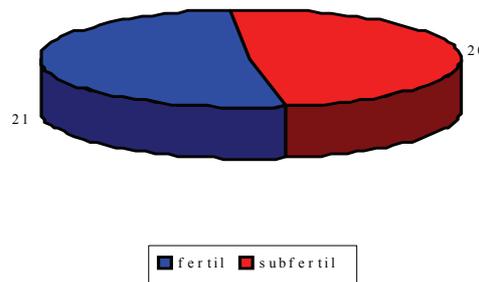


Abbildung 13: Anzahl der fertilen und subfertilen Proben

3.2. Gewinnung der Samenproben

Die Samenproben wurden nach zwei- bis viertägiger Karenz durch Masturbation in ein steriles Kunststoffgefäß in einem dafür vorgesehenen Raum des IVF-Labors gewonnen oder von den Probanden innerhalb von 30 Minuten nach Ejakulation ins Labor gebracht.

3.3. Das Spermogramm nach WHO-Kriterien

Normwerte für Ejakulatuntersuchungen entsprechend WHO-Richtlinien (Abb.14)

Verflüssigungszeit: < 60 Minuten

Volumen: > 2 ml; pH: > 7,2

Spermatozonenkonzentration: > 20 x 10⁶/ml

Gesamt-Spermatozonenzahl: > 40 x 10⁶

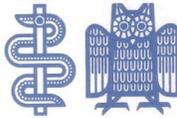
Motilität: > 40 % Beweglichkeit der Kategorien a + b (Globalmotilität), *oder* > 25 %

Beweglichkeit der Kategorie a (Progressivmotilität)

Morphologie: > 15 % Spermatozoen mit normaler Morphologie

Vitalität > 50 % lebende Spermatozoen

Leukozyten: < 1 x 10⁶/ml



(Zul. gemäß § 121a SGB V)

Lfd. Nr.:

Name des Patienten: Vorname: ID:

[Name der Patientin: Vorname:]

Spermogramm nach WHO Datum Uhrzeit

An den Hausarzt
oder überweisenden Arzt:

1. Makroskopische Untersuchung			[Normalwerte]
Volumen [ml]	normal/abnormal		2,0 ml
Karenzzeit [Tage]			3 Tage
Verflüssigung [Minuten]	normal/abnormal		15 bis 30 Minuten
Konsistenz (Viskosität)	normal/abnormal		
pH-Wert			7,2 bis 8,0
Cytur-Test	positiv/negativ		negativ

2. Mikroskopische Untersuchung			[Normalwerte]
Spermatozendichte			>20 * 10 ⁶
Motilität global [%]			>40%
Motilität progressiv [%]			>25%

3. Vitalitätstest			[Normalwerte]
Eosin-Test	ungefärbte (vitale) Spermien [%]		> 50%
	gefärbte (tote) Spermien [%]		
Hos-Test	geschwollene (vitale) Spermien [%]		> 60%
	nicht geschwollene (tote) Spermien [%]		

4. Spermien-Funktions-Test			[Normalwerte]
Penetrakt-Test [mm]	normal/abnormal		> 30mm
Mar-Test [%]	normal/abnormal		< 10% anhaft.
Immunobead-Test [%]	normal/abnormal		< 28% anhaft.
Akrosinaktivität [µm]	normal/abnormal		14µm

©L.F. Seyfried 1995

Lfd. Nr.:

Seite 2 zum Spermogramm Patient Untersuchung am

5. Spermocytogramm im gefärbten Abstrich			[Normalwerte]
Chromatin-Kondensation (Anilinblau) [%]	normal/abnormal		< 25% gefärbt
Morphologie (strict criteria) [%]			
morphologisch normale Spermatozoen			> 14% normal

6. Bakteriologische Untersuchung	
Erreger-Resistenz-Test	
Chlamydien	
Mykoplasma	
Pilz	am entnommen, Ergebnisse stehen noch aus.

7. Biochemische Untersuchung		[Normalwerte]
Zink [mmol/Ejakulat]		> 2,4 mmol
Zitronensäure [mmol/Ejakulat]		> 5,2 mmol
Fruktose [mmol/Ejakulat]		> 13 mmol
Saure Phosphatase [U/Ejakulat]		> 200 E.
Alpha-Glukosidase neutral [mU/Ejakulat]		20 mE.

8. Aufarbeitung/Methode			
Methode	Spermatozendichte >20 Mio./ml	Motilität >50%	Bemerkungen
Swim-up			
Percoll			
Glaswolle			
Sonstiges			

9. Beurteilung

10. Therapievorschlag

©L.F. Seyfried 1995

Abbildung 14: Das Spermogramm

3.3.1. Beurteilung der Viskosität und Volumenbestimmung

Unmittelbar nach der Ejakulation besitzt das Sperma eine gallertige, zähflüssige bis fadenziehende Konsistenz. Dadurch soll beim Geschlechtsverkehr ein sofortiges Herausfließen aus der Vagina verhindert werden, was mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit einer möglichen Schwangerschaft einhergehen würde.

Nach einer Verflüssigungszeit von 30 - 60 Minuten, in welcher die Proben auf einer Wärmeplatte bei 37 °C aufbewahrt wurden, fand eine makro- und mikroskopische Beurteilung des Ejakulates bzw. der Spermien nach WHO-Kriterien (1999) statt.

Zunächst wurde die Viskosität beurteilt und zwischen normal verflüssigt, leicht verflüssigt und zähflüssig/dickflüssig (Hyperviskosität) unterschieden. Danach wurde das gesamte Probenmaterial zur Bestimmung des Volumens in eine sterile Konustube (Falcon, Plymouth, England) gegeben und das Volumen anhand der aufgedruckten Skala abgelesen. Nach WHO-Bestimmungen werden zwischen 2 ml und 6 ml als Norm angesehen (WHO 1999).

Volumenangaben:

- Volumen 0 ml: Aspermie
- Volumen < 2,0 ml: Hypospermie
- Volumen > 2,0 ml: normal
- Volumen > 6,0 ml: Hyperspermie

Bei geringem Volumen ist von einer Störung der Funktion der Samenbläschen (Glandulae seminalis) auszugehen, die für die Menge des Ejakulates verantwortlich sind. Ohne die Flüssigkeit der Samenbläschen lässt die Beweglichkeit der Spermien schnell nach, da diese einen wichtigen Bestandteil enthält, welchen die Spermien für ihre Bewegung verstoffwechseln, die Fruktose. Daher kann die Konzentration der Fruktose im Ejakulat Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der Glandulae seminalis geben.

3.3.2. Bestimmung des pH-Wertes

Zur pH-Bestimmung wurde Spezialindikatorpapier mit einem pH-Bereich von 6,6 - 10,0 (Merck) verwendet. Dazu wurden 5 µl des verflüssigten Nativspermas mittels Pipette auf den Indikatorstreifen verteilt und nach 30 Sekunden – mit Auftreten einer gleichmäßigen Verfärbung – mit dem Kontrollstreifen verglichen und der dazugehörige Wert notiert. Der

pH- Wert liegt normalerweise zwischen 7,2 und 7,8 (WHO 1999), kann sich jedoch mit zunehmender Dauer nach Ejakulation sowie bei akuten Erkrankungen der Prostata oder der Samenblase weiter in den alkalischen Bereich verschieben.

3.3.3. Cyturtest

Der Cyturtest untersucht das Vorkommen von Leukozyten im Ejakulat. Dazu wurden 5 µl des verflüssigten Nativspermas auf einen Teststreifen (Roche) pipettiert. Nach einer Minute konnte man anhand eines Farbumschlages semi-quantitativ ablesen, wie viele Leukozyten in der Probe enthalten sind. Eine negative Reaktion, also das Fehlen von Leukozyten, gilt als normal (WHO 1999).

3.3.4. Spermatozoendichte

Zur Beurteilung der Spermatozoendichte wurden 5 µl des verflüssigten Nativspermas in die Vertiefung einer Zählkammer (MAKLER 1980, Abb. 15) gegeben und mit einem speziellen Deckglas verschlossen. Das Deckglas enthält auf der Unterseite eine eingravierte quadratische Fläche, die wiederum aus 100 Quadraten aufgebaut ist. Von den Quadraten wurden zur quantitativen Bestimmung der Spermienanzahl dreimal zehn Quadrate ausgezählt. Der Mittelwert der daraus resultierenden Anzahl entspricht der Spermatozoendichte in Millionen pro Milliliter. Diese soll nach WHO-Kriterien über 20 Millionen Spermien pro Milliliter liegen. Entspricht das Ergebnis nicht den erforderlichen Kriterien, können je nach Schweregrad Insemination, IVF oder ICSI als Therapie sinnvoll sein.



Abbildung 15: Die Zählkammer nach MAKLER

In der vorliegenden Studie wurden die Samenproben anhand von zwei Kriterien in eine fertile und eine subfertile Gruppe unterteilt. Eines der Kriterien war die Spermatozoendichte. Es wurde zwischen Proben mit einer Spermatozoendichte größer als 20 Millionen pro Milliliter und Proben mit 20 Millionen Spermien oder weniger pro Milliliter unterschieden.

Im Folgenden musste noch die Spermienmotilität (siehe 3.3.5.) als zweites Kriterium untersucht werden, um die Proben der Gruppe I (= fertil) oder der Gruppe II (= subfertil) zuzuordnen.

3.3.5. Spermienmotilität

Ein Spermium ist etwa 60 µm lang und setzt sich aus folgenden Teilen zusammen (Abb. 16):

- a) Kopf: enthält den Kern mit den Erbinformationen; der kappenförmige Anteil, das Akrosom, ist reich an Enzymen, die bei der Befruchtung der weiblichen Eizelle eine Rolle spielen.
- b) Halsstück
- c) Mittelstück: beinhaltet die Mitochondrien, die der Energiegewinnung dienen.
- d) Schwanzstück: übt wellenförmige zur Fortbewegung aus.

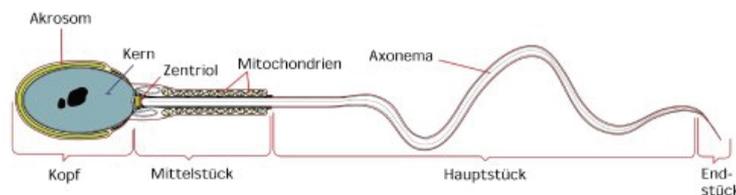


Abbildung 16: Aufbau eines Spermiums

(http://www.urologielehrbuch.de/hodenanatomie_02.html)

Die Beurteilung der Spermienmotilität erfolgt ebenfalls in der Zählkammer nach MAKLER.

Bestimmt wird die Motilität anhand der Unterscheidung in die Kategorien a - d:

- a: linear progressiv (schnelle Vorwärtsbewegung)
- b: progressiv (langsame ungeordnete Vorwärtsbewegung)
- c: nicht progressiv (nur lokale Beweglichkeit, Kreisschwimmer)
- d: immotil (keine Beweglichkeit)

Die Normwerte liegen für die Progressivmotilität bei $> 25\%$ in der Kategorie a und für die Globalmotilität bei $> 40\%$ in den Kategorien a und b zusammen (WHO 1999).

Neben dem Kriterium der Spermatozoendichte (siehe 3.3.4.) wurde die Spermienmotilität als zweites Einteilungskriterium untersucht. Es wurde zwischen einer Globalmotilität $> 40\%$ oder 40% und weniger unterschieden.

Bei einer Spermiedichte größer als 20 Millionen Spermien pro Milliliter und bei einer gleichzeitig bestehenden Globalmotilität höher als 40% wurden die Proben der fertilen Gruppe I mit $n_I = 21$ zugeordnet. War dies nicht der Fall, gehörten sie der subfertilen Gruppe II mit $n_{II} = 20$ an.

3.3.6. Vitalitätstests: Eosin-Test und Hypoosmotischer Spermischwelltest (HOS-Test)

Die funktionelle und strukturelle Integrität der Spermienmembran ist entscheidend für die Lebensfähigkeit des Spermiums.

Prinzip des Eosin-Tests

Der im Allgemeinen angewendete Eosin-Test zur Beurteilung der Spermienmembran macht nur Aussagen über die strukturelle Intaktheit. Intakte Zellen schließen Eosin aus, wohingegen tote Zellen (d.h. solche mit geschädigten Plasmamembranen) die rote Farbe des Eosins aufnehmen.

Beim Eosin-Test wurden $5\ \mu\text{l}$ verflüssigtes Nativsperma auf einen Objektträger pipettiert, dort mit der äquivalenten Menge an Eosinlösung (Eosinlösung 1% , Apotheke der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg) vermischt und mit einem Deckglas abgedeckt.

Nun wurden 100 Spermien unter dem Mikroskop ausgezählt und in ungefärbte (vitale) und rot gefärbte (avitale) Spermien unterteilt. Der Eosin-Test betrachtet insbesondere den Kopfteil des Spermiums. Liegt eine Schädigung der Membran vor, dringt roter Farbstoff ins Zytoplasma der Keimzelle ein. Nach WHO-Kriterien sollen mehr als 50% der ausgezählten Spermien ungefärbt sein.

Prinzip des HOS-Tests

Der hypoosmotische Spermischwelltest, der für menschliche Spermien entwickelt wurde (JEYENDRAN 1984), ermöglicht die Bewertung des funktionellen Zustandes der Spermienmembran. Das Prinzip des HOS-Tests ist in der Wasserdiffusion durch die Membran des Spermischwanzes unter hypoosmotischen Bedingungen begründet. Der Test basiert auf der Fähigkeit lebender Spermatozoen, mäßiger hypoosmotischer Belastung Stand zu halten. Tote Spermatozoen, deren Plasmamembranen nicht mehr intakt sind, zeigen keine Schwellung. Folglich wird der Anteil an Spermatozoen, der unter Testbedingungen kontrolliertes Anschwellen zeigt, als lebendiger Anteil mit geringer osmotischer Verletzlichkeit betrachtet.

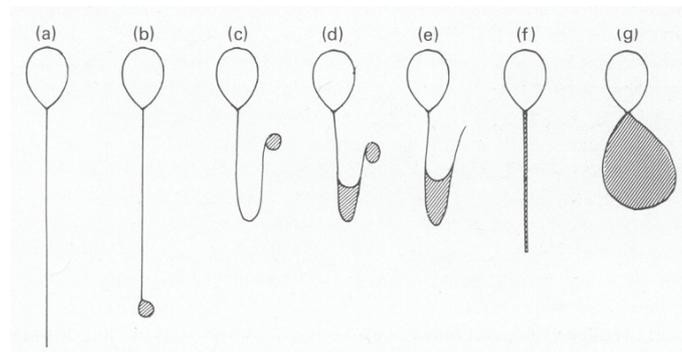


Abbildung 17: Verschiedene Formen der geschwollenen Spermien

(JEYENDRAN et al. 1984)

Der hypoosmotische Spermischwelltest (HOS-Test, hypoosmotic swell test) dient neben dem Eosin-Test zur Beurteilung der Vitalität. Als hypoosmotisches Medium wurde eine Lösung aus D-Fructose (2,75 g / 100 ml Aqua dest., 150 mOsmol/kg; Sigma, Deutschland) und aus tri-Natriumcitrat-Dihydrat z.A. (1,47 g / 100 ml Aqua dest., 150 mOsmol/kg; Sigma, Deutschland) hergestellt. Diese Lösung wurde zu je 1,0 ml in Eppendorfgefäße pipettiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren und gelagert. In ein aufgetautes Eppendorfgefäß, das 1 ml der Schwell-Lösung enthält, wurden 100 µl des verflüssigten Nativspermas hinzu gegeben und mit einer Pipette vorsichtig durchmischt. Das Gemisch wurde circa 45 Minuten bis zu einer Stunde bei 37 °C auf einer Wärmeplatte gelagert. Danach wurden 10 µl Gemisch auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Anschließend erfolgte die Beurteilung unter dem Mikroskop. Hierbei wurden nun Änderungen der Schwanzformen beurteilt (Abb. 17). Der HOS-Test wird als normal beurteilt, wenn mehr als 60 % der Spermischwänze anschwellen (WHO 1999).

3.3.7. Mixed Antiglobulin Reaction Test, MAR-Test (Gemischter Antiglobulin-Test)

Dieser Test weist auf der Oberfläche der Spermien gebundene Antikörper nach (Abb. 18). Er ist eine Referenzmethode zum Nachweis spermatozoenspezifischer IgG-Antikörper (WHO 1999).

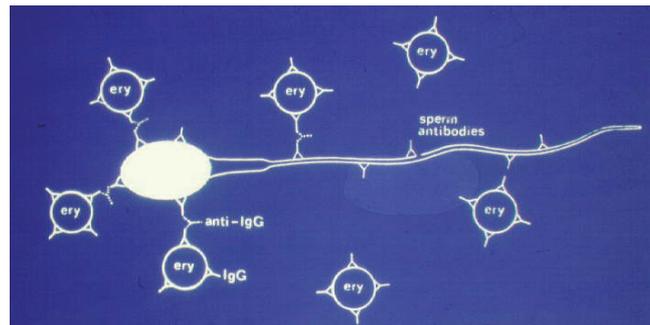


Abbildung 18: Prinzip des MAR-Tests

(<http://www.med.uni-giessen.de/infoweb/data/sperms/large/65.jpg>)

Prinzip des MAR-Tests

5 µl des verflüssigten Ejakulates, 5 µl IgG-beschichtete Latexpartikel (FertiPro, Beemen, Belgien) und 5 µl Antihuman-IgG-Antiserum (FertiPro, Beemen, Belgien) wurden auf einen Objektträger gegeben, gemischt und mit einem Deckglas abgedeckt. Durch die Vermischung von Antikörpern und dem auf der Spermatozoenoberfläche vorhandenem IgG kommt es zu einer Agglutination zwischen Latexpartikeln und Spermien.

Nach circa 5 Minuten wurde der Test unter dem Mikroskop beurteilt. Wenn $\geq 50\%$ der motilen Spermien agglutiniert sind, kann eine biologische Infertilität angenommen werden.

Normalerweise sollte die Anzahl der agglutinierten Spermien weniger als 10 % betragen (WHO 1999).

3.3.8. Spermienmorphologiebeurteilung mittels Papanicolaou-Färbung

Prinzip der Papanicolaou-Färbung

Die am weitesten verbreitete Färbetechnik ist die von Papanicolaou. Sie stellt eine der besten Differential-Färbemethoden für Spermien dar. Die Papanicolaou-Färbung unterscheidet klar zwischen basophilen und acidophilen Zellkomponenten und erlaubt eine detaillierte

Untersuchung des Chromatinmusters. Sie hat sich auch als nützlich zur Beurteilung der Morphologie von menschlichen Spermien und unreifen Keimzellen erwiesen. Die Anzahl normalgeformter Spermatozoen spielt eine wichtige Rolle für die Fertilitätsprognose. Die Ausstrichpräparate eines unauffälligen Ejakulates zeigen aber oftmals ein "gemischtes" Bild, d.h. zusätzlich zu den normalgeformten Spermatozoen findet man regelmäßig verschiedene Abweichungen von der Normalform. Spermatozoenzahl und -motilität können individuell starken Schwankungen unterliegen. Die Analyse der Spermatozoenmorphologie ist ein stabiler Faktor in der andrologischen Labordiagnostik, d.h. der Patient zeigt zumeist ein gleich bleibendes, individuelles "Muster" strukturell-testikulär bedingter Formabweichungen.

Bei Beurteilung der Morphologie der Spermien wurden v.a. Abnormitäten im Bereich des Kopfes und des Schwanzes beurteilt. Dazu wurden zunächst Ausstriche der verflüssigten Nativspermas und Ausstriche nach dem EAP mittels der verschiedenen Friermethoden nach Papanicolaou gefärbt. Die Auszählung erfolgte durch Fachpersonal des Labors mit Hilfe eines Mikroskops unter 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl. Dabei wurden 100 Spermien gezählt und in Normal- und Fehlform unterteilt. Nach WHO-Kriterien sollten mehr als 14 % der ausgezählten Spermien normal sein.

Tabelle 4: Für Spermien modifizierte Papanicolaou-Färbung

Arbeitsschritt	Lösung	Vorgang
1	Ethanol 80 %	2 min spülen
2	Ethanol 80 %	2 min spülen
3	Aqua dest.	2 min spülen
4	Hämatoxylin *	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	2 min spülen
10	Ethanol	2 min spülen
11	Ethanol	2 min spülen
12	Orange G-Lösung **	2 min färben
13	Ethanol	2 min spülen
14	Ethanol	2 min spülen
15	Ethanol	2 min spülen
16	EA 50-Lösung ***	2 min färben
17	Ethanol	2 min spülen
18	Ethanol	2 min spülen
19	Ethanol	2 min spülen
20	Ethanol	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

* Papanicolaou-Lösung 1b Hämatoxylinlösung S

** Papanicolaou-Lösung 2b Orange II-Lösung

*** Papanicolaou-Lösung 3b Polychromlösung EA 50

Danach wurden die gefärbten Objektträger getrocknet und mit Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Deutschland) und einem Deckglas abgedeckt.

3.4. Aufbereitung der Proben und Einfrieren

Die Vorbereitung zum Einfrieren der Proben wurde in mehreren Stufen durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden sollen. Zunächst wurde die Frierlösung hergestellt, deren Inhaltsstoffe weiter unten aufgeführt werden.

3.4.1. Human Sperm Preservation Medium (HSPM)

POLGE hat 1949 die kryoprotektive Wirkung des Glycerols entdeckt, welches die Basis des heutzutage häufig in der Kryotechnik angewendeten Kryoprotektionsmediums **Human Sperm Preservation Medium (HSPM)** bildet. Durch Erniedrigung des Gefrierpunktes und Ausbildung einer Äquivalenz zwischen den Flüssigkeiten innerhalb und außerhalb der Zelle durch das Glycerol wird die intrazelluläre Kristallbildung reduziert.

Rezeptur 1: Human Sperm Preservation Medium (HSPM)

Lösung I		
Substanz	Menge	in 100 ml Aqua bidest. lösen; bei -20 °C 3 Monate haltbar
NaCl	2,9 g	
KCl	0,2 g	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,05 g	
Na-Lactat	1,44 g = 1,15 ml	
Na-Dihydrogenphosphat	0,025 g	
Na-Hydrogencarbonat	1,3 g	
Hepes	2,383 g	

Lösung II		
Substanz	Menge	in 57,46 ml Aqua bidest. lösen
Saccharose	1,711 g	
Glucose	0,0059 g	
20 ml von Lösung I zu Lösung II geben, dazu		
Glycerin	15,8 g = 13 ml (Falconröhrchen)	
Streptomycin	0,005 g	
Humanalbumin	2,0 g = 2,8 ml	
Aliquotieren und bei -20 °C einfrieren		

3.4.2. Gefrierzubehör

Für das Einfrieren der Samenproben nach den drei verschiedenen Methoden wurde folgendes Zubehör verwendet:

- a) HSPM (Human Sperm Preservation Medium)
- b) Eppendorf-Hütchen für die 1:1 Ejakulat-Spermienfrierlösung-Mischung
- c) Fixierspray und Pipetten (100, 200 oder 500 µl) zum Entnehmen der benötigten Volumina je nach Menge des vorhandenen Ejakulates
- d) Insulin-Einwegspritze zum Mischen des Ejakulates mit der Frierlösung und zum Befüllen der Straws
- e) French Straws und Mini Straws (Abb. 22 und 23)
- f) Klarsichtkassetten mit verschiedenen farbigen Gleitschienen zum leichteren Erkennen der Proben; dabei wurde jeder Friermethode eine bestimmte Farbe zugeordnet (Abb.24)
- g) Aufbewahrungskästen zur Lagerung der OT nach dem Auftauen bis zum Färben
- h) Objektträger-Mappe zur Aufbewahrung der OT bei -20 °C nach dem Färben bis zur Auswertung

3.4.3. Verwendete Friermethoden

Nach der Verflüssigung wurden von jeder Samenprobe einige Nativausstriche für die späteren spezifischen Tests (CMA3 = Chromomycin A3; TUNEL = Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling; CON A = Concanavalin A-Lectin) angefertigt und nach einer Trocknungszeit von 5 Minuten mittels einer Sprühfixierung (Merckofix) haltbar gemacht. Die Ausstriche wurden in Aufbewahrungskästen gesammelt.

Danach wurde das benötigte Volumen für die o.g. Samenanalyse entnommen. Die verbliebene Menge des Ejakulates wurde nun im Verhältnis 1:1 in Eppendorf-Hütchen mit dem HSPM durch wiederholtes Aufziehen mit einer Einwegspritze vermischt. Dann wurde das Volumen zu gleichen Anteilen in drei Teile aufgeteilt (Diagramm 1).

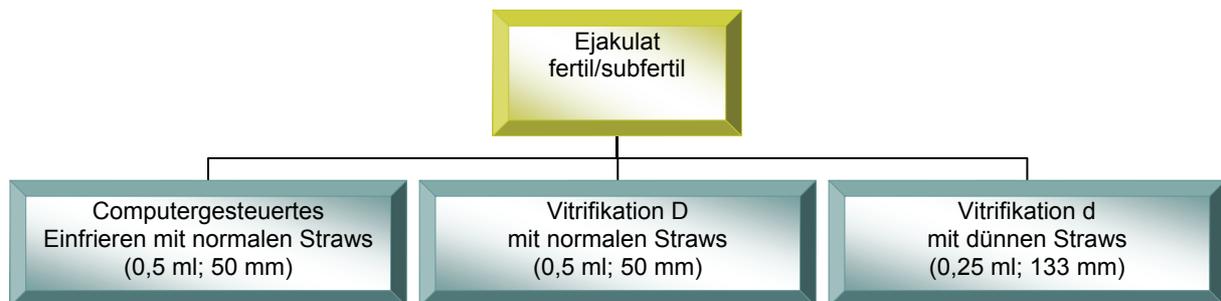


Diagramm 1: Die untersuchten Einfriermethoden

3.4.3.1. Computergesteuertes Einfriergerät

Für das Einfrieren mittels computergesteuertem Einfriergerät (controlled rate freezer) wurde ein Teil in Proberöhrchen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml und einer Länge von circa 50 mm, so genannte „French Straws“ (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland), gefüllt und mit Verschlusskugeln (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland) an beiden Enden versiegelt (Abb. 22). Die verschlossenen Röhrchen wurden in Klarsichtkassetten (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gefüllt und mit der entsprechenden Probennummer versehen, um anschließend in eine Frierschiene des Einfriergerätes (PLANER Kryo10, Serie III, MR3; Messer, Griesheim, Deutschland) (Abb. 20 und 21) eingelegt zu werden. Am Einfriergerät wurde das Einfrierprogramm „No. 3 S“ ausgewählt (siehe Kryoprotokoll, Abb. 19) und gestartet. Die Temperaturabsenkung des Programms zum Einfrieren von Spermien läuft in folgenden Schritten ab:

Tabelle 5: Ablauf des Einfrierens mit dem computergesteuerten Einfriergerät

Stufe	Gefriertrate	Temperatur am Ende der Stufe
1	1 °C pro Minute	+21 °C
2	5 min Halten der Temperatur	
3	20 °C pro Minute	+17 °C
4	15 °C pro Minute	+16 °C
5	11 °C pro Minute	+12 °C
6	8 °C pro Minute	-10 °C
7	21 °C pro Minute	-70 °C
8	12,5 °C pro Minute	-100 °C
9	7,5 °C pro Minute	-110 °C
10	10 °C pro Minute	-114 °C
11	25 °C pro Minute	-170 °C
12	Halten von -170 °C bis zur Entnahme der Proben	

Der Vorgang dauert ungefähr 22 - 30 Minuten.

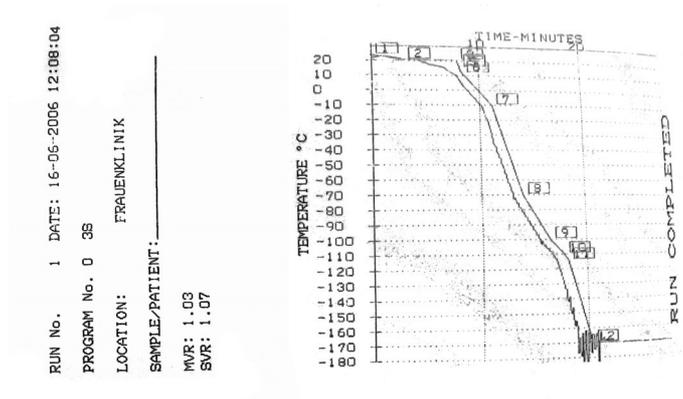


Abbildung 19: Das Kryoprotokoll

Danach wurden die Klarsichtkassetten zusammen mit den Proben in so genannte Köcher (= Metallbehälter zur Aufbewahrung der Kassetten) gestellt und in einem Dewar-Gefäß mit -196 °C kaltem, flüssigem Stickstoff bis zum Auftauen gelagert.



Abbildung 20: Das Einfriergerät



Abbildung 21: Einfriervorgang:
Haltevorrichtung für die Kassetten

3.4.3.2. Vitrifikation mit zwei verschiedenen Straw-Arten

Für die Vitrifikation D wurde ein Anteil anfänglich so gehandhabt wie für das Einfrieren mittels Einfriergerät. Die Klarsichtkassetten mit den French Straws (Abb. 22) wurden jedoch nicht mittels Einfriergerät stufenweise gefroren, sondern sie wurden sofort in die Köcher gestellt und in -196 °C kalten, flüssigen Stickstoff gebracht, also „schockgefroren“. Die gleiche Vorgehensweise wie bei der Vitrifikation D wurde für die Vitrifikation d

verwandt, nur dass dabei die Proberöhrchen ein geringeres Volumen und eine größere Oberfläche hatten. Es wurden Mini Straws zur Kryokonservierung (0,25 ml; 133 mm) mit stabförmigem Verschluss in verschiedenen Farben verwendet (Abb. 23). (MTG Medical Technology Vertriebs GmbH, Altdorf; Deutschland).



Abbildung 22: French Straws und Verschlusskugeln

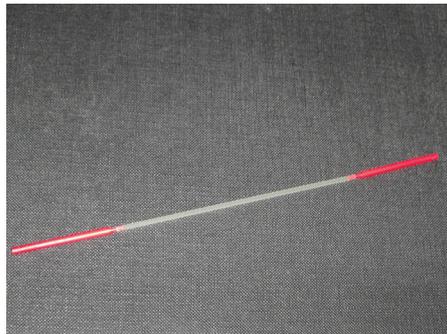


Abbildung 23: Mini Straw mit Verschlusskappen

3.4.4. Aufbewahrung der eingefrorenen Proben

Die Proben wurden im Durchschnitt 48,75 Tage in dem oben beschriebenen Dewar-Gefäß mit -196 °C kaltem, flüssigem Stickstoff bis zum Auftauen aufbewahrt (Abb. 24).



Abbildung 24: Aufbewahrung der Kassetten in Köchern im Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff

3.5. Auftauen der Proben

Nach einer mittleren Lagerungszeit von 48,75 Tagen wurden die Proben aus dem Dewar-Gefäß entnommen. Die Einfriergerät-Proben und die Vitrifikation D-Proben wurden wie folgt aufgetaut: Die Straws in den Klarsichtkassetten wurden nach der Entnahme aus dem Dewar-Gefäß in Konustuben (Falcon, Plymouth, England) gefüllt und der Konus mit einem Deckel verschlossen, um bei einem möglichen Platzen der Straws durch die plötzliche Temperaturschwankung kein Lösungsvolumen zu verlieren. Die Konusse wurden auf eine Wärmeplatte bei 37 °C gestellt. Es wurde abgewartet, bis das Ejakulat-Frierlösungsgemisch in den Straws aufgetaut war.

Bei der Vitrifikation d wurden die Mini Straws zunächst aus den Klarsichtkassetten heraus in eine Styroporwanne mit flüssigem Stickstoff gebracht. Dann wurde je ein Straw mit einer Pinzette aus der Wanne entnommen und an einem Ende geöffnet, um den im Röhrchen herrschenden Druck zu entlassen. Durch die Reibungswärme der Hände wurde das Gemisch in den Straws schnellstmöglich verflüssigt.

Der möglichst schnelle Übergang von einem in den jeweiligen anderen Aggregatzustand ist bei der letztgenannten Methode als vorteilhaft beschrieben worden. Das im Gegensatz dazu langsame Auftauen erlaubt es mikroskopisch kleinen Eiskristallen zu größeren Formen zu wachsen, von denen man weiß, dass sie Schäden verursachen (MAZUR et al. 1981).

Die aufgetauten Proben wurden wieder wie im nativen Zustand mittels Samenanalyse nach WHO-Kriterien beurteilt. Dabei wurden folgende Parameter berücksichtigt: die Spermatozoendichte, die Spermatozoenmotilität, die Vitalität (HOS-Test, Eosin-Test) und die Morphologie. Des Weiteren wurden nach dem Auftauen von jeder Methode Ausstriche für die o.g. spezifischen Tests (CMA3, TUNEL, CON A) angefertigt und in Aufbewahrungskästen bis zum späteren Gebrauch aufbewahrt.

3.6. Spezifische Tests

Für diese Tests wurde die **Phosphate Buffered Saline-Lösung (PBS)** benötigt, deren Rezeptur kurz beschrieben wird.

Rezeptur 2: Phosphate Buffered Saline (PBS)

Lösung 1 molar		
Substanz	Menge	in einem Liter Aqua dest. lösen
NaCl	8 g	
KCl	0,2 g	
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	
KH ₂ PO ₄	0,2 g	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,132 g	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,121 g	

3.6.1. Die Chromatinkondensation

3.6.1.1. Beurteilung der Chromatinkondensation der Spermien-DNA mittels Chromomycin A3 (CMA3)-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung

Chromomycin A3 ist ein glycosidisches Antibiotikum, welches durch Gärung produziert wurde, wobei *Streptomyces griseus* eine Rolle spielt. Es wird auch Toyomycin genannt.

Gebrauch:

- membran-durchlässiger Guanin/Cytosin-spezifischer fluoreszierender DNA-bindender Farbstoff
- antibakterielles Antibiotikum
- Antitumor-Antibiotikum, welches die RNA-Synthese verhindert, v.a. in soliden Tumoren

Für die vorliegende Studie war der erste Punkt von Bedeutung. Die Färbung mit Chromomycin A3 gibt Auskunft über den Kondensationszustand der Spermien-DNA. Protamine spielen eine wesentliche Rolle für den Ablauf der Chromatinkondensation. Bei Fehlen von Protaminen färbt Chromomycin A3 Sequenzen der DNA an, die Guanin- und Cytosin-reich sind und daraufhin im Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren, was auf eine unvollständige Kondensation hinweist.

Vorbereitung:

Die Ausstrichpräparate, die vor und nach EAP erstellt wurden, wurden zunächst für 5 Minuten in einer Lösung – bestehend aus einem Viertel Eisessigsäure und drei Vierteln Methanol – fixiert.

Danach wurden die Objektträger (OT) aus der Lösung entnommen und kurz zum Trocknen auf Zellstoff gelegt.

Zur Herstellung des Färbemediums wurden 10 mg des CMA3 (SIGMA, St. Louis, USA) in 40 ml PBS-Lösung gelöst. Dieser Vorgang sollte in einem abgedunkelten Bereich geschehen, da der Farbstoff sehr lichtempfindlich ist. Das Gemisch sollte danach zur Aufbewahrung in einem lichtundurchlässigen Gefäß bei +4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

Durchführung:

Die getrockneten OT wurden nun in einer Inkubationskammer verteilt, deren Boden mit etwas Wasser benetzt wurde. Im Dunkeln wurden die OT mit je 100 µl der CMA3-Lösung beschichtet. Danach wurde die Kammer geschlossen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die OT entnommen und kurz mit PBS-Lösung abgespült. Die OT wurden außerdem mit etwas Glycerin beschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Danach wurden sie zur Aufbewahrung in lichtundurchlässigen Mappen bei -18 °C im Gefrierschrank bis zur Auswertung aufbewahrt.

Auswertung:

Unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Exzitationsfilter von 490 nm wurden die gefärbten OT bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt. Es wurden je OT 100 Spermien ausgezählt, die in fluoreszierend (unvollständige Chromatinkondensation) und nicht-fluoreszierend (vollständige Chromatinkondensation) unterteilt wurden (Abb. 25 und 26).

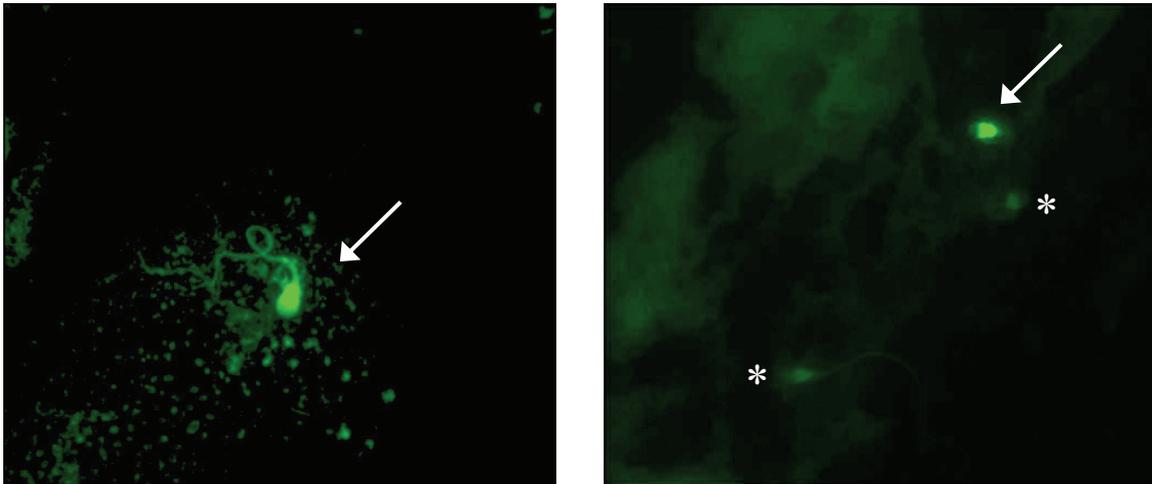


Abbildung 25 und 26: Fluoreszierende (→) und nicht-fluoreszierende (*) Spermien (CMA3-Test)

3.6.2. Die DNA-Fragmentierung

3.6.2.1. Beurteilung der Doppelstrangbrüche in der Spermien-DNA mittels TUNEL-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung

Der TUNEL-Test dient der Identifizierung apoptotischer Zellen. Die Abkürzung TUNEL steht für „Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“. Bei der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung durch Nukleasen. Dadurch werden 3'OH-Gruppen frei. Mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxyribosyltransferase (TdT) werden fluoreszenz-markierte Nukleotide (dUTP) an diese freien 3'OH-Enden angehängt. Es werden Anti-Fluorescein-Antikörper – an die Peroxidase gekoppelt ist – dazugegeben. Diese binden in einer Antigen-Antikörper-Reaktion an das Fluorescein. Durch die enzymatische Farbreaktion der Peroxidase wird die DNA-Fragmentierung im Mikroskop sichtbar.

Vorbereitung:

Die Ausstrichpräparate, die vor und nach EAP erstellt wurden, wurden zunächst in einem Gemisch bestehend aus 100 ml Natrium-Citrat-Lösung 0,1 % und 100 µl Triton, der so genannten Permeabilisationslösung, für 5 Minuten fixiert. Danach wurden die OT aus der Lösung entnommen, mit PBS-Lösung gewaschen und kurz zum Trocknen auf Zellstoff gelegt.

Durchführung:

Im Dunkeln wurden nun Label Solution (No.2) und Enzyme Solution (No.1 = Farbstoff) zusammengebracht. Dazu wurden zunächst 50 µl der Label Solution verworfen und durch 50 µl aus Lösung No.1 ersetzt und gut miteinander vermischt.

Nun wurden je 33 µl des Gemischs auf einen OT getropft und durch Auflegen eines Deckglases auf der ganzen Oberfläche verteilt. Die gefärbten OT wurden dann in der Inkubationskammer eine Stunde auf einer Wärmeplatte bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die OT mit PBS-Lösung gewaschen, wobei darauf zu achten war, dass die Deckgläser sich lösten. Die OT wurden kurz zum Antrocknen auf Zellstoff gelegt, mit etwas Glycerin beschichtet und wiederum mit einem Deckglas abgedeckt.

Auswertung:

Unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Exzitationsfilter von 490 nm wurden die gefärbten OT bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt. Es wurden je OT 100 Spermien ausgezählt, die in fluoreszierend (DNA-Doppelstrangbruch) und nicht-fluoreszierend (kein DNA-Doppelstrangbruch) unterteilt wurden (Abb. 27 und 28).

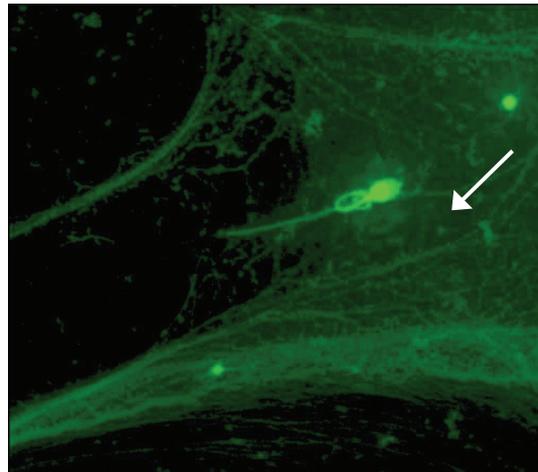


Abbildung 27: Fluoreszierendes (→) Spermium (TUNEL-Test)

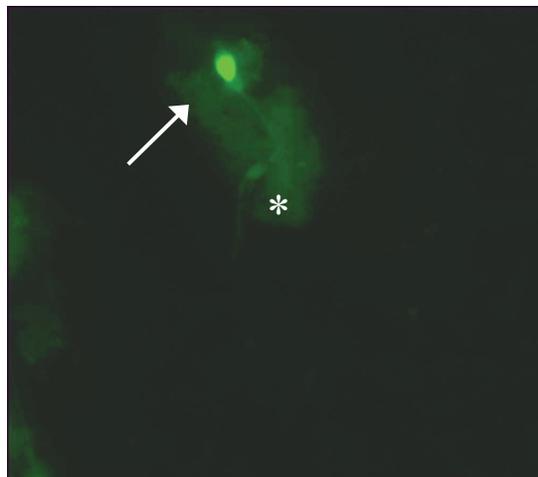


Abbildung 28: Fluoreszierendes (→) und nicht-fluoreszierendes (*) Spermium (TUNEL-Test)

3.6.3. Die Akrosomreaktion

3.6.3.1. Beurteilung des Spermienakrosoms mittels Concanavalin A-Lectin (CON A)-Färbung: Vorbereitung, Durchführung, Auswertung

Zur Vollendung der Kapazitation befindet sich das Spermium in einem Zustand, in dem es bereit ist, sich der Akrosomreaktion zu unterziehen. Die akrosomale Kappe von Spermien einiger Säugetiere ist groß genug, um unter dem Phasenkontrastmikroskop erkannt zu werden. Bei menschlichen Spermien ist dies leider nicht der Fall, so dass indirekte Methoden zur Darstellung des Vorhandenseins oder des Fehlens des Akrosoms entwickelt werden mussten. Dazu werden Fluorescein-beschichtete Lectine, monoklonale Antikörper und spezielle Färbemethoden gezählt.

Von den vielen Techniken, die heute verfügbar sind, um den Zustand des humanen Spermienakrosoms zu beurteilen, sind die fluoreszierenden Lectine am weitesten verbreitet.

Lectin von Concanavalin A (*Canavalia ensiformis*) FITC (SIGMA, St. Louis, USA), welches in dieser Arbeit verwendet wurde, bindet an Reste von D-Glucose und D-Mannose, die sich an der inneren akrosomalen Membran befinden. Voraussetzung für diese Kennzeichnung der Spermien durch Concanavalin A ist die Angreifbarkeit der inneren akrosomalen Membran durch Verlust des akrosomalen Inhaltes (HOLDEN et al. 1990).

Das Akrosom unversehrter Spermien ist intakt und kann somit nicht durch den fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. Bei geschädigten Spermien, bei denen die innere akrosomale Membran ungeschützt ist, kann sich der Farbstoff binden und die Spermienkopfregeion leuchtet.

Vorbereitung:

Von der oben genannten PBS (1 molar) wurden 10 ml genommen und diese mit 990 ml Aqua dest. gemischt, so dass eine 10 mM PBS-Lösung entstand. Diese diente als Waschlösung sowie zur Herstellung der Stammlösung und der Gebrauchslösung für die Färbung.

Die folgenden Schritte wurden in einem abgedunkelten Bereich durchgeführt, da der Farbstoff sehr lichtempfindlich ist.

Es wurden die 10 mg Concanavalin A-Lectin zunächst mit 2 ml der 10 mM PBS gelöst, etwas geschüttelt und dann vom Transportgefäß in einen Erlenmeyerkolben überführt, in den dann weitere 18 ml der 10 mM PBS gegeben wurden. Der Erlenmeyerkolben war zum Schutz vor Licht mit Alufolie umwickelt. Das Gemisch wurde mit einem Magnetrührer ein weiteres Mal durchgerührt. Die nun entstandene Lösung war die Stammlösung. Zur Herstellung der zum Färben benötigten Gebrauchslösung wurden 200 µl der Stammlösung mit 800 µl der 10 mM PBS-Lösung vermischt. Diese Menge genügte zur Färbung von 10 OT. Die Stammlösung wurde bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Durchführung:

Die Ausstriche, die vor und nach EAP angefertigt wurden, wurden zunächst mit Paraformaldehydlösung 4 % in PBS (pH = 7,4; Apotheke der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg) für 10 Minuten bedeckt. Danach wurden sie in 10 mM PBS-Lösung gewaschen und zum Trocknen auf Zellstoff ausgebreitet. Die folgende Färbung wurde im Dunkeln durchgeführt, da der fluoreszierende Farbstoff bei Licht zerfällt und so keine Fluoreszenz mehr möglich ist. Es wurden pro OT je 100 µl der Gebrauchslösung verwendet, die gleichmäßig über den OT verteilt wurde. Danach kamen die fertigen OT bei Raumtemperatur für 25 Minuten in eine mit Alufolie umwickelte Inkubationskammer, deren Boden vorher mit etwas Wasser beschichtet wurde. Nach dieser Zeit wurden die OT wieder in 10 mM PBS-Lösung gewaschen, zum Trocknen kurz auf Zellstoff gelegt und schließlich mit einem Tropfen Glycerin bedeckt, bevor ein Deckglas aufgelegt wurde.

Auswertung:

Die hergestellten OT wurden entweder sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Exzitationsfilter von 490 nm bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt, oder zur späteren Auswertung bei -18 °C im Gefrierfach in lichtundurchlässigen Mappen aufbewahrt. Es wurden je OT 100 Spermien ausgezählt, die in fluoreszierend (defektes Akrosom) und nicht-fluoreszierend (intaktes Akrosom) unterteilt wurden.

3.7. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erworbenen Daten wurde mit Hilfe von SPSS 11.0 (Statistical Package of Social Sciences) durchgeführt. Da die Daten nicht einer Normalverteilung entsprachen, standen nicht-parametrische Tests zur Verfügung. Dazu zählten der Wilcoxon-Test (Vorzeichentest) für 2 verbundene Stichproben, der zum Vergleich der unterschiedlichen Friermethoden bei der Gesamtgruppe (gleiche Proben → verbunden) angewendet wurde. Zum anderen wurde der Mann-Whitney-U-Test für 2 unverbundene Stichproben eingesetzt. Dieser Test diente dem Vergleich der subfertilen mit der fertilen Gruppe. Das Signifikanzniveau betrug bei beiden Tests $p \leq 0,05$. Die untersuchten Werte wurden durch Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (STD) und den Median anhand von Tabellen und Diagrammen dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Vergleich der Parameter in der Gesamtgruppe (fertil + subfertil) vor und nach dem Einfrieren unter Berücksichtigung der Kryokonservierungsmethode

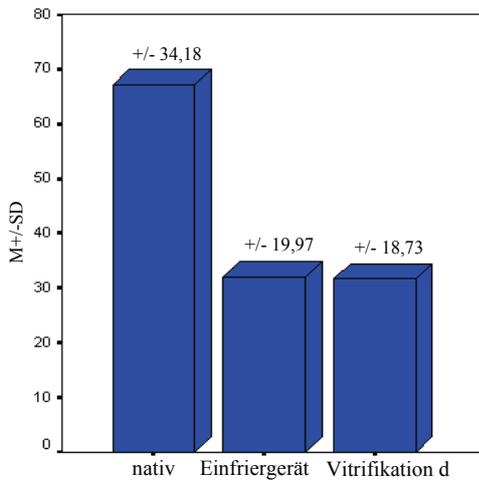
Tabelle 6: Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung der Gesamtgruppe in „Nativ“ und „Einfriergerät“; jeweilige Signifikanz nach EAP (p-Werte)

Parameter	Nativ		Einfriergerät		p-Wert
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	67,2 ± 34,18	71,0	32,0 ± 19,97	28,0	0,000
Progressivmotilität (a) [in %]	9,3 ± 9,25	5,0	2,5 ± 3,49	0,0	0,000
Globalmotilität (a+b) [in %]	37,7 ± 20,61	45,0	16,5 ± 13,50	15,0	0,000
Eosin-Test [ungefärbt in %]	46,2 ± 25,63	50,0	25,7 ± 16,97	24,0	0,000
HOS-Test [geschwollen in %]	66,4 ± 15,91	70,0	42,6 ± 13,84	40,0	0,000
Morphologie [Normalform in %]	28,8 ± 20,55	25,0	25,7 ± 18,99	17,0	0,094
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	71,6 ± 10,19	72,0	49,1 ± 18,67	46,0	0,000
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	75,7 ± 7,86	76,0	50,7 ± 10,14	50,0	0,000
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	84,3 ± 7,65	86,0	63,6 ± 12,38	64,0	0,000

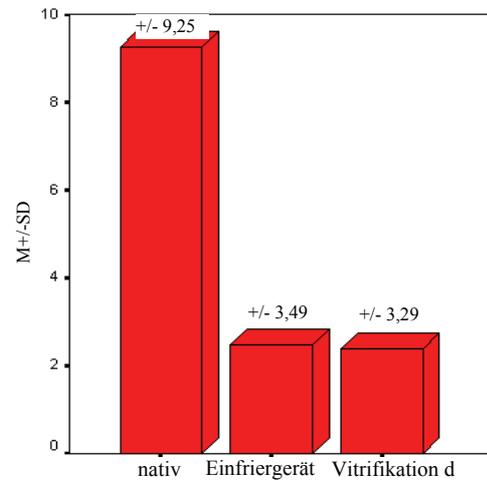
Tabelle 7: Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung der Gesamtgruppe in „Nativ“ und „Vitrifikation d“; jeweilige Signifikanz nach EAP (p-Werte)

n = 41 Parameter	Nativ		Vitrifikation d		p-Wert
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	67,2 ± 34,18	71,0	31,7 ± 18,73	31,0	0,000
Progressivmotilität (a) [in %]	9,3 ± 9,25	5,0	2,4 ± 3,29	0,0	0,000
Globalmotilität (a+b) [in %]	37,7 ± 20,61	45,0	14,3 ± 13,79	10,0	0,000
Eosin-Test [ungefärbt in %]	46,2 ± 25,63	50,0	19,2 ± 13,72	15,0	0,000
HOS-Test [geschwollen in %]	66,4 ± 15,91	70,0	43,7 ± 14,42	44,0	0,000
Morphologie [Normalform in %]	28,8 ± 20,55	25,0	25,8 ± 18,57	18,5	0,279
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	71,6 ± 10,19	72,0	48,3 ± 16,42	46,0	0,000
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	75,7 ± 7,86	76,0	51,1 ± 11,84	50,0	0,000
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	84,3 ± 7,65	86,0	64,2 ± 11,66	66,0	0,000

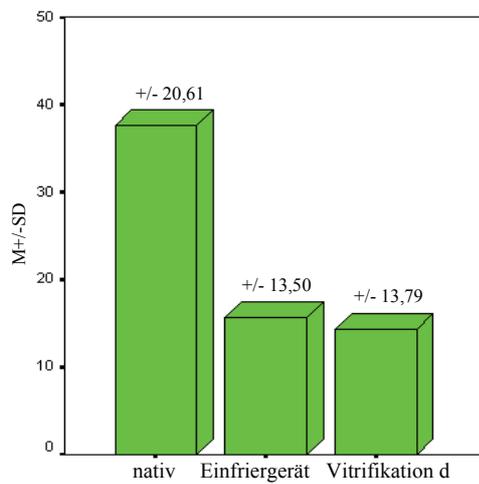
Den Tabellen 6 und 7 ist zu entnehmen, dass sich alle Parameter der Samenanalyse in der Gesamtgruppe unter Anwendung der beiden verglichenen Friermethoden zu den nativ gemessenen Werten signifikant verschlechtern (Histogramme 1 - 9). Die einzige Ausnahme bildet die Morphologie. Dort fällt die Anzahl normaler Spermien nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät von nativen $28,8 \pm 20,55$ % auf $25,7 \pm 18,99$ % und bei der Vitrifikation d sogar nur auf $25,8 \pm 18,57$ % ab, was keine signifikante Differenz nach EAP ergibt.



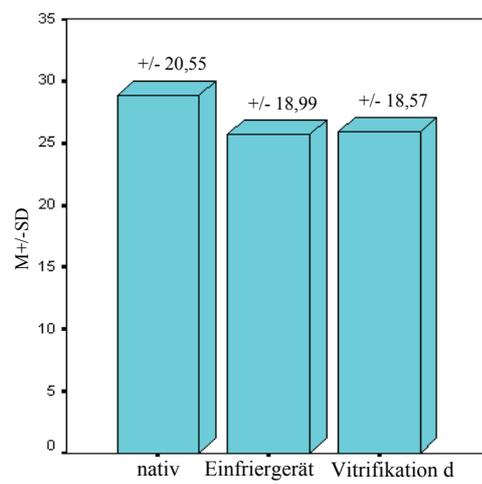
Histogramm 1: Spermiendichte



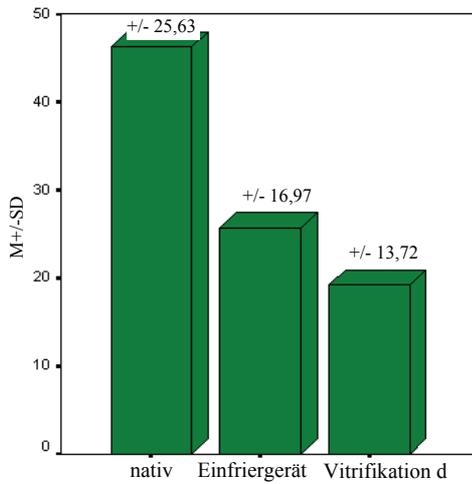
Histogramm 2: Progressivmotilität (a)



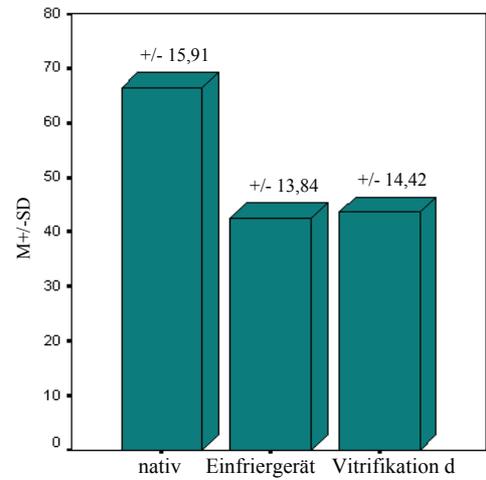
Histogramm 3: Globalmotilität (a+b)



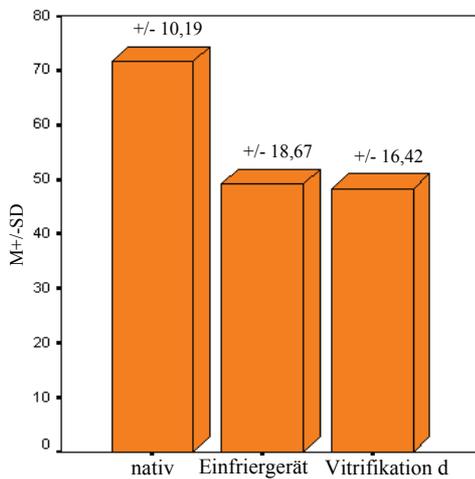
Histogramm 4: Morphologie (Normalform)



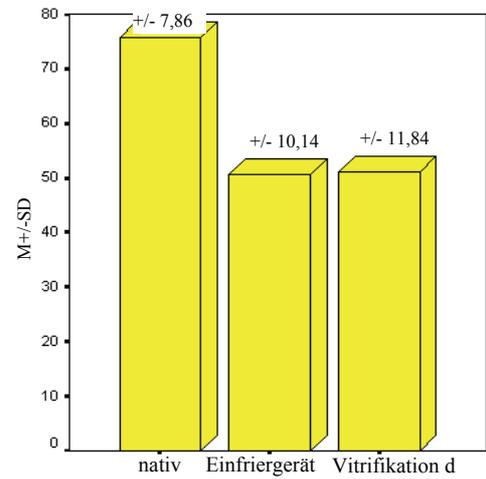
Histogramm 5: Eosin-Test
(vitale Spermien)



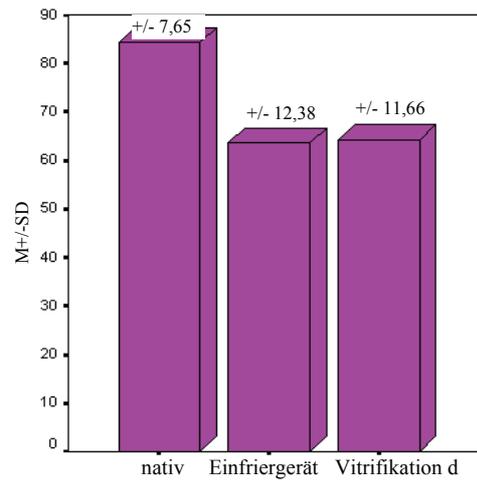
Histogramm 6: HOS-Test
(intakte Membran)



Histogramm 7: Chromomycin A3
(vollständige Kondensation)



Histogramm 8: Concanavalin A-Lectin
(Akrosomintegrität)



Histogramm 9: TUNEL (ohne DNA-Strangbruch)

Die Histogramme 1 - 9 zeigen außerdem die Unterschiede zwischen dem Einfrieren mittels Einfriergerät und der Vitrifikation d in der Gesamtgruppe auf. Im Vergleich der beiden Methoden der Kryokonservierung ergeben sich nur geringe, nicht signifikante Unterschiede. Die einzige Ausnahme bildet die Vitalität mit $p = 0,001$ zugunsten des Einfriergeräts (vgl. auch 4.2.; Tab. 8, Boxplot 1 - 3).

4.2. Veränderung der Parameter für die Gesamtgruppe nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d

Tabelle 8: Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der Gesamtgruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)

n = 41 Parameter	Einfriergerät		Vitrifikation d		p-Wert
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	32,0 ± 19,97	28,0	31,7 ± 18,73	31,0	0,840
Progressivmotilität (a) [in %]	2,5 ± 3,49	0,0	2,4 ± 3,29	0,0	0,812
Globalmotilität (a+b) [in %]	16,5 ± 13,50	15,0	14,3 ± 13,79	10,0	0,313
Eosin-Test [ungefärbt in %]	25,7 ± 16,97*	24,0	19,2 ± 13,72*	15,0	0,001*
HOS-Test [ungefärbt in %]	42,6 ± 13,84	40,0	43,7 ± 14,42	44,0	0,611
Morphologie [Normalform in %]	25,7 ± 18,99	17,0	25,8 ± 18,57	18,5	0,617
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	49,1 ± 18,67	46,0	48,3 ± 16,42	46,0	0,387
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	50,7 ± 10,14	50,0	51,1 ± 11,84	50,0	0,551
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	63,6 ± 12,38	64,0	64,2 ± 11,66	66,0	0,966

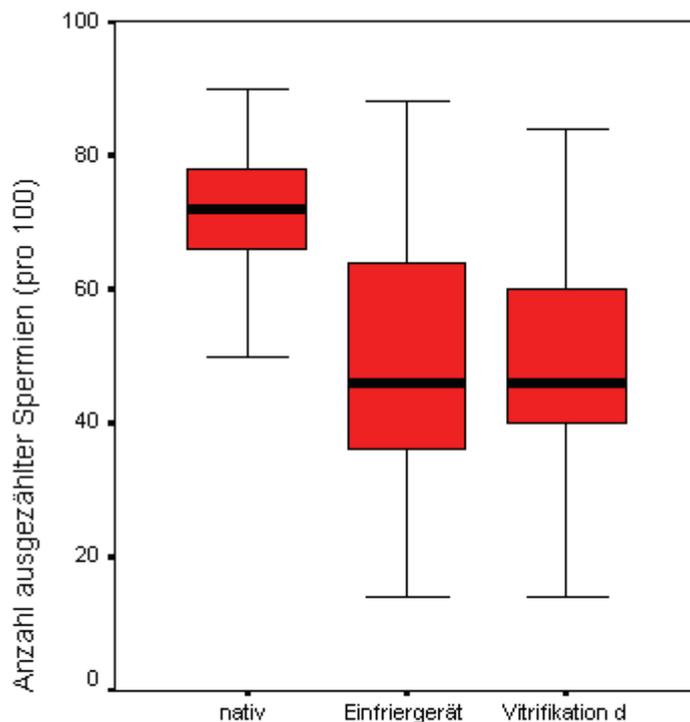
* p = 0,001 hochsignifikant

Die untersuchten Parameter unterscheiden sich im Hinblick auf die verwendete Methode bei der Gesamtgruppe nicht wesentlich voneinander (Tab. 8). Die Werte liegen bei der Einfriermethode mittels Einfriergerät als auch bei der Vitrifikation d in annähernd gleichen Bereichen. Es lassen sich nur geringe Unterschiede anhand der gebildeten Differenzen bei den einzelnen Parametern feststellen.

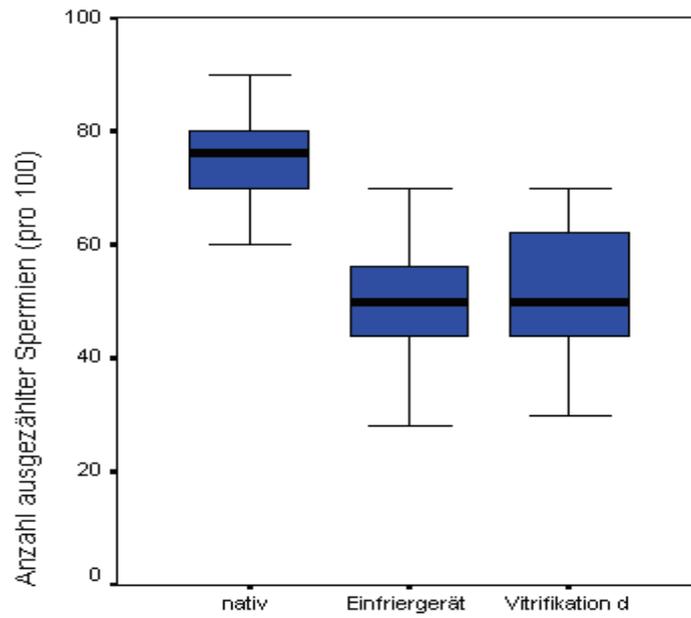
Bei der Spermiedichte, der Progressivmotilität, der Globalmotilität, der Vitalität (Eosin-Test) und der vollständigen DNA-Kondensation (CMA3-Färbung) stellte sich die Kryokonservierung mittels Einfriergerät um 0,3 Mio/ml, 0,1 %, 2,2 %, 6,5 % sowie 0,8 % besser als die Vitrifikation d heraus. Die Vitalität war als einziger Parameter hoch- signifikant besser ($p = 0,001$). Die Vitrifikationsmethode scheint sich bei der Membranintegrität (HOS-Test), der Morphologie, der Intaktheit des Akrosoms und der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche (TUNEL-Test) mit Differenzen von 1,1 %, 0,1 %, 0,4 % und 0,6 % als geringfügig besser zu erweisen.

Boxplots 1 - 3:

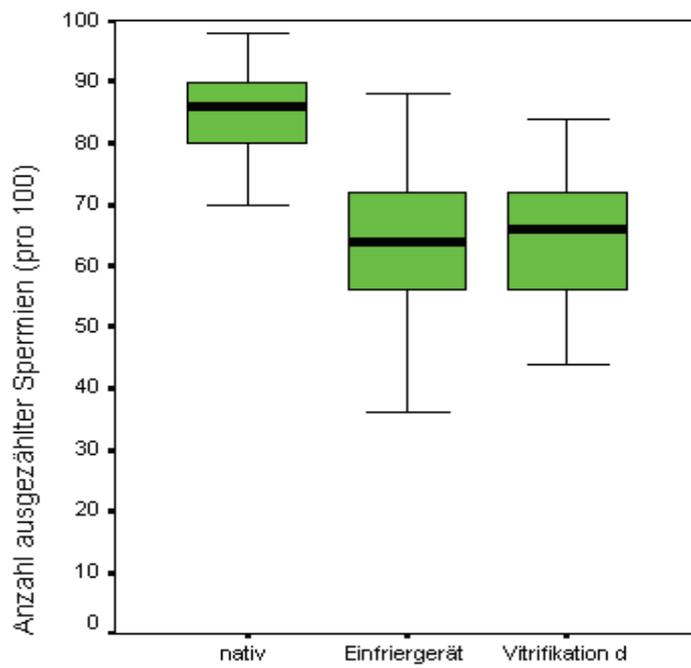
Darstellung der Veränderungen des Wertebereichs für die vollständige DNA-Kondensation (CMA3), die vorhandenen intakten Akrosome (CON A) und der Anzahl von Spermien ohne Doppelstrangbrüche (TUNEL-Test) nativ, nach dem Einfrieren mittels computergesteuertem Einfriergerät und nach Vitrifikation d in der Gesamtgruppe.



Boxplot 1: DNA-Kondensation (CMA3)



Boxplot 2: Akrosomintaktheit (CON A)



Boxplot 3: Spermien ohne DNA-Strangbruch (TUNEL)

Die Boxplots zeigen, dass sich die Wertebereiche nach dem Auftauen im Vergleich zur Nativprobe verschlechtern und die Reichweite der auftretenden Werte sich vergrößert. Im direkten Vergleich der Friermethoden sieht man, dass die Wertespanne bei der DNA-Kondensation unter Verwendung des Einfriergeräts etwas größer ist (Boxplot 1) und umgekehrt dazu bei der Akrosomintegrität die Vitrifikation d einen größeren Umfang aufweist (Boxplot 2). Bei der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch liegt ungefähr die gleiche Spanne an Werten bei beiden Methoden vor (Boxplot 3). Entscheidend ist jedoch die Betrachtung des Medians, der bei allen drei speziellen Färbemethoden für Einfriergerät und Vitrifikation d annähernd gleich ist. Dies lässt darauf schließen, dass mit der Vitrifikation d ebenso gute Ergebnisse erzielt werden können wie bei der Kryokonservierung mit dem computergesteuerten Einfriergerät.

4.3. Vergleich der unterschiedlichen Vitrifikationsmethoden im Bezug auf die untersuchten Parameter der Gesamtgruppe

Tabelle 9: Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in Vitrifikation d- und Vitrifikation D-Gruppe sowie Signifikanzunterschiede beider Gruppen (p-Werte)

n = 41 Parameter	Vitrifikation d		Vitrifikation D		p-Wert
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	31,7 ± 18,73*	31,0	36,4 ± 22,30*	35,0	0,034*
Progressivmotilität (a) [in %]	2,4 ± 3,29*	0,0	0,0 ± 0,15*	0,0	0,000*
Globalmotilität (a+b) [in %]	14,3 ± 13,79*	10,0	0,1 ± 0,34*	0,0	0,000*
Eosin-Test [ungefärbt in %]	19,2 ± 13,72*	15,0	2,2 ± 6,99*	0,0	0,000*
HOS-Test [geschwollen in %]	43,7 ± 14,42*	44,0	26,2 ± 12,43*	24,0	0,000*
Morphologie [Normalform in %]	25,9 ± 18,57	18,5	26,6 ± 20,44	18,0	0,993
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	48,3 ± 16,42*	46,0	38,1 ± 15,30*	38,0	0,000*
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	51,1 ± 11,84*	50,0	33,4 ± 10,18*	32,0	0,000*
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	64,2 ± 11,66*	66,0	48,6 ± 15,82*	48,0	0,000*

* p = 0,000 hochsignifikant, p = 0,034 signifikant

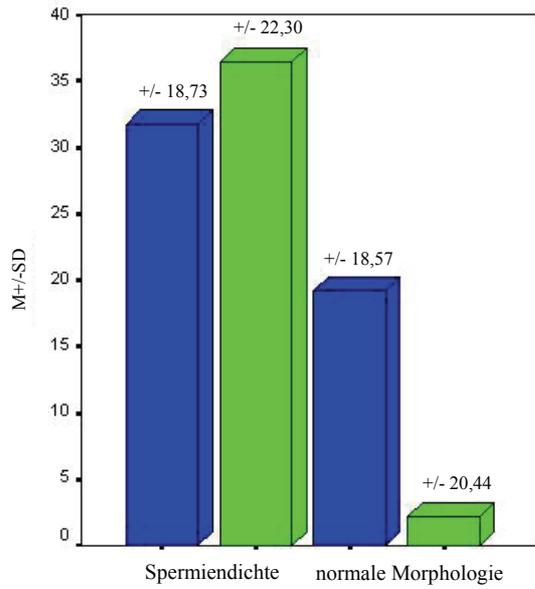
In der untersuchten Studie wurde die Vitrifikationsmethode mit zwei verschiedenen Straw-Systemen durchgeführt, die sich in Oberfläche/Volumen unterschieden. Tabelle 9 soll zeigen, dass der Einfluss des Volumens bzw. der Oberfläche eines Probenbehälters für die Änderung der einzelnen Parameter der Samenanalyse und der speziellen Nachweismethoden von großer Bedeutung ist und damit auch für die erfolgreiche Durchführung der Vitrifikationsmethode.

Alle Parameter außer der Morphologie sind bei der Vitrifikation d mit den Straws mit geringerem Volumen/geringerer Oberfläche signifikant besser als bei der Vitrifikation D mit Straws, die ein größeres Volumen/größere Oberfläche hatten (Histogramme 10 - 13).

Die Differenzen betragen 4,7 Mio/ml für die Spermiedichte, 2,4 % für die Progressivmotilität, 14,2 % für die Globalmotilität, 17 % für die Vitalität (Eosin-Test), 17,5 % für die Membranintegrität (HOS-Test), 10,2 % für die vollständige DNA-Kondensation (Chromomycin A3), 17,7 % für die Intaktheit des Akrosoms (Concanavalin A) und 15,6 % für die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche (TUNEL-Test).

Bei der Spermiedichte ist der Mittelwert für die großvolumigeren Straws mit $36,4 \pm 22,30$ Mio/ml signifikant höher ($p = 0,034$) als bei den dünnvolumigeren Straws mit einem Wert von $31,7 \pm 18,73$ Mio/ml. Dies lässt sich auf die erhöhte Anzahl avitaler Spermien bei der Vitrifikation D zurückführen, die sich nicht mehr fortbewegen können.

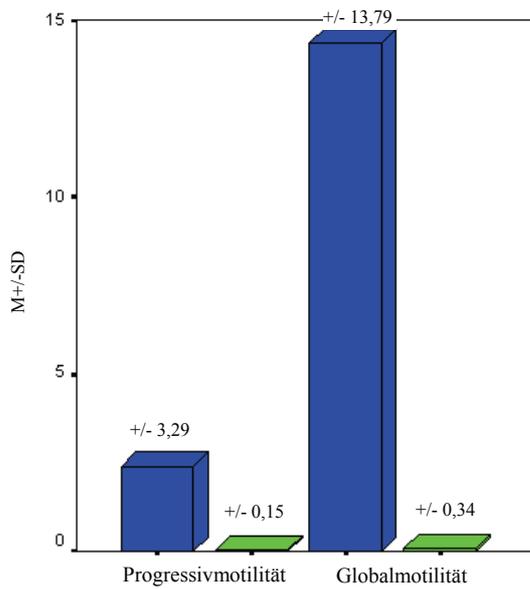
Der einzige nicht signifikante Parameter ist die Anzahl der normalgeformten Spermien (Morphologie) bei der eine Differenz von 0,7 % zwischen den beiden Vitrifikationsmethoden besteht.



- nach Vitrifikation d
- nach Vitrifikation D

Histogramm 10:

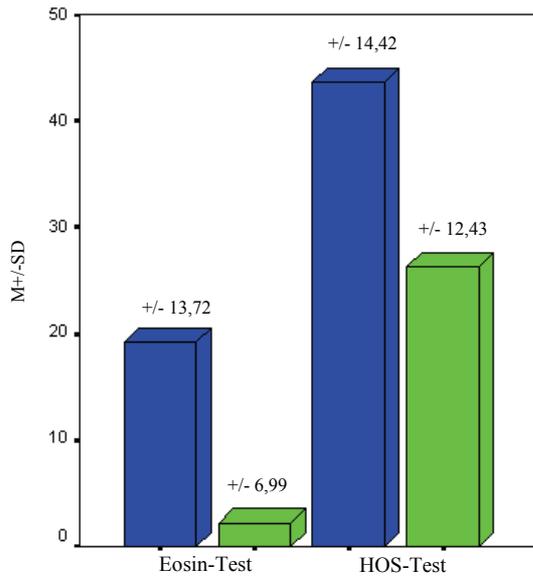
Darstellung der Spermiedichte und der normalen Morphologie der Gesamtgruppe nach EAP



- nach Vitrifikation d
- nach Vitrifikation D

Histogramm 11:

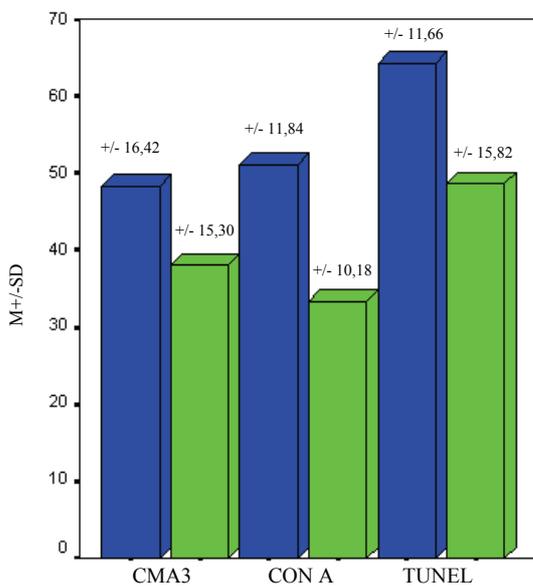
Darstellung der Progressiv- und der Globalmotilität der Gesamtgruppe nach EAP



- nach Vitrifikation d
- nach Vitrifikation D

Histogramm 12:

Darstellung der Vitalität (Eosin-Test) und der Membranintegrität (HOS-Test) der Gesamtgruppe nach EAP



- nach Vitrifikation d
- nach Vitrifikation D

Histogramm 13:

Darstellung der DNA-Kondensation (CMA3), der Akrosomintegrität (CON A) und der Anzahl der Spermien ohne Strangbruch (TUNEL) der Gesamtgruppe nach EAP

4.4. Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe vor und nach dem Einfrieren unter Berücksichtigung der Kryokonservierungsmethode

Tabelle 10: Fertile Gruppe (n = 21)

Parameter	Nativ fertil		Einfriergerät fertil		Vitrifikation d fertil	
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	M ± SD	Median
Spermiendichte [in Mio/ml]	82,9 ± 22,07	100,0	36,9 ± 16,73	31,0	35,3 ± 12,29	35,0
Progressivmotilität (a) [in %]	16,0 ± 8,15	15,0	4,6 ± 3,74	5,0	4,5 ± 3,41	5,0
Globalmotilität (a+b) [in %]	54,8 ± 10,42	50,0	25,4 ± 11,68	25,0	24,1 ± 12,54	28,0
Eosin-Test [ungefärbt in %]	65,5 ± 15,64	70,0	35,9 ± 11,50	35,0	25,2 ± 11,41	20,0
HOS-Test [ungefärbt in %]	71,6 ± 7,45	70,0	46,1 ± 11,41	48,0	51,0 ± 12,60	50,0
Morphologie [Normalform in %]	27,4 ± 18,90	18,0	27,0 ± 19,42	17,0	26,6 ± 18,18	20,0
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	71,1 ± 8,70	70,0	44,2 ± 19,15	40,0	43,6 ± 17,18	40,0
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	77,1 ± 7,33	76,0	52,5 ± 10,11	52,0	52,6 ± 12,05	52,0
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	84,3 ± 7,70	84,0	62,1 ± 10,30	64,0	64,5 ± 10,48	66,0

Tabelle 11: Subfertile Gruppe (n = 20)

Parameter	Nativ subfertil		Einfriergerät subfertil		Vitrifikation d subfertil	
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	M ± SD	Median
Spermiendichte [in Mio/ml]	49,9 ± 36,16	49,0	26,9 ± 22,14	22,5	28,0 ± 23,46	24,5
Progressivmotilität (a) [in %]	2,3 ± 3,02	0,0	0,3 ± 0,78	0,0	0,2 ± 0,48	0,0
Globalmotilität (a+b) [in %]	19,8 ± 10,93	20,0	5,5 ± 5,86	4,0	4,1 ± 4,17	3,5
Eosin-Test [ungefärbt in %]	26,0 ± 16,82	20,0	15,0 ± 15,17	10,0	12,9 ± 13,34	10,0
HOS-Test [ungefärbt in %]	61,0 ± 20,34	65,0	39,0 ± 15,48	40,0	36,0 ± 12,26	36,0
Morphologie [Normalform in %]	29,7 ± 19,38	29,0	24,2 ± 18,92	18,0	24,9 ± 19,55	17,0
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	72,1 ± 11,76	74,0	54,3 ± 17,12	54,0	53,2 ± 14,39	52,0
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	74,3 ± 8,34	74,0	48,8 ± 10,08	50,0	49,6 ± 11,74	47,0
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	84,3 ± 7,80	87,0	65,1 ± 14,35	65,0	64,0 ± 13,05	64,0

In der fertilen und der subfertilen Gruppe erkennt man bei allen betrachteten Parametern außer der Morphologie in der fertilen Gruppe einen deutlichen Abfall der Werte nach dem EAP sowohl mit dem computergesteuerten Einfriergerät als auch der Vitrifikation d. Im Vergleich der beiden Kryokonservierungsmethoden sind in der fertilen Gruppe jedoch nur der Eosin-Test (Vitalität) zugunsten der Einfriergerät ($p = 0,001$) und der HOS-Test (Membranintegrität) zugunsten der Vitrifikation d ($p = 0,036$) signifikant unterschiedlich (Tab. 12).

Die Spermiendichte liegt in der fertilen Gruppe nach EAP mit dem Einfriergerät etwas höher, in der subfertilen Gruppe erreicht die Vitrifikation d den geringfügig größeren Wert.

Sowohl bei der Progressiv- als auch der Globalmotilität schneidet das Einfriergerät gegenüber der Vitrifikation d in beiden Gruppen etwas besser ab.

In der fertilen und subfertilen Gruppe ergibt sich nach EAP mit dem computergesteuerten Einfriergerät bei der Vitalität (Eosin-Test) ein besserer Wert, der in der fertilen Gruppe auch signifikant ist (s.o.).

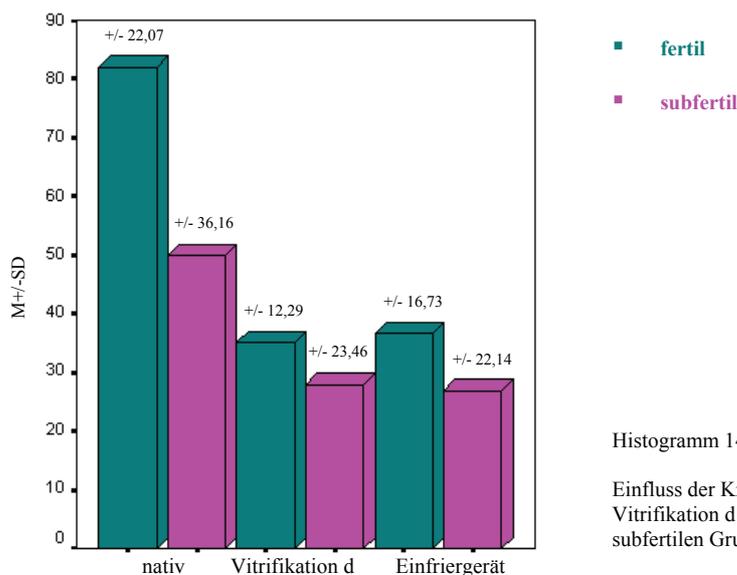
Beim HOS-Test (Membranintegrität) erreicht die Vitrifikation d in der fertilen Gruppe einen signifikant höheren Wert (s.o.), in der subfertilen Gruppe hingegen ist das Einfriergerät geringfügig besser. Bei der Morphologie treten in beiden Gruppen die geringsten Abfälle zum Nativwert auf, das Einfriergerät erreicht minimal bessere Werte.

Bezüglich der Anzahl vollständiger DNA-Kondensationen (CMA3) hat das computergesteuerte Einfriergerät unerheblich höhere Resultate.

Bei Betrachtung der Anzahl der intakten Akrosome (CON A) liegt der Vorteil in der subfertilen und der fertilen Gruppe auf Seiten der Vitrifikation d.

Die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch (TUNEL) ist in der fertilen Gruppe nach EAP mit Vitrifikation d minimal höher gegenüber dem Einfriergerät, in der subfertilen Gruppe ist das Ergebnis umgekehrt.

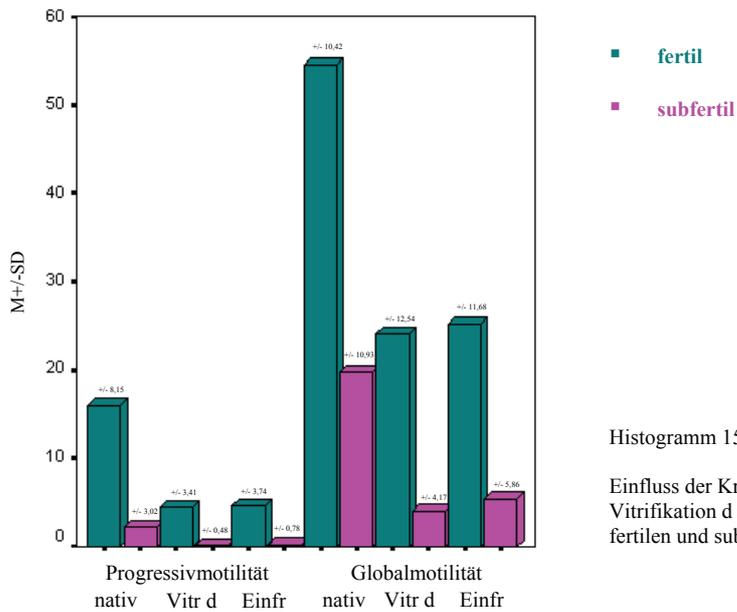
In den Histogrammen 14 - 20 werden die o.g. Ergebnisse im direkten Vergleich bildlich veranschaulicht.



Histogramm 14:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Spermiedichte in der fertilen und subfertilen Gruppe

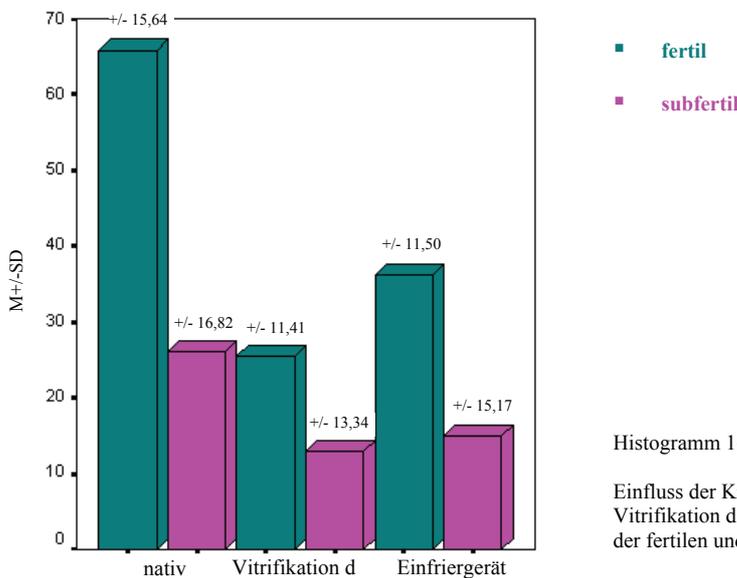
In der fertilen Gruppe hat das Einfrieren mittels Einfriergerät ein besseres Ergebnis bezüglich der Spermiedichte erzielt, umgekehrt ist es in der subfertilen Population. Dort schneidet die Vitrifikation d besser ab.



Histogramm 15:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Progressiv- und Globalmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe

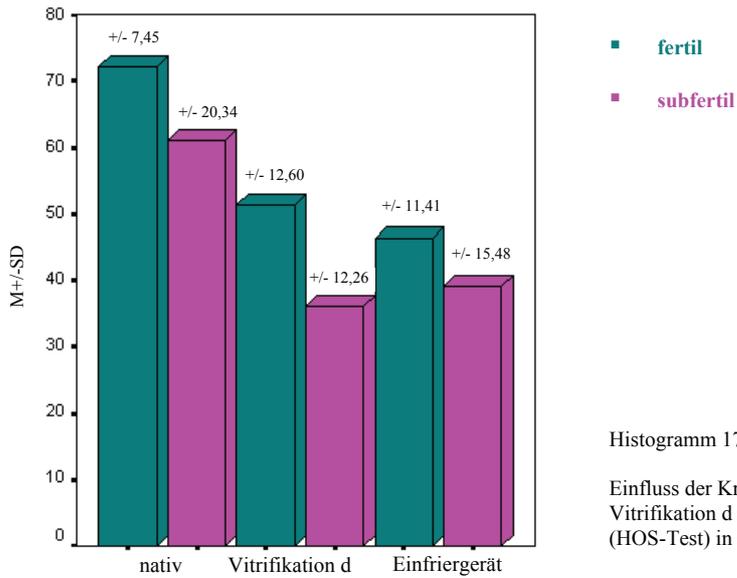
Die Progressivmotilität bei der subfertilen und der fertilen Gruppe schneidet bei Einfriergerät und Vitrifikation d annähernd gleich ab, bei der Globalmotilität erkennt man einen leichten Vorteil beim Einfrieren mit dem Einfriergerät bei beiden Gruppen.



Histogramm 16:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Vitalität der Spermien (Eosin-Test) in der fertilen und subfertilen Gruppe

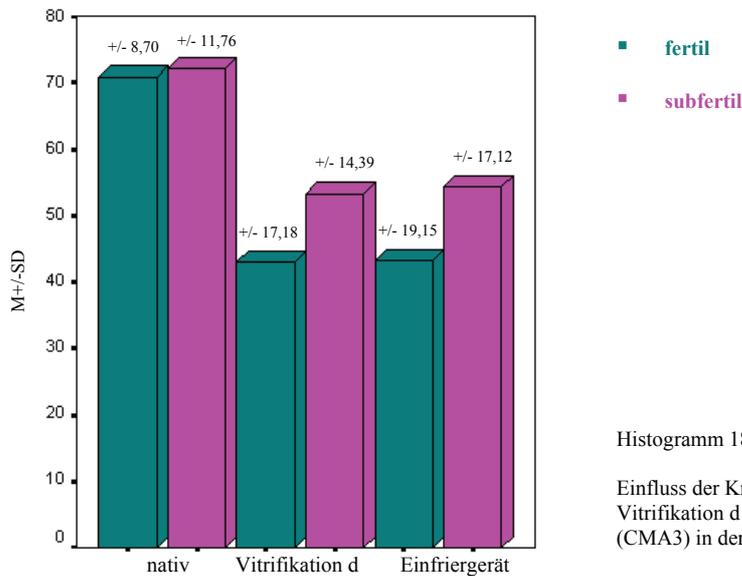
Bei Untersuchung der Vitalität (Eosin-Test) zeigt sich, dass das Einfriergerät in der fertilen Gruppe und in der subfertilen Gruppe besser abschneidet, wobei der Unterschied zwischen beiden Kryokonservierungsmethoden in der fertilen Gruppe deutlich größer ist ($p = 0,001$; Tab. 12) als in der subfertilen Gruppe.



Histogramm 17:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Membranintegrität der Spermien (HOS-Test) in der fertilen und subfertilen Gruppe

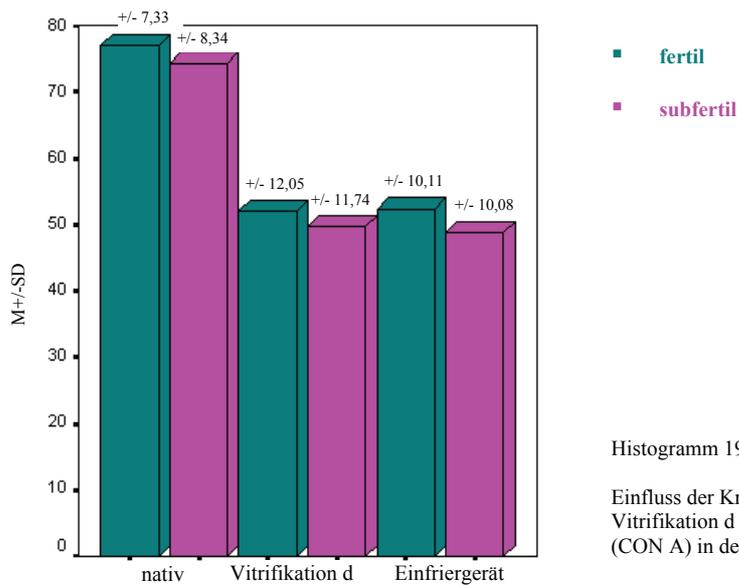
Die Membranintegrität (HOS-Test) der fertilen Gruppe schneidet nach EAP unter Verwendung der Vitrifikation d deutlich besser ab ($p = 0,036$; Tab. 12). Umgekehrt liegen die Werte in der subfertilen Gruppe nach EAP mit dem Einfriergerät etwas höher.



Histogramm 18:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die DNA-Kondensation der Spermien (CMA3) in der fertilen und subfertilen Gruppe

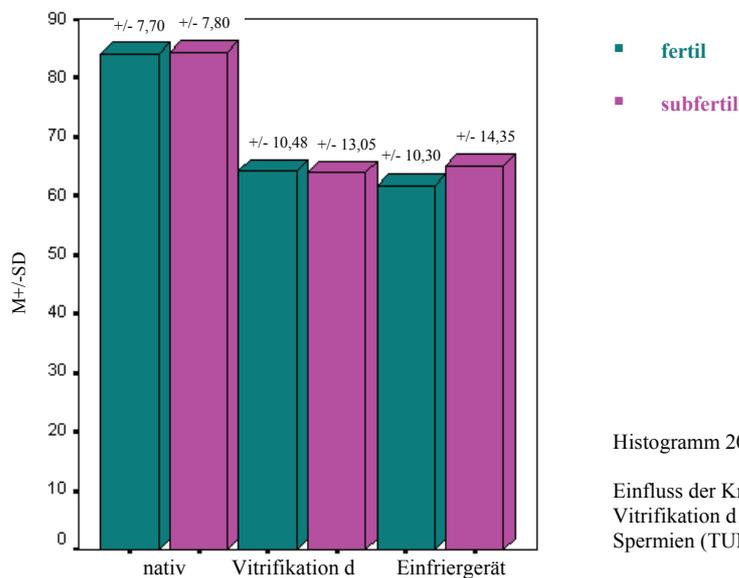
Sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe sind die erreichten Werte für eine vollständige DNA-Kondensation nach dem EAP mit Einfriergerät geringfügig besser.



Histogramm 19:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Intaktheit des Akrosoms der Spermien (CON A) in der fertilen und subfertilen Gruppe

Im Gegensatz zur DNA-Kondensation zeigt sich bei Untersuchung der Intaktheit des Akrosoms ein leichter Vorteil der Vitrifikation d, sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe.



Histogramm 20:

Einfluss der Kryokonservierung mittels Einfriergerät und Vitrifikation d auf die Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen der Spermien (TUNEL) in der fertilen und subfertilen Gruppe

Bei Betrachtung der Häufigkeit der Spermien ohne DNA-Strangbruch ist die Anzahl in der fertilen Gruppe etwas höher nach Anwendung der Vitrifikation d, in der subfertilen Gruppe schneidet das Einfriergerät geringfügig besser ab.

4.5. *Veränderung der Parameter nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d für die fertile Gruppe*

Tabelle 12: Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der fertilen Gruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)

n = 21 Parameter	Einfriergerät		Vitrifikation d		p-Wert
	M ± SD	Median	M± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	36,9 ± 16,73	31,0	35,3 ± 12,29	35,0	0,614
Progressivmotilität (a) [in %]	4,6 ± 3,74	5,0	4,5 ± 3,41	5,0	0,842
Globalmotilität (a+b) [in %]	25,4 ± 11,68	25,0	24,1 ± 12,54	28,0	0,816
Eosin-Test [ungefärbt in %]	35,9 ± 11,50*	35,0	25,2 ± 11,41*	20,0	0,001*
HOS-Test [ungefärbt in %]	46,1 ± 11,41*	48,0	51,0 ± 12,60*	50,0	0,036*
Morphologie [Normalform in %]	27,0 ± 19,42	17,0	26,6 ± 18,18	20,0	0,866
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	44,2 ± 19,15	40,0	43,6 ± 17,18	40,0	0,759
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	52,5 ± 10,11	52,0	52,6 ± 12,05	52,0	0,880
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	62,1 ± 10,30	64,0	64,5 ± 10,48	66,0	0,361

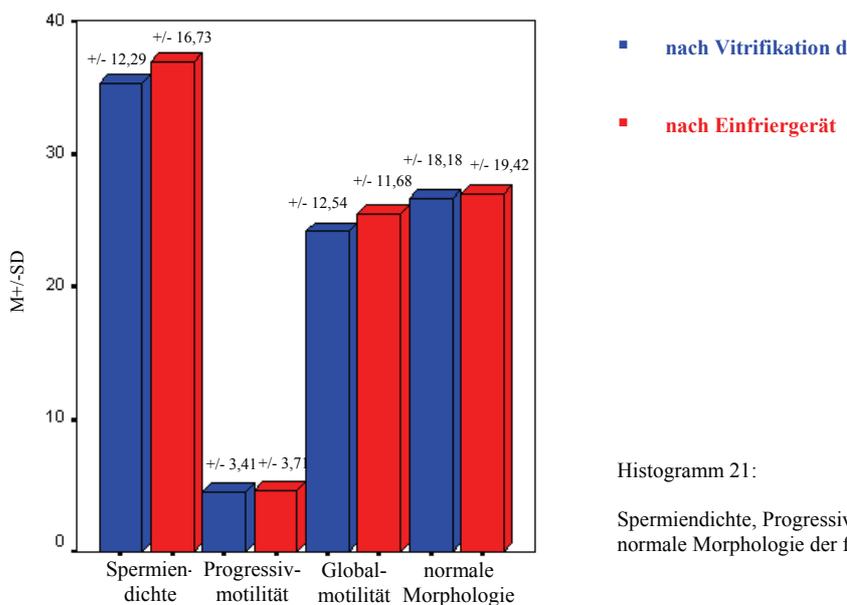
* p = 0,001 und p = 0,036 signifikant

Beim Vergleich der Friermethoden in der fertilen Gruppe fällt zunächst auf, dass die p-Werte für die Vitalität (Eosin-Test) und die Membranintegrität (HOS-Test) mit 0,001 und 0,036 unter 0,05 liegen und somit signifikant sind. Der Wert für das Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d ist dabei um 10,7 % (35,9 ± 11,50 vs. 25,2 ± 11,41; Eosin-Test) bzw. für die

Vitrifikation d im Vergleich zum Einfriergerät um 4,9 % ($51,0 \pm 12,60$ vs. $46,1 \pm 11,41$; HOS-Test) besser.

Bezüglich der anderen Parameter besteht keine Signifikanz. Jedoch sind die Werte für die Spermiedichte ($36,9 \pm 16,73$ Mio/ml vs. $35,3 \pm 12,29$ Mio/ml), die Progressivmotilität ($4,6 \pm 3,74$ % vs. $4,5 \pm 3,41$ %), die Globalmotilität ($25,4 \pm 11,68$ % vs. $24,1 \pm 12,54$ %), die Morphologie ($27,0 \pm 19,42$ % vs. $26,6 \pm 18,18$ %) und die vollständige DNA-Kondensation ($44,2 \pm 19,15$ % vs. $43,6 \pm 17,18$ %) bei den mittels Einfriergerät eingefrorenen Proben minimal besser als für die Vitrifikation d. Bei der Intaktheit des Akrosoms und der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche ist es umgekehrt, hier ist die Vitrifikation d mit Werten von $52,6 \pm 12,05$ % vs. $52,5 \pm 10,11$ % und $64,5 \pm 10,48$ % vs. $62,1 \pm 10,30$ % etwas besser.

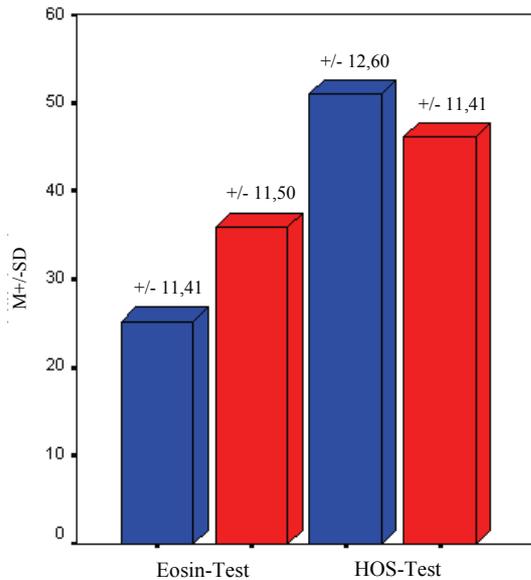
Die Histogramme 21 - 23 stellen die Parameter nach Vitrifikation d und Einfriergerät in der fertilen Gruppe dar.



Histogramm 21:

Spermiedichte, Progressiv- und Globalmotilität sowie normale Morphologie der fertilen Gruppe nach EAP

Dieses Histogramm zeigt, dass die Unterschiede zwischen den beiden Kryokonservierungsmethoden bei den ausgewählten Parametern sehr geringfügig sind. Das Einfrieren mit dem Einfriergerät schneidet dabei minimal besser ab.

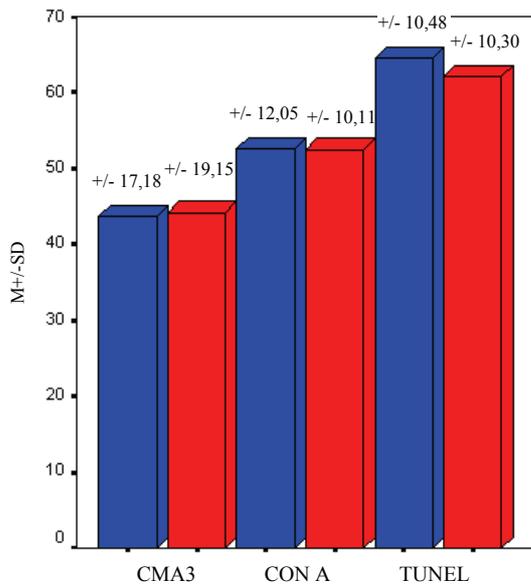


- nach Vitrifikation d
- nach Einfriergerät

Histogramm 22:

Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) der fertilen Gruppe nach EAP

Bei der Untersuchung der Vitalität und der Membranintegrität erkennt man in Histogramm 22, dass die Werte beim Eosin-Test im Vergleich zum HOS-Test – sowohl für das computergesteuerte Einfriergerät als auch für die Vitrifikation d – um einiges schlechter abschneiden. Vergleicht man die Methoden untereinander, so lässt sich sagen, dass das Einfriergerät beim Eosin-Test (Kopfbereich des Spermiums) und die Vitrifikation d beim HOS-Test (Schwanzbereich des Spermiums) signifikant besser abschneidet (Tab. 12).



- nach Vitrifikation d
- nach Einfriergerät

Histogramm 23:

DNA-Kondensation (CMA3), Akrosomintegrität (CON A) und Anzahl der Spermien ohne Strangbruch (TUNEL) der fertilen Gruppe nach EAP

Bei Betrachtung der verschiedenen Färbemethoden in Histogramm 23 wird ersichtlich, dass sich die Methoden für die fertile Gruppe in ihrer Effektivität nicht wesentlich unterscheiden. Für die DNA-Kondensation scheint das computergesteuerte Einfriergerät etwas besser zu sein, bei der Untersuchung der Anzahl der DNA-Strangbrüche schneidet die Vitrifikation d etwas besser ab. Die Intaktheit des Akrosoms stellt sich hier für beide Methoden annähernd gleich dar.

4.6. *Veränderung der Parameter nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät im Vergleich zur Vitrifikation d für die subfertile Gruppe*

Tabelle 13: Parameter der Spermienanalyse; Einfriergerät-Vitrifikation d-Vergleich der subfertilen Gruppe; jeweilige Signifikanzen (p-Werte)

n = 20 Parameter	Einfriergerät		Vitrifikation d		p-Wert
	M ± SD	Median	M ± SD	Median	
Spermiendichte [in Mio/ml]	26,8 ± 22,14	22,5	28,0 ± 23,46	24,5	0,808
Progressivmotilität (a) [in %]	0,3 ± 0,78	0,0	0,2 ± 0,48	0,0	0,317
Globalmotilität (a+b) [in %]	5,5 ± 5,86	4,0	4,1 ± 4,17	3,5	0,130
Eosin-Test [ungefärbt in %]	15,0 ± 15,17	10,0	12,9 ± 13,34	10,0	0,134
HOS-Test [ungefärbt in %]	39,0 ± 15,48	40,0	36,0 ± 12,26	36,0	0,105
Morphologie [Normalform in %]	24,2 ± 18,92	18,0	24,9 ± 19,55	17,0	0,367
CMA3 [nicht-fluoreszierend in %]	54,3 ± 17,12	54,0	53,2 ± 14,39	52,0	0,256
CON A [nicht-fluoreszierend in %]	48,8 ± 10,08	50,0	49,6 ± 11,74	47,0	0,517
TUNEL [nicht-fluoreszierend in %]	65,1 ± 14,35	65,0	64,0 ± 13,05	64,0	0,487

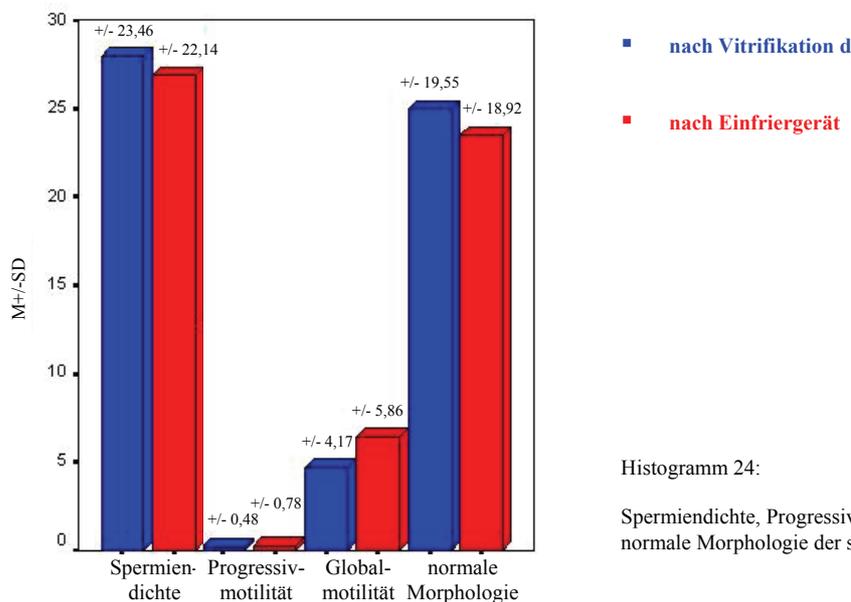
In der subfertilen Gruppe findet man im Vergleich zur fertilen Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einfriergerät und der Vitrifikation d.

Dennoch bestehen auch hier geringe Differenzen bei einzelnen Parametern entweder zugunsten der Vitrifikation d – deren Werte bei der Spermiendichte, der Morphologie und der Intaktheit des Akrosoms um 1,2 Mio/ml, 0,7 % und 0,8 % besser sind – oder zugunsten des Einfriergeräts, was bei der Progressivmotilität (0,1 %), der Globalmotilität (1,4 %), dem

Eosin-Test (2,1 %), dem HOS-Test (3,0 %), der vollständigen DNA-Kondensation (1,1 %) und der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche (1,1 %) der Fall ist.

Abschließend kann man anhand der Tabellen 8, 12 und 13 schlussfolgern, dass die Vitrifikation d ähnlich gute Ergebnisse für die einzelnen Parameter bringt wie die konventionelle Friermethode mittels Einfriergerät. Besonders bei dem untersuchten subfertilen Proben bestehen bei keinem Parameter signifikante Abweichungen im Vergleich der beiden Methoden.

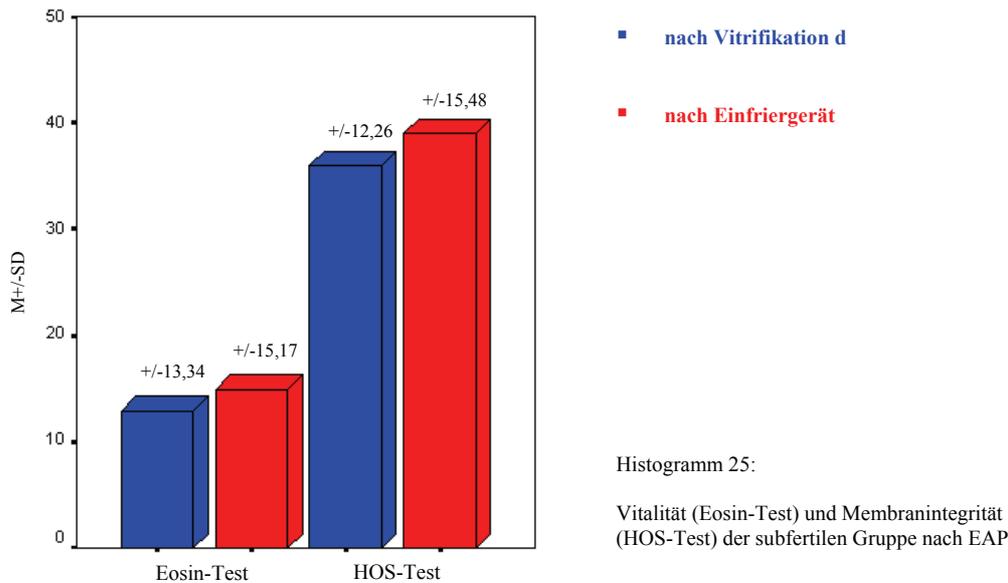
Die Histogramme 24 - 26 stellen die Parameter nach Vitrifikation d und Einfriergerät in der subfertilen Gruppe dar.



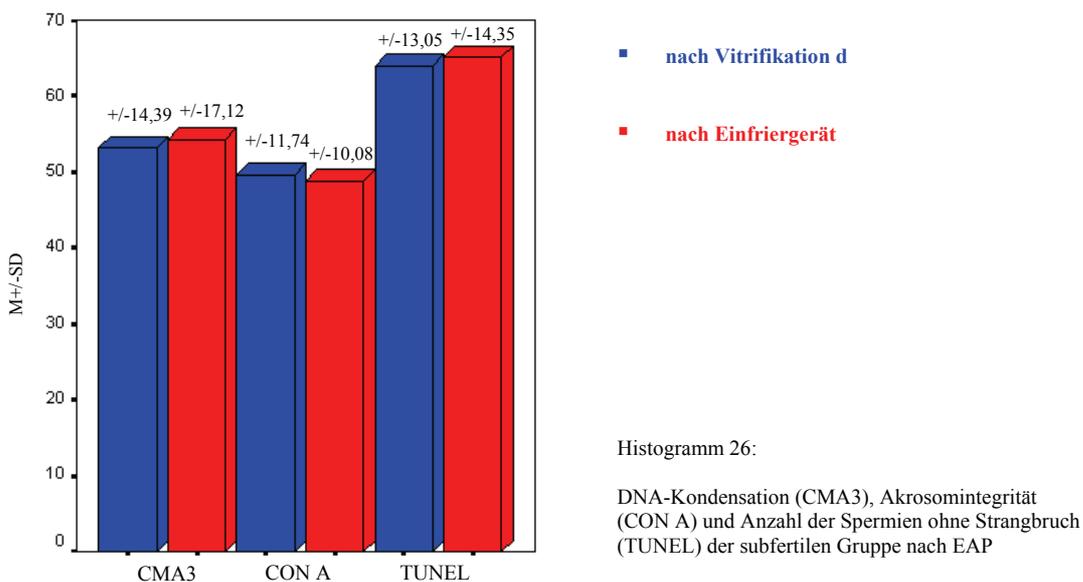
Histogramm 24:

Spermien-dichte, Progressiv- und Globalmotilität sowie normale Morphologie der subfertilen Gruppe nach EAP

Dieses Histogramm lässt erkennen, dass die Vitrifikation d für subfertile Populationen bei Untersuchung der Spermien-dichte und der normalen Morphologie etwas besser abschneidet als das Einfriergerät, wohingegen die zuletzt genannte Methode etwas vorteilhafter bezüglich der Motilität zu sein scheint.



Bei der Beurteilung der Vitalität und der Membranintegrität anhand des Eosin- und des HOS-Tests in Histogramm 25 stellt sich das Kryokonservieren mit Einfriergerät etwas besser dar.



Betrachtet man die Auswirkungen des Kryokonservierens auf die DNA-Kondensation, die Intaktheit des Akrosoms und die Anzahl der DNA-Strangbrüche, erkennt man auch in Histogramm 26, dass die Werte zwischen beiden Methoden nur geringfügig variieren.

4.7. Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät

Tabelle 14: Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in fertile und subfertile Gruppe nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät (Darstellung in Prozent des Nativwertes nach EAP)

Parameter	Fertil (n = 21)	Subfertil (n = 20)
	Prozent des Nativwertes nach EAP [in %]	Prozent des Nativwertes nach EAP[in %]
Spermiendichte	44,51	53,91
Progressivmotilität (a)	28,75	13,04
Globalmotilität (a+b)	46,35	27,78
Eosin-Test [ungefärbt]	54,81	57,70
HOS-Test [ungefärbt]	64,39	63,93
Morphologie [Normalform]	98,54	81,48
CMA3 [nicht-fluoreszierend]	62,17	75,31
CON A [nicht-fluoreszierend]	68,10	65,68
TUNEL [nicht-fluoreszierend]	73,67	77,22

Der Abfall zwischen der nativen Probe und der Probe nach dem Einfrieren wird in Tabelle 14 und 15 in Form von Prozenten angegeben, wobei der Nativwert 100 % entspricht und sich der Wert nach dem EAP dementsprechend gemäß der Formel „(100 / Nativwert) x Auftauwert“ nach Einfriergerät bzw. nach Vitrifikation ergibt. Auf diese Weise können die fertile und die subfertile Gruppe direkt miteinander verglichen werden.

Bei der fertilen und der subfertilen Gruppe verringern sich die Nativwerte bei allen betrachteten Parametern, sowohl nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät (Tab. 14; 4.7.) als

auch nach der Vitrifikation d (Tab. 15; 4.8.). Im Vergleich der beiden Friermethoden ergeben sich nur geringe Unterschiede in beiden Gruppen (Tab. 10 und 11; 4.4.).

Vergleicht man diese Prozentangaben in der fertilen und subfertilen Gruppe nach EAP mit dem Einfriergerät, ergeben sich folgende Resultate:

Die Spermiendichte beträgt in der fertilen Gruppe nach EAP noch 44,51 %, in der subfertilen Gruppe 53,91 %. Dies kann damit erklärt werden, dass in der subfertilen Gruppe mehr immotile Spermien nach EAP vorliegen, was zu einer höheren Spermiendichte führt.

Die Progressiv- und Globalmotilität nimmt in der fertilen Gruppe nach EAP auf 28,75 % bzw. 46,35 % des Ausgangswertes ab. In der subfertilen Gruppe liegen die Werte mit 13,04 % bzw. 27,78 % wesentlich schlechter. Die vorhandenen motilen Spermien büßen ihre Beweglichkeit nach EAP sehr stark ein.

Die Vitalität (Eosin-Test) beträgt nach EAP mit dem Einfriergerät in der fertilen Gruppe noch 54,81 %, in der subfertilen Gruppe liegt der Wert mit 57,70 % etwas besser. Der schädigende Einfluss auf die Kopfreion des Spermiums scheint in der subfertilen Gruppe etwas geringer zu sein.

Die Membranintegrität (HOS-Test) sinkt in der fertilen Gruppe auf 64,39 % des Ausgangswertes ab, in der subfertilen Gruppe liegt der Wert mit 63,93 % nur knapp darunter. Betrachtet man die Anzahl normal geformter Spermien (Morphologie) nach EAP mit dem Einfriergerät, liegt die fertile Gruppe mit 98,54 % deutlich vor der subfertilen Gruppe mit 81,48 % des Nativwertes.

Die Anzahl an vollständigen DNA-Kondensationen (CMA3) sinkt in der fertilen Gruppe auf 62,17 % und liegt damit unter dem Wert der subfertilen Gruppe mit 75,31 % des Ausgangswertes.

Bei der Anzahl der intakten Akrosome (CON A) schneidet die fertile Gruppe mit 68,10 % geringfügig besser ab als die subfertile Gruppe mit 65,68 %.

Die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch liegt mit 77,22 % in der subfertilen Gruppe hingegen etwas höher als in der fertilen Gruppe mit 73,67 % des Nativwertes.

4.8. Vergleich der Parameter der fertilen und der subfertilen Gruppe nach dem Einfrieren mit Vitrifikation d

Tabelle 15: Parameter der Spermienanalyse; Unterteilung in fertile und subfertile Gruppe nach dem Einfrieren mit Vitrifikation d
(Darstellung in Prozent des Nativwertes nach EAP)

Parameter	Fertil (n = 21)	Subfertil (n = 20)
	Prozent des Nativwertes nach EAP [in %]	Prozent des Nativwertes nach EAP[in %]
Spermiendichte	42,58	56,11
Progressivmotilität (a)	28,13	8,70
Globalmotilität (a+b)	43,98	20,71
Eosin-Test [ungefärbt]	38,47	49,62
HOS-Test [ungefärbt]	71,23	59,02
Morphologie [Normalform]	97,10	83,84
CMA3 [nicht-fluoreszierend]	61,32	73,79
CON A [nicht-fluoreszierend]	68,22	66,76
TUNEL [nicht-fluoreszierend]	76,51	75,92

Vergleicht man diese Prozentangaben in der fertilen und subfertilen Gruppe nach EAP mit Vitrifikation d erkennt man Folgendes:

Die Spermiendichte beträgt in der fertilen Gruppe nach EAP noch 42,58 %, in der subfertilen Gruppe 56,11 %. In der subfertilen Gruppe liegen mehr immotile Spermien nach EAP vor, was zu einer höheren Spermiendichte führt.

Die Progressiv- und Globalmotilität nimmt in der fertilen Gruppe nach EAP auf 28,13 % bzw. 43,98 % des Ausgangswertes ab. In der subfertilen Gruppe sind die Werte mit 8,70 % bzw.

20,71 % bedeutend geringer. Die vorhandenen motilen Spermien verlieren zu 80 - 90 % ihre Beweglichkeit nach EAP.

Die Vitalität (Eosin-Test) beträgt nach EAP mit der Einfriergerät in der fertilen Gruppe noch 38,47 %, in der subfertilen Gruppe liegt der Wert bei 49,62 % etwas besser. Der schädigende Einfluss auf die Kopfregion des Spermiums scheint in der subfertilen Gruppe weniger ausgeprägt zu sein.

Die Membranintegrität (HOS-Test) sinkt in der fertilen Gruppe auf 71,23 % des Ausgangswertes ab, in der subfertilen Gruppe liegt der Wert mit 59,02 % wesentlich darunter. Betrachtet man die Anzahl normal geformter Spermien (Morphologie) nach EAP mit der Einfriergerät, liegt die fertile Gruppe mit 97,10 % deutlich besser als die subfertile Gruppe mit 83,84 % des Nativwertes.

Die Anzahl an vollständigen DNA-Kondensationen (CMA3) sinkt in der fertilen Gruppe auf 61,32 % und liegt damit deutlich unterhalb der subfertilen Gruppe mit 73,79 % des Ausgangswertes.

Bei der Anzahl der intakten Akrosome (CON A) schneidet die fertile Gruppe mit 68,22 % geringfügig besser ab als die subfertile Gruppe mit 66,76 %.

Die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch (TUNEL) liegt bei der Vitrifikation d mit 76,51 % in der fertilen Gruppe minimal höher als in der subfertilen Gruppe mit 75,92 % des Nativwertes.

In der Gesamtbetrachtung von Tabelle 14 und 15 (4.7. und 4.8.) lässt sich zusammenfassen:

Die subfertile Gruppe erzielt nach dem Einfrieren mit der Einfriergerät bei der Spermiedichte, der Vitalität (Eosin-Test), der Anzahl vollständiger DNA-Kondensationen (CMA3) und der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch (TUNEL) höhere Resultate als die fertile Gruppe.

Dieses Ergebnis lässt sich auch für die Spermiedichte, die Vitalität (Eosin-Test) und die Anzahl der vollständigen DNA-Kondensationen (CMA3) beim Einfrieren mit Vitrifikation d feststellen.

Bei den restlichen Parametern, zu denen die Progressiv- und Globalmotilität, die Membranintegrität (HOS-Test), die Morphologie, die Anzahl intakter Akrosome (CON A) und bei der Vitrifikation d auch die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche (TUNEL) gehören, schneidet die fertile Gruppe besser ab.

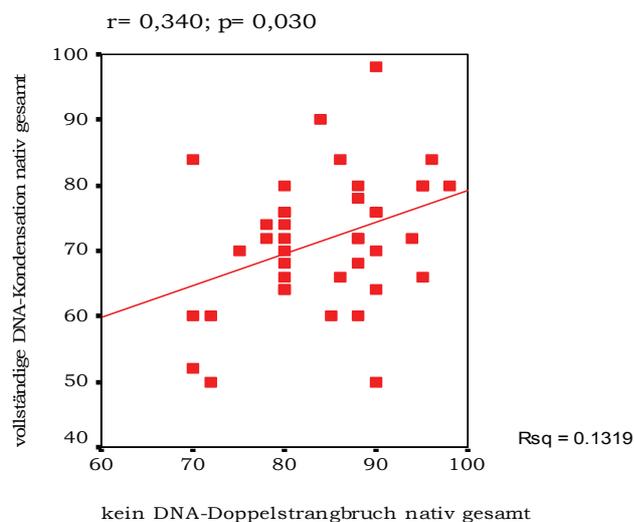
4.9. Korrelationen und Streudiagramme

Tabelle 16 a - c: Parameterkorrelationen für beide Gruppen insgesamt sowie für die fertile und die subfertile Gruppe bei Untersuchung des **Nativspermas**; (Korrelation signifikant, wenn $p < 0,05$; Korrelation signifikant, wenn $p < 0,01$)

Tabelle 16 a: Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der Gesamtgruppe

n = 41 beide Gruppen	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	r = -0,126 p = 0,432	r = 0,089 p = 0,581	r = 0,289 p = 0,067	r = 0,261 p = 0,099	r = 0,277 p = 0,079
Vitalität (Eosin-Test) vital		r = 0,285 p = 0,071	r = -0,087 p = 0,587	r = 0,161 p = 0,314	r = 0,034 p = 0,833
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			r = -0,266 p = 0,093	r = -0,072 p = 0,653	r = -0,141 p = 0,380
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				r = 0,234 p = 0,140	r = 0,340* p = 0,030
Akrosomreaktion (CON A) intakt					r = -0,023 p = 0,886

* Farblich unterlegte Korrelationen werden anhand von Streudiagrammen bildlich dargestellt.

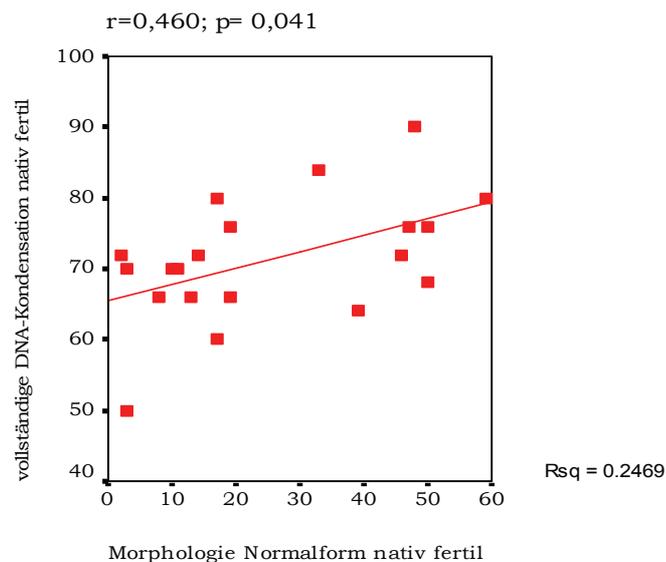


Streudiagramm 1: Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit im Nativsperma der Gesamtgruppe

Bei Untersuchung des Nativspermas erkennt man in allen drei Gruppen (insgesamt, fertil, subfertil), dass verschiedene Parameter signifikant miteinander korrelieren. Dazu gehören in der Gesamtgruppe die vollständige DNA-Kondensation, die mit einem Koeffizienten $r = 0,340$ mit der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen korreliert. Je weniger Doppelstrangbrüche, desto höher die vollständige DNA-Kondensation (Streudiagramm 1).

Tabelle 16 b: Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der fertilen Gruppe

n = 21 fertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	$r = -0,105$ $p = 0,661$	$r = 0,155$ $p = 0,513$	$r = 0,460$ $p = 0,041$	$r = 0,305$ $p = 0,191$	$r = 0,111$ $p = 0,641$
Vitalität (Eosin-Test) vital		$r = 0,162$ $p = 0,483$	$r = -0,315$ $p = 0,165$	$r = 0,046$ $p = 0,842$	$r = -0,086$ $p = 0,711$
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			$r = 0,098$ $p = 0,673$	$r = 0,060$ $p = 0,796$	$r = -0,190$ $p = 0,410$
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				$r = -0,062$ $p = 0,790$	$r = 0,094$ $p = 0,684$
Akrosomreaktion (CON A) intakt					$r = -0,303$ $p = 0,182$

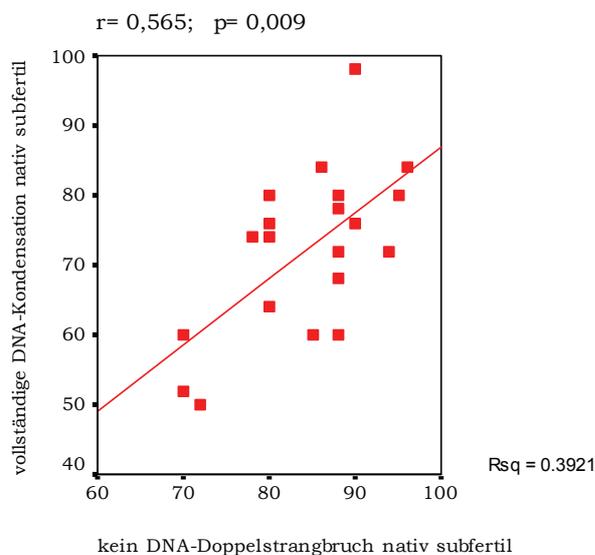


Streudiagramm 2: Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und normaler Spermienmorphologie im Nativsperma der fertilen Gruppe

Bei der fertilen Gruppe lässt sich feststellen, dass morphologisch normale Spermien auch mit der vollständigen DNA-Kondensation korrelieren ($r = 0,460$). In der subfertilen Gruppe hängt – wie in der Gesamtgruppe – die vollständige DNA-Kondensation mit den Doppelstrangbrüchen zusammen. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,565$, was auch hier bedeutet: je geringer die Anzahl der Doppelstrangbrüche, desto höher ist die Anzahl vollständiger DNA-Kondensationen. Der Zusammenhang wird anhand der Streudiagramme 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 16 c: Untersuchung des Nativspermas: Korrelationen in der subfertilen Gruppe

n = 20 subfertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	$r = -0,040$ $p = 0,868$	$r = 0,090$ $p = 0,706$	$r = 0,179$ $p = 0,451$	$r = 0,190$ $p = 0,423$	$r = 0,406$ $p = 0,076$
Vitalität (Eosin-Test) vital		$r = -0,017$ $p = 0,945$	$r = 0,246$ $p = 0,296$	$r = -0,039$ $p = 0,869$	$r = 0,178$ $p = 0,452$
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			$r = -0,412$ $p = 0,071$	$r = -0,304$ $p = 0,192$	$r = -0,079$ $p = 0,741$
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				$r = 0,470$ $p = 0,036$	$r = 0,565$ $p = 0,009$
Akrosomreaktion (CON A) intakt					$r = 0,267$ $p = 0,255$



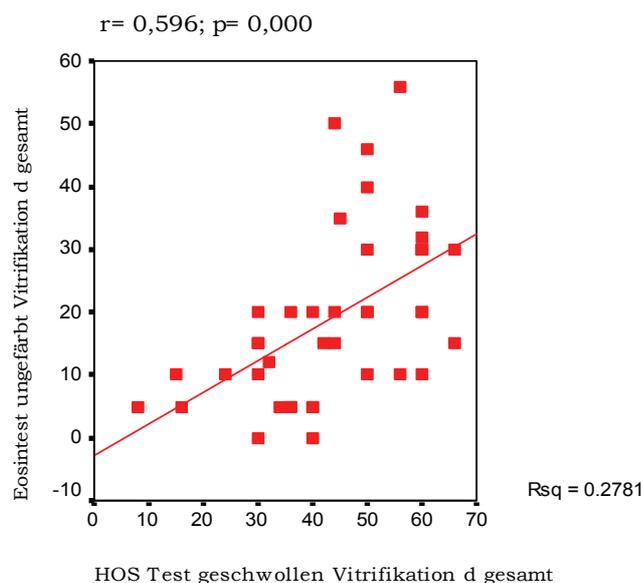
Streudiagramm 3: Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit im Nativsperma der subfertilen Gruppe

In der subfertilen Gruppe scheint zusätzlich ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Akrosoms und der vollständigen DNA-Kondensation zu bestehen ($r = 0,470$; $p = 0,036$).

Tabelle 17 a - c: Parameterkorrelationen für beide Gruppen insgesamt sowie für die fertile und die subfertile Gruppe bei Untersuchung nach **Vitrifikation d**; (Korrelation signifikant, wenn $p < 0,05$; Korrelation signifikant, wenn $p < 0,01$)

Tabelle 17 a: Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der Gesamtgruppe

n = 41 beide Gruppen	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	$r = 0,129$ $p = 0,439$	$r = 0,205$ $p = 0,217$	$r = 0,272$ $p = 0,098$	$r = 0,283$ $p = 0,085$	$r = -0,036$ $p = 0,831$
Vitalität (Eosin-Test) vital		$r = 0,596$ $p = 0,000$	$r = -0,036$ $p = 0,825$	$r = 0,174$ $p = 0,277$	$r = 0,190$ $p = 0,234$
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			$r = -0,187$ $p = 0,241$	$r = 0,100$ $p = 0,534$	$r = -0,023$ $p = 0,889$
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				$r = 0,205$ $p = 0,199$	$r = 0,206$ $p = 0,196$
Akrosomreaktion (CON A) intakt					$r = 0,422$ $p = 0,006$

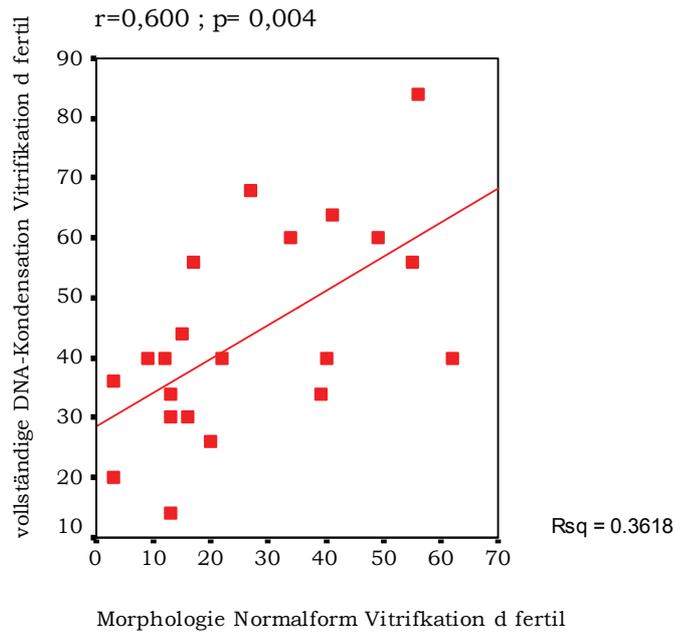


Streudiagramm 4: Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) nach Vitrifikation d in der Gesamtgruppe

Nach dem Einfrieren mit Vitrifikation d verschieben sich die Korrelationen der Parameter. In der Gesamtgruppe wird der Zusammenhang zwischen Vitalität und Membranintegrität durch $r = 0,596$ für den Korrelationskoeffizienten von Eosin- und HOS-Test bei einer Signifikanz von $p = 0,000$ (Streudiagramm 4) verdeutlicht. Außerdem zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Akrosoms und der Häufigkeit von Doppelstrangbrüchen der DNA, die umso seltener auftreten, je größer die Anzahl der intakten Akrosome ist ($r = 0,422$; $p = 0,006$).

Tabelle 17 b: Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der fertilen Gruppe

n = 21 fertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	$r = -0,031$ $p = 0,893$	$r = 0,162$ $p = 0,483$	$r = 0,600$ $p = 0,004$	$r = 0,140$ $p = 0,544$	$r = -0,024$ $p = 0,919$
Vitalität (Eosin-Test) vital		$r = 0,390$ $p = 0,080$	$r = 0,112$ $p = 0,627$	$r = -0,198$ $p = 0,389$	$r = -0,064$ $p = 0,783$
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			$r = 0,244$ $p = 0,286$	$r = 0,030$ $p = 0,897$	$r = 0,092$ $p = 0,690$
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				$r = 0,432$ $p = 0,050$	$r = 0,167$ $p = 0,468$
Akrosomreaktion (CON A) intakt					$r = 0,565$ $p = 0,008$

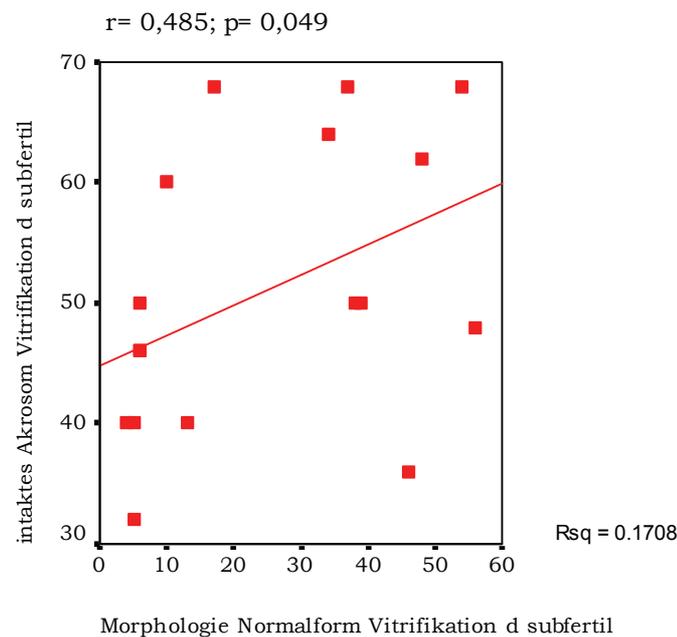


Streudiagramm 5: Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und normaler Spermienmorphologie nach Vitrifikation d in der fertilen Gruppe

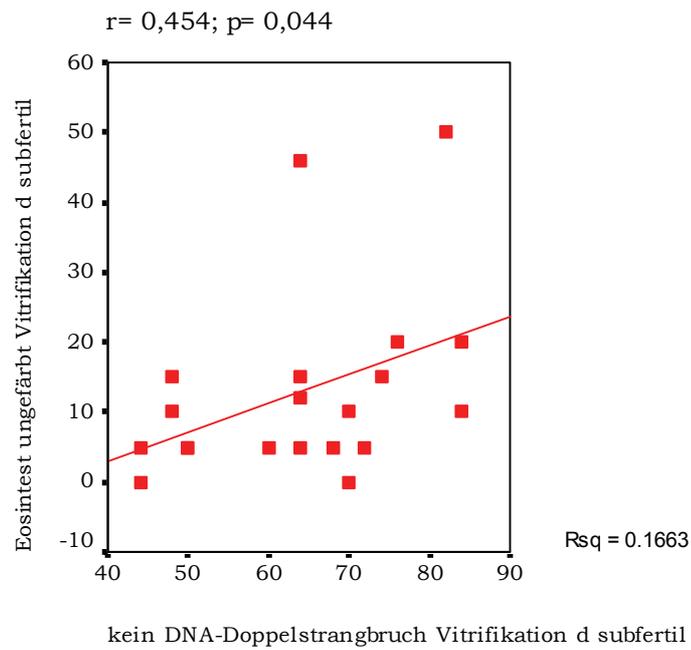
In der fertilen Gruppe spielt die Morphologie eine wichtige Rolle bezüglich der Anzahl vollständiger DNA-Kondensationen. Bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,600$ kann man sagen, je normaler ein Spermium sich morphologisch darstellt, desto höher die Chance einer vollständigen DNA-Kondensation (Streudiagramm 5). Der p-Wert ist mit 0,004 hochsignifikant. Des Weiteren erkennt man auch in dieser Gruppe, dass ein Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Akrosoms und den DNA-Doppelstrangbrüchen besteht ($r = 0,565$; $p = 0,008$).

Tabelle 17 c: Untersuchung nach Vitrifikation d: Korrelationen in der subfertilen Gruppe

n = 20 subfertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	r = 0,032 p = 0,902	r = 0,149 p = 0,568	r = -0,020 p = 0,940	r = 0,485 p = 0,049	r = 0,008 p = 0,976
Vitalität (Eosin-Test) vital		r = 0,259 p = 0,270	r = 0,234 p = 0,320	r = 0,392 p = 0,087	r = 0,454 p = 0,044
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			r = -0,383 p = 0,096	r = 0,201 p = 0,396	r = -0,108 p = 0,650
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				r = 0,084 p = 0,726	r = 0,330 p = 0,155
Akrosomreaktion (CON A) intakt					r = 0,289 p = 0,217



Streudiagramm 6: Korrelation zwischen Intaktheit des Akrosoms und normaler Spermienmorphologie nach Vitrifikation d in der subfertilen Gruppe



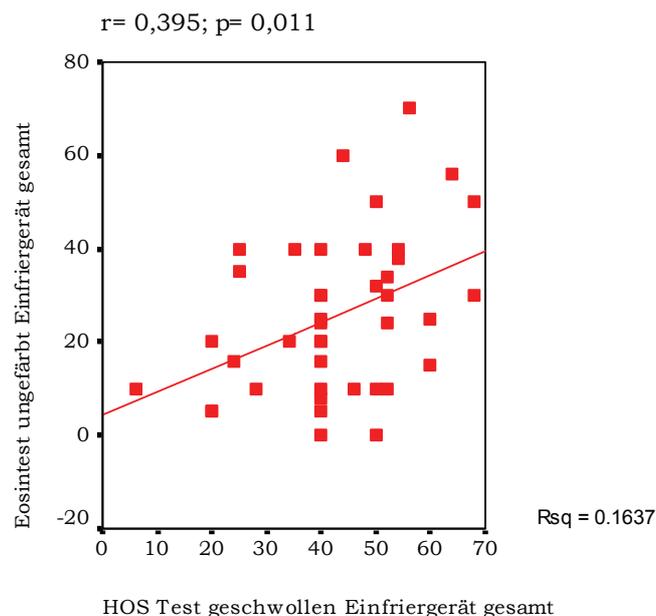
Streudiagramm 7: Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit nach Vitrifikation d in der subfertilen Gruppe

In der subfertilen Gruppe gibt es Zusammenhänge zwischen der Morphologie und der Intaktheit des Akrosoms ($r = 0,485; p = 0,049$; Streudiagramm 6) und zwischen der Vitalität (Eosin-Test) und der Anzahl der Doppelstrangbrüche ($r = 0,454; p = 0,044$; Streudiagramm 7). Die jeweiligen p-Werte sind hier allerdings nur knapp signifikant.

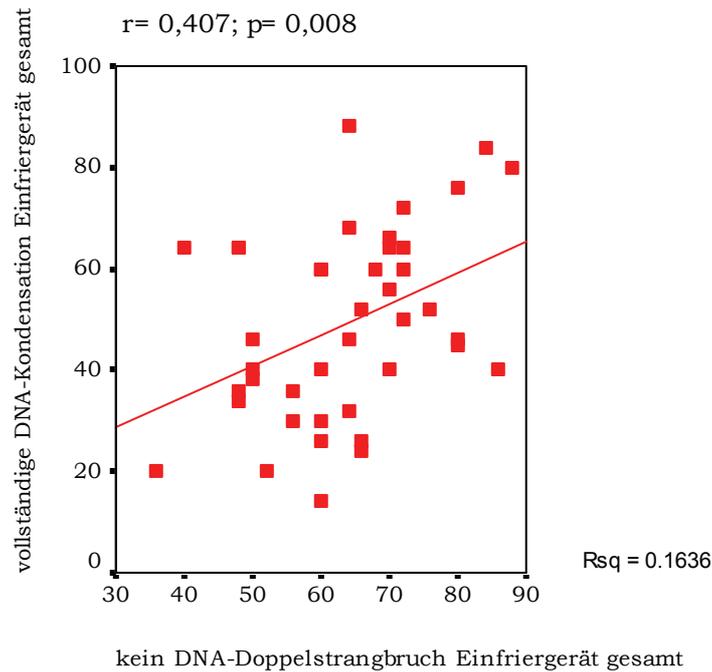
Tabelle 18 a - c: Parameterkorrelationen für beide Gruppen insgesamt sowie für die fertile und die subfertile Gruppe bei Untersuchung nach Einfrieren mit **Einfriergerät**; (Korrelation signifikant, wenn $p < 0,05$; Korrelation signifikant, wenn $p < 0,01$)

Tabelle 18 a: Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät:
Korrelationen in der Gesamtgruppe

n = 41 beide Gruppen	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	r = 0,065 p = 0,694	r = 0,139 p = 0,400	r = 0,161 p = 0,329	r = 0,162 p = 0,326	r = 0,059 p = 0,721
Vitalität (Eosin-Test) vital		r = 0,395 p = 0,011	r = -0,219 p = 0,169	r = 0,231 p = 0,146	r = 0,177 p = 0,268
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			r = -0,056 p = 0,728	r = -0,041 p = 0,801	r = -0,148 p = 0,354
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				r = 0,147 p = 0,728	r = 0,407 p = 0,008
Akrosomreaktion (CON A) intakt					r = 0,231 p = 0,147



Streudiagramm 8: Korrelation zwischen Vitalität (Eosin-Test) und Membranintegrität (HOS-Test) nach Einfrieren mit Einfriergerät in der Gesamtgruppe



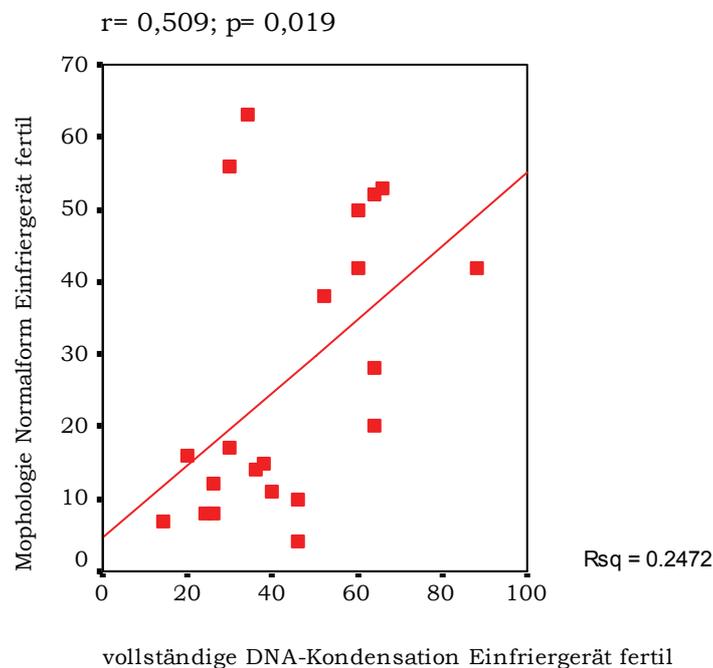
Streudiagramm 9: Korrelation zwischen vollständiger DNA-Kondensation und DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit nach Einfrieren mit Einfriergerät in der Gesamtgruppe

Nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät lässt sich für die Gesamtgruppe zeigen, dass auch hier – wie bei der Vitrifikation d – ein Zusammenhang zwischen der Vitalität und der Membranintegrität besteht. Die Korrelation beträgt $r = 0,395$ bei einer Signifikanz von $p = 0,011$, was auch hier bedeutet, je mehr Zellen vital sind, desto seltener liegen Membranschäden vor und umgekehrt (Streudiagramm 8).

Außerdem korreliert die Anzahl der vollständigen DNA-Kondensationen mit der Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbruch ($r = 0,407$; $p = 0,008$; Streudiagramm 9).

Tabelle 18 b: Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät:
Korrelationen in der fertilen Gruppe

n = 21 fertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	r = -0,216 p = 0,347	r = 0,202 p = 0,381	r = 0,509 p = 0,019	r = -0,043 p = 0,852	r = -0,028 p = 0,904
Vitalität (Eosin-Test) vital		r = 0,239 p = 0,297	r = 0,074 p = 0,749	r = 0,256 p = 0,263	r = 0,321 p = 0,156
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			r = 0,322 p = 0,155	r = -0,168 p = 0,466	r = 0,215 p = 0,348
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				r = 0,366 p = 0,102	r = 0,360 p = 0,109
Akrosomreaktion (CON A) intakt					r = 0,466 p = 0,033



Streudiagramm 10: Korrelation zwischen normaler Spermienmorphologie und vollständiger DNA-Kondensation nach Einfrieren mit Einfriergerät in der fertilen Gruppe

Für die fertile Gruppe gilt wie bei der Vitrifikation d, dass die Anzahl der normalen Spermien mit der Anzahl der vollständigen DNA-Kondensationen ($r = 0,509$; $p = 0,019$; Streudiagramm 10) zusammenhängt und die Intaktheit des Akrosoms auch eine Rolle bei der Anzahl der Doppelstrangbrüche spielt. Das wird durch einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,466$ bei $p = 0,033$ bestätigt.

Tabelle 18 c: Untersuchung nach Einfrieren mit Einfriergerät:
Korrelationen in der subfertilen Gruppe

n = 20 subfertile Gruppe	Vitalität (Eosin-Test) vital	Membran- integrität (HOS-Test) geschwollen	DNA- Kondensation (CMA3) vollständig	Akrosom- reaktion (CON A) intakt	Kein DNA- Doppelstrang- bruch (TUNEL) ungefärbt
Morphologie normal	$r = -0,059$ $p = 0,817$	$r = 0,049$ $p = 0,847$	$r = -0,123$ $p = 0,626$	$r = 0,351$ $p = 0,153$	$r = 0,201$ $p = 0,425$
Vitalität (Eosin-Test) vital		$r = 0,259$ $p = 0,270$	$r = -0,039$ $p = 0,871$	$r = -0,241$ $p = 0,307$	$r = 0,410$ $p = 0,073$
Membranintegrität (HOS-Test) geschwollen			$r = -0,336$ $p = 0,147$	$r = -0,017$ $p = 0,943$	$r = -0,379$ $p = 0,131$
DNA-Kondensation (CMA3) vollständig				$r = 0,061$ $p = 0,800$	$r = 0,415$ $p = 0,069$
Akrosomreaktion (CON A) intakt					$r = 0,122$ $p = 0,608$

Bei der subfertilen Gruppe ließen sich bei dieser Friermethode keine signifikanten Korrelationen zeigen. Man erkennt zwar eine Tendenz dahingehend, dass die vollständige DNA-Kondensation mit dem selteneren Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen zusammenhängt, jedoch ist der p-Wert von $p = 0,069$ bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,415$ nicht signifikant.

5. DISKUSSION

5.1. Bedeutung der Spermienmorphologie

Die Spermienmorphologie stellt eine etablierte Methode in der Fertilitätsdiagnostik dar, mit deren Hilfe man u.a. eine Aussage über die Anwendung möglicher – und je nach Ergebnis Erfolg versprechender Reproduktionsmethoden machen kann. Die Kryokonservierung verursacht Schäden in der Spermienmorphologie, Schäden in den Mitochondrien, akrosomale Veränderungen und Veränderungen des Spermischwanzes (WOOLLEY und RICHARDSON 1978).

In der vorliegenden Studie hatten 12 von 41 Probanden im Nativejakulat einen Anteil von weniger als 14 % normal geformter Spermien, womit sie unterhalb der nach strict criteria geltenden Referenzbereiche lagen. Davon gehörten sieben Probanden zur fertilen Gruppe und fünf Patienten zur subfertilen Gruppe. Das verdeutlicht, dass die Spermienmorphologie ein wichtiger, aber nicht allein aussagekräftiger Parameter für die Fertilitätsprognose ist. Insgesamt ergab die Anzahl normal geformter Spermien im Nativejakulat bei jeweils 100 ausgezählten Spermien im Durchschnitt $28,8 \pm 20,55$ %. Nach dem EAP unter Verwendung der unterschiedlichen Friermethoden stellte sich das Ergebnis wie folgt dar: Nach der Vitrifikation d waren 15 Probanden – davon sieben fertile und acht subfertile – unterhalb der Normwertgrenze und die durchschnittliche Anzahl normaler Spermien fiel auf $25,8 \pm 18,57$ % ab ($p = 0,279$; Tab. 7). Nach dem Einfrieren mit Einfriergerät hatten 17 Probanden – davon acht fertile und neun subfertile – Morphologiewerte unterhalb der Norm, die durchschnittliche Anzahl normalgeformter Spermien sank auf $25,7 \pm 18,99$ % ($p = 0,094$; Tab. 6). Somit waren die Ergebnisse in der Morphologie vor und nach Anwendung der jeweiligen Friermethode in der Gesamtgruppe nicht signifikant unterschiedlich. Auch der Vergleich zwischen den verwendeten Friermethoden zeigt keine bedeutsame Differenz in der Effektivität der jeweiligen Methode ($p = 0,617$; Tab. 8).

DONNELLY et al. (2001) untersuchten die Spermien fertiler und subfertiler Männer, indem sie diese mit einem herkömmlichen Kryoprotektivum mischten und als Friermethode den Stickstoffdampf wählten. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall der normal geformten Spermien in der fertilen Gruppe nach EAP von nativen Spermien und von Spermien nach Swim Up-Präparation. In der subfertilen Gruppe sanken die Ausgangswerte ebenfalls signifikant in der unpräparierten Gruppe und nach Vorbereitung mit Swim Up. Betrachtet man in der vorliegenden Studie die unterschiedlichen Gruppen im Vergleich dazu, so zeigen

sich folgende Ergebnisse: In der fertilen Gruppe sank der Ausgangswert nach EAP – sowohl unter Anwendung des Einfriergerätes als auch nach Vitrifikation d – nicht signifikant ab (Tab. 10). Für die subfertile Gruppe ergaben sich nach dem EAP für beide Methoden ebenfalls ähnliche Werte, wobei keine Gruppe bedeutend schlechter war (Tab. 11).

Die vergleichende Betrachtung bezüglich der verwendeten Friermethoden als auch bezüglich der unterschiedlichen Probandengruppen zeigt in beiden Fällen keine signifikante Differenz der gemessenen Werte. Die nicht-signifikanten p-Werte liegen für die fertile und die subfertile Gruppe bei $p = 0,866$ (Tab. 12) bzw. $p = 0,367$ (Tab. 13). Die nur geringfügigen Unterschiede der Nativwerte in der fertilen und subfertilen Gruppe und der geringe Abfall der Werte nach EAP können durch den Learning-Curve-Effect erklärt werden. Dieser besagt, dass mit zunehmender Erfahrung (d.h. im vorliegenden Fall: im Umgang mit dem Mikroskop und den zu unterscheidenden Morphologieformen sowie qualifiziertes Personal) die Anzahl der korrekt zugeordneten Spermienmorphologien zunimmt und die Richtigkeit der Aussagen über die Morphologie steigt. Da die Morphologie in der betrachteten Studie von drei verschiedenen Personen – mit unterschiedlichem Erfahrungsgrad im Bezug auf die Morphologieauswertung – bestimmt wurde, ergeben sich hierfür Werte, die von den Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien zu dem untersuchten Thema entsprechend abweichen können. In der Studie von DONNELLY et al. (2001) konnte bei der Untersuchung auf Strangbrüche der Spermien-DNA weder in der fertilen noch in der subfertilen Gruppe sowie ohne oder mit Swim Up eine signifikante Korrelation zwischen der Spermienmorphologie und der DNA-Integrität, die mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) untersucht wurde, erkannt werden. Diese Feststellung wird auch bei anderen Untersuchungsbedingungen in der vorliegenden Studie bestätigt: Zwischen der Morphologie und der DNA-Integrität, die hier mittels dem TUNEL-Test untersucht wurde, konnte keine Korrelation in der Nativgruppe oder nach EAP in der fertilen oder subfertilen Gruppe nachgewiesen werden (Tab. 16 - 18).

O' CONNELL et al. (2002) verwendeten zur Beurteilung der Morphologie Spermien fertiler Probanden, die in eine glycerol-basierte Hapes-Buffer-Lösung (15 %) gebracht und für 15 Minuten in Stickstoffdampf gefroren wurden, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Später wurden die Proben bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach dem EAP war die Anzahl morphologisch normaler Spermien signifikant um 37 % gesunken ($p = 0,001$). Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Studienbedingungen nur bedingt mit der betrachteten Studie vergleichen. Die Tendenz zu einer Verschlechterung der Morphologie nach EAP in der Gesamtgruppe ist auch hier zu erkennen, hat jedoch keine Signifikanz ($p_E = 0,094$; $p_{Vd} = 0,279$; Tab. 6 und 7).

HAMMADEH et al. (2001) untersuchten die Effektivität des Einfrierens von Spermien subfertiler Männer mittels computergesteuertem Einfriergeräts und des Einfrierens mit Stickstoffdampf. Als Kryoprotektivum verwendeten sie eine Mischung aus Glycerol, Glycin und Glucose (HSPM) 1:1 vermischt mit Ejakulat. Die Morphologie wurde mittels Papanicolaou-Färbung nach WHO-Kriterien und durch eine erfahrene Person untersucht. Die Anzahl morphologisch normaler Spermien im Nativzustand verringerte sich signifikant ($p = 0,001$) nach EAP bei beiden Methoden: nach Kryokonservierung mit Stickstoffdampf und mittels computergesteuertem Einfriergeräts. Allerdings war die Differenz innerhalb der beiden Methoden mit $p = 0,07$ nicht signifikant. In der behandelten Studie wurde bezüglich der Morphologie weder ein signifikanter Abfall der Werte nach EAP in der fertilen oder subfertilen Gruppe festgestellt, noch trat eine bedeutende Differenz bezüglich der verwendeten Friermethoden auf. Beim Vergleich der beiden Kryokonservierungsmethoden sind die p-Werte sowohl bei der fertilen als auch subfertilen Population nicht signifikant unterschiedlich, was für eine gleichwertige Effektivität der Friermethoden spricht ($p_{\text{fertil}} = 0,866$; $p_{\text{subfertil}} = 0,367$; Tab. 12 und 13). Der Abfall der Werte in der subfertilen Gruppe ist – trotz höherer Ausgangswerte – größer, was durch eine größere Angreifbarkeit der subfertilen fragileren Spermien gegenüber dem EAP erklärt werden könnte. BIANCHI et al. (1996) untersuchten Spermien auf mögliche Zusammenhänge zwischen Morphologie und Chromatinkondensation. Fast alle makrozephalen Spermien fluoreszierten bei Färbung mit CMA3, wohingegen Spermien mit amorphen oder normalen Köpfen in der Chromatinkondensation variierten. Es konnte keine Korrelation zwischen Spermien mit abnormaler Kopfkonfiguration und CMA3-positiven Spermien nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie konnte bei der fertilen Gruppe im Nativsperma ($r = 0,460$; $p = 0,041$; Tab. 16 b), nach Vitrifikation ($r = 0,6$; $p = 0,004$; Tab. 17 b) und nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät ($r = 0,509$; $p = 0,019$; Tab. 18 b) eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl morphologisch normal geformter Spermien und der vollständigen Chromatinkondensation festgestellt werden. Das bedeutet, dass bei einer normalen Spermienmorphologie häufiger auch eine vollständige Chromatinkondensation auftritt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass sich in beiden betrachteten Gruppen (fertil und subfertil) keine bedeutsamen Unterschiede bezüglich der Effektivität der angewendeten Kryokonservierungsmethoden erkennen lassen. Die untersuchten p-Werte sind nicht im signifikanten Bereich, was eine Äquivalenz der Methoden – im Hinblick auf den Parameter Morphologie – erkennen lässt.

5.2. Bedeutung der Spermienmotilität

Zu den gemessenen Parametern der behandelten Studie gehört auch die Spermienmotilität. Die Spermienmotilität gehört auch zu den Parametern, die eine Aussage über die Fertilitätsprognose machen können und wird standardmäßig bei jedem Spermioogramm mit untersucht. Sie ist besonders empfindlich gegenüber der Kryokonservierung (HENRY 1993) und stellt einen wichtigen Parameter dar, um einen Hinweis auf die Möglichkeit und den Erfolg einer IVF-Behandlung zu geben. Kryokonservierte Spermien zeigen oft eine geringere Progressivmotilität und sind fragiler als nicht-gefrorene Spermien (ALVAREZ und STOREY 1993). Der am häufigsten beschriebene Effekt der Kryokonservierung auf menschliche Spermien ist die markante Reduktion der Motilität (CRITSER 1988; ENGLERT et al. 1989). In der Gesamtgruppe ist ein signifikanter Abfall der Progressiv- und Globalmotilität sowohl nach Einfrieren mit dem Einfriergerät als auch nach Vitrifikation d (jeweils $p = 0,000$; Tab. 6 und 7) zu erkennen. Die Spermienmotilitätsunterschiede sind jedoch in der Gesamtgruppe, wenn man die beiden verwendeten Kryokonservierungsmethoden miteinander vergleicht, nicht signifikant unterschiedlich ($p_{\text{Prog mot}} = 0,812$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,313$; Tab. 8).

In der vorliegenden Studie erkennt man einen deutlichen Unterschied – bezüglich der Progressiv- und der Globalmotilität – bei den Nativwerten der fertilen und der subfertilen Gruppe. Die Spermienmotilität der fertilen Gruppe liegt für die Progressivmotilität bei $16,0 \pm 8,15$ % und die Globalmotilität bei $54,8 \pm 10,42$ % (Tab. 10). Im Vergleich dazu sind die Nativwerte der subfertilen Gruppe mit $2,3 \pm 3,02$ % (Progressivmotilität) und $19,8 \pm 10,93$ % (Globalmotilität) deutlich schlechter (Tab. 11). Nach dem EAP sinken die Werte in der fertilen Gruppe (Tab. 10) als auch in der subfertilen Gruppe deutlich ab (Tab. 11). Bei Betrachtung der fertilen als auch der subfertilen Gruppe lassen sich keine signifikanten Ergebnisse der Motilitätsveränderungen bei einer Gegenüberstellung von Einfriergerät und Vitrifikation d darstellen (fertile Gruppe: $p_{\text{Prog mot}} = 0,842$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,816$; Tab. 12; subfertile Gruppe: $p_{\text{Prog mot}} = 0,317$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,130$; Tab. 13).

O' CONNELL et al. (2002) untersuchten die Auswirkung der Kryokonservierung auf die Motilität. Dabei verwendeten sie die computerassistierte Samenanalyse (CASA), bei der für fast alle Motilitätsparameter eine hochsignifikante Reduktion nach EAP nachgewiesen wurde. Die Motilitätswerte wurden auf fast die Hälfte ihres Ausgangswertes reduziert. Einen ähnlichen Trend zeigten frühere Studien zur Kryokonservierung, die in eine vergleichbare Verringerung der Motilitätsparameter mündeten (HOLT et al. 1988; LEFFLER und WALTERS 1996).

RAGNI et al. (1990) betrachteten die Auswirkung der Frieremethode auf die Motilität, die Viabilität (d.h. die Funktions-/ Lebensfähigkeit mittels Eosin- und HOS-Test) und die Schwellung der Spermien bei Männern mit Morbus Hodgkin oder Hodentumoren, die krankheitsbedingt bereits eine abnormale Spermatogenese aufwiesen. Dazu verglichen sie das („schnelle“) Frieren mit Stickstoffdampf und das („langsame“) Frieren mittels computergesteuerten Einfriergeräts. Nach 24 Stunden wurden die Proben aufgetaut und die Progressivmotilität, die Viabilität untersucht. Alle Parameter waren signifikant schlechter nach EAP, wobei die Ergebnisse nach Kryokonservierung mit Einfriergerät besser waren als nach Anwendung der Stickstoffdampfemethode. Die Motilität war nach Anwendung der Stickstoffdampfemethode signifikant geringer. Im Vergleich zum betrachteten Studiendesign mit computergesteuertem Einfriergerät als „Slow-Freezing-Methode“ und Vitrifikation d als „Fast-Freezing-Methode“ lassen sich in der subfertilen Gruppe signifikante Abfälle sowohl in der Global- als auch in der Progressivmotilität feststellen. Die Vitrifikation d schneidet nur geringfügig schlechter ab als das computergesteuerte Einfrieren. Die Differenz der Werte ist nicht signifikant ($p_{\text{Prog mot}} = 0,317$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,130$; Tab. 13).

HAMMADEH et al. (1999) untersuchten die Motilität nach EAP mit computergesteuertem Einfriergerät mittels Maklerkammer, wobei in der Gesamtgruppe (fertil + subfertil) die Motilität reduziert wurde. Die prozentuale Reduktion der Motilität in der fertilen Gruppe war nicht signifikant besser gegenüber dem Wert der subfertilen Gruppe. In der hier vorliegenden Studie nahmen die Global- und die Progressivmotilität der Gesamtgruppe nach EAP mittels computergesteuertem Einfriergerät ebenfalls ab. Im Vergleich dazu war auch die Reduktion der Werte nach Vitrifikation d nicht signifikant schlechter ($p_{\text{Prog mot}} = 0,812$ und $p_{\text{Glob mot}} = 0,313$; Tab. 8). Die Motilität hat in der fertilen Gruppe für beide Kryokonservierungsmethoden – prozentuell betrachtet – eindeutig weniger verloren als in der subfertilen Gruppe (siehe 4.7. und 4.8.; Tab. 14 und 15). Das Einfriergerät erzielt im Vergleich der verwendeten Frieremethoden – sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe – bessere Werte, diese sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu denen der Vitrifikation d (Tab. 12 und 13).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass ein signifikanter Abfall der Spermienmotilität nach EAP stattfindet, sich jedoch in beiden betrachteten Gruppen (fertil und subfertil) keine bedeutsamen Unterschiede bezüglich der Effektivität der angewendeten Kryokonservierungsmethode erkennen lassen. Die untersuchten p-Werte sind nicht im signifikanten Bereich, was eine Äquivalenz der Methoden – im Hinblick auf den Parameter Motilität – erkennen lässt.

5.3. Bedeutung der Vitalität und Membranintegrität

Die Vitalität und die Membranintegrität sind Parameter, die bei jeder Samenanalyse untersucht werden und eine bedeutende Aussagekraft bezüglich des Fruchtbarkeitspotentials des Spermiums besitzen. Der Eosin-Test betrachtet dabei hauptsächlich den Kopfteil des Spermiums, der HOS-Test den Spermischwanz. Die funktionelle und strukturelle Integrität der Spermienmembran ist entscheidend für die Lebensfähigkeit der Spermatozoen. Ein allgemein verwendeter Färbetest, um die Spermienmembran zu bewerten, ist der Eosin-Test. Dieser untersucht die strukturelle Integrität (LECHNIAK 2002). Der hypoosmotische Spermischwelltest (HOS-Test) ist ursprünglich für menschliche Spermien entwickelt worden (JEYENDRAN et al. 1984). Der Test ermöglicht es, den funktionellen Status der Spermienmembran zu eruieren. Das Prinzip basiert auf dem Wassertransport durch die Spermischwanzmembran unter hypoosmotischen Bedingungen (LECHNIAK 2002). Die Spermienmembranintegrität kann die Spermienmotilität beeinflussen, da eine funktionelle Plasmamembran nötig ist, um die Spermienbewegung zu unterstützen (VAN DER VEN et al. 1986).

CHAN et al. (1990) stellten eine Reduktion der Spermienintegrität von 36 % auf 16 % in der Anzahl der geschwollenen Spermien nach EAP fest. In der hier vorliegenden Studie zeigen die Vitalität (Eosin-Test) und die Membranintegrität (HOS-Test) der Spermien einen signifikanten Abfall der Werte in der Gesamtpopulation nach dem EAP sowohl bei dem Einfriergerät als auch bei der Vitrifikation d im Vergleich zum Nativsperma (jeweils $p = 0,000$; Tab. 6 und 7). Die p -Werte beim Vergleich der beiden Kryokonservierungsmethoden sind für den Eosin-Test mit $p = 0,001$ hochsignifikant und für den HOS-Test mit $p = 0,611$ nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 8).

Bei der fertilen Gruppe schneidet die Vitalität (Eosin-Test) nach Einfrieren mit dem Einfriergerät signifikant besser ab als nach Vitrifikation d ($p = 0,001$; Tab. 12).

Bei der Membranintegrität (HOS-Test) ist das Ergebnis in der fertilen Gruppe nach Vitrifikation d signifikant besser als nach Einfrieren mit dem Einfriergerät ($p = 0,036$; Tab. 12). Bezüglich der fertilen Gruppe stellt sich die Vitrifikationsmethode in der betrachteten Studie annähernd gleich effizient zum konventionellen Einfrieren mit Einfriergerät dar, da alle anderen Parameter keine signifikanten p -Werte aufweisen.

In der subfertilen Gruppe findet man keine signifikanten Differenzen. Nach der vorliegenden Studie können damit beide Kryokonservierungsmethoden in der subfertilen Gruppe mit gleich

guten Ergebnissen bei den untersuchten Parametern angewendet werden ($p_{\text{Eosin-Test}} = 0,134$ und $p_{\text{HOS-Test}} = 0,105$; Tab. 13).

Bei ihren Untersuchungen an Patienten mit Morbus Hodgkin zeigten RAGNI et al. (1990), dass die Vitalität nach schnellem Frieren mittels Stickstoffdampf signifikant geringer ist als nach dem langsamen, stufenweisen Frieren mit dem Einfriergerät. Die gleichen Ergebnisse zeigten sich auch bei der Untersuchung der Membranintegrität. Vergleichend dazu zeigt sich in der betrachteten Studie bezogen auf die subfertile Gruppe ein Abfall der Ausgangswerte der Vitalität und der Membranintegrität nach dem computergesteuerten langsamen Einfrieren und nach Vitrifikation d, wobei die Werte nach Kryokonservierung mittels dem computergesteuerten Einfriergerät etwas weniger absinken (Tab. 11). Die p-Werte nach EAP im Vergleich beider Methoden sind jedoch – wie oben bereits beschrieben – nicht signifikant unterschiedlich.

HAMMADEH et al. (1999) beschreibt bei seiner Untersuchung nach EAP mit dem computergesteuerten Einfriergerät ebenfalls eine signifikante Reduktion der Anzahl der Spermien mit intakter Membran (HOS-Test), aber keinen signifikanten Unterschied zwischen fertiler und subfertiler Gruppe. In der hier behandelten Studie sinkt die Anzahl der geschwollenen Spermien nach EAP mit computergesteuertem Einfriergerät und mit Vitrifikation d in der fertilen Gruppe deutlich ab (Tab. 10). Dabei sind die Ergebnisse nach Verwendung der Vitrifikation d hier signifikant besser ($p = 0,036$; Tab. 12). In der subfertilen Gruppe kommt es – bei der Membranintegrität – ebenfalls zu einem großen Abfall der Ausgangswerte (Tab. 11). Im Vergleich der beiden Friermethoden schneidet hier das computergesteuerte Einfrieren geringfügig, aber nicht signifikant besser ab ($p = 0,105$; Tab. 13). Im prozentualen Vergleich der fertilen und subfertilen Gruppe nach EAP mit dem Einfriergerät erzielt die fertile Gruppe minimal bessere Ergebnisse als die subfertile Gruppe (64,39 % vs. 63,93 % des Nativwertes; Tab. 14). Bei der Vitrifikation d liegt das Ergebnis eindeutiger auf der Seite der fertilen Gruppe (71,23 % vs. 59,02 %; Tab. 15).

Der von HAMMADEH et al. (1999) durchgeführte Vitalitätstest mit Eosin zeigt nach EAP mit computergesteuertem Einfriergerät einen signifikanten Anstieg der durch Eosin angefärbten Spermien. Dabei weist die subfertile Gruppe eine höhere Prozentzahl gegenüber der fertilen Gruppe auf, welche jedoch nicht signifikant ist. In der hier durchgeführten Studie zeigt sich folgendes Ergebnis: In der fertilen Gruppe wird nach EAP ein signifikanter Abfall der ungefärbten Spermien bei beiden untersuchten Methoden festgestellt, wobei das Ergebnis nach Vitrifikation d hier signifikant schlechter ist (Tab. 10; $p = 0,001$; Tab. 12). Die subfertile Gruppe hat bereits zu Beginn einen geringeren Nativwert an ungefärbten Spermien und

erfährt einen weiteren Abfall nach EAP (Tab. 11). Die Differenz der beiden verwendeten Friermethoden ist nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,134$; Tab. 13). Im prozentualen Vergleich der fertilen mit der subfertilen Gruppe zeigt sich jedoch, dass die subfertile Gruppe beim Einfrieren mit dem Einfriergerät und bei der Vitrifikation d geringere Verluste als die fertile Gruppe hat (Tab. 14 und 15).

HAMMADEH et al. (2001) beschreibt nach EAP von subfertilen Proben mit dem computergesteuerten Einfriergerät und mit der Stickstoffdampfmethodene eine signifikante Reduktion der vitalen Spermien (= Eosin-ungefärbt). Die Vitalität kann dabei signifikant besser durch das Frieren mittels computergesteuertem Einfriergeräts als durch das Frieren mittels des Stickstoffdampfes bewahrt werden ($p = 0,022$). In der vorliegenden Studie kommt es nach EAP der subfertilen Spermien mit dem computergesteuerten Einfriergerät und mit Vitrifikation d auch zu einer signifikanten Reduktion der vitalen Spermien. Der Unterschied der beiden Friermethoden ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,134$; Tab. 13), was – im Hinblick auf die Vitalität – für eine gleichwertige Effizienz der Methoden bei Subfertilität zu werten ist.

Der Nativwert der subfertilen Spermien mit intakter Membran (= HOS-ungeschwollen) fällt in der betrachteten Studie nach EAP ebenfalls ab. Auch hier ist der Unterschied der beiden Methoden nicht signifikant ($p = 0,105$; Tab. 13). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den vorausgegangenen Untersuchungen von HAMMADEH et al. (2001), bei denen in der subfertilen Population ebenfalls eine signifikante Reduktion der ungeschwollenen Spermien nach EAP auftrat. Dabei wurde zwischen den beiden verwendeten Friermethoden auch kein signifikanter Unterschied festgestellt.

In der hier betrachteten Studie wurden mögliche Zusammenhänge zwischen Vitalität und Membranintegrität sowie anderen Parametern betrachtet. Dabei ließen sich im Nativsperma keine möglichen Korrelationen erkennen.

Nach Vitrifikation d konnte man für die Gesamtpopulation eine signifikante Korrelation zwischen der Membranintegrität und der Vitalität feststellen ($r = 0,596$; $p = 0,000$; Streudiagramm 4; Tab. 17 a), die auch nach dem Frieren mit dem Einfriergerät auftrat ($r = 0,395$; $p = 0,011$; Streudiagramm 8; Tab. 18 a). Es ist nicht ersichtlich, wie dieser Zusammenhang zu erklären ist oder in welcher Form sich Veränderungen im Bereich der Kopf- bzw. der Schwanzregion des Spermiums gegenseitig verstärken oder beeinträchtigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auch für die Parameter Vitalität und Membranintegrität, in beiden betrachteten Gruppen (fertil und subfertil) keine eindeutigen Unterschiede im Hinblick auf die Effektivität der verwendeten Kryokonservierungsmethode.

5.4. Bedeutung der Chromatinkondensation

Die Bildung von reifen Spermatozoen aus Spermatiden setzt einige strukturelle und chemische Modifikationen voraus, zu denen die Substitution lysinreicher Histone durch Protamine gehört. Diese beinhalten viel Arginin und sind negativ geladen, was eine dichtere Bindung an die DNA ermöglicht. Diese Verdichtung wird „Kondensation“ genannt (HECHT 1986). Weiterhin findet eine Kondensation während der Wanderung durch den Epididymis sowie gleichzeitig eine Oxidation der Cystein-Reste und die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Protaminen statt. Auch nach der Ejakulation wird eine erneute Kondensation hervorgerufen, da das im Ejakulat enthaltene Zink an die freien Thiol-Gruppen bindet (ARVER und ELIASSON 1982). Dieser mehrschrittige Kondensationsvorgang scheint präventiv vor Schädigungen zu bewahren und ist essentiell, da den Spermien Reparaturenzyme für ihre DNA fehlen (MATSUDA et al. 1985).

Nach Eindringen des Spermiums in die reife Eizelle (Stadium MII) kommt es zur Dekondensation des Chromatins im Zytoplasma der Eizelle. Dies ist die Voraussetzung für eine Befruchtung. Die Disulfidbrücken der Protamine im Kern werden durch Glutathion reduziert (PERREAULT 1992) und nachfolgend durch embryonale Histone ersetzt (LENO et al. 1996).

In der vorliegenden Studie wurde der Kondensationsstatus des Chromatins der Spermien mittels einer Chromomycin A3-Färbung beurteilt. Bei der Spermiogenese ist der Ersatz von Chromatinproteinstrukturen (= Histone) durch Protamine ein zentrales Ereignis, wodurch eine strukturelle Organisation im Spermienkern stattfinden kann (WARD und COFFEY 1991). Durch die Protamine wird ein fester Zusammenhalt bewirkt. Jede Modifikation oder das Fehlen der Protamine kann zu einer Unregelmäßigkeit im Verpackungsprozess des Spermienkernes führen, und die Spermienqualität sowie die Befruchtungsfähigkeit beeinflussen. CMA3 ist ein nützliches Werkzeug, um Spermien zu erkennen, denen das Protamin fehlt (BIANCHI 1993).

In der untersuchten Studie verringerte sich in der Gesamtgruppe die Anzahl der Spermien mit vollständig kondensierter DNA im Vergleich zum Nativsperma nach EAP sowohl bei der Vitrifikation d, als auch unter Verwendung des Einfriergerätes signifikant (jeweils $p = 0,000$; Tab. 6 und 7). Die Unterschiede in der DNA-Kondensation (CMA3) waren nach EAP im Vergleich der beiden untersuchten Friermethoden sowohl in der Gesamtgruppe mit einem p -Wert von 0,387 (Tab. 8) als auch in der fertilen und der subfertilen Gruppe mit $p = 0,759$ bzw. $p = 0,256$ nicht signifikant unterschiedlich

(Tab. 12 und 13). Darüber hinaus fand man eine signifikante Korrelation beim Nativsperma der Gesamtpopulation zwischen der vollständigen DNA-Kondensation und der Anzahl an Spermien, die keine DNA-Doppelstrangbrüche aufwiesen ($r = 0,340$ und $p = 0,030$; Streudiagramm 1; Tab. 16 a). Das bedeutet, dass je vollständiger die Kondensation des Chromatins ablief, desto weniger Doppelstrangbrüche konnten nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Untersuchungen von LOPES et al. (1998), SAKKAS et al. (2002) und PIASECKA et al. (2006) überein.

Das Nativsperma der subfertilen Population zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen der vollständigen DNA-Kondensation und dem Fehlen von Doppelstrangbrüchen in der DNA ($r = 0,565$; $p = 0,009$; Streudiagramm 3; Tab. 16 c) sowie einen weiteren Zusammenhang mit der Intaktheit des Akrosoms ($r = 0,470$; $p = 0,036$; Tab. 16 c).

In der fertilen Gruppe konnte im Nativsperma eine knapp signifikante Korrelation zwischen dem Anteil morphologisch normaler Spermien und dem Anteil vollständig kondensierter Spermien mittels der CMA3-Färbung ($r = 0,460$ und $p = 0,041$; Streudiagramm 2; Tab. 16 b) nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang konnte für das Nativsperma der subfertilen Population nicht dargestellt werden (Tab. 16 c).

Frühere Untersuchungen von FRANKEN et al. (1999) konnten ebenfalls den Zusammenhang zwischen Morphologie und Chromatinfärbung mit CMA3 bei fertilen und subfertilen Populationen nachweisen. Die Chromatinkondensation war signifikant und negativ ($r = -0,40$ und $p = 0,001$) mit einer abnormalen Spermienmorphologie korreliert, d.h. je dichter das Chromatin gepackt ist, desto seltener tritt eine abnormale Spermienmorphologie auf. Dieses Resultat stimmt auch mit den Ergebnissen der hier betrachteten Studie überein.

Nach Vitrifikation wurde der bereits oben beschriebene Zusammenhang zwischen Morphologie und DNA-Kondensation in der fertilen Gruppe noch deutlicher ($r = 0,600$; $p = 0,004$; Streudiagramm 5; Tab. 17 b).

Nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät ergab sich in der Gesamtgruppe eine Korrelation zwischen der vollständigen DNA-Kondensation und dem Fehlen von Doppelstrangbrüchen ($r = 0,407$; $p = 0,008$; Streudiagramm 9; Tab. 18 a). In der fertilen Gruppe konnte bei dieser Methode ein Zusammenhang zwischen der Morphologie und der DNA-Kondensation nachgewiesen werden ($r = 0,509$; $p = 0,019$; Streudiagramm 10; Tab. 18 b). In der subfertilen Gruppe ließen sich nach dem Einfrier-Auftau-Prozess mit dem Einfriergerät keine Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern erkennen.

Der Zusammenhang zwischen der vollständigen Chromatinkondensation und der normalen Morphologie der Spermien stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von BIANCHI et al.

(1996) und ESTERHUIZEN et al. (2000) zu diesem Thema überein. Auch dort wurde die CMA3-Färbung verwendet.

Eine frühere Studie hat gezeigt, dass Spermien mit abnormaler Chromatinorganisation häufiger bei infertilen als bei fertilen Männern auftreten (EVENSON et al. 1980). Vergleicht man dazu die Nativwerte der fertilen und subfertilen Gruppe in der vorliegenden Studie, so lässt sich dieses Ergebnis nicht bestätigen. Es gibt annähernd gleich viele Spermien mit guter Chromatinkondensation sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe (Tab. 10 und 11).

HAMMADEH et al. (1999) verwendeten nach EAP mit dem Einfriergerät die Anilinblau-Färbung, um den Chromatinzustand darzustellen. Es zeigte sich, dass nach EAP die Menge des dekondensierten Chromatins in der fertilen Population anstieg. In der subfertilen Gruppe waren ebenfalls höhere Werte für die unvollständige Kondensation des Chromatins festzustellen. Es wurde erkannt, dass der Kryoschaden in der subfertilen Gruppe signifikant größer ist ($p < 0,009$). Dies lässt vermuten, dass das Chromatin in der fertilen Population den Kryoschäden besser widerstehen kann als in der subfertilen Gruppe. In früheren Studien wurde auch demonstriert, dass Defekte der Chromatinstruktur in einer erhöhten DNA-Instabilität resultieren und die Empfindlichkeit gegenüber denaturierenden Faktoren steigt (MANICARDI 1995). Diese Ergebnisse stimmen für die Chromatinkondensation mit der hier vorliegenden Studie nur teilweise überein. Die Anzahl des kondensierten Chromatins sinkt in der fertilen Gruppe nach EAP mit dem Einfriergerät und nach Vitrifikation d (Tab. 10). In der subfertilen Gruppe ist auch ein deutlicher Abfall zu erkennen (Tab. 11). Vergleicht man die Methoden miteinander, so lassen sich in der fertilen Gruppe ($p = 0,759$; Tab. 12) als auch in der subfertilen Gruppe ($p = 0,256$; Tab. 13) keine signifikanten Unterschiede in der Effektivität der verwendeten Friermethoden erkennen.

HAMMADEH et al. (2001) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Friermethoden (computergesteuertes Einfriergerät, Stickstoffdampf) auf die Spermienqualität subfertiler Männer. Dazu verwendeten sie als Kryoprotektiva das HSPM – bestehend aus Glycerol, Glycin und Glukose – welches 1:1 mit Ejakulat gemischt wurde. Mit der Acridin-Orange-Färbung wurde die Chromatinkondensation untersucht. Die Ausgangswerte im Nativsperma fielen nach dem Einfrier-Auftau-Prozess mit der Stickstoffdampfmethod und nach dem computergesteuerten Einfrieren ab. Der Unterschied zwischen den beiden Friermethoden war mit $p = 0,001$ signifikant. Die Chromatinintegrität wurde durch das Einfriergerät besser erhalten als durch den Stickstoffdampf, was auch mit den Untersuchungen von McLAUGHLIN (1992) übereinstimmt. In der hier behandelten Studie wurden ebenfalls

unterschiedliche Friermethoden zur Kryokonservierung der subfertilen Gruppe angewendet (computergesteuertes Einfriergerät, Vitrifikation d) und die Spermien wurden auch auf die gleiche Weise wie oben gefroren. Die Chromatinkondensation wurde jedoch anhand der CMA3-Färbung bestimmt. Es konnte ein signifikanter Abfall der Werte von vollständig kondensierter DNA der Spermien vor und nach EAP mit dem computergesteuerten Einfriergerät und mit der Vitrifikation d nachgewiesen werden (Tab. 11). Im Vergleich der Friermethoden konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,256$; Tab. 13) festgestellt werden. HOFMANN et al. (1991) zeigten, dass die Chromatinkondensation nicht nur in missgebildeten Spermien, sondern auch in normalen Morphologieformen beeinträchtigt ist. Die Prozentzahl der Spermien mit Chromatinkondensationsstörungen steigt an, wenn ein höheres Vorkommen an abweichenden Morphologiemustern – im Vergleich zur Normalform – vorhanden ist. Dies wird auch durch die – in der vorliegenden Studie auftretende – schwach signifikante Korrelation der Morphologie mit der Chromatinkondensation im Nativsperma der fertilen Population bestätigt ($r = 0,460$; $p = 0,041$; Streudiagramm 2; Tab. 16 b). Das bedeutet, dass je höher der Anteil des vollständig kondensierten Chromatins ist, desto größer ist die Anzahl morphologisch normaler Spermien. IRANPOUR et al. (2000) untersuchten die Zusammenhänge zwischen der Chromatinkondensation (CMA3) und anderen Spermienparametern. Die Spermien wurden dazu in PBS gewaschen, in Methanoleisessigsäure fixiert und auf Objektträger ausgestrichen. Es fand kein EAP statt. Die CMA3-positiven Spermien (unvollständige Chromatinkondensation) wiesen in der Studie eine negative Korrelation mit der Befruchtungsrate, mit der Motilität und mit der Anzahl der Spermien sowie eine positive Korrelation mit der Anzahl abnormaler Spermienmorphologieformen auf. In der hier vorliegenden Studie kann – umgekehrt ausgedrückt – ein positiver Zusammenhang zwischen der vollständigen Chromatinkondensation und der normalen Morphologie im Nativsperma für die fertile Gruppe bestätigt werden ($r = 0,460$; $p = 0,041$; Streudiagramm 2; Tab. 16 b). Die subfertile Nativgruppe zeigte keine signifikante Korrelation der beiden Parameter zueinander ($r = 0,179$; $p = 0,423$; Tab. 16 b).

KARYDIS et al. (2005) führten keine Kryokonservierung durch, untersuchten aber das Auftreten abnormaler Chromatinkondensation zu anderen Parametern und stellten heraus, dass eine positive Korrelation zur Spermienkonzentration auftrat. Keine Korrelation hingegen wurde bezüglich der Morphologie, der Motilität und der Befruchtungsrate festgestellt. In der vorliegenden Studie wurde dazu abweichend im fertilen Nativsperma eine Korrelation

zwischen der Chromatinkondensation und der Morphologie festgestellt ($r = 0,460$; $p = 0,041$; Streudiagramm 2; Tab. 16 b).

LOLIS et al. (1996) fanden eine stark negative Korrelation ($r = -0,64$; $p < 0,001$) zwischen der Spermienmenge sowie der abnormalen Spermienmorphologie und der Anzahl der CMA3-positiven Spermien. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen im Umkehrschluss eine positive Korrelation zwischen der normalen Morphologie und der vollständigen Chromatinkondensation im Nativsperma der fertilen Gruppe ($r = 0,460$; $p = 0,041$, Streudiagramm 2, Tab. 16 b).

KAZEROONI et al. (2009) verglichen die Spermien von Patienten, bei denen nach Befruchtung rezidivierende Aborte auftraten, mit einer Kontrollgruppe. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl CMA3-positiver Spermien in der Patientengruppe. Die Spermienmorphologie und die Progressivmotilität waren negativ mit der Anzahl CMA3-positiver Spermien korreliert, d.h. je höher der Anteil an unvollständiger Chromatinkondensation war, desto geringer waren die Progressivmotilität und die Anzahl an morphologisch normalen Spermien.

HENKEL et al. (2010) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Chromatinkondensation der Spermien, der Spermienmorphologie, der ROS-Produktion, der DNA-Schädigung der Spermien und dem Auftreten von Leukozyten im Ejakulat. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen CMA3-positiven Spermien, der Leukozytenkonzentration und der ROS-Menge nachgewiesen werden. Vor allem Patienten mit einer Leukozytenkonzentration von mehr als $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ wiesen eine höhere Anzahl an CMA3-positiven Spermien (unvollständige Chromatinkondensation) auf. Patienten mit einem geringen Anteil an normaler Spermienmorphologie (0 – 4 %) hatten eine signifikant höhere Prozentzahl an DNA-geschädigten Spermien.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Vitrifikation eine adäquate Methode darstellt, um die Kondensation der Spermien-DNA annähernd gleich gut – wie das herkömmliche Einfrieren mittels computergesteuerten Einfriergeräts – zu bewahren.

5.5. Bedeutung der DNA-Doppelstrangbruchhäufigkeit

In der hier betrachteten Studie wurde das Auftreten von DNA-Strangbrüchen nach dem EAP mittels TUNEL-Färbung (Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) untersucht. Bei der Analyse des menschlichen Spermias hat der TUNEL-Test ähnliche Ergebnisse wie die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) erzielt (COLLINS et al. 1997). Die Spermien-DNA ist sehr resistent gegenüber physikalischer und chemischer Denaturierung. Veränderungen in der Kernstruktur des Spermiums (z.B. ungenügender Austausch der Histone gegen Protamine) während der Spermatogenese können Anomalitäten in der Chromatinstruktur bei menschlichen Spermien bedingen (MANICARDI et al. 1995).

Die DNA-Brüche bei Spermien können sich aus einem mangelhaften Verpacken des Chromatins während der Spermiogenese (MANICARDI et al. 1995; SAILER et al. 1995), aus einer unzureichenden Apoptose vor Ejakulation (SAKKAS 1999; 2002) oder aus einer massiven Produktion von ROS (Reactive Oxygen Species) im Ejakulat ergeben (SUN 1997; AITKEN 1998; LOPES 1998 a; IRVINE 2000; MOUSTAFA 2004). Im Gegensatz zu den meisten Körperzellen verfügen Spermien von Säugetieren nicht über ein effektives DNA-Reparatursystem (SEGA et al. 1978). Das Reparatursystem der Eizellen kann bis zu einem bestimmten Ausmaß auf geschädigte Spermien-DNA einwirken, so dass die Fähigkeit der Befruchtung der Eizelle durch das Spermium ermöglicht wird.

Die Exposition gegenüber Umwelt- und Industriegiften, die Genetik, der oxidative Stress, das Rauchen usw. begründen ebenfalls die DNA-Fragmentierung und Infertilität (OLIVA 2001; SALEH 2002). Die Befruchtung durch Spermien mit fragmentierter DNA resultiert in schlechterer embryonaler Entwicklung, seltenerer Implantation, geringeren Schwangerschaftsraten und wiederkehrenden Fehlgeburten (LOPES 1998 a; EVENSON 1999).

In der behandelten Studie verringerte sich die Anzahl der Spermien ohne Doppelstrangbrüche in der Gesamtgruppe nach dem EAP mit beiden Friermethoden im Vergleich zum Nativsperma signifikant (jeweils $p = 0,000$; Tab. 6 und 7). Die Unterschiede in der Anzahl der vorhandenen Doppelstrangbrüche nach EAP waren beim Vergleich der beiden untersuchten Friermethoden sowohl in der fertilen Gruppe als auch in der subfertilen Gruppe mit $p = 0,361$ bzw. $p = 0,487$ nicht signifikant verschieden. Dies betont – bezüglich der Anzahl des Auftretens von DNA-Doppelstrangbrüchen – ein äquivalentes Resultat der beiden Friermethoden (Tab. 12 und 13).

AITKEN et al. (1993) sowie GOMEZ und AITKEN (1996) zeigten in ihren Studien, dass erhöhte Konzentrationen an ROS bei gleichzeitigem Vorhandensein einer geringeren

Protaminierung mit einer schlechteren Spermienqualität und einer größeren DNA-Fragmentierung einhergehen. BUTTKE und SANDSTROM (1994) sowie RATTAN et al. (1994) wiesen ebenfalls nach, dass ROS – wie Superperoxid-Anionen und Hydrogenperoxide – zur DNA-Fragmentierung in Zellen führen. Übermäßige Mengen an ROS tragen zum Verlust der Spermien-DNA-Integrität bei (AITKEN 2001; MARCHETTI 2002).

HAMMADEH et al. (2008) bestätigten auch die Auswirkung der ROS-Konzentration auf die Spermienqualität. Es wurde eine negative Korrelation zur Vitalität, zur Membranintegrität, zur normalen Spermienmorphologie und zur Befruchtungsfähigkeit nachgewiesen. Die TAS (Total Antioxidant Status)-Menge korrelierte positiv mit der Befruchtungsrate, d.h. je größer die Konzentration an Antioxidantien war, desto erfolgreicher war die Befruchtung. Des Weiteren korrelierte eine erhöhte DNA-Strangbruch-Häufigkeit negativ mit der Spermienmotilität, der Vitalität und der Membranintegrität. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine Korrelation zwischen der Vitalität und dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen nach Vitrifikation d in der subfertilen Gruppe festgestellt ($r = 0,454$; $p = 0,044$; Streudiagramm 7; Tab. 17 c).

DONNELLY et al. (2001) untersuchten natives und kryokonserviertes Sperma von fertilen und infertilen Probanden und unterschieden weiterhin speziell vorbereitete von unpräparierten Proben. Mit einem gängigen Kryoprotektivum wurde in Stickstoffdampf gefroren, bevor die Proben in flüssigen Stickstoff gebracht und zu einem späteren Zeitpunkt bei Raumtemperatur wieder aufgetaut wurden. Die DNA-Integrität wurde mittels einer modifizierten Methode der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) beurteilt (HUGHES et al. 1998). Dabei wurden die Spermien in Agarose-Gel eingebettet, die Plasmamembranen aufgelöst und die Anordnung der Proteine aufgebrochen. Die Fragmente der DNA-Stränge wurden durch Elektrophorese sichtbar gemacht. Bei DONNELLY et al. (2001) ergab sich in der fertilen Gruppe kein signifikanter Unterschied in der DNA-Integrität von nativen und präparierten oder unpräparierten kryokonservierten Spermien. Im Vergleich dazu fand man in der hier betrachteten Studie einen starken Abfall der Intaktheit der DNA in der fertilen Gruppe bei computergesteuertem Einfrieren als auch bei der Vitrifikation d (Tab. 10) mit einem geringfügig besseren Ergebnis unter Verwendung der letztgenannten Friermethode ($p = 0,361$; Tab. 12). In der infertilen Gruppe wurde bei DONNELLY et al. (2001) ein signifikanter Abfall der intakten DNA nach Kryokonservierung – ohne und mit vorheriger Präparation – der Spermien festgestellt. In der vorliegenden Studie zeigte sich ein ähnlich starker Abfall der Werte nach EAP in der subfertilen Gruppe (Tab. 11), wobei hier das

computergesteuerte Einfrieren ein minimal besseres Ergebnis erbrachte als die Vitrifikation d ($p = 0,487$; Tab.13).

Betrachtet man die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern, so wurde in der vorliegenden Studie in der Gesamtgruppe eine Korrelation zwischen der DNA-Kondensation und der Doppelstrangbruchhäufigkeit festgestellt. Je höher der Anteil an vollständig kondensiertem Chromatin ist, umso seltener treten Doppelstrangbrüche der DNA auf ($r = 0,340$; $p = 0,030$; Streudiagramm 1; Tab. 16 a)

Außerdem ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der vollständigen DNA-Kondensation und dem Fehlen von DNA-Doppelstrangbrüchen beim Nativsperma der subfertilen Gruppe ($r = 0,565$; $p = 0,009$; Streudiagramm 3; Tab. 16 c). Diese Korrelation war auch für die Gesamtgruppe nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät nachweisbar ($r = 0,407$; $p = 0,008$; Streudiagramm 9; Tab. 18 a). Die vorliegende Studie zeigt, dass die unvollständige Chromatinkondensation mit einer höheren Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen einhergeht – oder anders gesagt – dass vollständig kondensiertes Chromatin mit einer geringeren Anzahl an DNA-Strangbrüchen assoziiert ist. Diese Feststellung wurde auch bereits durch Untersuchungen von MANICARDI et al. (1995) gemacht. Die Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress scheint bei unkondensiertem Chromatin größer zu sein.

In der betrachteten Studie korrelierte in der Gesamtpopulation nach der Vitrifikation d das Fehlen von Doppelstrangbrüchen mit der Intaktheit des Akrosoms ($r = 0,422$; $p = 0,006$; Tab. 17 a). Dies konnte auch in der fertilen Gruppe für beide Kryokonservierungsmethoden nachgewiesen werden (Vitrifikation d: $r = 0,565$; $p = 0,008$; Tab. 17 b; computergesteuertes Einfriergerät: $r = 0,466$; $p = 0,033$; Tab. 18 b). Der EAP hat sowohl einen Einfluss auf die Häufigkeit der DNA-Strangbrüche als auch auf die Intaktheit des Akrosoms, welche eine wesentliche Rolle für das erfolgreiche Eindringen des Spermiums in die Eizelle spielt und somit für die Befruchtungsraten wichtig ist.

SUN et al. (1997) und LOPES et al. (1998) bestätigten diesen Zusammenhang in ihren Untersuchungen. Die Spermien infertiler Männer wiesen im Gegensatz zur fertilen Gruppe eine höhere Prozentzahl an DNA-Strangbrüchen auf. Die Prozentzahl an Strangbrüchen der Spermien-DNA zeigte eine negative Korrelation mit den Befruchtungsraten in IVF und ICSI. MARTINS et al. (2007) verwendeten den AOT (Acridine Orange Test) und den TUNEL-Test, um den DNA-Status von Rindersperma zu bestimmen, welches durch Gefriertrocknen konserviert wurde. Der Grad der DNA-Fragmentierung korrelierte hier ebenfalls negativ mit dem Befruchtungspotential.

IRVINE et al. (2000) wiesen für infertile Männer mit wenig Spermienmotilität und abnormaler Spermienmorphologie einen erhöhten Anteil an DNA-Fragmentierung im Gegensatz zu Individuen mit normalen Spermienparametern nach. In der vorliegenden Studie war die Anzahl der intakten DNA-Stränge in der fertilen und in der subfertilen Population vor dem EAP annähernd gleich (Tab. 10 und 11).

SUN et al. (1997) und LOPES et al. (1998) zeigten, dass eine nicht unerhebliche Anzahl motiler Spermien von infertilen Männern fragmentierte DNA enthält. CHOCHAN et al. (2006), IRVINE et al. (2000) und ERENPREISS et al. (2001) untersuchten Spermien infertiler und fertiler Männer und zeigten, dass erhöhte Raten von DNA-Brüchen in der infertilen Gruppe auftraten, was mit dem TUNEL-Test nachgewiesen wurde.

In der betrachteten Studie liegt der Anteil der unfragmentierten DNA sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe vor dem EAP bei $84,3 \pm 7,70$ % bzw. $84,3 \pm 7,80$ %. Es ist daher nur ein minimaler Unterschied in der Anzahl der DNA-Strangbrüche zwischen beiden Gruppen festzustellen (Tab. 10 und 11, Histogramm 20).

PIASECKA et al. (2006) fanden eine negative Korrelation zwischen der Anzahl von Spermien, die DNA-Strangbrüche aufwiesen, und der Anzahl morphologischer Normalformen der Spermien. Das bedeutet, dass je geringer der Anteil morphologischer Normalformen war, umso größer war die Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen. Diese Ergebnisse stimmen mit der vorliegenden Studie nicht überein: Hier lagen weder im Nativzustand noch nach EAP signifikante Korrelationen zwischen den beiden Parametern vor (Tab. 16, 17 und 18).

LEWIS et al. (2008) bestätigten eine positive Korrelation zwischen der DNA-Schädigung des Spermiums (nach Beurteilung mittels TUNEL und Comet Assay) und den niedrigen Befruchtungsraten bei IVF, den geminderten Implantationsraten, dem erhöhten Auftreten von Fehlgeburten und der Entstehung von Krankheiten bei Nachkommen, einschließlich der Krebserkrankungen im Kindesalter.

In der vorliegenden Studie konnte im Hinblick auf das Befruchtungspotential festgestellt werden, dass nach EAP in der fertilen Gruppe eine positive Korrelation zwischen DNA-Integrität und Intaktheit des Akrosoms auftritt (Tab. 17b und 18b). Die Befruchtungswahrscheinlichkeit bei Vorhandensein intakter Akrosome ist sowohl nach computergesteuertem Einfrieren als auch nach Vitrifikation d umso größer, je geringer der Anteil an DNA-Strangbrüchen ist.

CAGLAR et al. (2007) untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem DNA-Fragmentierungs-Index (DFI) und dem ICSI-Ergebnis. Der DFI wurde mittels TUNEL

und Comet Assay beurteilt. Es konnte keine Korrelation zum Resultat der ICSI ermittelt werden. Der DFI korrelierte jedoch negativ mit der Spermienkonzentration, der Progressivmotilität und der normalen Spermienmorphologie. MEDHI et al. (2009) untersuchten die DNA-Schädigung von Patienten mit normalen Spermienparametern, Asthenozoospermie und Teratozoospermie mit einhergehender männlicher Infertilität. Der DNA-Fragmentierungs-Index (DFI) wurde mittels TUNEL gemessen. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der abnormalen Spermienmorphologie und dem DFI in der Teratozoospermiegruppe.

In der vorliegenden Studie konnte keine Korrelation zwischen der DNA-Fragmentierung und der Morphologie festgestellt werden (Tab. 16, 17 und 18).

OZMEN et al. (2007) erforschten den Zusammenhang zwischen der DNA-Fragmentierung und der Akrosomreaktion sowie der Viabilität. Die Akrosomreaktion und die Viabilität zeigten einen negativen Zusammenhang mit hohen DFI-Werten. Das bedeutet, dass je unvollständiger die akrosomale Reaktion abläuft und je geringer die Viabilität ist, desto höher ist der DFI.

In der betrachteten Studie zeigte sich nach Vitrifikation eine positive Korrelation zwischen der Intaktheit des Akrosoms und den fehlenden DNA-Strangbrüchen in der Gesamtpopulation ($r = 0,422$; $p = 0,006$; Tab. 17 a) und in der fertilen Gruppe ($r = 0,565$; $p = 0,008$; Tab. 17 b). In der subfertilen Population hingegen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen vorhandener Vitalität und bestehender DNA-Integrität nachgewiesen werden ($r = 0,454$; $p = 0,044$; Streudiagramm 7; Tab. 17 c). Die Intaktheit des Akrosoms korrelierte in der fertilen Gruppe auch nach dem Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät positiv mit der DNA-Integrität ($r = 0,466$; $p = 0,033$; Tab. 18 b). In der Naivgruppe konnten keine ähnlichen Korrelationen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von OZMEN et al. (2007) – soweit sie vergleichbar sind – überein. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auch für den Parameter DNA-Doppelstrangbruch in beiden betrachteten Gruppen (fertil und subfertil) eine annähernd gleiche Effektivität der beiden verwendeten Kryokonservierungsmethoden.

5.6. Bedeutung der Akrosomreaktion

Das Akrosom ist ein membrangebundener Vesikel, der an der vorderen Kopfreion des Spermiums lokalisiert ist (VIRTANEN et al. 1984; ZAMBONI 1987). Das Akrosom wird zum Zellinneren hin von der akrosomalen Membran begrenzt, die über der Kernmembran lokalisiert ist. Die äußere Begrenzung erfolgt durch die äußere akrosomale Membran, dazwischen befindet sich der akrosomale Inhalt. Dieser setzt sich aus verschiedenen Enzymen zusammen, deren Hauptanteil das Akrosin ist, welches bei der Penetration des Spermiums in die Eizelle als Serinproteinase eine entscheidende Rolle spielt (SIDHU und GURAYA 1989). Das Akrosin liegt als Proenzym vor und wird erst während der Kapazitation bzw. während der akrosomalen Reaktion in die aktive Form umgewandelt (AITKEN 1990; ZANEVELD 1991). Die akrosomale Reaktion ist dem Vorgang der Exozytose ähnlich und wird durch eine Veränderung der Membranstruktur im Kopfbereich des Spermiums hervorgerufen (CROSS und MEIZEL 1989; DE JONGE et al. 1989). Die freigesetzten lytischen Enzyme verhelfen dem Spermium dazu, die Zona pellucida zu penetrieren und mit der Eizelle zu verschmelzen (CROSS und MEIZEL 1989; FRASER und AHUJA 1988).

In der vorliegenden Studie wurde die Akrosomreaktion mittels Concanavalin A-Lectin-Färbung beurteilt. Mittels dieser Färbemethode kann eine Aussage über die Intaktheit des Akrosoms getroffen werden, welche eine große Rolle bei der Kapazitation spielt und einen Faktor für die erfolgreiche Befruchtung darstellt.

Akrosomschäden sind mit dem Verlust der Fruchtbarkeitsfähigkeit verbunden und können folglich mit Sterilität einhergehen (ZAMBONI 1987). Die Akrosomreaktion ist ein exozytotischer Vorgang, der Fusionen zwischen der Plasmamembran und der äußeren Akrosomenmembran erfordert, was in einem Freiwerden des Akrosomeninhalts und der Exposition der inneren akrosomalen Membranen resultiert (ZANEVELD et al. 1991). Der kleine Umfang des Spermienakrosoms macht die Darstellung eines Akrosomenverlustes durch konventionelle Lichtmikroskopie unmöglich. Verschiedenste Techniken, wie z.B. Färbungen (TALBOT und CHACON 1981), indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern (WOLF et al. 1985) und Kennzeichnungen mit Fluorescein-markierten Lectinen (TALBOT und CHACON 1980; CROSS und OVERSTREET 1987) wurden entwickelt und verwendet, um den Status der Akrosomen von menschlichen Spermien zu bewerten. Lectine sind die zugänglichsten Reagenzien. Sie binden an die Glyco-Bestandteile der akrosomalen Matrix oder der äußeren Akrosomenmembran (MORTIMER 1987). Lectine und Antikörper produzieren Markierungen von größerer Intensität und stärkerem Kontrast im Vergleich zu

den Färbetechniken. Concanavalin A-Lectin bindet spezifisch an α -D-Mannose- und α -D-Glucose-Reste von Zuckermolekülen (NICOLSON und YANAGIMACHI 1972) und überwiegend an die innere Akrosomenmembran. Deshalb erfordert die Markierung mit CON A ein Freilegen dieser Membran durch Verlust des akrosomalen Inhalts (HOLDEN et al. 1990).

HAMMADEH et al. (2000) untersuchten die Akrosomreaktion von subfertilen und fertilen Proben nach EAP mit flüssigem Stickstoffdampf in TYBG und HSPM als Frierlösungen. Bei beiden Gruppen gab es einen signifikanten Abfall der Anzahl intakter Akrosome. HSPM als Friermedium zeigte dabei einen signifikant höheren Abfall der Werte als TYBG.

In der vorliegenden Studie verringerte sich die Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom in der Gesamtgruppe nach dem EAP im Vergleich zum Nativsperma bei beiden Kryokonservierungsmethoden signifikant (jeweils $p = 0,000$; Tab. 6 und 7). Die Differenzen in der Anzahl der intakten Akrosomen (CON A) nach EAP waren beim Vergleich der beiden untersuchten Friermethoden sowohl in der fertilen Gruppe als auch in der subfertilen Gruppe (Tab. 12 und 13, Histogramm 26) mit $p = 0,880$ bzw. $p = 0,517$ nicht signifikant unterschiedlich. Die Methoden scheinen auch beim Vergleich dieses Parameters äquivalente Ergebnisse zu erzielen.

5.7. Bedeutung der Straw-Art bzw. des Straw-Volumens

In der betrachteten Studie wurde auch der Einfluss des Volumens bzw. der Oberfläche des Probengefäßes auf das Ergebnis der Vitrifikation untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Straw-Systeme verwendet, der French Straw mit dem größeren Volumen und der größeren Oberfläche und der Mini Straw mit einem kleineren Volumen und einer kleineren Oberfläche.

Betrachtet man die Gesamtgruppe, so lässt sich im Vergleich der beiden verwendeten Straw-Systeme feststellen, dass nach Vitrifikation mit den Mini Straws die Progressivmotilität, die Globalmotilität, die Vitalität, die Membranintegrität, ebenso wie das Auftreten von vollständiger DNA-Kondensation und von einem intakten Akrosom sowie das Fehlen von DNA-Doppelstrangbrüchen bedeutend besser abschnitten als unter der Verwendung der French Straws (Histogramme 10 - 13). Die p-Werte waren mit $p = 0,000$ hochsignifikant (Tab. 9).

Nur die Spermiedichte war nach EAP mit French Straws signifikant besser ($p = 0,034$; Tab. 9), was auf mehr tote, unbewegliche Spermien in dem untersuchten Material nach EAP zurückgeführt werden kann. Die Anzahl der morphologisch normal geformten Spermien war bei beiden Vitrifikationsmethoden nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,993$; Tab. 9).

Einen Zusammenhang zwischen Volumen/Oberfläche und dem Zustand der Spermien nach EAP beschrieben auch VAJTA et al. (1998). Dort hieß es: *„Obwohl die Kryokonservierung bestimmter Säugetierembryos heutzutage eine routinemäßig durchgeführte Maßnahme ist, bestehen beträchtliche Unterschiede in der Wirksamkeit. Diese ist abhängig vom Stadium, der Art und dem Ursprung (in vivo oder in vitro) der Proben. Die Faktoren, die in Verdacht stehen, die meisten dieser Unterschiede hervorzurufen, sind der Anstieg der intrazellulär auftretenden Fetttropfen und die unterschiedliche Mikrotubulstruktur, welche zu Kälteschäden führen können, als auch der Volumen/Oberflächen-Quotient, der Einfluss auf das Eindringen der Kryoprotektiva in die Zelle hat.“*

ARAV et al. (2002) bestätigten, dass eine Erhöhung der Viskosität und der Gefriereschwindigkeit sowie die Verringerung des Volumens die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Vitrifikation steigert.

LIEBERMANN et al. (2002) fanden heraus, dass der direkte und schnelle Kontakt mit flüssigem Stickstoff verbunden mit einem minimalen Volumen an Vitrifikationslösung höhere Gefriereraten ermöglicht.

Die Probengröße kann durch den Gebrauch verschiedener Carrier-Systeme minimiert werden (siehe 2.6.3.), so dass die Dauer der Verfestigungszeit der flüssigen Phase während der Vitrifikation verringert wird und somit ein besseres Ergebnis der Spermienparameter erreicht werden kann. Der Volumen/Oberflächen-Quotient hat also einen positiven Einfluss auf die Spermienfunktion. Je kleiner die Oberfläche und je geringer das Volumen des Carrier-Systems ist, desto besser ist das Resultat nach EAP unter Anwendung der Vitrifikationmethode.

5.8. Bedeutung des Friermediums/Verwendung von Kryoprotektiva bei der Vitrifikation: Ja oder Nein?

Bei der betrachteten Studie wurde HSPM (Human Sperm Preservation Medium) – eine Frierlösung, die Kryoprotektiva enthält – wie in 3.4.1. beschrieben, für alle Friermethoden verwendet: sowohl für das computergesteuerte Frieren mittels Einfriergeräts als auch bei den zwei unterschiedlichen Methoden des Schockfrierens (Vitrifikation d und Vitrififikation D). Es ließen sich im Vergleich der verschiedenen Friermethoden untereinander einige Unterschiede bezüglich verschiedener Parameter finden, wie im Kapitel 4 näher erläutert wurde.

Häufig findet man Studien, die eine Vitrififikation ganz ohne Kryoprotektiva bevorzugen und als beste Methode ansehen. Was ist nun besser: Vitrififikation mit oder ohne Kryoprotektiva? Die vorliegende Studie zeigt, dass die Vitrififikation d unter Anwendung einer kryoprotektiven Frierlösung durchaus die Resultate des Einfrierens von Spermien mit einem computergesteuerten Einfriergerät erreichen kann. Bei allen untersuchten Parametern ließen sich keine signifikant schlechteren Ergebnisse finden: Sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe stellte sich die Vitrififikation d als adäquate Alternative zur Kryokonservierung von Spermien mittels computergesteuertem Einfriergerät dar.

SCHUSTER et al. (2003) beschrieben ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten, ob Cryoloops zum schnellen Einfrieren geringer Anzahlen von Spermien ebenso gute Ergebnisse erzielen können, wie das konventionelle langsame Einfrieren. Als Kryoprotektivum wurde Test Yolk Buffer mit Glycerol (TYBG) in beiden Gruppen verwendet. Die mit Spermien beladenen Cryoloops wurden für mehrere Minuten in flüssigen Stickstoffdampf getaucht. Die Ergebnisse wurden anhand der Spermienmotilität und der Membranintegrität (HOS-Test) zueinander in Relation gesetzt. Bei Gebrauch des o.g. Kryoprotektivums war die Spermienmotilität nach dem EAP bei beiden untersuchten Methoden des Einfrierens annähernd gleich. Diese Ergebnisse sind allerdings nur bedingt mit der hier betrachteten Studie vergleichbar, da viele Parameter differieren (anderes Friermedium, Cryoloops, Dauer des Friervorganges, Aufbewahrungsdauer). Viel häufiger als die Vitrififikation mit Kryoprotektivum – wie in der vorliegenden Studie – findet man in der aktuellen Forschung die Vitrififikation menschlicher Spermien ohne Kryoprotektivum.

Ein erstes Beispiel dafür könnte bereits JAHNEL (1938) gewesen sein. Er tauchte humane Spermien in einem Glasröhrchen sofort in flüssigen Stickstoff bei -196 °C ein, einmal 4 Stunden und einmal 52 Stunden lang. Einzelne Spermien wiesen nach raschem Auftauen in

37 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung eine ebenso lebhafte Beweglichkeit wie vor dem Einfrieren auf. JAHNEL schloss daraus, dass bei nicht so tiefen Temperaturen (-10 bis -20 °C) Spermien schneller zugrunde gehen als bei tieferen Temperaturen um die -196 °C. Ob diese Spermien jedoch befruchtungsfähig waren, ließ sich bei dem damaligen Forschungsstand nicht sagen. Diese Methode der Kryokonservierung zeigte erste Ansätze in Richtung des schnellen Einfrierens, wie es heute durch die Vitrifikation möglich ist. Ob dabei ein Friermedium verwendet wurde, lässt sich nicht sagen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass zumindest die Beweglichkeit der Spermien nach schnellem Einfrieren bei tiefen Temperaturen und darauf folgendem raschen Auftauen ausreichend gut erhalten blieb.

Diese Feststellung kann durch die Ergebnisse in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die Progressiv- und Globalmotilität der fertilen Gruppe unterscheidet sich nach EAP mit der Vitrifikation nicht signifikant von den Ergebnissen nach computergesteuertem langsamen Einfrieren ($p_{\text{Prog mot}} = 0,842$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,816$; Histogramm 21; Tab. 12). Ähnliche Ergebnisse lassen sich für die subfertile Gruppe ($p_{\text{Prog mot}} = 0,317$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,130$; Histogramm 24; Tab. 13) und für die Gesamtgruppe bestätigen ($p_{\text{Prog mot}} = 0,812$; $p_{\text{Glob mot}} = 0,313$; Tab. 8).

NAWROTH et al. (2002) verglichen eine mögliche Vitrifikation von Spermien bei Kühlraten von ca. 10.000 °C/min – mit und ohne Kryoprotektivum – mit dem langsamen Einfrieren. Es wurden gesunde, fertile Probanden untersucht, deren Proben mittels programmierbaren Einfriergeräts mit TYBG (Test-Yolk-Buffer mit Glycerol) als Kryoprotektivum eingefroren wurden bzw. eine Kryokonservierung durch Vitrifikation stattfand. Dabei verwendeten sie Kupferschleifen (Cryoloops) mit 5 mm-Durchmesser oder Standard-0,25 ml-Inseminationsröhrchen (Straws), die in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Sowohl beim langsamen als auch beim schnellen Einfrieren wurden die Proben mindestens 24 Stunden im flüssigen Stickstoff aufbewahrt, bevor sie wieder aufgetaut wurden. Es wurden vier Untergruppen unterschieden: native Spermien – ohne und mit Kryoprotektivum – sowie Spermien nach Swim Up – mit und ohne Kryoprotektivum. Die Spermienmotilität, die Viabilität und die Spermienmorphologie wurden beurteilt. Dabei verdeutlichte sich Folgendes: Kryoprotektiva setzen die Motilität und die Morphologie der Spermien deutlich herab, sowohl im Nativzustand als auch nach der Kryokonservierung. Ebenso sinkt auch ohne Kryoprotektiva die Motilität nach EAP deutlich ab. Der zusätzliche Einfluss des Probengefäßes auf den Zustand der Spermien nach EAP wurde deutlich, da die Vitrifikation mit Kupferschleifen (ohne Kryoprotektiva und nach Swim Up) die beste Motilität erzielte – signifikant besser als das konventionelle Einfrieren. Die Morphologie schnitt am besten nach konventionellem Einfrieren mit TYBG (nach Swim Up) ab, wobei die Vitrifikation nicht signifikant schlechter

war. Nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät konnte die größte Anzahl an lebensfähigen Zellen (nach Swim Up) beim Einfrieren mit TYBG – vergleichbar mit der Vitrifikation (nach Swim Up) ohne Kryoprotektivum – nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse insgesamt konnten unter Einsatz der Vitrifikationsmethode (nach Swim Up) ohne Kryoprotektiva erreicht werden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit der vorliegenden Studie ist nicht möglich, da zu viele Parameter des Versuchsaufbaus (u.a. TYBG als Kryoprotektivum, EAP ohne Kryoprotektiva, Anwendung von Swim Up, Verwendung von Kupferschleifen, unterschiedliche Aufbewahrungsdauer) sich unterscheiden. Dennoch lassen sich einige ähnliche Vorgehensweisen und Ergebnisse erkennen. Man verwendete für die Vitrifikation unter Anwendung eines Kryoprotektivums die gleiche Frierlösung, die auch für das computergesteuerte langsame Einfrieren verwendet wurde. Die Aufbewahrungsdauer nach Einfrieren war mit einem Maximum von 24 Stunden zwar geringer als in der hier vorliegenden Studie (im Durchschnitt 48 Tage), aber länger als in einigen anderen betrachteten Studiendesigns zu diesem Thema. Es wurden in der betrachteten Studie auch mehrere Parameter untersucht: darunter die Spermienmotilität, die Spermienmorphologie und die Vitalität der Spermien. In den Ergebnissen zeigen sich die folgenden Parallelen: Die Motilität der Spermien nach EAP mit Kryoprotektiva sinkt signifikant ab ($p = 0,000$; Histogramme 2 und 3; Tab. 6 und 7). Die Vitrifikationsmethode erzielt in der vorliegenden Studie das beste Ergebnis unter Verwendung des kleinsten Probenvolumens (Mini Straws, Vitrifikation d; siehe 5.7.). Die Morphologieergebnisse in der Gesamtgruppe sind annähernd gleich im Vergleich der untersuchten Friermethoden ($p = 0,617$; Tab. 8). Es kann kein signifikanter Abfall der Nativwerte erkannt werden (Tab. 6 und 7). Die Intaktheit des Akrosoms ist sowohl beim Einfrieren mittels Einfriergerät als auch bei der Vitrifikation d ähnlich hoch (Boxplot 2; Tab. 8) und gibt Hinweise auf ein mögliches Befruchtungspotential. In der vorliegenden Studie sind die Ergebnisse des computergesteuerten Einfriergeräts und der Vitrifikation d unter Anwendung von Kryoprotektiva bei fast allen betrachteten Parametern annähernd gleich. Es findet sich nur ein signifikanter Unterschied ($p_{\text{Eosin-Test}} = 0,001$; Tab. 8), was zeigt, dass auch die Vitrifikation d mit Kryoprotektiva zu ähnlich guten Resultaten führt, wie das konventionelle Einfrieren mit kryoprotektiven Lösungen.

ISACHENKO et al. (2004 a) untersuchten Spermien von gesunden Männern nach Swim Up und teilten die Proben in vier Gruppen ein. Es wurde einerseits konventionell mit dem Einfriergerät – mit und ohne Kryoprotektivum – eingefroren und andererseits die Vitrifikationsmethode durchgeführt, wobei auch hier in eine Gruppe mit und in eine ohne kryoprotektive Stoffe unterteilt wurde. Als Kryoprotektivum wurde TYBG verwendet. Zum

Einfrieren mit Einfriergerät wurden Straws benötigt. Die Vitrifikation erfolgte mit Kupferschleifen mit einem Durchmesser von 5 mm, die in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. Es wurden die Motilität (Maklerkammer) und die DNA-Integrität (Comet Assay) untersucht. Die Motilität der Spermien nach dem Einfrieren mit dem Einfriergerät und unter Anwendung des Kryoprotektivums war ähnlich zu den Ergebnissen nach Vitrifikation ohne Kryoprotektivum. Die DNA-Integrität zeigte keine Veränderung, weder die Kryokonservierungsmethode noch das Kryoprotektivum hatten einen signifikanten Einfluss auf die Werte. In der vorliegenden Studie zeigt die Motilität in der Gesamtgruppe unter der Verwendung eines Kryoprotektivums bei beiden Methoden – dem computergesteuerten Einfrieren und der Vitrifikation d – nach EAP ebenfalls annähernd gleiche Ergebnisse, die sich nicht signifikant unterscheiden ($p_{\text{Progmot}} = 0,812$; $p_{\text{Globmot}} = 0,313$; Histogramme 2 und 3; Tab. 8). Bei Betrachtung der fertilen Gruppe wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Effektivität der Friermethoden festgestellt ($p_{\text{Progmot}} = 0,842$; $p_{\text{Globmot}} = 0,816$; Histogramm 21; Tab. 12). In der subfertilen Gruppe waren die Resultate entsprechend ($p_{\text{Progmot}} = 0,317$; $p_{\text{Globmot}} = 0,130$; Histogramm 24; Tab. 13). Die DNA-Integrität (TUNEL) verschlechterte sich in der Gesamtgruppe im Vergleich zum Nativwert bei beiden Methoden jedoch signifikant (jeweils $p = 0,000$; Boxplot 3; Tab. 6 und 7). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Vitrifikation d mit dem computergesteuerten Einfrieren weder in der Gesamtpopulation ($p = 0,966$; Tab. 8) noch in der fertilen ($p = 0,361$; Tab. 12) oder in der subfertilen Gruppe ($p = 0,487$; Tab. 13) nachgewiesen werden.

ISACHENKO et al. (2005) führten eine Vitrifikation ohne kryoprotektive Agenzien durch. Als Materialien verwendeten sie Cryoloops, Droplets, Open Pulled Straws und Open Standard Straws. Die untersuchten Proben stammten von Männern mit Oligoasthenoteratozoospermie (OAT), die mittels Swim Up präpariert wurden. Die vier verschiedenen Arten des Kryokonservierens zeigten ungefähr 40 % Reduktion der Spermienmotilität ($p < 0,05$) im Vergleich zur nativen Kontrollgruppe. Im Vergleich der Methoden zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils an motilen Spermien. Die Open Pulled Straw-Methode sollte – gemäß ISACHENKO et al. (2005) – aufgrund der Isolierung der Spermien vom flüssigen Stickstoff und der damit verbundenen maximalen Reduktion des Risikos einer mikrobiellen Kontamination bevorzugt werden.

Die Ergebnisse können mit den Resultaten der vorliegenden Studie nur bedingt verglichen werden, da dort kein Kryoprotektivum verwendet wurde. Des Weiteren bestehen

Unterschiede in den Vorgehensweisen, da dort z.B. die Spermien zunächst mittels Zentrifugation und Swim Up vorbereitet wurden. Auch eine Übereinstimmung der verwendeten Kryogefäße liegt nicht vor, da in der vorliegenden Studie French Straws und Mini Straws verwendet wurden, die andere Volumina und Oberflächenverhältnisse sowie andere Spermienanzahlen als bei den Untersuchungen von ISACHENKO et al. (2005) mit sich bringen. Man kann nur die Tendenz erkennen, dass sowohl Vitrifikation mit Kryoprotektivum als auch ohne Kryoprotektivum zu guten Ergebnissen nach dem Auftauen führen kann, die auch an die Ergebnisse nach konventionellem langsamen Einfrieren mittels Einfriergerät heranreichen können.

Einige Studien untersuchten auch die Vitrifikation mit Kryoprotektiva wie in der betrachteten Studie und kamen zu folgenden Ergebnissen:

HOSSAIN et al. (2007) verwendeten Saccharose als Kryoprotektivum kombiniert mit dem direkten Eintauchen der Proben in flüssigen Stickstoff als Einfriermethode. Man fand eine geringe aber annehmbare Motilität (30 %) und Viabilität (60 %) nach EAP. Die kryoprotektive Fähigkeit von Saccharose war für die Proben bei Normo- als auch bei Oligozoospermie identisch.

ISACHENKO et al. (2008) untersuchten den Einfluss der Kryoprotektiva auf die Veränderung der Spermienparameter nach der Vitrifikation. Die Spermien wurden vor der Vitrifikation mit der Swim Up-Methode vorbereitet. Danach wurden sie in flüssigen Stickstoff getaucht und für mindestens 24 Stunden aufbewahrt, bevor sie schnell wieder aufgetaut wurden. Die Anzahl der progressiv-beweglichen Spermien war in dem – mit Saccharose ergänzten – Medium signifikant höher, was für eine stärkere kryoprotektive Wirkung auf die Integrität des Mitochondrienmembranpotentials spricht. Daher lässt sich sagen, dass die Vitrifikation von menschlichen Spermien mit nicht-permeablen Kryoprotektiva wie HSA (Human Serum Albumin) und Saccharose ohne eine bedeutende Verschlechterung signifikanter Parameter einhergeht.

Bezüglich der Verwendung von kryoprotektiven Stoffen bei Anwendung der Vitrifikationsmethode bedarf es weiterer Studien unter Berücksichtigung gleicher Ausgangsbedingungen. Ob die Vitrifikation mit oder ohne Kryoprotektiva bessere Resultate erzielt, konnte aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden nicht erkannt werden. Es gab sowohl Gründe für als auch gegen das Anwenden von kryoprotektiven Stoffen bei der Vitrifikationsmethode. Eine Vereinheitlichung des Versuchsaufbaus ist daher zum direkten Vergleich notwendig, um konkrete Aussagen machen zu können. Weitere Studien sollten unter diesen Gesichtspunkten durchgeführt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Aitken RJ (1990)
Evaluation of human sperm function
Br Med Bull; 46 (3): 654-674
- 2 Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D (1993)
Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa
J Reprod Fertil; 97 (2): 441-450
- 3 Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS (1998)
Relative impact of oxidative stress on functional competence and genomic integrity of human spermatozoa
Biol Reprod; 59 (5): 1037-1046
- 4 Aitken RJ, Krausz C (2001)
Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome
Reproduction; 122 (4): 497-506
- 5 Aitken RJ, De Luliis GN (2007)
Value of DNA integrity assays for fertility evaluation
Soc Reprod Fertil Suppl; 65: 81-92 (abstract)
- 6 Al-Nuaim LA, Jenkins JM (2002)
Assisted hatching in assisted reproduction: Review
British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 109 (8): 856-862
- 7 Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D (1987)
Cryopreservation of human oocytes
Hum Reprod; 2 (8): 695-700
- 8 Alvarez JG, Storey BT (1993)
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.; 14 (3): 199-209
- 9 Arav A (1998)
Method of cryopreservation of biological samples
US Patent 5; 715, 686
- 10 Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002)
New trends in gamete's cryopreservation
Molecular and Cellular Endocrinology; 187 (1-2):77-81
- 11 Armitage WI, Hall SC, Routledge C (2002)
Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110 degrees C
Investigative Ophthalmology and Visual Sciences; 43 (7): 2160-2164
- 12 Arver S, Eliasson R (1982)
Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. II Contribution by ligands of different origin to the zinc binding properties of human seminal plasma
Acta Physiol Scand; 115: 217-224

- 13 Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A (2002)
A comparison of four different techniques of assisted hatching
 Hum Reprod; 17(5): 1239-1243
- 14 Bernard A and Fuller BJ (1996)
Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives
 Hum Reprod update; 2 (3): 193-207
- 15 Best B (1990 ff)
Vitrification in cryonics
 www.benbest.com
- 16 Best B (1990 ff)
Viability, chilling injury and cryoprotectant toxicity in cryonics
 www.benbest.com
- 17 Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1993)
Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human spermatozoa
 Biol.Reprod.; 49: 1083-1088
- 18 Bianchi PG, Manicardi D, Bizzaro D, Campana A, Bianchi U, Sakkas D (1996)
Use of guanine-cytosine (GC) specific fluorochrome, chromomycin A3, as an indicator of poor sperm morphology
 Journal of Ass Reprod Genet; 13 (3): 246-250
- 19 Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D (1996)
Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa
 Molecular Human Reproduction; 2 (3): 139-144
- 20 Bolarinde O, Masoud A, Khaldoun S, Spyros P, nahed H, Barratt CLR (2001)
Debate – continued: Should ICSI be treatment of choice for all cases of in - vitro conception? Considerations of fertilisation and embryo development, cost effectiveness and safety
 Hum Reprod; 16 (12): 2485 - 2490
- 21 Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A (2002)
Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999)
 Hum Reprod; 17 (3): 671-694
- 22 Brugh VM, Matschke HM , Lipshultz LI (2003)
Male factor infertility
 Endocrinology and Metabolism Clinics of North America; 32 (2): 689-707 (abstract)
- 23 Brzechffa PR, Daneshmand S, Buyalos RP (1998)
Sequential clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin with intrauterine insemination: the effect of patient age on clinical outcome
 Hum Reprod ; 13 (8): 2110-2114

- 24 Burrows PJ ; Schrepferman CG, Lipshultz LI (2002)
Comprehensive office evaluation in the new millenium
 Urologic Clinics of North America; 29 (4): 873-894 (abstract)
- 25 Buttke TM, Sandstrom PA (1994)
Oxidative stress as a mediator of apoptosis
 Immunol Today; 15 (1): 7-10
- 26 Caglar GS, Köster F, Schöpfer B, Asimakopoulos B, Nehls B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hasani S (2007)
Semen DNA fragmentation index, evaluated with both TUNEL and Comet assay, and the ICSI outcome
 In Vivo; 21 (6): 1075-1080 (abstract)
- 27 Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P (2009)
Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreservation by slow-freezing and vitrification
 Fertil Steril; 92 (4): 1306-1311 (abstract)
- 28 Chaffkin LM, Nulsen JC, Luciano AA, Metzger DA (1991)
A comparative analysis of the cycle fecundity rates associated with combined human menopausal gonadotropin (hMG) and intrauterine insemination (IUI) versus either hMG or IUI alone
 Fertil Steril; 55 (2): 252-257
- 29 Chan PTK, Palermo GD, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN (2001)
Testicular sperm extraction combined with intracytoplasmatic sperm injection with the treatment of men with persistent azoospermia postchemotherapy
 Cancer; 92 (6): 1632-1637
- 30 Chan SY, Craft IL, Chan YM, Leong MK, Leung CK (1990)
The hypoosmotic swelling test and cryosurvival of human spermatozoa
 Hum. Reprod.; 5 (6): 715-718
- 31 Chehval MJ and Purcell MH (1992)
Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: Evidence of progressive testicular damage
 Fertil Steril; 57 (1): 174-177
- 32 Chen C (1986)
Pregnancy after human oocyte preservation
 The Lancet; 327 (8486): 884-886
- 33 Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS (2000 a)
Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws
 Hum Reprod; 15 (12): 2598-2603
- 34 Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS. (2000 b)
Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws
 Fertil Steril; 74 (4): 804-808

- 35 Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS (2001)
Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids
Hum Reprod; 16 (11): 2350-2356
- 36 Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT (2006)
Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm
J Androl; 27 (1): 53-59
- 37 Cobo A, Bellver J, Domingo J, Perez S, Crespo J, Pellicer A, Remohi J (2008)
New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification
RBM Online; 17 (1): 68-72 (abstract)
- 38 Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J (1988)
Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration
The Lancet; 362 (9378): 162
- 39 Cohen J, Alikani M, Liu HC, Rosenwaks Z (1994)
Rescue of human embryos by micromanipulation
Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology; 8 (1): 95-116
- 40 Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT (1997)
Cryopreservation of single human spermatozoa
Hum Reprod; 12 (5): 994-1001
- 41 Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R (1997)
The comet assay: what can it really tell us?
Mutat Res; 375 (2): 183-193
- 42 Collins JA, Wrixon W, Janes LB, Wilson EH (1983)
Treatment- independent pregnancy among infertile couples
N Engl J Med; 309: 1201-1206
- 43 Comhaire FH, Zalata A, Mahmoud A, Depoorter B, Huysse L, Christophe A, Depuydt C (1995)
Diagnostic and therapeutic approach to moderate and severe male subfertility in 1995
Hum Reprod; 10 (Suppl 1): 144-150
- 44 Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA (2002)
Sperm phospholipase Czeta from human and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes
Reproduction; 124 (5): 611-623
- 45 Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A (2004)
Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes
Hum Reprod; 19 (2): 300-305
- 46 Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Ameson BW, Ball GD (1988)
Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility
Fertil Steril; 50 (2): 314-320

- 47 Crosignani PG, Walters DE (1994)
Clinical pregnancy and male subfertility, the ESHRE multicentre trial on the treatment of male subfertility
Hum Reprod; 9 (6): 1112-1118
- 48 Cross NL, Overstreet JW (1987)
Glycoconjugates of the human sperm surface: Distribution and alterations that accompany capacitation in vitro
Gamete Res; 16: 23-35
- 49 Cross NL, Meizel S (1989)
Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm
Biol. Reprod.; 41: 635-641
- 50 De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJD (1989)
Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction
J Androl; 10 (3): 232-239
- 51 De Vos A (2000)
Intracytoplasmic sperm injection
Hum Reprod; 15 (Suppl. 4): 59-64
- 52 Dinnyés A, Dai J, Jiang S, Yang X (2000)
High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation , in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer
Biol Reprod; 63 (2): 513-518
- 53 Donnelly ET, Steele EK, Mc Clure N, Lewis SEM (2001)
Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation
Hum Reprod; 16 (6): 1191-1199
- 54 Drobnis EZ, Andrew JB, Katz DE (1988)
Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon?
Journal of Experimental Zoology; 245: 206-216
- 55 Dunaif A, Thomas A (2001)
Current concepts in the polycystic ovary syndrome
Annu Rev Med; 52: 401-419
- 56 Edi-Osagie E, Hooper L, Seif MW (2003)
The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review
Hum Reprod; 18 (9): 1828-1835
- 57 Edwards RG (1965)
Maturation in vitro of human ovarian oocytes
The Lancet; 286 (7419): 926-929
- 58 El-Danasouri I and Selman H (2001)
Successful pregnancies and deliveries after simple vitrification protocol for day 3 human embryos
Fertil Steril; 76 (2): 400-402

- 59 Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y (1999)
The outcome of cryopreserved human embryos after ICSI and traditional IVF
 J Assist Reprod Genet; 16 (8): 405-409
- 60 Englert Y, Delvigne A, Vekemans M, Lejeune B, Henlisz A, de Maertelaer G, Leroy F (1989)
Is fresh or frozen semen to be used in in vitro fertilization with donor sperm?
 Fertil Steril; 51 (4): 661-664
- 61 Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkains J (2001)
Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity
 J Androl; 22 (1): 45-53
- 62 Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, Van Rooyen LH (2000)
Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates
 Hum Reprod; 15 (3): 657-661
- 63 Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980)
Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility
 Science; 210 (4474): 1131-1133
- 64 Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999)
Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in human fertility clinic
 Hum Reprod; 14 (4): 1039-1049
- 65 Evers JL (2002)
Female Subfertility
 The Lancet 360 (9327): 151-159
- 66 Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, Merola M, Comi R, De Ponti E, Dal Canto MB (2009)
Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods
 RBM Online; 19 (2): 171-180 (abstract)
- 67 Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984)
Vitrification as an approach to cryopreservation
 Cryobiology; 21 (4): 407-426
- 68 Fahy GM (1986)
Vitrification: a new approach to organ preservation
 In Meryman HT (ed.), Transplantation: Approaches to graft Rejection. New York: Alan R. Liss: 305-335
- 69 Fahy GM (1988)
Vitrification
 In Mc Grath JJ and Diller KR (eds), Progress in low temperature biotechnology: emerging applications and engineering contributions. American Society of mechanical engineers, New York; 165-188
- 70 Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S (2004)
Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity
 Cryobiology; 48 (1): 22-35
- 71 Fahy GM, Wowk B, Wu J, Phan J, Rasch C, Chang A, Zendejas E (2004)
Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances
 Cryobiology; 48 (2): 157-178

- 72 Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L, Timson J, Jacobson M, Gobetz L, Green S, Campbell A, Lisi R (2000)
Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception?
Hum Reprod; 15 (6): 1278-1283
- 73 Francavilla F, Romano R, Santucci R, Poccia G (1990)
Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligospermia and/or asthenospermia
Fertil Steril; 53 (5): 892-897
- 74 Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villers A (1999)
Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining
Andrologia; 31 (6): 361-366
- 75 Fraser LR, Ahuja KK (1988)
Metabolic and surface events in fertilization
Gamete Res; 20: 491-519
- 76 Fujita T, Takami Y, Ezol K, Saito T, Sato K, Takeda N, Yamamoto Y, Homma K, Jimbow K, Sato N (2000)
Successful preservation of human skin by vitrification
Journal of Burn Care and Rehabilitation; 21 (4): 304-309
- 77 Gao DY, Mazur P, Critser J (1997)
Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa
In: Karow AM, Critser JK (eds) Reproductive Tissue Banking Academic Press, London; 263-328
- 78 Gijzen AP, Land JA, Goossens VJ, Leffers P, Bruggeman CA, Evers JLH (2001)
Chlamydia pneumoniae and screening for tubal factor subfertility
Hum Reprod; 16 (3): 487-491
- 79 Gnoth C, Godehardt E, Frank- Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G (2005)
Definition and prevalence of subfertility and infertility
Hum Reprod 20 (5): 1144- 1147
- 80 Gomez E, Aitken J (1996)
Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa
Fertil Steril; 65 (4): 880-882
- 81 Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP (1998)
Efficacy of treatment for unexplained infertility
Fertil Steril; 70 (2): 207-213
- 82 Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Dong X, Vogel DL (2001)
Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men
N Engl J Med; 345 (19): 1388-1393
- 83 Hammadeh ME, Askari AS; Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W (1999)
Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men
International Journal of Andrology; 22: 155-162

- 84 Hammadeh ME , Dehn C, Georg T, Greiner S, Hippach M , Rosenbaum P, Schmidt W (2000)
Der Einfluss verschiedener Gefriermethoden bezüglich der Morphologie und der Chromatinintegrität auf menschliche Spermatozoen von fertilen und subfertilen Männern
 J. Urol. Urogynäkol.; 7 (4) (Ausgabe für Schweiz): 27-33
- 85 Hammadeh ME, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W (2001)
Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen
 Andrologia; 33: 331-336
- 86 Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W (2001)
Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmes biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques
 Journal of Assisted Reproduction and Genetics; 18 (7): 364-370
- 87 Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Molaen S, Rosenbaum P, Schmidt W (2005)
Zusammenhang zwischen Spermienzahl vor und nach Spermienpräparation und der Schwangerschaftsrate nach IUI
 J Urol Urogynäkol; 12 (2): 7-11
- 88 Hammadeh ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W, Fischer-Hammadeh C (2008)
Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients
 Arch Gynecol Obstet; 277 (6): 515-526 (abstract)
- 89 Hancke K, Denschlag D, Gitsch G, Keck C (2006)
Therapeutische Ansätze bei idiopathischer Infertilität des Mannes
 Geburtsh Frauenheilk; 66: 26-33
- 90 Handyside AH, Pattison JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RML, Tuddenham EGD (1989)
Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification
 The Lancet; 1 (8634): 347-349
- 91 Hart R, Khalaf Y, Yeong CT, Seed P, Taylor A and Braude P (2001)
A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception
 Hum Reprod; 16 (11): 2411-2417
- 92 Hart R (2003)
ABC of subfertility: Unexplained infertility, endometriosis and fibroids
 BMJ; 327: 721-724
- 93 He Z, Liu HC, Rosenwaks Z (2003)
Cryopreservation of nuclear material as potential method of fertility preservation
 Fertil Steril; 79 (2): 347-354
- 94 Hecht NB (1986)
Regulation of gene expression during mammalian spermatogenesis
 In: Rossant J, Pederson RA (eds.) Experimental approaches to mammalian embryonic development Cambridge University Press, New York; 151-193 (online verfügbar)

- 95 Henkel R, Bastiaan HS, Schüller S, Hoppe I, Starker W, Menkveld R (2010)
Leucocytes and intrinsic ROS production may be factors compromising sperm chromatin condensation status
Andrologia; 42 (2): 69-75 (abstract)
- 96 Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK (1993)
Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity and mitochondrial function
Fertil Steril; 60 (5): 911-918
- 97 Hirsh A (2003)
Male subfertility
BMJ; 327: 669-672
- 98 Hoagland H, Pincus G (1942)
Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen
J Genet Physiol; 25: 337-344
- 99 Hofmann N, Hilscher B (1991)
Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men
Hum Reprod; 6 (7): 979-982
- 100 Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH, Trounson AO (1990)
Assessment of the human sperm acrosome reaction using Concanavalin A lectin
Mol Reprod Develop; 25: 247-257
- 101 Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD (1988)
Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope
J Exp Zool; 246 (3): 305-314
- 102 Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs IIS (1988)
Influence of serum luteinising hormone concentration on ovulation, conception and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome
BMJ; 297 (6655): 1024-1026
- 103 Horne G, Atkinson A, Brison DR, Madford J, Yin JAL, Edi-Osagie ECO, Pease EHE, Lieberman BA (2001)
Achieving pregnancy against the odds: successful implantation of frozen-thawed embryos generated by ICSI using spermatozoa banked prior to chemo/radiotherapy for Hodgkin's disease and acute leukaemia
Hum Reprod; 16 (1): 107-109
- 104 Hossain AM, Osuamkpe CO (2007)
Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation
Arch Androl; 53 (2):99-103
- 105 Hsieh Y, Tsai H, Chang C and Lo H (2000)
Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae
Fertil Steril; 73 (4): 694-698

- 106 Huang L, Mo Y, Wang W, Li Y, Zhang Q, Yang D (2008)
Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification
 Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 139 (2): 193-198 (abstract)
- 107 Hughes CM, Lewis SEM, Mc Kelvey- Martin VJ, Thompson W (1998)
The effect of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity
 Hum Reprod; 13 (5): 1240-1247
- 108 Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, Al-Taraihi TM (2000)
Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility
 J Assist Reprod Genet.; 17 (1): 60-66
- 109 Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ (2000)
DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality
 J Androl; 21 (1): 33-44
- 110 Isachenko V, Selman H, Isachenko E, Montag M, El-Danasouri I, Nawroth F (2003 a)
Modified vitrification and cooling of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure
 RBM Online; 7 (2): 211-216
- 111 Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Dessole S, Nawroth F (2003 b)
Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success
 RBM Online; 6 (2): 191-200
- 112 Isachenko E, Isachenko V, Katkov I, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F (2004 a)
DNA Integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification
 Hum Reprod; 19 (4): 932-939
- 113 Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, Montag M, Dessole M, Nawroth F, van der Ven H (2004 b)
Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity and fertilization ability
 Biology of Reproduction; 71: 1167-1173
- 114 Isachenko V., Isachenko E., Montag M, Zueva V, Krivokharchenko I, Nawroth F, Dessole S, Katkov I, van der Ven H (2005)
Clean techniques for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa
 RBM Online; 10 (3): 350-354
- 115 Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, Van der Ven H (2006)
Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant
 Fertil Steril; 85 (3): 741-747
- 116 Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreienberg R, Katkov II, Schulz M, Lulat AG, Risopatron MJ, Sanchez R (2008)
Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose
 Reproduction; 136 (2): 167-173
- 117 Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, Rahimi G, Kreienberg R, Reinsberg J, Weiss J (2008)
Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction?
 Cryo Letters; 29 (4): 301-314 (abstract)

- 118 Jahnel F (1938)
Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte
Klinische Wochenschrift; 37: 88-89
- 119 Jelinkova L; Selman Ha, Arav A, Strehler E, Reeka N, Sterzik K (2002)
Twin pregnancy after vitrification of 2-pronuclei human embryos
Fertil Steril; 77 (2): 412-414
- 120 Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pealez M, Grabo BG, Zaneveld LJD (1984)
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics
J Reprod Fertil; 70: 219-225
- 121 Jurema MW, Vieira AD, Bankowski B, Petrella C, Zhao Y, Wallach E, Zacur H (2005)
Effect of ejaculatory abstinence period on the pregnancy rate after intrauterine insemination
Fertil Steril; 84 (3): 678-681
- 122 Kamischke A, Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Schaefer T, Nieschlag E (1998)
Recombinant human follicle stimulating hormone for treatment of male idiopathic infertility: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial
Hum Reprod; 13 (3): 596-603
- 123 Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW and Yanagimachi R (2003 a)
Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status
Biol Reprod; 69 (6): 1859-1862
- 124 Kaneko T, Whittingham DG and Yanagimachi R (2003 b)
Effect of pH value of freeze - drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa
Biol Reprod; 68 (1): 136-139
- 125 Kartberg AJ, Hambiliki F, Arvidsson T, Stavreus-Evers A, Svalander P (2008)
Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solutions without DMSO
RBM Online; 17 (3): 378-384 (abstract)
- 126 Karydis S, Asimakopoulos B, Papadopoulos N, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, Nikolettos N (2005)
ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation
In Vivo; 19 (5): 921-925 (abstract)
- 127 Kasai M, Ito K, Edashige K (2002)
Morphological appearance of cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury
Hum Reprod; 17 (7): 1863-1874
- 128 Kastrop PM, Weima SM, Van Kooij RJ, Te Velde ER (1999)
Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilisation (IVF) with high insemination concentration after total fertilisation failure in a previous IVF attempt
Hum Reprod; 14 (1): 65-69
- 129 Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E (2003)
High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy
Fertil Steril; 80 (1): 223-224

- 130 Katkov II, Katkova N, Critser JK, Mazur P (1998)
Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration
 Cryobiology; 37: 235-338
- 131 Katz MG, Fitzgerald L, Bankier A, Savulescu J, Cram DS (2002)
Issues and concerns of couples presenting for preimplantation genetic diagnosis (PGD)
 Prenat Diagn; 22: 1117-1122
- 132 Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J (2009)
Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion
 J Assist Reprod Genet; 26 (11-12): 591-596 (abstract)
- 133 Keskinetepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG (2002)
Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa
 Biol Reprod; 67 (2): 409-415
- 134 Khalaf Y (2003)
ABC of subfertility: Tubal subfertility
 BMJ; 327: 610-613
- 135 Knochenhauer ES, Key TJ, Kashar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R (1998)
Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study
 J Clin Endocrinol Metab; 83 (9):3078-3082
- 136 Kolettis PN (2003)
Evaluation of subfertile men
 American Family Physician; 67 (10): 2165-2172
- 137 Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA (1987)
A quick, reliable staining technique for sperm morphology
 Arch Androl; 18: 275-277 (abstract)
- 138 Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Matta JF, Simons KF, Oehninger S (1988)
Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization
 Fertil Steril 49 (1): 112-117
- 139 Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trouson A (1999 a)
Birth following vitrification of a small number of human oocytes
 Hum Reprod; 14 (12): 3077-3079
- 140 Kuleshova LL, Mac Farlane DR, Trounson A, Shaw JM (1999 b)
Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene – glycol based solutions and have a low toxicity to embryos and oocytes
 Cryobiology; 38 (2): 119-130
- 141 Kuleshova LL, Lopata A (2002)
Vitrification can be more favourable than slow cooling
 Fertil Steril; 78 (3): 449-454

- 142 Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG and Yanagimachi R (2001)
Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa
Proc Natl Acad Sci USA; 98 (24): 13501-13506
- 143 Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP (2005 a)
Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes
RBM Online; 11 (3): 300-308
- 144 Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O (2005 b)
Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination
RBM Online; 11 (5): 608-614
- 145 Kwon IK, Park KE and Niwa K (2004)
Activation, pronuclear formation and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa
Biol Reprod; 71: 1430-1436
- 146 Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK (1999 b)
Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique
Fertil Steril; 72 (6): 1073-1078
- 147 Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer IF, Oehninger S, Muasher SJ (1998)
A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age
Hum Reprod; 13 (2): 409-413
- 148 Lechniak D, Kedzierski A, Stanislawski D (2002)
The use of HOS Test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro
Reprod Dom Anim; 37: 379-380
- 149 Leffler KS and Walters A (1996)
A comparison of time, temperature and refreezing variables on frozen sperm motility recovery
Fertil Steril; 65 (2): 272-274
- 150 Leno GH, Mills AD, Philipott A, Laskey RA (1996)
Hyperphosphorylation of neuceoplasmin facilitates xenopus sperm decondensation at fertilisation
J Biol Chem; 271: 7253-7256
- 151 Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J (2008)
Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis
Syst Biol Reprod Med; 54 (3): 111-125
- 152 Li Y, Zhou C, Yang G, Wang Q, Dong Y (2007)
Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues
Chin Med J; 120 (2): 110-114
- 153 Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ (2002)
Potential importance of vitrification in reproductive medicine
Biol Reprod; 67: 1671-1680

- 154 Liebermann J, Tucker MJ (2002 a)
Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos assessed by survival and developmental potential after vitrification
 Reproduction; 124 (4): 483-489
- 155 Liebermann J, Dieltz J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ (2003)
Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?
 RBM Online; 7(6): 623-633
- 156 Liebermann J et Tucker MJ (2006)
Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application
 Fertil Steril; 86 (1): 20-26
- 157 Liebermann J (2009)
Vitrification of human blastocysts: an update
 RBM Online; 19 (suppl.4): 4328 (abstract)
- 158 Liow SL, Foong LC, Chen NQ, Yip WY, Khaw CL, Kumar J, Vajta G, Ng SC (2009)
Live birth from vitrified-warmed human oocytes fertilized with frozen-thawed spermatozoa
 RBM Online; 19 (2): 198-201
- 159 Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer J, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X (2004)
Freeze-dried sperm fertilisation leads to full-term development in rabbits
 Biol Reprod; 70 (6): 1776-1781
- 160 Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I (1996)
Chromomycin A3 staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization
 Int J Androl ; 19 (1): 23-27 (abstract)
- 161 Lopes S, Jurisicova A, Casper RF (1998)
Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection
 Hum Reprod; 13 (3): 703-708
- 162 Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998 a)
Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa
 Hum Reprod; 13 (4): 896-900
- 163 Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC (2008)
Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis
 Fertil Steril; 90 (1): 186-193 (abstract)
- 164 Lovelock JE (1953)
The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing
 Biochim Biophys Acta; 10 (3): 414-426
- 165 Luyet BJ (1937)
Working hypotheses on the nature of life
 Biodynamica; 1: 1-7 (abstract)

- 166 Luyet BJ (1937)
The vitrification of organic colloids and protoplasm
 Biodynamica; 1: 1-14 (abstract)
- 167 Luyet BJ, Hodapp R (1938)
Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air
 Proc Soc Exp Biol NY; 39: 433-434
- 168 MacLeod J (1950)
The male factor in fertility and sterility. An analysis of ejaculate volume in 800 fertile men and in 600 men in infertile marriages
 Fertil Steril; 1: 347-361
- 169 Makler A (1980)
The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation
 Fertil Steril; 33 (3): 337-338
- 170 Malpani A (2002)
PGD and sex selection
 Hum Reprod; 17 (2): 517-523
- 171 Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizarro D, Bianchi U, Sakkas D (1995)
Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility
 Biol Reprod; 52: 864-867
- 172 Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P (2002)
Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm
 Hum Reprod; 17 (5): 1257-1265
- 173 Martins CF, Dode MN, Bao SN and Rumpf R (2007)
The use of acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA
 Genet Mol Res; 6 (1): 94-104
- 174 Matsuda Y, Yamada T, Tobar I (1985)
Studies on chromosome aberration in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation
I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation
 Mutat Res; 148 (1-2): 113-117
- 175 Mazur P (1970)
Cryobiology: the freezing of biological systems
 Science; 168: 939-949
- 176 Mazur P, Leibo P, Chu EHY (1972)
A two-factor hypothesis of freezing injury
 Experimental Cell Research; 71: 345-355

- 177 Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N (1981)
Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes
 Biophysical Journal; 36: 653-675
- 178 Mazur P, Katkov II, Katkova N, Critser JK (2000)
The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an E. coli membrane preparation Oxyrase TM to lower the oxygen concentration
 Cryobiology; 40 (3): 187-209
- 179 McGann LE (1978)
Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents
 Cryobiology; 15 (4): 382-390
- 180 McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG (1992)
The contribution of toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservation to the decline in human sperm motility during cryopreservation
 J Reprod Fertil; 95: 749-754
- 181 Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A (2009)
Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters
 Andrologia; 41 (6): 383-386 (abstract)
- 182 Mehrafza M, Nobakhti N, Roushan ZA, Dashtdar H, Oudi M, Hosseini A (2003)
The correlation between semen parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination
 Iranian Journal of Reprod Medicine; 1 (1): 29-32
- 183 Meirow D (2000)
Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients
 Molecular and Cellular Endocrinology 2000; 169 (1-2): 123-131
- 184 Meister U, Finck C, Stöbel-Richter Y, Schmutzer G, Brähler E (2005)
Knowledge and attitudes towards preimplantation genetic diagnosis in Germany
 Hum Reprod; 20 (1): 231-238
- 185 Meltendorf C, Hiocha DK, Hoffmann P (2002)
Vitrification of posterior corneal lamellae
 Cryobiology; 44 (2): 170-178
- 186 Menkveld R and Kruger FT (1996)
Basic semen analysis
 In Acosta, AA and Kruger TF (eds), Human spermatozoa in Assisted Reproduction. Parthenon Publishing, Carnforth, England: 53-71 (online verfügbar)
- 187 Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AMM, Thomas CMG, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM (2001)
Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardisation of in vivo thresholds
 Hum Reprod; 16 (6): 1165-1171

- 188 Mortimer D, Curtis EF, Miller RG (1987)
Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon
 J Reprod Fertil; 81: 127-135
- 189 Moustafa MH, Sharma RK, Thornion J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr., Agarwal A (2004)
Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility
 Hum Reprod; 19 (1): 129-138
- 190 Mukaida T, Nasamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K (2001)
Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with the use of cryoloop containerless technique
 Fertil Steril; 76 (3): 618-623
- 191 Mukaida T, Takahashi K, Kasai M (2002)
Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique
 RBM Online; 6 (2): 221-225
- 192 Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K (2003)
Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles
 Hum Reprod; 18 (2): 384-391
- 193 Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Marquez C, Sable D, Ferraretti AP, Massey JB, Scott R (1999)
Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos
 Hum Reprod; 14 (9): 2191-2199
- 194 Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A (2006)
Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility
 Fertil Steril; 85 (3): 629-635
- 195 Nauk VA (1991)
Structure and function of spermatozoa from farm animal by cryopreservation
 Shtiinca Kishineu; 1-198
- 196 Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, Peters D, Orth I, Isachenko E (2002)
Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants
 CryoLetters; 23 (2): 93-102
- 197 Naysmith TE, Blake DA, Harvey VJ, Johnson NP (1998)
Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future?
 Hum Reprod; 13 (11): 3250-3255
- 198 Nicolson GL, Yanagimachi R (1972)
Terminal saccharides on sperm plasma membranes: identification by specific agglutinins
 Science; 177 (4045): 276-278
- 199 Nudell DM, Monoski MM, Lipshultz LI (2002)
Common medications and drugs: How they affect male fertility?
 Urologic Clinics of North America; 29 (4): 983-992 (abstract)

- 200 O'Connell M, Mc Clure N, Lewis SEM (2002)
The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function
 Human Reprod.; 17 (3): 704-709
- 201 Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE jr., Carnevale EM, Squires EL (2000)
Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods
 Theriogenology; 55 (2): 607-613
- 202 Ohashi Y, Milharu N, Honda H, Samura O and Ohama K (2001)
High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men
 Hum Reprod; 16 (4): 703-708
- 203 Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG (1998)
Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology?
 Fertil Steril; 69 (1): 1-7
- 204 Oliva A, Spira A, Multigner L (2001)
Contribution of environmental factors to the risk of male infertility
 Hum Reprod; 16 (8): 1768-1776
- 205 Ombelet W, Bosmans E, Janssens M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, Steeno O, Kruger T (1997)
Semen parameter in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing
 Hum Reprod; 12 (5): 987-993
- 206 Ozmen B, Caglar GS, Koster F, Schopper B, Diedrich K, Al-Hasani S (2007)
Relationship between sperm DNA damage, induced acrosome reaction and viability in ICSI patients
 RBM Online; 15 (2): 208-214
- 207 Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z (1995)
ICSI: a novel treatment for all form of male factor infertility
 Fertil Steril; 63 (6): 1231-1240
- 208 Palermo GD, Neri QV, Hariprashad JJ, Davis OK, Veeck LL, Rosenwaks Z (2000)
ICSI and its outcome
 Semin Reprod Med; 18 (2): 161-169
- 209 Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, Park EI, Yoon SH, Chung KS, Lim JH (2000)
Ultrarapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids
 Hum Reprod; 15 (8): 1787-1790
- 210 Paynter SJ (2005)
A rational approach to oocyte cryopreservation
 RBM Online; 10 (5): 578-586
- 211 Pennings G (2002)
Personal desires of patients and social obligations of geneticists: applying preimplantation genetic diagnosis for non-medical sex selection
 Prenat Diagn; 22 (12): 1123-1129

- 212 Perreault SD (1992)
Chromatin remodelling in mammalian zygotes
Mutat Res; 296: 43-55 (abstract)
- 213 Peterson CM, Hatasaka HH, Jones KP, Poulson AM jr., Carrell DT, Urry RL (1994)
Ovulation induction with gonadotropins and intrauterine insemination compared with in vitro fertilisation and no therapy: a prospective randomized cohort study and meta - analysis
Fertil Steril; 62 (3): 535-544
- 214 Piasecka M, Gaczarzewicz D, Laszczynska M (2006)
Evaluation of sperm genomic integrity of normozoospermic men: a prospective study
Folia Histochemica et Cytobiologica; 44 (2): 117-122
- 215 Plachot M (1992)
Viability of preimplantation embryos
Baillere's Clinical Obstetrics and Gynaecology; 6 (2): 327-338
- 216 Polge C, Smith AV, Parkes AS (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures
Nature; 164 (4172): 666
- 217 Pool TB, Leibo SP (2004)
Symposium: Cryopreservation and assisted human conception
RBM Online; 9 (2): 132-133
- 218 Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Gianchi B, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C (2000)
Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation
Molecular and Cellular endocrinology; 169 (1-2): 33-37
- 219 Quallich S (2006)
Examining male infertility
Urologic Nursing 26 (4): 277-288
- 220 Ragni G, Caccamo AM, Serra AD, Guercilena S (1990)
Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapour freezing
Fertil Steril; 53 (6): 1072-1075
- 221 Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Wartenberg M, Isachenko V, Hescheler J, Maltmann P, Nawroth (2001)
Measurement of apoptosis in long term cultures of human ovarian tissue
Reproduction; 122 (4): 657-663
- 222 Rall WF, Fahy GM (1985)
Ice-free cryopreservation of mouse embryos at - 196° C by vitrification
Nature; 313 (6003): 573-575
- 223 Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG (1987)
Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification
J Reprod Fertil; 80 (2): 499-504
- 224 Rall WF, Meyer TK (1989)
Zona fracture damage and its avoidance during cryopreservation of mammalian embryos
Theriogenology; 31 (3): 683-692

- 225 Rattan PR, Murphy TH, Baraban JM (1994)
Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons
J Neurochem; 62 (1): 376-379
- 226 Reed ML, Lane M, Gardner DK, Jensen NL, Thompson J (2002)
Short communication: Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring
J Assist Reprod Genet; 19 (6): 304-306
- 227 Reubinoff BE, Peri MG, Vajta G, Trounson AO (2001)
Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method
Hum Reprod; 16 (10): 2187-2194
- 228 Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995)
Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay
J Androl; 16 (1): 80-87
- 229 Saito H, Ishida GM, Kaneko T, Kawachiya S, Okta N, Takahashi T, Saito T, Hiroi M (2000)
Application of vitrification to human embryo freezing
Gynaecology and Obstetric Investigation; 49 (3): 145-149
- 230 Saki G, Dezfily FG (2005)
Vitrification of human oocyte using cryoloop
Iranian Journal of Reproductive Medicine; 3 (1): 19-24
- 231 Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999)
Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa
Rev Reprod; 4: 31-37
- 232 Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizarro D (2002)
Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis
Biol. Reprod; 66: 1061-1067
- 233 Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ jr. (2002)
Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study
Fertil Steril; 78 (3): 491-499
- 234 Samardzija M, Karadjole M, Getz I, Zdenko M, Cergolj M, Dobranic T (2006)
Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro
Reproductive Biology and Endocrinology; 4: 58
- 235 Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, Pellicer A (2010)
Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification
Fertil Steril; 93 (1): 268 (abstract)
- 236 Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Brady T (1988)
The effects of cooling human oocytes
Hum Reprod; 3 (8): 968-977
- 237 Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, SwannK, Lai FA (2002)
Phospholipase zeta: a sperm-specific trigger of calcium (2+) oscillations in eggs and embryo development
Development; 129: 3533-3544

- 238 Schoolcraft WB, Keller JL, Schlenker T (2009)
Excellent embryo quality obtained from vitrified oocytes
 RBM Online; 19 (6): 820-823 (abstract)
- 239 Schoysman R, Gerris J (1983)
Twelve-year follow-up study of pregnancy rates in 1291 couples with idiopathically impaired male fertility
 Acta Eur Fertil; 14 (1): 51-56 (abstract)
- 240 Schuster TG, Keller LM, Dunn RL , Ohl DA, Smith GD (2003)
Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops
 Hum Reprod; 18 (4) :788-795
- 241 Schwarzer JU, Fiedler K, v. Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D, Schleyer M, Ovens-Räder A, Hennig M (2003)
Male factors determining the outcome of ICSI with epididymal and testicular spermatozoa
 Andrologia; 35 (4): 220-226
- 242 Schwarzer JU, Fiedler K, v.Herwig I, Krüsmann G, Würfel W, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D (2003)
Sperm retrieval procedures and ICSI with epididymal and testicular sperms
 Urol Int; 70 (2): 119-123
- 243 Sega GA, Stomayor RE, Owens JGA (1978)
Study of unscheduled DNA synthesis induces by x-rays in the germ cells of male mice
 Mutat Res; 49 (2): 239-257
- 244 Shaffner CS (1942)
Longevity of fowl spermatozoa in frozen condition
 Science; 96 (2493): 337
- 245 Sharlip I, Jarow J, Belker A, Lipshultz L, Sigman M, Thomas A et al. (2002)
Best practice policies for male infertility
 Fertil Steril; 77 (5): 873-882
- 246 Shaw JM, Kola I, Mac Farlane DR, Trounson AO (1991 a)
An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of cryoprotective solution
 J Reprod Fertil; 91(1): 9-18
- 247 Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000)
Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue
 Theriogenology; 53 (1): 59-72
- 248 Shaw JM and Jones GM (2003)
Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos
 Hum Reprod Update; 9 (6): 583-605
- 249 Sheehan MT (2004)
Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management
 Clinical Medicine and Research; 2 (1): 13-27

- 250 Sidhu KS, Guraya SS (1989)
Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa
 Int Rev Cytol; 118: 231-280 (abstract)
- 251 Sigman M, Lipshultz LI, Howards SS (1997)
Evaluation of the subfertile male
 In Lipshultz LI and Howards SS (eds.), Infertility in the male (3rd ed.) (p.173) St.Louis: Mosby
- 252 Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P (1995)
High fertilisation and pregnancy rate after ICSI with spermatozoa obtained from testicle biopsy
 Hum Reprod; 10 (1): 148-152
- 253 Smith AU (1961)
Biological effects of freezing and supercooling
 Edward Arnold Ltd, London
- 254 Smith GD , Silva CASE (2004)
Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos
 RBM Online; 9 (2): 171-178
- 255 Son WY, Yoon SH, Yoon HI, Lee SM, Lim JH (2003)
Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele
 Hum Reprod; 18 (1): 137-139
- 256 Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JPJ, Wiemer KE, Cohen J (2008)
A new, safe, simple and successful vitrification method for human and bovine blastocysts
 RBM Online ; 17 (3): 360-367
- 257 Stein IF, Leventhal ML (1935)
Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries
 Am J Obstet Gynecol; 29: 181-191
- 258 Steptoe PC , Edwards RG (1978)
Birth after the reimplanation of a human embryo
 The Lancet; 312 (8085): 366
- 259 Sun JG, Jurisicova A, Casper RF (1997)
Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro
 Biol Reprod; 56: 602-607
- 260 Talbot P, Chacon R (1980)
A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm
 Gamete Res; 3 (3): 211-216
- 261 Talbot P, Chacon R (1981)
A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm
 J Exp Zool; 215 (2): 201-208
- 262 Tammann G (1898)
Ueber die abh angigkeit der Zahl der Kerne, welche sich in verschiedenen unterkohlten fl ussigkeiten bilden , von der temperatur
 Z Phys Chem; 25: 441-479

- 263 Thirumala S, Ferrer MS, Al-Jarrah A, Eilts BE, Paccamonti DL, Devireddy RV (2003)
Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents
 Cryobiology; 47 (2): 109-124
- 264 Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabste JM, Spira A (1991)
Incidence and main causes of infertility in a resident population (1.850.000) of three French regions (1988-1989)
 Hum Reprod; 6 (6): 811-816
- 265 Tournaye H (1999)
Surgical sperm recovery for ICSI: which method is to be preferred?
 Hum Reprod; 14 (Suppl.1): 71-81
- 266 Tucker MJ, Morton PC, Sweitzer CL, Wright G (1995)
Cryopreservation of human embryos and oocytes
 Current Opinion in Obstetrics and Gynaecology; 7: 188-192
- 267 Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998)
Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos
 Mol Reprod Dev; 51 (1): 53-58
- 268 Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H (1999)
The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw vitrification
 Theriogenology; 52 (5): 939-945
- 269 Van den Abbeel E, Van Steirteghem A (2000)
Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in vitro viability
 Hum Reprod; 15 (2): 373-378
- 270 Van der Ven HH, Jeyendran RS, El-Hasani S, Perez-Peleaz M, Crabo BG, Zeneveld LJD (1986)
Correlation between human sperm swelling in hypo-osmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization
 Journal of Andrology; 7: 190-196
- 271 Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch., Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida Takahashi K, Schoysman R (2002)
Birth after vitrification of morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocystic cavity before vitrification
 Hum Reprod; 17 (3): 744-751
- 272 Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch., Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, Zech H (2003)
Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: application of assisted hatching after thawing
 Hum Reprod; 18 (7): 1501-1511

- 273 Verheyen G, Pletinex I, Van Steirtegham A (1993)
Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm
Hum Reprod; 8 (10): 1678-1684
- 274 Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Letho VP (1984)
Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells
J Cell Biol; 99: 1083-1091
- 275 Wakayama T, Yanagimachi R (1998)
Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa
Nat Biotechnol; 16: 639-641
- 276 Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW (2008)
Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation
Hum Reprod; 23 (10): 2256-2265
- 277 Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG and Yanagimachi R (2003)
Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection
Biol Reprod; 69: 2100-2108
- 278 Ward WS, Coffey DS (1991)
DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells
Biol.Reprod.; 44: 569-574
- 279 Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD (1995)
Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy and sex of the baby.
New England Journal of Medicine; 333 (23): 1517-1521
- 280 Wolf DP, Boldt J, Byrd W, Bechtol KB (1985)
Acrosomal status evaluation of human ejaculated sperm with monoclonal antibodies
Biol Reprod; 32: 1157-1162
- 281 Woolley DM, Richardson DW (1978)
Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing
J. Reprod.Fert.; 53: 389-394
- 282 World Health Organisation (1999)
WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical- Mucus Interaction.
4 th edn, Cambridge University Press, Cambridge
- 283 Wright DL, Eroglu A, Toner M, Toth TL (2004)
Use of sugars cryopreserving human oocytes
RBM Online; 9 (2): 179-186
- 284 Yeoman RP, Gerami-Naini B, Mitalipar S, Nusser KD, Widmann-Browning AA, Wolf DP (2001)
Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts
Hum Reprod; 16 (9): 1965-1969

- 285 Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y (2000)
Successful pregnancy following blastocysts vitrification
Hum Reprod; 15 (8): 1802-1803
- 286 Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yokota H, Araki Y (2001 a)
Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts
Fertil Steril; 75 (5): 1027-1029
- 287 Yokota Y, Yokota H, Yokota M, Sato S, Araki Y (2001 b)
Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos
Fertil Steril; 76 (5): 1063-1065
- 288 Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY (2000)
Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in stimulated in vitro fertilisation embryo transfer program
Fertil Steril; 74 (1): 180-181
- 289 Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY (2003)
Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilisation embryo transfer program
Fertil Steril; 79 (6): 1323-1326
- 290 Zamboni L (1987)
The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality
Fertil Steril; 48 (5): 711-729
- 291 Zaneveld LJD, Dejonge CJ, Anderson RA, Mack SR (1991)
Human sperm capacitation and the acrosome reaction
Hum Reprod; 6 (9): 1265-1274
- 292 Zech N, Stecher A, Vanderzwalmen P, Zech H (2002)
Vitrifikation von der Eizelle bis zur Blastozyste
Journal für Fertilität und Reproduktion; 12 (4): 9-13 (Ausgabe für Schweiz)

7. DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei all denen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. vet. Mohammed Eid Hammadeh als meinem Doktorvater und direktem Ansprechpartner zu jeder Zeit meiner Dissertation. Seine nette Persönlichkeit und seine fürsorgliche Art und Hilfsbereitschaft erleichterten die gemeinsame Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des IVF-Labors Frau Stefanie Seyfried und Frau Ellen Maurer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre familiäre Aufnahme im Labor und ihre liebenswürdige Art sowie die Unterstützung beim Sammeln der Proben.

Ferner möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Stefan Gräber und Frau Dr. rer. nat. Mei Fang Ong des Institutes für Medizinische Informatik und Biometrie bedanken für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Meinem Freund Sascha danke ich für die Hilfe bei der Formatierung und beim Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass er – seit unserer Schulzeit – immer für mich da ist und mich stets liebevoll und fürsorglich unterstützt.

Weiterhin möchte ich meiner Schwester Bettina und ihrem Mann Thorsten danken für die kompetente Beratung und stetige Unterstützung sowie die vielen hilfreichen Tipps und Ratschläge während der Zeit meines Studiums.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Marga und Berthold Müller aussprechen, die mir immer zur Seite standen und mir erst das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben sowie meinen Großeltern Gretel und Josef Maass für ihre immerwährende liebevolle Fürsorge und unsere gemeinsame Zeit.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Eva Caroline Müller

geboren am 19.09.1982 in Saarlouis

ledig, deutsch, römisch-katholisch

6, rue du moulin,

57320 Colmen (Frankreich)

Eltern: Berthold und Marga Müller

geb. Maass

Schulbildung

Grundschule in Elm-Sprengen

1989-1993

Max-Planck-Gymnasium Saarlouis

Allgemeine Hochschulreife, Note „1,3“

1993-2002

Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin

an der Universität des Saarlandes

10/2002-12/2008

Ärztliche Vorprüfung, Note „gut“

09/2004

Ärztliche Prüfung, Note „gut“

12/2008

Pflegepraktika

Knappschaftskrankenhaus, Püttlingen

08/2002

St. Michael-Krankenhaus, Völklingen

07/2003-08/2003

Famulaturen

Anästhesiologie

Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg

Prof. Dr. med. R. Larsen

02/2005-03/2005

Gynäkologie und Geburtshilfe

St. Elisabeth-Klinik Saarlouis

Prof. Dr. med. N. Schöndorf

07/2005-08/2005

	Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin und Innere Medizin, Püttlingen Jürgen Becker/ Stefan Schulte	09/2005-10/2005
	Gemeinschaftspraxis für Frauenheilkunde, Saarlouis Schmidt/Jungmann/Koppers	03/2007-04/2007
<u>Praktisches Jahr</u>	Klinikum Winterberg Saarbrücken	08/2007-07/2008
1. Tertial	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Chefarzt PD Dr. med. D. Mink	
2. Tertial	Klinik für Innere Medizin Chefarzt Prof. Dr. med. G. Görge Chefarzt Prof. Dr. med. D. Grandt	
3. Tertial	Klinik für Chirurgie/Orthopädie Chefarzt Prof. Dr. med. J. Limmer Chefarzt Prof. Dr. med. U. Harland	
	Vorstellung der Zusammenfassung und vorläufigen Ergebnisse dieser Arbeit beim 28. Saarländischen Gynäkologentag in Saarbrücken	11/2007
	Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe im Marienhausklinikum St. Elisabeth in Saarlouis	seit 01/2009