

Aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Native und aufbereitete Spermienqualität unter besonderer
Berücksichtigung der nucleären und mitochondrialen DNA vor und nach
Kryokonservierung von fertilen und subfertilen Männern**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von Kaija Lena Krämer, geb. Johannes
geboren am 26.11.1982 in Zweibrücken

Meinen Eltern und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	8
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	8
1.2 Englische Zusammenfassung (Summary)	11
2 Einleitung	14
2.1 Physiologie der Spermatogenese	14
2.2 Aufbau des Spermatozoons.....	17
2.3 Bedeutung der Spermienchromatinkondensation.....	20
2.4 Bedeutung der Spermienmorphologie	21
2.5 Physiologie der Befruchtung.....	22
2.5.1 Kapazitation.....	22
2.5.2 Akrosomale Reaktion.....	23
2.5.3 Induktion der akrosomalen Reaktion in vivo und in vitro.....	24
2.5.4 Spontane Akrosomenreaktion.....	25
2.5.5 Bedeutung der Akrosomenreaktion.....	26
2.6 Apoptose.....	26
2.6.1 Bedeutung der Apoptose.....	27
2.6.2 Methoden der Apoptosedetektion.....	28
2.7 Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen.....	29
2.7.1 Einfluss auf die Spermienmembran.....	30
2.7.2 Einfluss auf das Akrosom.....	32
2.7.3 Einfluss auf die DNA im Spermienkopf.....	32
2.8 Klassische Samenanalyse.....	33
2.9 Eigene Fragestellung	34
3 Material und Methodik	35
3.1 Probengewinnung.....	35
3.2 Kryokonservierung der Spermatozoen.....	35
3.3 Fertigung von Ausstrichpräparaten.....	36
3.4 Spermienaufbereitung.....	37
3.4.1 Swim-up Methode.....	37
3.5 Konventionelle Spermaanalyse.....	37
3.5.1 Volumenbestimmung.....	38
3.5.2 Bestimmung der Spermatozoendichte	38
3.5.3 Bestimmung der Spermatozoenmotilität	38

3.5.4 Bestimmung des pH- Wertes.....	38
3.5.5 Cytur-Test	39
3.5.6 MAR-Test.....	39
3.5.7 Vitalitätstests.....	40
3.5.7.1 Eosintest.....	40
3.5.7.2 HOS- Test.....	40
3.6 Spermienmorphologie	42
3.6.1 Färbung nach Papanicolaou (PAP).....	42
3.7 Chromatinkondensation.....	44
3.7.1 Chromomycin A ₃ (CMA ₃) Färbung.....	44
3.8 Apoptosebeurteilung.....	46
3.8.1 TUNEL-Färbung.....	46
3.8.2 Annexin V/ CFDA- Färbung.....	48
3.9 Induktion der Akrosomenreaktion.....	50
3.9.1 Challenging-Test/ ARmax-Concept.....	50
3.10 Nachweis der Akrosomenreaktion	51
3.10.1 Concanavalin-A-lectin Färbung.....	51
3.11 Verwendete Standardlösungen.....	53
3.12 Einteilung der Proben und statistische Auswertung.....	56
4 Ergebnisse.....	57
4.1 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf Dichte und Motilität menschlicher Spermatozoen unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien).....	57
4.1.1 Dichte.....	57
4.1.1.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	57
4.1.1.2 Vergleich der Spermiedichte in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik.....	58
4.1.1.3 Vergleich der Spermiedichte in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	60
4.1.2 Motilität.....	62
4.1.2.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	62
4.1.2.2 Vergleich der Spermienmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik.....	65
4.1.2.3 Vergleich der Spermienmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	68

4.2 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und die Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999).....	72
4.2.1 Vitalität (Eosin-Test).....	72
4.2.1.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	72
4.2.1.2 Vergleich der Spermienvitalität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	73
4.2.2 Membranintegrität (HOS-Test).....	74
4.2.2.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	74
4.2.2.2 Vergleich der Spermiemembranintegrität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik.....	75
4.2.2.3 Vergleich der Spermiemembranintegrität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	77
4.2.3 Morphologie (PAP-Färbung).....	79
4.2.3.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	79
4.2.3.2 Vergleich der Spermiemorphologie in der fertilen und subfertilen Gruppe nach Aufbereitung mittels swim-up Technik.....	80
4.2.3.3 Vergleich der Spermiemorphologie in der fertilen und subfertilen Gruppe nach Kryokonservierung.....	81
4.3 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf den Chromatinkondensationsstatus (Cromomycin- Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999).....	82
4.3.1 Chromatinkondensationsstatus (Cromomycin-Färbung).....	82
4.3.1.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	82
4.3.1.2 Vergleich des Spermienchromatinkondensationsstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik.....	83
4.3.1.3 Vergleich des Spermienchromatinkondensationsstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	85
4.4 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die DNA-Fragmentation (Tunel-Färbung) und die Apoptose-/Nekroserate (Annexin/CFDA- Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999).....	87
4.4.1 DNA-Fragmentation (TUNEL-Färbung).....	88
4.4.1.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	88

4.4.1.2 Vergleich DNA- Fragmentationsraten in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung.....	89
4.4.1.3 Vergleich der DNA- Fragmentationsraten in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	91
4.4.2 Apoptose-/Nekroserate (Annexin/CFDA- Färbung).....	93
4.4.2.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	93
4.4.2.2 Vergleich Apoptose-/Nekroserate in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	94
4.5 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die spontane und mittels Ionophore induzierte Akrosomreaktion (Concanavalin A-Lectin- Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999).....	98
4.5.1 Akrosomreaktion (Concanavalin-A-Lectin- Färbung).....	98
4.5.1.1 Überblick über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben.....	98
4.5.1.2 Vergleich der spontanen Akrosomenreaktion in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik und der mittels Ionophore induzierten Akrosomreaktion	99
4.5.1.3 Vergleich des Akrosomenstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung.....	102
5 Diskussion.....	105
5.1 Einfluss der Aufbereitung und Kryokonservierung auf die untersuchten andrologischen Parameter mit und ohne Berücksichtigung der Fertilität.....	105
5.1.1 Einfluss auf die Dichte.....	105
5.1.2 Einfluss auf die Motilität.....	107
5.1.3 Einfluss auf die Vitalität und Membranintegrität.....	109
5.1.4 Einfluss auf die Morphologie.....	110
5.1.5 Einfluss auf die Chromatinkondensation.....	112
5.1.6 Einfluss auf die DNA-Fragmentation und Apoptose-/Nekroserate.....	113
5.1.7 Einfluss auf die spontane und induzierte Akrosomenreaktion.....	117
5.1.8 Fazit.....	122
6 Publikationen.....	123
7 Literaturverzeichnis.....	124
8 Danksagung.....	153

9 Lebenslauf.....	154
10 Anhang.....	155

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HOS	Hypoosmotischer Schwelltest
HPSM	Human Sperm Preservation Medium
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	Invitrofertiliation
Kap.	Kapitel
MAR	Mixed Antiglobulin Reaction Test
M ±SD	Mittelwert ±Standartabweichung
n	Anzahl
OAM	Outer acrosomal membran
p	Signifikanzkoeffizient
PAP	Färbung nach Papanicolaou
PBS	Phosphate Buffered Saline
PS	Phosphatidylserin
SD	Standardabweichung
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling- Methode
WHO	World Health Organisation

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Im Bereich der zunehmend komplexer werdenden Reproduktionsmedizin gibt es trotz des in den letzten Jahrzehnten enormen Wissenszuwachses noch viele unzureichend geklärte Fragen. Schon 1940 wurde erstmalig festgelegt, dass die Grundlage jeder Ejakulatuntersuchung die Bestimmung der Dichte, der Motilität und der Morphologie sein sollte. Heute sind diese klassischen Spermatozoenparameter modifiziert in den Richtlinien der WHO (World Health Organisation) festgelegt und stellen die Grundpfeiler zur Beurteilung männlicher Fertilität dar. Die meisten der Infertilitätspatienten weisen eine reduzierte Spermatozoendichte, -motilität oder morphologie auf, nicht selten sogar eine Kombination dieser einzelnen Faktoren. Jedoch etwa ein Viertel der ungewollt Kinderlosen weist normale Spermiogrammbefunde auf und somit liefert hier die klassische Ejakulatuntersuchung nur unzureichende Informationen über das Fertilisationspotential der Spermatozoen dieser Patienten. An dieser Stelle setzt die Zielsetzung der Forschung an, die einen zusätzlichen Informationsgewinn nutzen könnte, um die Auswahl der passenden assistierten Reproduktionsmethode zu verfeinern und vielleicht die immer noch nicht vollends zufriedenstellenden Erfolgsraten von in-vitro Fertilisation (IVF) und intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) zu verbessern.

Die vorliegende Studie widmet sich der Untersuchung des Einflusses der Aufbereitung und der Kryokonservierung von Spermatozoen fertiler und subfertiler Männer auf verschiedene andrologische Parameter, die nach heutigem Stand der Wissenschaft von Bedeutung sind für eine erfolgreiche Befruchtung.

Da auch die Kryokonservierung und Aufbereitung humaner Spermatozoen im Rahmen von assistierten Reproduktionsverfahren eine sehr wichtige Rolle spielt, wurden die Funktionstests beziehungsweise Färbungen einmal an nativen, aufbereiteten sowie gefrorenen nativen und gefrorenen aufbereiteten Proben vorgenommen und die entsprechenden Ergebnisse miteinander verglichen.

Es wurden die Ejakulate von 39 Männern untersucht und ein klassisches Spermioogramm nach WHO-Richtlinien erstellt. 20 Proben lagen außerhalb der Normwerte für die Spermienkonzentration und –motilität und wurden dementsprechend der subfertilen Gruppe

zugeordnet. Die anderen 19 Proben bildeten mit normwertigen Spermiogrammparametern die fertile Gruppe.

Die Spermatozoendichte aller untersuchten Proben hat durch die Aufbereitung mittels swim-up erwartungsgemäß abgenommen, da das Prinzip dieser Methode ja darin besteht unbewegliche Spermatozoen auszusortieren. Ebenfalls alle Proben wiesen nach Kryokonservierung geringere Spermatozoenzahlen auf.

Die Motilität der Spermatozoen konnte durch die Aufbereitung verbessert werden, insbesondere die Gruppe der progressiv beweglichen Spermatozoen hat sehr stark zugenommen, wohingegen die Zahl der unbeweglichen Spermatozoen deutlich verringert wurde. Die Gruppe der global und stationär beweglichen Spermatozoen hat durch die Aufbereitung keine so ausgeprägte Veränderung erfahren. Die Kryokonservierung wirkt sich negativ auf die Motilität, besonders die progressive und globale, aus. Der Anteil der stationären und unbeweglichen Spermatozoen ist bei den gefrorenen Proben deutlich größer im Vergleich zu den ungefrorenen Proben.

Wie bei jeder lebenden und korrekt funktionierenden Zelle ist auch bei den Spermatozoen die Vitalität unabdingbar mit einer intakten Zellmembran verbunden. Um dies nachzuweisen wurden die Proben im nativen Zustand mittels Eosin gefärbt. Wie schon in vielen anderen Studien nachgewiesen leidet die Vitalität der Spermatozoen unter dem Einfrier- und Auftauprozess, wobei dieser Effekt hier in der fertilen Gruppe statistisch signifikant und in der subfertilen Gruppe nicht statistisch signifikant war. Ebenfalls zur Untersuchung der Membranintegrität wurde der hypoosmotische Schwelltest (HOS) an nativen und aufbereiteten Proben durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Aufbereitung mittels swim-up der Anteil der Spermatozoen mit intakter Zellmembran gesteigert werden kann und dass durch die Kryokonservierung Schäden an der Zellmembran zunehmen. Die subfertile Gruppe hat in dieser Studie bezüglich der Membranintegrität und Vitalität im Vergleich zu den fertilen Proben von der Aufbereitung deutlicher profitiert und durch die Kryokonservierung vermehrt Schäden erlitten.

Alle Proben wurden hinsichtlich ihrer Morphologie nach entsprechender Färbung untersucht. Gemäß WHO-Richtlinien ist der Anteil normal konfigurierter Spermatozoen in der fertilen Gruppe größer als in der subfertilen Gruppe. Nach Aufbereitung sind durchschnittlich mehr morphologisch normal geformte Spermatozoen zu beobachten und umgekehrt nimmt nach Kryokonservierung der Anteil normal geformter Spermatozoen ab.

Eine korrekte Kernchromatinkondensation ist für den Erfolg der Fertilisation wichtig und kann, wie in dieser Studie, mittels der Chromomycinfärbung nachgewiesen werden. Nach

Aufbereitung der Proben hat der Anteil von Spermatozoen mit gut kondensiertem Chromatin zugenommen, in der subfertilen Gruppe sogar etwas stärker als in der fertilen Gruppe. Das Einfrieren und Auftauen wirkt sich negativ auf die Chromatinkondensation aus und der Anteil gut kondensierter Spermatozoen nimmt in der fertilen und subfertilen Gruppe annähernd gleich ab.

Das Apoptoseverhalten der untersuchten Spermatozoenproben wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Zum einen wurde mit dem TUNEL- Test die DNA- Fragmentation nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Aufbereitung weniger Spermatozoen im Apoptosestadium vorhanden sind und dies in der fertilen Gruppe noch deutlicher ausgeprägt ist im Vergleich zur subfertilen Gruppe. Nach Kryokonservierung hat der Anteil apoptotischer Spermatozoen in beiden Gruppen zugenommen, was wiederum dafür spricht, dass die Spermatozoen durch das Frieren geschädigt wurden und daher den programmierten Zelltod auslösen.

Desweiteren wurde eine Färbung mit Annexin und CFDA an aufbereiteten Proben durchgeführt, die es ermöglicht vitale, apoptotische und nekrotische Spermatozoen zu differenzieren. Die Abnahme des Anteils vitaler Spermatozoen nach Kryokonservierung war insgesamt statistisch hoch signifikant und in der subfertilen Gruppe ausgeprägter. Der Anteil der nekrotischen und apoptotischen Spermatozoen hat in beiden Gruppen abgenommen, diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Die Akrosomenreaktion ist schon vielfach untersucht worden und scheint eng mit dem Fertilisationserfolg von Spermatozoen zu korrelieren. In dieser Studie wurde die spontane Akrosomenreaktion und die mittels Ionophore induzierte Akrosomenreaktion der nativen, aufbereiteten und gefrorenen Spermatozoengruppen untersucht und mit der Concanavalin-A- Lectin- Färbung nachgewiesen. Durch die Aufbereitung sowohl der ungefrorenen als auch der gefrorenen Proben nimmt die Rate akrosomreagierter Spermatozoen in beiden Gruppen ab. Ebenfalls in beiden Gruppen steigt die Rate an akrosomreagierten Spermatozoen durch das Einfrieren und Auftauen. Die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion durch Ionophore ist in der fertilen und subfertilen Gruppe annähernd gleich. Und auch die gefrorenen mit Ionophore behandelten Proben weisen im Vergleich zu den ungefrorenen Proben keine signifikanten Unterschiede in der induzierten Akrosomenreaktionsrate auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in dieser Studie die fertilen und subfertilen Spermatozoenproben durch die Aufbereitung in den untersuchten Parametern verbessern und die subfertilen Proben zumeist noch etwas stärker von der Aufbereitung profitieren. Die Kryokonservierung wirkt sich auf alle Spermatozoenproben negativ aus und es lässt sich die

Tendenz erkennen, dass die subfertilen Ejakulate stärker von den negativen Auswirkungen des Einfrierens betroffen sind.

Um die Erkenntnisse im andrologischen Bereich der Reproduktionsmedizin noch zu vertiefen und damit als dem letztendlichen Ziel die Ergebnisse von IVF und ICSI zu optimieren sind sicher noch zahlreiche weiterführende Studien nötig.

1.2 Englische Zusammenfassung

Summary

Despite an enormous growth in knowledge in the field of reproduction medicine, many questions remain to be solved. Since 1940, the evaluation of ejaculate is based on determination of the density, motility and morphology of sperm. These classical criteria have been incorporated into the guidelines issued by the World Health Organization (WHO) for estimation of male fertility.

Most infertile patients display reduced density or motility, or morphology of sperm, or in a considerable proportion of cases, combinations of two or three abnormalities. In approximately 25% of cases, no abnormalities of sperm density or motility are found, and the sperm cells appear normal upon microscopical examination. Consequently, the classical examination of ejaculate may provide insufficient information concerning fertility.

The aim of the present study is to improve the examination and processing of ejaculate of fertile and subfertile men, in order to improve success rates of in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), including aspects of cryoconservation.

Since cryoconservation plays an important role in assisted reproduction, functional tests, as well as staining of native, processed, frozen native and frozen processed samples were included in the study. Ejaculate samples from 39 men were examined, including a spermogram prepared according to WHO guidelines. In 20 samples, results concerning concentration or motility of spermatozoa were abnormal, the remaining 19 samples served as normal reference. The spermatozoa density was slightly reduced due to sample processing by

swim-up procedure used for eliminating immotile spermatozoa. Cryoconservation also resulted in a slight loss in viable spermatozoa within the samples.

The processing procedure resulted in a considerably higher proportion of progressively motile spermatozoa, whereas the proportion of immotile spermatozoa was reduced.

Cryoconservation reduces motility, especially the progressive and global motility, increasing the proportion of immotile spermatozoa.

Cell viability is influenced by the properties of the cell membrane. Eosin staining revealed that freezing and thawing may damage the membranes. The effect was statistically significant in the fertile group, but not in the subfertile group. The hypo-osmotic swelling assay showed that processing by swim-up procedure increased the proportion of spermatozoa with intact cell membranes and that cryoconservation increases the proportion of spermatozoa with damaged cell membranes. In the subfertile group, damages induced by cryoconservation were more pronounced than in the fertile group, and the subfertile group appeared to benefit more from sample processing than the fertile group concerning membrane integrity and viability than the fertile group.

All samples were examined concerning morphology using specific staining procedures. Using to WHO guidelines for evaluation, the proportion of spermatozoa with normal configuration was larger in the fertile group than in the subfertile group. Sample processing increased the proportion of morphologically normal spermatozoa, whereas cryoconservation had the opposite effect.

Correct condensation of nuclear chromatin is important for success of fertilization procedures. Using chromocyanine staining, sample processing increased the proportion of spermatozoa with well condensed chromatin; the effect was more pronounced in the subfertile than in the fertile group. Again, cryoconservation had a negative effect, both in fertile and subfertile spermatozoa.

Apoptosis was examined by TUNEL-test and DNA fragmentation. Sample processing reduced the proportion of apoptotic spermatozoa; the effect was more pronounced in the fertile group. Cryoconservation increased the proportion of apoptotic spermatozoa in both groups. By staining with annexin and CFDA, the proportion of viable, necrotic, and apoptotic spermatozoa can be determined. Cryoconservation mainly reduced the proportion of viable spermatozoa.

The acrosome reaction displays a high degree of correlation with success of fertilization. We examined the spontaneous acrosome reaction and the acrosome reaction induced by ionophores in native, processed, and frozen samples, using concavalin A-lectin staining.

Sample processing reduced the proportion of acrosome-reacting spermatozoa in both groups, whereas freezing and thawing increased the proportion. The effect of the inonophore was nearly similar in the fertile and subfertile groups, with no significant differences between native and frozen samples.

Sample processing improves parameters of spermatozoa viability both in fertile and subfertile samples. Subfertile samples appear to benefit more from processing. Cryoconservation reduces viability of spermatozoa, and the effect is more pronounced in the subfertile samples.

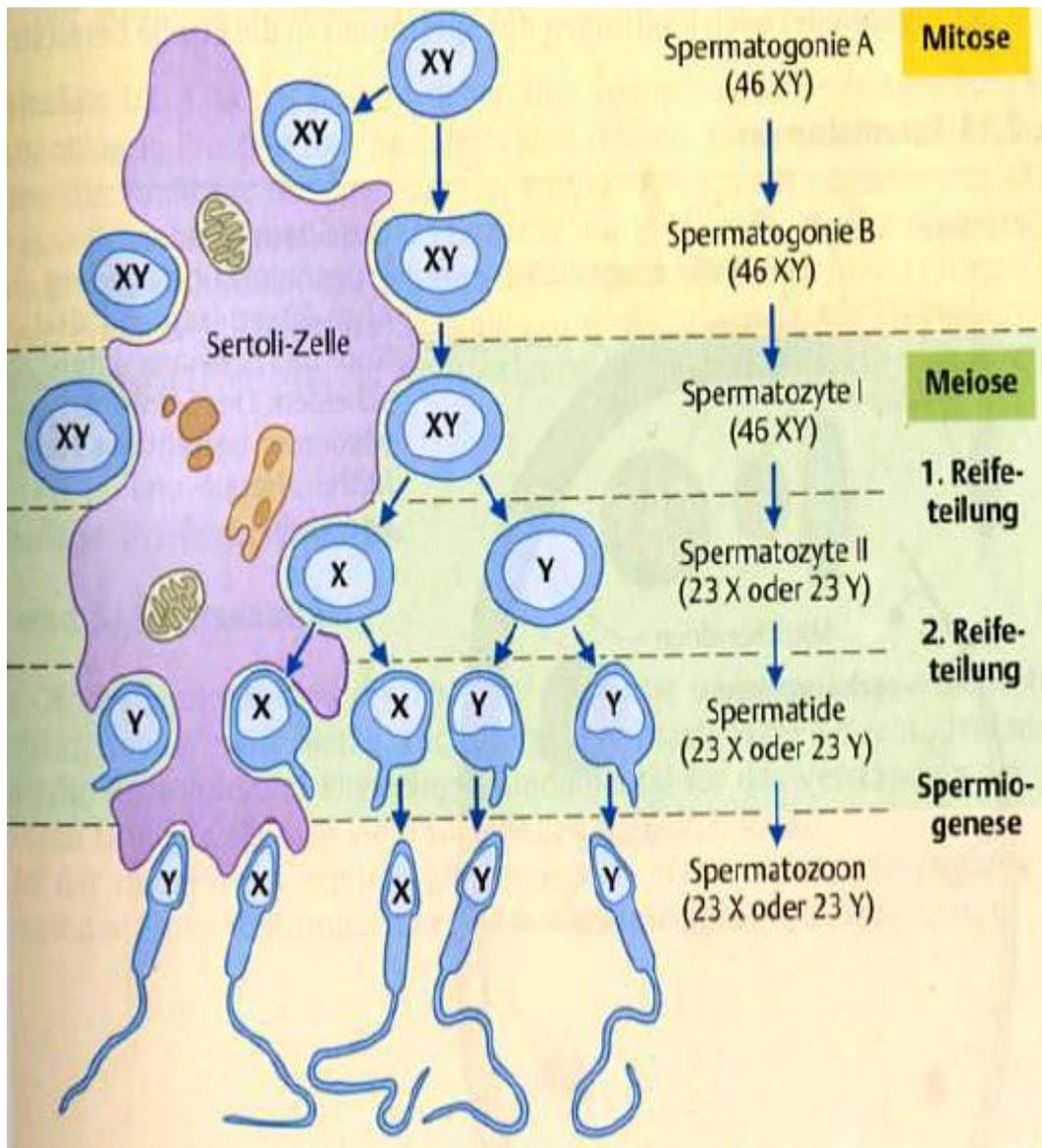
2. Einleitung

Zum Verständnis der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Färbungen und Funktionstests einzelner Spermatozoonbestandteile gibt dieses Kapitel einen allgemeinen Überblick über die Physiologie der Spermatogenese und Befruchtung mit Schwerpunkt Akrosomenreaktion, den Aufbau des Spermatozoons und die Bedeutung von Apoptose und Chromatinkondensationsstatus.

2.1 Physiologie der Spermatogenese

Die Bildung und Reifung der männlichen Samenzellen erfolgt im Keimgewebe des Hodens in den Tubuli seminiferi. Es handelt sich um einen kontinuierlichen Prozess, in dessen Verlauf aus den diploiden männlichen Stammzellen (Spermatogonien) haploide Spermien entstehen. Die Spermatogonien werden eingeteilt in sogenannte Typ A- und Typ B-Spermatogonien. Die Typ A-Spermatogonien entsprechen einer sich ständig teilenden Stammzellpopulation. Durch Mitosen entstehen aus ihnen zum Teil neue Typ A-Spermatogonien, die Stammzellen bleiben, sowie Typ B-Spermatogonien, die sich durch mitotische Teilung zu primären Spermatozyten entwickeln. Durch eine erste nun meiotische Reifeteilung entstehen aus diesen Spermatozyten 1. Ordnung Spermatozyten 2. Ordnung, die direkt in die zweite Reifeteilung eintreten und zu Spermatisden mit einem nun haploiden Chromosomensatz ($n=23$) werden. Während ihrer gesamten Entwicklung bleiben Spermatogonien und Spermatisden in Einbuchtungen der Sertoli-Zellen eingebettet, deren Funktion der Schutz und die Ernährung der Keimzellen ist.

Abb.2.1 : Spermatogenese



[Quelle: Lehrbuch Urologie, Sökeland/Schulze/Rübgen, 13.Aufl., Thieme]

Die Differenzierung der Spermatischen zu reifen Spermatozoen ist der letzte Schritt der Spermatogenese bzw. Spermio-genese und lässt sich in 4 Phasen einteilen:

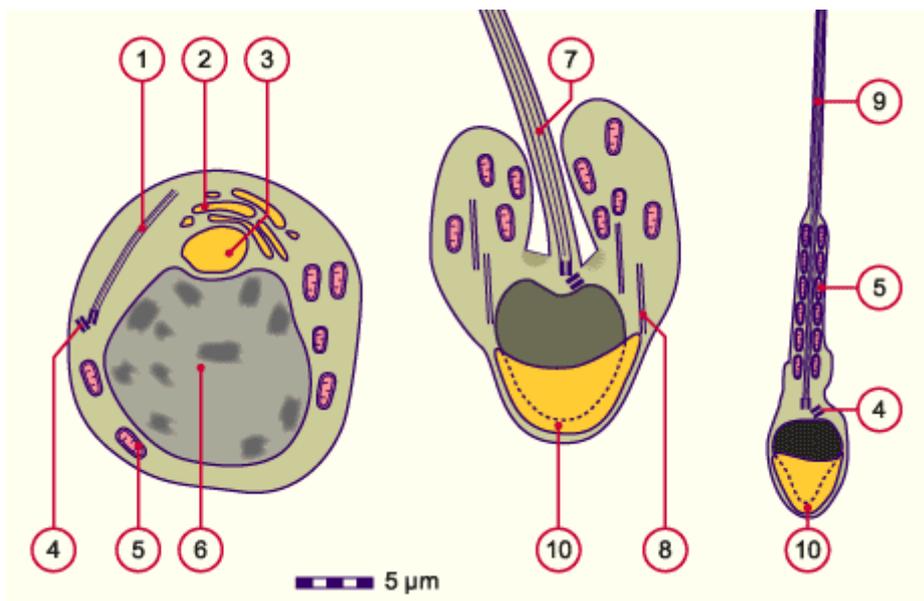
In der Golgi-Phase entstehen das Akrosombläschen und die kranio-kaudale Symmetrie. Das Akrosom entwickelt sich in der Kappenphase und bedeckt bis zu zwei Drittel des kranialen Teils des sich elongierten Spermatischen. Es entspricht funktionell einem Lysosom und enthält lysosomale Enzyme (u.a. Hyaluronidase). Die Akrosomphase ist charakterisiert durch die weitere Elongation der Keimzelle und die Kernkondensation, im Rahmen derer die meisten Histone gegen Protamine ausgetauscht werden und die DNA nun so in ihrer

'Verpackungsform' vorliegt. In der Reifungsphase des Spermatids wird das restliche Zytoplasma als so genannter Residualkörper abgestoßen und von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Dies hat regulatorische Bedeutung, da elongierte Spermatiden bzw. deren Residualkörper die sekretorische Funktion der Sertoli-Zellen beeinflussen und parallel zur Degradation des Residualkörpers ein neuer Zyklus der Spermatogenese beginnt.

(ANDROLOGIE, Nieschlag/Behre/Nieschlag, 3.Aufl., Springer)

Die genannten Entwicklungsschritte von der Spermatide bis zum reifen Spermium laufen nicht strikt nacheinander ab, sondern überschneiden sich. Die Geißelbildung beispielsweise beginnt bereits während der Entstehung des Akrosoms.

Abb. 2.2 :Spermiogenese



- 1 Axonemiale Struktur, erste Geisselanlage
- 2 Golgi Apparat
- 3 Akrosomales Bläschen
- 4 Zentriolenpaar (distales und proximales)
- 5 Mitochondrium
- 6 Kern
- 7 Geisselanlage
- 8 Mikrotubuli
- 9 Spermienschwanz
- 10 Akrosomenkappe

Drei verschiedene Stadien der Spermiogenese: links eine ganz frische Spermatide, rechts ein unreifes Spermium, in der Mitte ein Zwischenstadium. Durch eine Rotation des Kerns kommt es zu einer Umlagerung des akrosomalen Bläschens. Dieses stülpt sich kappenförmig über den sich immer weiter kondensierenden Kern (punktierte Linie). Die nicht mehr benötigten zytoplasmatischen Zellbestandteile werden abgeschnürt (und in Form von Residualkörperchen eliminiert) und die Mitochondrien dicht um den Anfangsteil der Geißel gepackt. Als Zeichen seiner Unreife besitzt das ins Lumen abgegebene Spermium (re.) noch etwas Zytoplasma um den Hals.

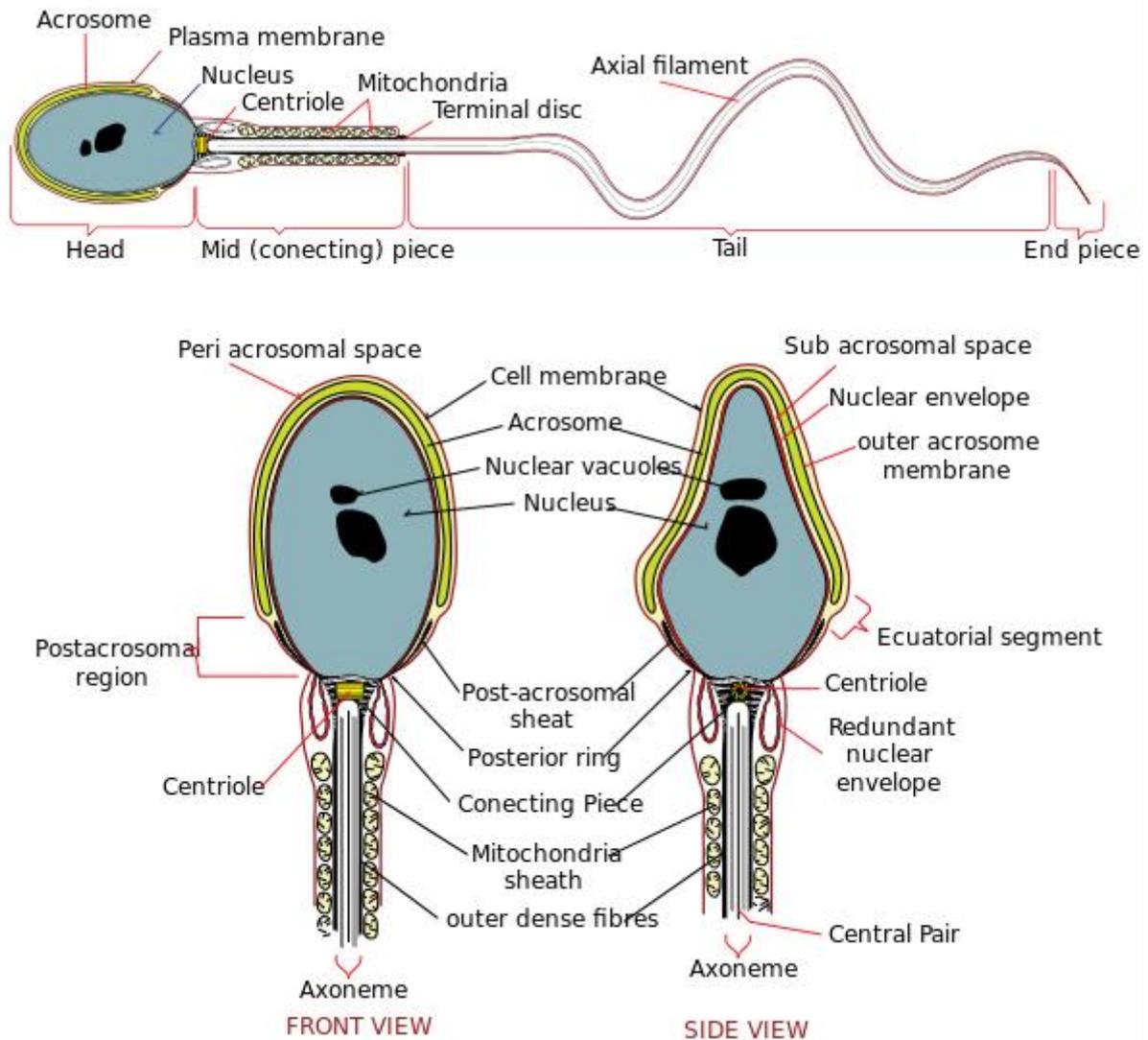
[Quelle: www.embryology.ch]

Nach abgeschlossener Differenzierung und Elongation werden die reifen Spermatozoen durch Pulsation der Wand der Tubuli seminiferi und der Ductuli efferentes passiv in den Nebenhoden transportiert, wo sie bis zur Ejakulation verbleiben. Der gesamte Prozess der Spermatogenese dauert beim Menschen mindestens 64 Tage. In neueren Untersuchungen wird sogar ein Zeitraum von 74 Tagen für den gesamten Prozess inklusive der Erhaltungsteilung der A-Spermatogonien postuliert (AMANN, 2008).

2.2 Aufbau des Spermatozoons

Das reife Spermatozoon ist eine freie und aktiv bewegliche Zelle. Die morphologischen und funktionellen Hauptkomponenten sind der Spermatozoonkopf mit dem Akrosom, das Hals- oder Verbindungsstück und das Flagellum, welches in drei Abschnitten untergliedert werden kann, nämlich einem mitochondrientragenden Mittelstück, sowie einem Haupt- und Endstück. Die Gesamtlänge beträgt ca. 60µm.

Abb.2.3 : Aufbau des reifen Spermatozoons



[Quelle: www.answers.com]

Der normomorphe humane Spermatozoenkopf ist längsoval, 4-5 μm lang und 2,5-3,5 μm breit. Der vordere Teil des Kopfes wird kappenartig vom Akrosom bedeckt, der übrige Anteil wird vom Zellkern ausgefüllt, der die hochkondensierte DNA enthält.

Bei dem während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat der Spermatide entstandenen Akrosom handelt es sich um ein membrangebundenes Organell, das etwa 40-60 % des Kopfes einnimmt und eine Reihe von hydrolytischen Enzymen enthält (FAWCETT, 1975; BELLVE & O'BRIAN, 1983). Die wichtigsten spermispezifischen akrosomalen Enzyme sind Hyaluronidase und Akrosin, wobei erstere die Penetration des Cumulus oophorus erleichtern

und Akrosin als Schlüsselenzym zur Penetration der Zona fungieren soll (SCHILL, 1975; SCHILL et al., 1988).

Das Akrosom besteht aus zwei Segmenten, dem anterioren Anteil und dem Äquatoralsegment (EDDY & O'BRIAN, 1994).

Die akrosomale Matrix wird von speziellen Membranen begrenzt. Direkt unter der Plasmamembran liegt die äußere akrosomale Membran, die innere akrosomale Membran liegt der Kernmembran an. Während der akrosomalen Reaktion verschmelzen die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran des anterioren Segmentes, während die innere akrosomale Membran und das äquatoriale Segment bestehen bleiben (EDDY & O'BRIAN, 1994). Die unmittelbar apikal zum äquatorialen Segment liegende Region wird als eine wichtige Fusionsstelle für die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran während der Akrosomreaktion angesehen (NAGAE et al., 1986). Die Plasmamembran, die das Äquatoralsegment bedeckt, spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion zwischen Spermatozoon und Eizelle (BEDFORD et al., 1979).

Die zytoskelettalen Strukturen, die das Akrosom stabilisieren, sind in den Schichten zwischen Akrosom und Zellkern, Akrosom und Plasmamembran und zwischen dem Zellkern und der postakrosomalen Plasmamembran lokalisiert (EDDY & O'BRIAN, 1994).

Eine besonders hervorzuhebende Bedeutung kommt dieser Spermatozoenstruktur zu, da nur bei intaktem Akrosom eine erfolgreiche Akrosomreaktion, Zonabindung und Zonapenetration möglich ist, die für den Fertilisationsprozess unabdingbar ist (STOREY, 1995).

Das menschliche Spermien-Flagellum ist 50-60 μm lang und kann lichtmikroskopisch in vier Hauptsegmente unterteilt werden: Das Halsstück (etwa 1 μm), Mittelstück (etwa 6 μm), Hauptstück (etwa 45 μm) und Endstück (etwa 5 μm) (HOLSTEIN, 1981).

Das Mittelstück beinhaltet den zytoplasmatischen mitochondrialen Apparat, der der Energieversorgung des Spermatozoons dient (VAN DEURS et al., 1973).

Im elektronenmikroskopischen Querschnitt des Flagellums zeigt sich der typische Aufbau einer Geißel mit zentral gelegenem Axonem, welches aus neun kreisförmig angeordneten Doppeltubulipaares und einem zentralen Mikrotubulipaars besteht. Über den Auf- und Abbau der die Tubuli verbindenden Dyneinarme wird eine Verschiebung der Tubuli gegeneinander und so eine Geißelbewegung d.h. Fortbewegung des Spermiums erreicht (GIBBONS, 1981). Umgeben wird das Axonem von den Mantelfasern, die zwischen Hals- und Mittelstück liegen (SERRES et al., 1983) und passiv-elastische Funktionen haben (SWAN et al., 1980);

HENKEL et al., 1992). Sie schützen das Spermium vor den bei der Ejakulation auftretenden Scherkräften (BALTZ et al., 1990).

2.3 Bedeutung der Spermienchromatinkondensation

Die Spermienchromatinstruktur wird bereits während der Spermatogenese umorganisiert mit dem Ziel einer maximalen Kondensation der DNA. Dabei werden lysinreiche Histone durch Protamine ersetzt, welche reich an Arginin und negativ geladen sind. Dadurch ist eine engere Bindung an die DNA möglich, was zu einer Verdichtung des Spermienchromatins führt, der sogenannten Kondensation (HECHT, 1986).

Eine weitere Kondensation des Chromatins findet während der epididymalen Wanderung der Spermatozoen statt durch Oxidation der Cystein-Reste und Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen den Protaminmolekülen.

Der dritte Schritt der Kondensation findet nach der Ejakulation statt, bei dem das in der Samenflüssigkeit enthaltene Zink an die freien Thiol-Gruppen innerhalb des Chromatins bindet und so zur Ausbildung einer Quartärstruktur führt (ARVER & ELLIASON, 1982; BJÖRNDAHL & KVIST, 1990). Zusätzlich wird das Gleichgewicht zwischen S-S-Brücken und freien Thiol-Gruppen stabilisiert (BJÖRNDAHL, 1986; KVIST et al., 1987).

All diese Prozesse führen zu einer hohen Stabilität des Chromatins (BALHORN, 1989; HECHT, 1989).

Die Chromatinkondensation ermöglicht es zum einen, die DNA in einem kleinen Volumen unterzubringen, was den Transport des männlichen Genoms in die Eizelle erleichtert (YANAGIMACHI, 1994). Zum anderen ist das männliche Genom durch eine maximale Kondensation auch besonders stabil und widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen, wie beispielsweise enzymatischen Abbau, chemische und physikalische Noxen (HAMMADEH, 1997).

In einer neueren Arbeit schreibt WARD (2010) über die im Unterschied zu somatischen Zellen strukturell andersartige Organisation der Spermien-DNA. Der Großteil der Spermien-DNA wird hochkondensiert an Protamine gebunden, ein kleinerer Teil in loserer Form an Histone und die restliche DNA ist angehängt an die Zellkernmembran als sogenannte matrix attachment regions (MARs).

Es ist untersucht worden, dass protaminarme Spermatozoen anfälliger gegenüber äußerliche Stress sind (CALVIN & BEDFORD, 1971; BIZZARO et al., 1998) und umgekehrt die Zugabe von Protamin die Stabilität von Spermatozoen- DNA erhöht (BALHORN et al., 2000). Die ungewöhnlich stabilen und hochstrukturierten Spermatozoennuclei von Säugetieren können als eine Art Kompensationsmechanismus für fehlende DNA-Reparatursysteme in Spermatozoen angesehen werden (MATSUDA et al., 1987; OLSEN et al., 2005). Denn für eine erfolgreiche Befruchtung und das frühe Überleben des Embryos ist eine intakte Chromatinstruktur der Spermien sehr wichtig (BALLACHEY et al., 1987). Dazu konnten mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen einem schlechten Chromatinkondensationsgrad und verminderten Befruchtungsraten nach IVF/ICSI zeigen (HAMMADEH et al. 1998; ESTERHUIZEN et al., 2002; SAKKAS et al., 1996).

2.4 Bedeutung der Spermienmorphologie

Menschliche Spermatozoen zeichnen sich durch eine große Heterogenität bezüglich ihrer Morphologie aus. Viele Studien konnten beweisen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen normaler Spermienmorphologie und positiven Fertilisationsraten besteht (ROGERS et al., 1983; KRUGER et al., 1986; HAMMADEH et al., 1998; Bartoov et al., 2003).

Umgekehrt wurde im Ejakulat infertiler Männer ein erhöhter Anteil von Spermien mit pathologischer Kopfmorphologie gefunden (BIELSA et al., 1994).

Daher ist die Beurteilung der Spermienmorphologie zum festen Bestandteil der Basisfertilisationsdiagnostik im Rahmen des Spermioграмms geworden und es hat sich die auch in dieser Studie zur Anwendung gekommene PAP-Färbung bewährt (LUDWIG & FRICK, 1987; WHO, 1999).

Die Auswertung der gefärbten Ausstriche kann unter Berücksichtigung der WHO-Richtlinien (1999) erfolgen, die ein Vorhandensein von wenigstens 30% normalen Spermienformen zur Einstufung als normal vorsieht oder es können die strikten Kriterien Anwendung finden, die 14% normalgeformte Spermatozoen fordern. Verschiedene Studien haben sich mit der Korrelation zwischen Fertilisationsraten und der Auswertung der Morphologie nach oben genannten Kriterien befasst (KRUGER et al., 1987; ENGINSU et al., 1996; MENKVELD et al., 1990).

Die hohe prognostische Aussagekraft der Spermienmorphologie bezüglich einer erfolgreichen Befruchtung der Eizelle und Schwangerschaft liegt auch darin mitbegründet, dass, wie mehrere Autoren beschrieben haben, eine Korrelation zwischen Defekten in der Chromatinkondensation und morphologisch fehlerhaften Spermatozoen zu bestehen scheint (SUN et al., 2006; ESTERHUIZEN et al., 2000a; LOPES et al., 1998).

2.5 Physiologie der Befruchtung

2.5.1 Kapazitation

Nach der Ejakulation müssen die Spermatozoen einen Aktivierungsprozeß, die Kapazitation, durchmachen um die Eizelle befruchten zu können (KÜPKER et al., 1998). Dieser Kapazitationsprozeß führt nicht zu sichtbaren morphologischen Veränderungen, sondern ist vielmehr mit Membranveränderungen und biochemischen Prozessen verbunden, die Voraussetzung für die Zona-pellucida-induzierte akrosomale Reaktion, die Zonapenetration und Fusion mit der Eizelle sind (AUSTIN 1960; CHANG 1984; TÖPFER-PETERSEN et al., 1996). Die im Seminalplasma zuvor erworbenen „sperm-coat“-Antigene, so genannte Dekapazitationsfaktoren, die die Plasmamembran stabilisieren und die ‚verfrühte‘ Akrosomreaktion verhindern (OLIPHANT et al., 1985), werden im Verlauf der Kapazitation eliminiert. Weitere wichtige Schlüsselereignisse sind die Entfernung von Cholesterin aus der Plasmamembran und ein Kalziumioneninflux in das Spermatozoon (LANGLAIS & ROBERTSON, 1985). Desweiteren werden die Spermatozoen hypermotil (BURKMAN, 1990), was für die mechanische Penetration der Zona pellucida eine wichtige Rolle spielt (KATZ et al., 1993).

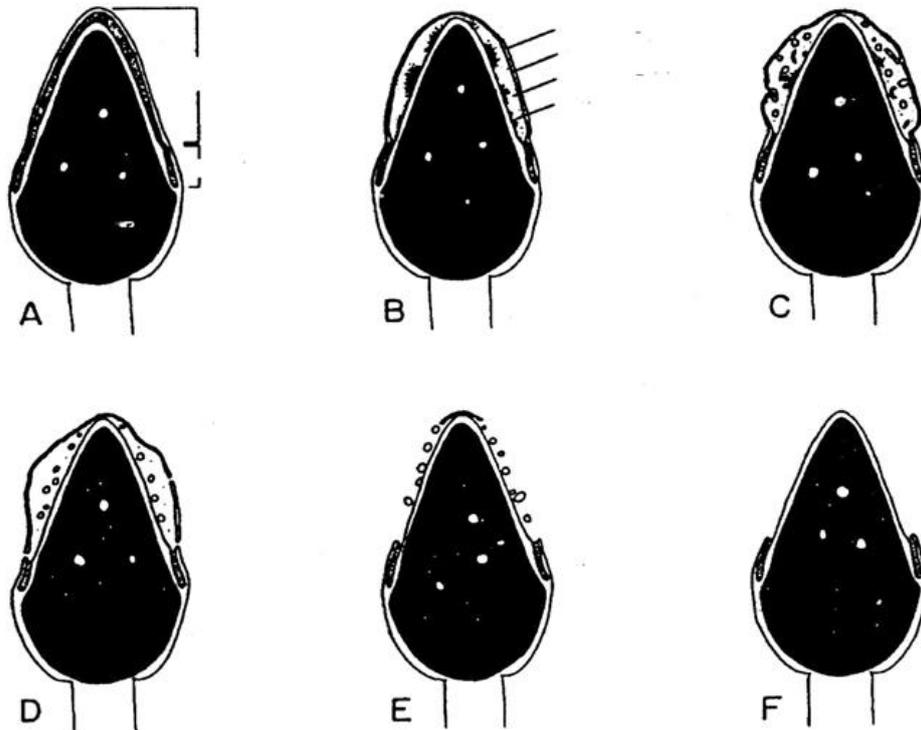
2.5.2 Akrosomale Reaktion

Der Kapazitation schließt sich die akrosomale Reaktion unmittelbar an. Es handelt sich hierbei um einen exozytotischer Prozess, der essentiell für die Penetration der Zona pellucida und die Bindung an die weiblichen Eizelle ist (BARROS et al., 1967; LANGE et al., 1992). Es kommt zum Verschmelzen der äußeren akrosomalen Membran (outer acrosomal membrane, OAM) mit der darüber lokalisierten Plasmamembran (NAGAE et al., 1986; YUDIN et al., 1988).

Die Akrosomreaktion kann in-vivo nur an kapazitierten Spermatozoen ablaufen.

Elektronenmikroskopisch lassen sich fünf beziehungsweise sechs morphologische, zeitlich aufeinanderfolgende Schritte erkennen (Nagae et al., 1986; Stock und Fraser, 1987) (siehe Abbildung 2.4). In Zeichnung A ist das intakte morphologisch unauffällige Akrosom als Ausgangspunkt dargestellt. Es kommt zunächst zu einer Schwellung der akrosomalen Matrix; die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran sind intakt (B). Danach sind innerhalb der akrosomalen Membran viele Vesikel zu beobachten und die Plasmamembran und die äußere Membran kräuseln sich (C). Zeichnung D zeigt die nun erfolgte Verschmelzung der Plasmamembran mit der äußeren Membran, wobei die akrosomale Matrix weitgehend freigesetzt wird. Im letzten Schritt (E/F) fehlen die Plasmamembran, die äußere akrosomale Membran und die akrosomale Matrix, so dass die innere akrosomale Membran exponiert wird. Auf ihr verbleiben Akrosin- und Proakrosinmoleküle, die später eine Schlüsselrolle bei der Bindung an die Zona pellucida der Eizelle und die Lyse derselben spielen (URCH et al., 1985). Das Äquatoralsegment bleibt erhalten und hier findet nach erfolgreicher Akrosomenreaktion später die Fusion mit der Plasmamembran der Eizelle statt. Nur korrekt akrosomal reagierte Spermatozoen sind in der Lage mit der Eizelle zu verschmelzen (YANAGIMACHI, 1994).

Abb. 2.4 Schematischer Verlauf der akrosomalen Reaktion bei menschlichen Spermatozoen
[aus Nagae et al., 1986]



2.5.3 Induktion der akrosomalen Reaktion in vivo und in vitro

Die Akrosomenreaktion kann durch physiologische Induktoren in-vivo und durch nicht-physiologische Induktoren in-vitro ausgelöst werden.

Zu den natürlichen Induktoren, die bislang beschrieben wurden gehören die folgenden Substanzen: Cumulus oophorus (TESARIK 1985), Glykoproteine der Zona (BENOFF et al., 1997), hydrolytische Enzyme, vor allem Proteasen (VAN DER VEN et al., 1985; DeJONGE et al., 1989), Glykosaminoglykane, wie unter anderem Heparin (DELGADO et al., 1988), biogene Amine (MEIZEL und WORKING, 1980), Serumalbumin (COHEN et al., 1982), Progesteron (BLACKMORE et al., 1990; DeJONGE et al., 1993; OEHNINGER et al., 1994), Follikularflüssigkeit (YAO et al., 2000), Arachidonsäuremetabolite sowie schwefelhaltige β -Aminosäuren (MEIZEL, 1985).

Experimentell kann mit dem auch in dieser Studie verwendeten Calcium- Ionophore A23187 Calcium membrangängig gemacht und dadurch die Akrosomenreaktion in-vitro induziert

werden (TALBOT et al., 1976 und 1980, JANIL und WHITE, 1981; TESSARIK, 1985). Die durch A23187 induzierte akrosomale Reaktion unterscheidet sich morphologisch nicht von der durch physiologische Stimuli induzierten akrosomalen Reaktion (PETERSON et al., 1978; RUSSELL et al., 1979).

Ebenso können zur Induktion der Akrosomenreaktion in-vitro auch Phosphodiesterase-Inhibitoren, Analoga des cAMP, sowie Stimulatoren der Adenylatzyklase, Stimulatoren der Proteinkinase C und Progesteron eingesetzt werden (OSMANN et al., 1989; DeJONGE et al., 1991a und 1991b; MEIZEL, 1995). Auch Ethanol und Lysophosphatidylcholin lösen eine akrosomale Reaktion aus (MEIZEL, 1984).

Ein physikalischer Stimulus für die Akrosomenreaktion sind niedrige Temperaturen, die sogenannte Kälteinduktion (SANCHEZ und SCHILL, 1991a und 1991b).

2.5.4 Spontane Akrosomenreaktion

Bei in-vitro Untersuchungen humaner ejakulierter Spermatozoen konnte gezeigt werden, dass ein gewisser Anteil Spermatozoen auch ohne Kontakt mit physiologischen und artifiziellen Induktoren akrosomal reagieren (YANAGIMACHI, 1994). Diese Reaktion der Spermatozoen in einem Kapazitationsmedium ohne Stimulanzen wird als spontane akrosomale Reaktion bezeichnet und ist unter anderem abhängig vom Kulturmedium, der Aufbereitung der Ejakulate und der Inkubationsdauer (ESTEVEZ et al., 1998; GREEN et al., 1999). Es kommt wie auch bei der Zona-pellucida-induzierten akrosomalen Reaktion zu einem Verlust der Kopfkappe. Diese zu früh akrosomal reagierten Spermatozoen sind nicht mehr in der Lage an die Zona pellucida zu binden und die Eizelle zu befruchten (KOPF und GERTON, 1991). Somit wirkt sich ein hoher Anteil spontan akrosomal reagierter Spermatozoen negativ auf die Fertilität aus (CUMMINS et al., 1991) und es sollte im Hinblick darauf ein möglichst großer Anteil erst bei adäquatem Stimulus entsprechend reagieren (TESARIK, 1989).

2.5.5 Bedeutung der Akrosomenreaktion

Bei der Bedeutung der Akrosomenreaktion für die männliche Fertilität muss zwischen induzierbarer und spontaner akrosomaler Reaktion unterschieden werden. Die induzierbare Akrosomenreaktion ist definiert als Differenz zwischen der spontanen akrosomalen Reaktion und der induzierten akrosomalen Reaktion.

Die spontane Akrosomenreaktion scheint alleine keine klare Vorraussagekraft für die Befruchtungsfähigkeit humaner Spermatozoen zu haben lautete das Resumée verschiedener Studien (BYRD und WOLF, 1986; STOCK &FRASER, 1987; AITKEN, 1990; FENICHEL, 1995). Dagegen korreliert die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion deutlich mit der Fertilität. Es konnten signifikante Unterschiede im Akrosomenstatus zwischen Ejakulaten fertiler und subfertiler Patienten gefunden werden (HENKEL et al., 1992). CUMMINS et al. (1991) und PILIKIAN et al. (1992) zeigten eine reduzierte Ionophor-induzierte Akrosomenreaktion bei infertilen Patienten. Ebenso beschrieb HENKEL et al. (1993) bei Patienten mit pathologisch erniedrigter Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion reduzierte Fertilisationsraten in-vitro. Auch die durch Kälte und Progesteron induzierte Akrosomenreaktion hat Vorraussagekraft für die Fertilität (HENKEL et al., 1992; OEHNINGER et al., 1994).

2.6 Apoptose

Es können zwei Formen des Zelltods unterschieden werden: Apoptose und Nekrose.

Der Vorgang der Apoptose, als kontrollierter physiologischer Zelltod, geht einher mit einer Schrumpfung der Zelle, Kondensierung des Zellkerns und Abschnürung der Zellmembran. Danach wandelt sich die Zelle komplett in apoptotische Fragmente um, die von benachbarten Zellen phagozytiert werden. Eine Entzündungsreaktion bleibt immer aus (WYLLIE et al., 1980).

Im Unterschied dazu kommt es bei der Nekrose, dem Zelluntergang, primär zur Schwellung der Zelle, dann zum Aufreißen der Plasmamembran und die Freisetzung des Zytoplasmas schließt sich an. Die Folge ist eine lokale Entzündungsreaktion (MARTELLI et al., 2001).

Die Apoptose unterliegt einer komplexen Regulation auf molekularer Ebene, die der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase dient und bei der Caspasen, zytosolische Proteasen mit Aspartatspezifität, die zentrale Rolle bei der apoptotischen Signaltransduktion spielen (PAASCH et al., 2005).

Die Induktion der Apoptose kann über den intrinsischen, oder mitochondrialen, und über den extrinsischen, oder Todesrezeptor-, Signalweg erfolgen. Der intrinsische Signalweg kann durch extrazelluläre Signale oder intrazelluläre Ereignisse, wie beispielsweise DNS-Schädigung durch UV- Bestrahlung, oxidativen Stress oder Protein- und Lipidmodifikationen ausgelöst werden. (WHANG et al., 2003). Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Vermittlung und Ausbreitung der Todessignale (KROEMER et al., 1998; GREEN et al., 1998; JOZA et al., 2001; DESAGHER et al., 2000).

Beim extrinsischen Signalweg wird durch Bindung eines Liganden am Todesrezeptor ein membranständiger Signalkomplex gebildet, der die komplexe Caspasen- Kaskade aktiviert, die maßgeblich den Vorgang der Apoptose vermittelt und reguliert (DENECKER et al., 2001; RENEHAN et al., 2001; SCHULZE et al., 1998; ASHKENAZI et al., 1998).

2.6.1 Bedeutung der Apoptose

Der „programmierte“ Zelltod wird bei Bedarf im Sinne einer Protektion ausgelöst. Beschädigte oder funktionslose Zellen können auf diese Weise eliminiert werden. Besondere Bedeutung kommt der Apoptose bei der Selektion von Keimzellen zu (PEREZ et al., 1999; LAWEN, 2003). Eine große Zahl der Keimzellen werden bereits vor Erreichen des finalen Reifegrades apoptotisch, was dazu beiträgt, dass hierdurch unter anderem genetisch veränderte Keimzellen entfernt werden, bevor eine Übertragung auf Nachkommen möglich wäre (BLANCO-RODRIGUEZ, 1998).

Die Bedeutung des programmierten Zelltods der reifen potentiell befruchtungsfähigen Spermatozoen ist noch nicht endgültig geklärt, auch aufgrund der Schwierigkeit den Apoptoseprozess in-vitro zu studieren. Im Gegensatz zu den Vorstufen der reifen Spermatozoen für die es allgemein anerkannte Hypothesen und Erkenntnisse gibt, fehlen hier ähnlich fundierte Erkenntnisse (OOSTERHUIS, 2000).

2.6.2 Methoden der Apoptosedetektion

Es gibt verschiedene methodische Ansätze die Apoptose von ejakulierten Spermatozoen nachzuweisen.

Bei dem auch in dieser Studie angewendeten Annexin V-Test macht man sich den Umstand zu Nutze, dass schon ab der frühen Apoptosephase Phosphatidylserin (PS) von der Zelle exprimiert wird, unabhängig vom Zelltypus und der Art der Apoptoseauslösung (MARTIN et al., 1995; VERMES et al., 1995). In der vitalen Zelle ist Phosphatidylserin ein in der zytosolseitigen Membranschicht lokalisiertes Phospholipid, dass in der frühen Exekutionsphase der Apoptose, im Anschluss an die durch Caspasen verursachte proteolytische Kaskade, an die äußere Membranschicht transportiert und hier der Aussenwelt zugänglich wird (VAN ENGELAND et al., 1998). Bei Annexin V handelt es sich um ein calciumabhängiges phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserinen (BARROSO et al., 2006). Um eine flowzytometrische oder fluoreszenzmikroskopische Analyse zu ermöglichen können die Annexin V- Moleküle mit Farbstoffen wie beispielsweise Fluorescein Isothiocyanit (FITC) markiert werden (VAN ENGELAND et al., 1998). Das Annexin V- Molekül kann die Zellmembran vitaler Zellen nicht penetrieren. Ist jedoch die Zellintegrität, wie bei der Nekrose, aufgehoben, wird auch die innere Membranschicht dem Annexin V zugänglich. Um zwischen vitalen, avitalen und apoptotischen Zellen unterscheiden zu können ist es notwendig einen zweiten Farbstoff mit dem konjugierten Annexin V zu kombinieren. Das in dieser Studie verwendete CFDA kann intakte Zellmembranen penetrieren und so vitale Spermatozoen detektieren. Im Falle einer gleichzeitigen Annexin- Färbung können so in Apoptose befindliche Zellen detektiert werden (PRODUCT INFORMATION, Roche Applied Science; MARTI et al., 2006).

Eine andere Methode der Apoptosedetektion ist der Nachweis der während des programmierten Zelltods entstandenen DNA- Strangbrüche mit dem TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling-) Test (PAASCH et al., 2007). Dabei hängt das Enzym Terminale Transferase modifizierte Nukleotide an 3'-Enden der Bruchstellen (nicks) oder Enden (ends) der DNA- Doppelstrangs. Die Nukleotide (dUTP) sind mit einem Fluorochrom, hier beispielsweise FITC, markiert und ermöglichen so die Untersuchung am Fluoreszenzlichtmikroskop (INSTRUCTION MANUAL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH; LEBERL et al., 2008).

Die DNA- Fragmentierung wird eher der späten Phase der Apoptose zugeordnet (SHEN et al., 2002). Sie wird als wichtiger prognostischer Faktor für den Erfolg assistierter Reproduktion diskutiert (SUN et al., 1997; EVENSON et al., 2002; BENCHAIB et al., 2003 und 2007). Die TUNEL- Technik wurde in vielen Arbeiten als zuverlässiger Apoptose -Marker angewendet und auch mit anderen Methoden der Apoptosedetektion, wie dem Annexin V-Test (SHEN et al., 2002) oder Kriterien der Spermienqualität, -morphologie oder -motilität verglichen (GANDINI et al., 2000; BARROSO et al., 2000). In den Spermatozoenproben infertiler Männer wurde in mehreren Studien eine höhergradige DNA- Fragmentierung festgestellt (BACETTI et al., 1996; HOST et al., 1999; SHEN et al., 2002).

2.7 Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen

Die Kryokonservierung von Spermatozoen ist eine Methode mit langer Tradition, die es möglich macht, Spermien über einen fast unbegrenzten Zeitraum zu konservieren, um sie zu gegebener Zeit Methoden der assistierten Reproduktion zuführen zu können (LUDWIG et al., 1998).

Aber die beim Einfrieren und Auftauen auftretenden Temperaturänderungen haben zum Teil großen Einfluss auf einzelne Bestandteile des Spermatozoons. Es kann zu Änderungen der Spermienstruktur und -funktion kommen (WARD, 2010). Häufig beschrieben worden ist eine Reduktion von Motilität und Vitalität (ALVAREZ et al., 1992 und 1993; CENTOLA et al., 1992; CRITSER et al., 1987 und 1988; YOSHIBA et al., 1990; NALLELLA et al., 2004), sowie Veränderungen der Morphologie und der Chromatinintegrität (HAMMADEH et al., 2002).

Wesentlicher Faktoren, die die zu erwartende Kryoschädigung und somit die Überlebensrate von Spermatozoen mitbestimmen sind die Wahl des Friermediums, der Einfrier-/Auftaumethode und die Lagerungsdauer (FARRANT, 1980).

Insbesondere die Spermatozoen von Patienten mit hochgradig eingeschränkter Spermaqualität überstehen den Gefrier-/Auftauvorgang nur mit deutlich höheren Verlusten bezüglich des prozentualen Anteils motiler Spermatozoen und der absoluten Überlebensrate (SAWETAWAN et al., 1993; SCHILL et al., 1986).

Auch eine Verminderung des Anteils von Spermatozoen mit intaktem Akrosom sowie eine gleichzeitig verminderter Akrosin-Aktivität nach Kryokonservierung beeinträchtigt die

Fertilisierungsfähigkeit aufgetauter Spermatozoen (MACK et al., 1987; CROSS et al., 1991; Mc LAUGHLIN et al., 1992).

Durch Zugabe eines Kryoprotektivums soll die Abnahme von Motilität und Vitalität nach Kryokonservierung so gering wie möglich gehalten werden (KADEN et al., 1983). Als eine Hauptursache für die bei der Kryokonservierung auftretende Spermenschädigung wird nämlich die Eiskristallbildung angesehen (HAMMADEH et al., 2000). Bei den Kryoprotektiva Glycerin und DMSO handelt es sich um hydrophile Nicht-Elektrolyte mit stark dehydrierender Wirkung (FARRANT, 1965), die den Gefrierpunkt erniedrigen und so die spontane intrazelluläre Kristallbildung erst bei niedrigeren Temperaturen eintreten lässt (LEIBO, 1977; LEIBO und MAZUR, 1978; MAZUR, 1963). Dadurch erhält die Zelle mehr Zeit für die Dehydrierung beim Einfrieren (MULDREW et al., 1994).

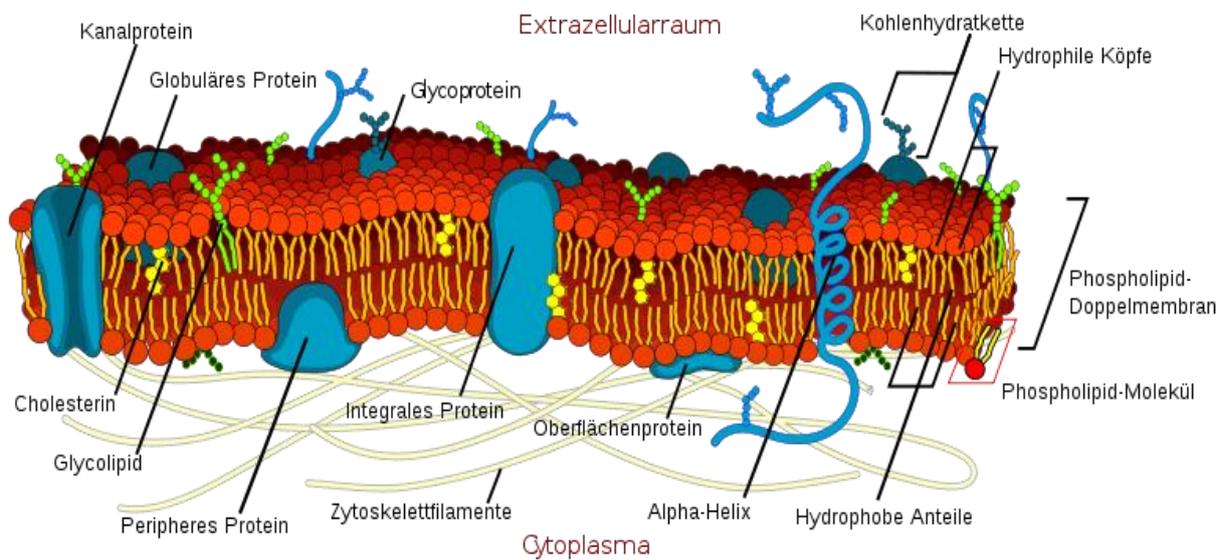
2.7.1 Einfluss auf die Spermienmembran

Die Spermienmembran besteht vorwiegend aus Lipiden und Proteinen. Phosphoglycerolipide, Glykoglycerolipide und Cholesterol sind die vorwiegend vorkommenden Lipide, die einen polaren Kopfteil, der hydrophil („wasserliebend“) und fettabstoßend ist, und einen apolaren Schwanzteil der dagegen hydrophob (wasserabweisend) und lipophil („fettliebend“) ist besitzen.

Bei den vielen unterschiedlichen Proteine kann man periphere und integrale Proteine unterscheiden. Die peripheren Proteine sind elektrostatisch an den polaren Kopfteil der Lipide gebunden und die integralen Proteine reichen mit einem hydrophoben Molekülabschnitt in das hydrophobe Zentrum der Membran hinein. Des Weiteren gibt es so genannte Transmembranproteine, die auf der Innen- und Außenseite der Membran sichtbar werden. Vorkommende Tunnelproteine bilden im Inneren einen feinen Kanal, der Ein- bzw. Austritt kleiner Moleküle und von Wasser ermöglicht.

Alle Bestandteile der Zellmembran sind frei beweglich und können sich gegeneinander verschieben. ("fluid mosaic model" von SINGER und NICHOLSON, 1972 dargestellt)

Abb.2.5 Flüssig-Mosaik-Modell



[Quelle: www.wikipedia.org]

Nach physikalischen Gesetzen nimmt die Beweglichkeit der Moleküle mit steigender Temperatur zu. So ist bei niedrigen Temperaturen die Membran dünner und gelartig und bei hohen Temperaturen dicker und solartig.

Die Membranfunktion wird durch die Wechselwirkungen der verschiedenen Bestandteile innerhalb der Membran bestimmt und so kann eine Störung der Membranmorphologie, z. B. durch den Kryoprozess, Funktionsstörungen nach sich ziehen. (ALOIA et al, 1988.).

2.7.2 Einfluss auf das Akrosom

Die akrosomale Matrix der Spermatozoen kann ebenfalls durch die physikalischen und chemischen Einflüsse der Kryokonservierung geschädigt werden. Dies hat zur Folge, dass die komplexen Vorgänge der akrosomalen Reaktion, die in Kap. 2.4 näher beschrieben sind, gestört werden und somit der Erfolg bei der Befruchtung der Eizelle ausbleibt (GOODPASTURE et al., 1981; MAHADEVAN und TROUNSON, 1984).

2.7.3 Einfluss auf die DNA im Spermienkopf

Die DNA liegt in kondensierter und stabilisierter Form im Inneren des Spermienkopfes vor. So wird der sichere Transport des männlichen Genoms auf dem Weg zur Befruchtung der Eizelle gewährleistet und es kommt erst nach dem Eindringen in die Eizelle zur Dekondensation der DNA. Da der Kondensationsprozess die Chromatinmasse und damit ihre Oberfläche deutlich reduziert, ist sie enzymatischen, chemischen und physikalischen Einflüssen gegenüber weitgehend geschützt. Wie in Kap. 2.7 beschrieben handelt es sich bei der Verpackung des Chromatins um einen sehr komplexen Prozeß, der bei Spermatozoen subfertiler Männer ungleich häufiger fehlerhaft bzw. gestört ist (FORESTA et al., 1992).

Auch abnormes Chromatin kann zum Misserfolg bei der Befruchtung führen (IBRAHIM et al., 1990). und ist somit ein wichtiges Kriterium, welches bei der Beurteilung der Schädigung durch die Kryokonservierung eine Rolle spielt.

So sind Spermatozoen subfertiler Männer, welche schon vor dem Kryokonservieren gehäuft Abnormalitäten im Bereich der Chromatinkondensation bzw. des Chromatins selbst zeigen, durch die physikalischen Vorgänge während des Kühlprozesses deutlich anfälliger für Schädigungen während des Einfrierens und Auftauens. Dies können beispielsweise die intrazelluläre Eiskristallbildung oder auch die osmotischen Schwankungen sein, die sich negativ auf das Chromatin auswirken (Hammadeh et al., 1997 und 1999).

2.8 Klassische Samenanalyse

Für das normale Spermogramm das auch im Rahmen dieser Studie von jeder Probe angefertigt wurde hat die World Health Organization (WHO) folgende Referenzwerte festgelegt (WHO 1993):

Volumen: $\geq 2\text{ml}$

pH: $\geq 7,2-8,0$

Spermatozoenkonzentration: $\geq 20\text{ Mio./ml}$

Gesamt-Spermatozoen-Zahl: $\geq 40\text{ Mio/ Ejakulat}$

Motilität: $\geq 50\%$ WHO-Kategorie *a* und *b* oder $\geq 25\%$ WHO-Kategorie *a*

a = schnelle progressive Beweglichkeit

b = langsame progressive Beweglichkeit

c = keine progressive Beweglichkeit (stationäre Beweglichkeit)

d = Immotilität

Morphologie: $\geq 30\%$ mit normaler Form

($\geq 14\%$ nach *strict criteria*)

Leukozythen: $< 1\text{ Mio./ml}$

MAR-Test: $\leq 10\%$ mit adhärennten Partikeln

Eosin-Test: $\geq 75\%$ vitale Spermien (ohne Färbung)

HOS-Test: $>60\%$ geschwollene Spermischwänze

Desweiteren wurde, um die Abweichungen von normwertigen Ejakulatparametern zu beschreiben, folgende Nomenklatur eingeführt (KÖHN et al., 2002):

Normozoospermie	- Normale Ejakulatparameter
Oligozoospermie	- Reduzierte Spermienkonzentration
Asthenozoospermie	- Reduzierte Motilität
Teratozoospermie	- Reduzierter Anteil von Spermien mit normaler Morphologie
Oligoasthenoteratozoospermie (OHT-Syndrom)	- Kombination aus Oligo-, Astheno- und Teratozoospermie
Azoospermie	- Keine Spermazoen im Ejakulat
Aspermie	- Kein Ejakulat

2.9 Eigene Fragestellung

Ziel dieser Studie war die vergleichende Untersuchung der Akrosomenreaktion, des Apoptoseverhaltens und der Chromatinkondensation fertiler und subfertiler Spermatozoenproben vor und nach Kryokonservierung. Es wurde einmal die spontane akrosomale Reaktion und zum anderen die durch Ionophore A2318 induzierte akrosomale Reaktion untersucht und mit der ConcanavalinA-Lectin- Färbung nachgewiesen. Die Apoptosebeurteilung wurde mit zwei verschiedenen Methoden, der Tunel- Färbung und der Annexin V/ CFDA- Färbung, durchgeführt. Ebenfalls wurden die Parameter der Motilität, Morphologie und Vitalität (Eosin- und HOS- Test) der fertilen und subfertilen Proben miteinander vor und nach Kryokonservierung verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Probengewinnung

Für diese Studie wurden im Zeitraum von März 2007 bis August 2008 insgesamt 39 Samenproben untersucht, die zum Teil von Patienten der Kinderwunschprechstunde der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsklinik des Saarlandes stammen. Gemäß den WHO-Richtlinien der Normwerte für die Spermienkonzentration und –motilität wurden 20 Proben, die die entsprechenden Kriterien erfüllten, zu einer subfertilen Gruppe zusammengefasst. Die anderen 19 Proben bildeten die fertile Vergleichsgruppe.

Die Spermaproben wurden nach dreitägiger sexueller Karenz durch Masturbation in einen sterilen Kunststoffbecher gewonnen in einem dafür vorgesehenen Raum des Labors der Universitätsfrauenklinik. Direkt nach Abgabe der Probe wurde diese auf eine Wärmeplatte gestellt, um eine Reduktion der Motilität durch Wärmeverlust zu vermeiden.

3.2 Kryokonservierung der Spermatozoen

Nach Liquefizierung des Spermas auf der Wärmeplatte wurde etwa die Hälfte der Probe in ein steriles Konusröhrchen (PP-Test tubes, Cellstar, Greiner, Bio-One, GmbH, Frickenhausen) überführt, um es dort 1:1 mit dem Kryoprotektionsmedium, Human Sperm Preservation Medium (HPSM) (Rezeptur siehe Kap.3.11) zu vermischen. Das mit der Frierlösung versetzte Sperma wurde nun in kleine Plastikröhrchen mit ca. 0,25µl Fassungsvermögen, so genannte straws, gefüllt, die an beiden Enden mit kleinen Metallkugeln verschlossen wurden. Die gefüllten straws einer Probe wurden in eine Klarsichtkassette (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) gefüllt, diese mit der entsprechenden Probennummer beschriftet und dann zum Einfrieren in einen Metallkorb platziert. Dieser Metallkorb mit der Probe wird in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter über dem Flüssigkeitsspiegel befestigt, so dass die Probe vollständig von Stickstoffdampf umschlossen wird. Nach 45 Minuten wurde die Klarsichtkassette mit der Spermaprobe aus dem Stickstoffdampf genommen und in die endgültige Aufbewahrungstonne mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die straws einer Probe zunächst bei Zimmertemperatur, dann auf der Wärmeplatte bei 37° gelagert. Der Inhalt aller straws einer Probe wurde in ein steriles Konusröhrchen zur Weiterverarbeitung überführt.

3.3 Fertigung von Ausstrichpräparaten

In dieser Studie wurden für die unterschiedlichen Färbungen folgende Ausstrichpräparate von jeder Probe angefertigt.

Vor dem Einfrieren:

- 4 Ausstriche nativ
- 4 Ausstriche nach swim-up
- 1 Ausstrich nach Ionophore
- 1 Ausstrich nach Annexin/CFDA

Nach Kryokonservierung und Auftauen:

- 4 Ausstriche nativ
- 4 Ausstriche nach swim-up
- 1 Ausstrich nach Ionophore
- 1 Ausstrich nach Annexin/CFDA

Um ein Ausstrichpräparat zu erhalten wird von der jeweiligen Probe ein Tropfen mit der Pipette auf einen Objektträger aufgebracht und mit der Kante eines zweiten Objektträgers gleichmäßig verteilt. Anschließend werden die Ausstriche für ungefähr 10 Minuten luftgetrocknet und mit Fixationspray (Merckofix®, Merck, Darmstadt, Germany) fixiert.

3.4 Spermienaufbereitung

Im Rahmen der konventionellen Spermaanlyse und für die Durchführung der zusätzlichen Färbungen wurde jede Spermaprobe aufbereitet, für diese Studie nach der swim-up Methode, die nachfolgend näher beschrieben wird.

3.4.1 Swim-up-Methode

Bei dieser Methode wird der Umstand ausgenutzt, dass motile Spermien in der Lage sind nach Zentrifugation aus dem Pellet an die Oberfläche zu schwimmen.

Das verflüssigte Nativejakulat wird dazu mit Kulturmedium (HAM'S F-10 + Humanalbumin, Herstellung siehe Kap.3.11) vermischt und bei 500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird verworfen und das verbliebene Pellet wird erneut mit 1 ml Kulturmedium vorsichtig überschichtet. Das Konusröhrchen mit dem überschichteten Spermienpellet wird nun in leicht schräger Position für 45 Minuten bei 37 °C und 6% CO² inkubiert. In dieser Zeit lösen sich die motilen Spermien aus dem Pellet und schwimmen in Richtung Oberfläche. Sie können danach mit dem Überstand vorsichtig abgehoben werden, der nun einen größeren Anteil motiler Spermatozoen enthält.

3.5 Konventionelle Spermaanlyse

Bei der konventionellen Analyse des Ejakulates werden die einzelnen Parameter in einem standardisierten Datenerhebungsbogen, dem sogenannten Spermogramm festgehalten (siehe Kap.10 Anhang). Es werden hierbei das Volumen der Probe, die Viskosität, die Spermatozoendichte und –motilität sowie die Ergebnisse des Eosin-, HOS- und MAR-Test dokumentiert. Ein zweites Mal werden die Spermindichte, die Motilität und das Ergebnis des HOS-Test nach Aufbereitung (swim-up) notiert.

3.5.1 Volumenbestimmung

Nach 20 minütiger Liquefizierung auf einer Wärmeplatte (37°) wird zunächst die Viskosität beurteilt und die Probe dann in ein steriles graduiertes Konusröhrchen (PP-Test tubes Cellstar, Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) gefüllt. Anhand der Skalierung wird das Volumen abgelesen, das normalerweise ≥ 2 ml beträgt (WHO, 1999).

3.5.2 Bestimmung der Spermatozoendichte

Zur Beurteilung der Spermatozoendichte werden 5 μ l des liquefizierten Nativspermas in die Vertiefung der Zählkammer (MAKLER) pipettiert und mit dem dazugehörigen Deckglas verschlossen. Im Boden des Deckglases befindet sich eine Einteilung in hundert Quadranten, von denen drei mal zehn ausgezählt werden bei 40facher Vergrößerung. Der Mittelwert entspricht der Spermatozoendichte in Millionen pro Milliliter. Als normal gilt eine Spermatozoendichte von ≥ 20 Mio./ml vor Aufbereitung (WHO, 1999).

3.5.3 Bestimmung der Spermatozoenmotilität

Im gleichen Schritt wird in der Maklerkammer die Spermienmotilität beurteilt. Dabei unterscheidet man zwischen progressiver und globaler Motilität sowie stationärer Beweglichkeit und Immotilität. Der entsprechende Anteil wird in % notiert, wobei der Anteil beweglicher Spermien, also progressive und globale Motilität zusammen, mindestens 50% betragen sollte (WHO, 1999).

3.5.4 Bestimmung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde ein spezielles Indikatorpapier (Testbereich pH 6,5-10,0; Merck, Darmstadt) verwendet. Das liquefizierte Ejakulat wird auf den Testbereich des Indikatorstreifens aufgetropft und nach einer gleichmäßigen Verfärbung des Indikatorpapiers kann nach ca. 30 Sekunden das entsprechende Ergebnis abgelesen werden. Der Normbereich des pH-Wertes liegt zwischen 7,2 und 8,0 (WHO, 1999).

3.5.5 Cyturtest

Dieser Test weist die Esteraseaktivität von Granulozyten nach. Der Indoxylester des Teststreifens wird durch die Esterasen zu Indoxyl gespalten, welches mit einem Diazoniumsalz zu einem violetten Farbstoff reagiert. So werden semiquantitativ intakte und bereits lysierte Leukozyten erfasst. Eine kleine Menge des Ejakulates wird auf den Teststreifen (Combur-Test LN, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgebracht und das Ergebnis kann nach ca. 120 Sekunden abgelesen werden. Es gibt 3 Abstufungen der Farbreaktion, welche mit einer Referenztabelle auf der Packung verglichen werden. Normalerweise wird ein negatives Ergebnis, also das Fehlen von Leukozyten in der Probe, erwartet (WHO, 1999).

3.5.6 MAR-Test (Mixed Antiglobulin Reaction Test)

Durch den Martest (SpermMar IgG Test, FertilPro, Beernem, Belgien) werden auf der Oberfläche der Spermien gebundene IgG-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von IgG-Antikörpern ist für die Routineuntersuchung ausreichend, da IgA-Antikörper fast nie ohne begleitende IgG-Antikörper vorkommen. Das Testkit wird im Kühlschrank bei zwei bis acht Grad Celsius aufbewahrt und besteht aus folgenden zwei Reagenzien:

- SpermMar Latex Partikel: Es handelt sich hierbei um eine Suspension Polystyren-Latex-Teilchen mit einem Durchmesser von ca. zwei Mikrometern, die mit humanem IgG beschichtet sind.
- SpermMar Antiserum: Dies ist ein monospezifisches Antiserum, welches sich gegen das Fc-Fragment von humanem IgG richtet.

Zur Durchführung des Tests werden 5µl des liquefizierten Ejakulates auf einen Objektträgeraufgebracht und mit 5µl der Latex-Suspension vermischt. Danach werden 5µl des IgG-Antiserums hinzugefügt und alles mit einem Deckglas abgedeckt. Nach ca. 5 Minuten kann der Test unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden: Spermatozoen ohne Antikörper bewegen sich frei zwischen den Latexpartikeln. Wenn sich dagegen Antikörper auf den Spermatozoen befinden führt dies zu einer Agglutination mit den Latexpartikeln. Eine Anhaftung von weniger als 10% der Spermatozoen gilt als normal und wird im Spermogramm als negatives Ergebnis dokumentiert.

3.5.7 Vitalitätstests

3.5.7.1 Eosintest

Mit diesem Test lassen sich tote von vitalen Spermien differenzieren. Der Hintergrund ist, dass tote Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die normalerweise als chemische Barriere fungiert, Eosinfarbstoff aufnehmen und so im Gegensatz zu vitalen Spermien selektiv anfärbbar sind.

Durchführung:

5µl liquefiziertes Nativsperma wird auf einen Objektträger pipettiert, mit der gleichen Menge einer Eosin-Lösung (Apotheke der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg) vermischt und danach mit einem Deckglas bedeckt.

Auswertung:

Unter dem Lichtmikroskop werden 100 Spermien ausgezählt, wobei die rot gefärbten Spermien dem Anteil der toten und die ungefärbten Spermien dem Anteil der vitalen Spermien entsprechen. Als normal wird ein Vorhandensein von wenigstens 50% vitaler Spermien angesehen (WHO, 1999). Mit dieser Methode können tote Spermien von solchen unterschieden werden, die vital aber unbeweglich sind.

3.5.7.2 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)

Der HOS-Test dient zur Bestimmung der Integrität der Plasmamembran im Bereich des Spermatozoenschwanzes. Das Funktionsprinzip dieses Tests beruht auf der Tatsache, dass die intakte Spermienmembran semipermeabel ist und es so unter hypoosmotischen Bedingungen zu einem Hydrops der Spermienzelle kommt, was unter dem Lichtmikroskop an einer Änderung der Schwanzform zu erkennen ist (vgl. Abb. 3.1). Ist die Membranintegrität durch Schädigung verloren gegangen, kommt es trotz Konzentrationsgradient zu keinem Wassereinstrom, eine Schwellung des Schwanzes bleibt aus (HOS-negativ)

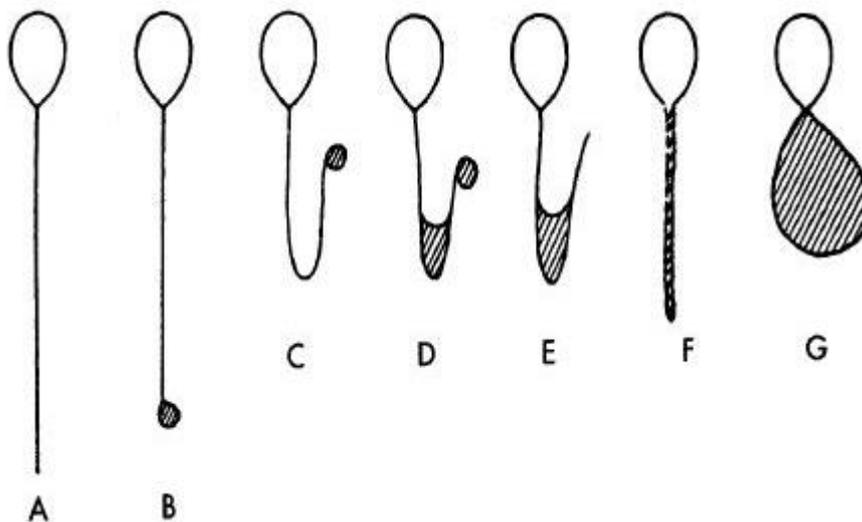
Durchführung:

Dieser Test wurde vor und nach Aufbereitung des Ejakulates durchgeführt. Zunächst wird ein Milliliter der eingefrorenen Schwelllösung (Rezeptur siehe Kap. 3.11) auf 37° erwärmt und dann 100 µl des Ejakulates hinzugefügt. Auf der Wärmeplatte wird diese Mischung bei 37° zwischen 30 und maximal 90 Minuten inkubiert.

Auswertung:

10 µl der inkubierten Lösung werden entnommen und zur Beurteilung auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Eindecken des Objektträgers mit einem Deckglas kann das Präparat nun unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilt werden. Es werden 100 Spermatozoen ausgezählt und es entspricht dabei die Anzahl von Spermien mit geschwollenen Schwänzen der Anzahl derer mit intakter Membran, also vitaler Spermien. Der HOS-Test wird als normal beurteilt, wenn mehr als 60% der Spermischwänze angeschwollen sind.

Abb. 3.1 HOS-Test



Mögliche morphologische Veränderungen, die durch den Einfluss der hypoosmotischen Lösung auftreten können. Die schraffierten Bereiche entsprechen den Schwellungen des Spermatozoenschwanzes. Das links dargestellte Spermium zeigt keine Schwellung, es ist somit vom Verlust der Membranintegrität auszugehen.

[Quelle: Handbuch für MTA-Schüler, Universitätsfrauenklinik des Saarlandes]

3.6 Spermienmorphologie

3.6.1 Färbung nach Papanicolaou (PAP)

Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurde eine für Spermien modifizierte Färbung nach Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942; WHO, 1993) verwendet.

Von jeder Probe wurden dafür sowohl Ausstriche nativ und nach swim-up als auch nach Kryokonservierung nativ und nach swim-up angefertigt.

Zur Durchführung der Färbung nach Papanicolaou wurde der Färbeautomat „Varistain“ 24-4 der Firma Shandon benutzt, der die einzelnen Färbeschritte automatisch nach einem vorprogrammierten Schema durchführt, welches nachstehend aufgeführt ist. Diese Automatisierung der Färbung trägt zu gleichmäßigeren Färbeergebnissen bei als das bei von Hand gefärbten Ausstrichen möglich ist.

Durchführung:

Die angefertigten Ausstriche wurden zunächst luftgetrocknet und dann fixiert mit Fixationspray (Merckofix®, Merck, Darmstadt, Germany). Danach erfolgte die Färbung im Automaten in folgenden Schritten:

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

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

Beurteilung der Morphologie:

Die nach der PAP-Methode gefärbten Objektträger wurden unter dem Lichtmikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv mit 100 –facher Vergrößerung beurteilt. Es wurden pro Objektträger 100 Spermatozoen nach ihrer Morphologie beurteilt und unter zu Hilfenahme eines standardisierten Auswertungsbogens dokumentiert.

Das Akrosom erscheint bei dieser Färbung hellblau, die postakrosomale Region dagegen dunkelblau. Eine eventuell auftretende Rotfärbung des Mittelstücks wird nur dann als abnormal gewertet, wenn dieser Bereich zugleich deutlich aufgetrieben oder deformiert erscheint. Der Spermatozoenschwanz ist violett bis dunkelblau gefärbt. Vorhandene

Zytoplasmotropfen stellen sich grün dar. Alle Umrisse des Spermiums sollten gut erkennbar sein.

Die morphologische Beurteilung der einzelnen Spermienbestandteile erfolgt nach WHO Kriterien bzw. nach Strict Criteria.

Kopf

Der Kopf sollte im Normalfall oval geformt sein mit deutlicher Abgrenzung. Spermien mit abnormen Formen und/oder Größen des Kopfes wie große, kleine, zigarrenförmige, birnenförmige, amorphe Köpfe sowie Doppelköpfe, fehlende Köpfe und solche mit nicht gefärbten Vakuolen, die > 20% der Kopffläche einnehmen wurden als pathologisch beurteilt. Das Akrosom muss deutlich abgrenzbar sichtbar sein und sollte circa 40-79% der Kopfoberfläche einnehmen.

Hals und Mittelstück

Auch dieser Bereich sollte klar abgrenzbar und regelmäßig geformt sein sowie axial anhaften. Es sollten also keine Knicke oder Brüche in diesem Bereich auftreten und der Übergang von Kopf zu Hals sollte sich fließend darstellen. Der gesamte Bereich darf nicht aufgetrieben, abnorm dünn oder lang ausgezogen sein.

Schwanz

Der Schwanz muss anhaften, sollte klar abgrenzbar, nicht spiralisiert und gleichmäßig schmaler als das Mittelstück geformt sein. Als pathologisch gelten zu kurze, haarnadelförmige, aufgerollte Schwänze sowie Doppel- und Mehrfachschwänze. Aber auch eine unregelmäßige Breite, Bruchstellen und endständige Zytoplasmotropfen charakterisieren ein Spermium abnormal.

3.7 Chromatinkondensation

3.7.1 Chromomycin A3- Färbung

Diese Färbung macht es möglich, eine Aussage bezüglich des Chromatinkondensationszustandes einzelner Spermatozoen zu treffen.

Das von *Streptomyces griseus* gebildete Chromomycin A3 ist ein Magnesium assoziiertes Dimer, das in Abwesenheit von Protaminen an die Guanin-Cytosin-reichen DNA-Sequenzen bindet (MONACO & RASCH, 1982). Also bindet Chromomycin bevorzugt an die DNA, wenn diese dekontensiert, unreif, ist und erlaubt eine indirekte Darstellung der Chromatinkondensation, da es die protaminarme, teilweise dekontensierte DNA unreifer Spermien durch Fluoreszenz sichtbar macht (BIANCHI et al., 1993). Daher nimmt auch der Grad der Floreszenz während der Spermiogenese aufgrund der zunehmenden Protaminierung ab. Es kann so bei der Auswertung zwischen fluoreszierenden unreifen und ungefärbten, gut kondensierten Spermatozoen unterschieden werden.

Von jeder Probe wurden Ausstriche nativ und nach swim.up sowohl vor als auch nach Einfrieren gefärbt und hinsichtlich der Chromatinkondensation beurteilt.

Reagenzien:

- Fixationslösung: Mischung bestehend aus $\frac{3}{4}$ Methanol und $\frac{1}{4}$ Essigsäure.
- Färbelösung: 10mg CMA³ (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, C2659) werden in 40ml PBS gelöst und können im Kühlschrank lichtgeschützt für circa 4 Wochen aufbewahrt werden.

Durchführung:

Die Ausstrichpräparate werden zunächst in die Fixationslösung für 5 Minuten oder länger eingetaucht und danach luftgetrocknet. Die so fixierten Objektträger werden nun für 20 Minuten mit jeweils 100µl CMA³ beschichtet. Anschließend wurden sie mit PBS gespült und mit Glycerin eingedeckt.

Da es sich bei Chromomycin A3 um einen Fluoreszenzfarbstoff handelt sollten die Arbeitsschritte mit der Färbelösung unter Lichtausschluss erfolgen und die gefärbten Objektträger bis zur Auswertung im Dunkeln gelagert werden.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion. Pro Präparat wurden 100 Spermien ausgewertet und in fluoreszierend oder nicht fluoreszierend eingeteilt.

3.8 Apoptosebeurteilung

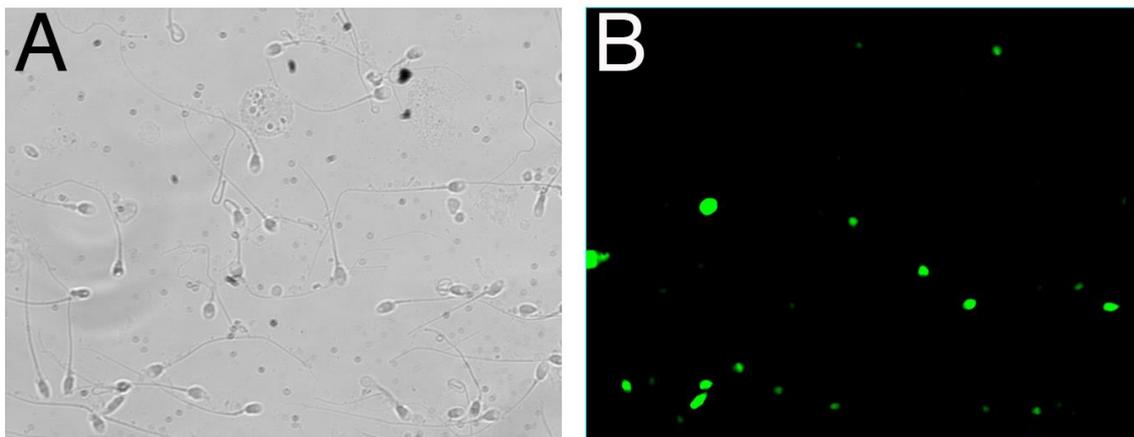
Zur Beurteilung der Apoptoseraten der Spermaproben wurden im Rahmen dieser Studie zwei verschiedene Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt.

3.8.1 TUNEL-Färbung

Mit der TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling-)-Methode können während der Apoptose entstandene DNA- Einzel- und Doppelstrangbrüche detektiert werden. Es werden dabei modifizierte, mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehene Nukleotide durch eine enzymatische Reaktion mittels TdT, an die freien 3'-OH Enden der Strangbrüche gebunden (siehe auch Abb. 3.2). Diese können dann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes dargestellt und quantifiziert werden (INSTRUCTION MANUAL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Von jeder Probe wurden Ausstriche vor und nach Einfrieren jeweils nativ und nach swim-up mit dieser Methode gefärbt.

Abb.3.2 TUNEL-Test



In Bild A Ansicht der gefärbten Spermatozoen im Lichtmikroskop, in Bild B leuchten die Gefärbten Spermatozoen grün unter dem Fluoreszenzmikroskop.

[Quelle: www.utahhealthsciences.net]

Reagenzien:

-In Situ Cell Death Detection Kit, Florescein

Cat. No. 11684795910, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

-Fixationslösung: 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4

-Permeabilisationslösung: 0,1% Triton X-100 (Sigma St.Louis, USA) in 0,1% Natriumcitrat-Lösung (Merck, Darmstadt, Germany)

-PBS-Lösung (Herstellung siehe Kap.3.11)

-Label-Solution (im Kit enthalten)

-Enzyme-Solution (im Kit enthalten)

-Tunel reaction mixture (Mischung aus Label- und Enzyme-Solution)

Durchführung:

Die mit Merckofix® fixierten Ausstriche werden zunächst in der Fixationslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Tunel reaction mixture hergestellt. Dabei ist es wichtig unter Lichtausschluss zu arbeiten wegen des Fluoreszenzfarbstoffes, der sonst vorzeitig seine Energie abgibt und es so zu schwachen Färbeergebnissen kommen kann. Das Gesamtvolumen der Enzyme-Solution (50µl) wird mit 450µl der Label-Solution gemischt und bis zum Gebrauch lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Lösung muss jedes Mal unmittelbar vor der Färbung neu angesetzt werden. Die inzwischen in der Fixationslösung inkubierten Objektträger werden in PBS gespült. Danach werden die Präparate mit Permeabilisationslösung für 2 Minuten im Kühlschrank bei 2-8 °C inkubiert und anschließend zweimal in PBS-Lösung gespült. Die Objektträger werden nun in eine feuchte Kammer gelegt, mit jeweils 50µl der Tunel reaction mixture eingedeckt und für 1 Stunde im Dunkeln in der Wärmekammer bei 37 °C inkubiert. Nach 1 Stunde werden die Deckgläser von den Objektträgern entfernt und diese dreimal in PBS-Lösung gewaschen.

Die so gefärbten Ausstriche werden mit Glycerin (Merck, Darmstadt, Germany) eingedeckt und können im Dunkeln bei -20 bis -80 °C bis zur schnellstmöglichen Auswertung gelagert werden.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes unter Verwendung eines FITC (=Fluoresceinisothiocyanat)-Filters mit einem Emissionsspektrum von 525 nm. Bei 100-facher Vergrößerung werden mit einer Öl-Immersionlinse von jeder Probe 100 Spermien ausgezählt. Es kann zwischen positiv apoptotisch, grün fluoreszierenden Spermien und negativen, nicht fluoreszierenden Spermien unterschieden werden.

3.8.2 Annexin V/ CFDA-Färbung

Bei Annexin V handelt es sich um ein calciumabhängiges phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserinen, die im frühen Stadium der Apoptose von der inneren Zellmembran auf die Zelloberfläche transferiert werden. Somit kann dieses Protein als ein sensibler Marker für die Phosphatidylserinexpression von Spermatozoen und damit als Apoptosemarker verwendet werden (PRODUCT INFORMATION, Roche Applied Science). Da aber auch nekrotische Zellen auf Grund des Verlustes der Membranintegrität Phosphatidylserine exprimieren, ist es notwendig diese von den apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Mit Hilfe von CFDA (CarboxyFluoresceinDiAcetate), welches in die Zelle eindringt und in eine grün fluoreszierende Verbindung umgewandelt wird, ist es möglich intakte Zellen zu detektieren, da dieser Vorgang nur in vitalen Zellen durch Esterasen abläuft (MARTI et al., 2006).

Bei Annexin-V-FLUOS und bei CFDA handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe, die auf Grund ihres unterschiedlichen Absorptionsspektrums (Annexin rot, CFDA grün) eine Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich machen. So ergibt sich für die Annexin/CFDA-gefärbten Spermatozoen die folgenden Möglichkeiten bezüglich ihres Färbeverhaltens: einmal grün fluoreszierend (CFDA positiv) und damit vital, rot/grün fluoreszierend (Annexin und CFDA positiv) und somit im Apoptosestadium befindlich, und schließlich noch rot fluoreszierend (Annexin positiv) und avital.

Reagenzien:

- Annexin-V-FLUOS Staining Kit
Cat. No. 11988549001, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
- PBS- Lösung
- Propidium Iodide (im Kit enthalten)
- Pufferlösung (HEPES, im Kit enthalten)
- Annexin-V-Fluorescein (im Kit enthalten)
- Annexin-V-FLUOS- Färbelösung (Mischung aus Propidium Iodide, Pufferlösung und Annexin-V-Fluorescein)
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- CFDA
- Kulturmedium (Herstellung siehe Kap.3.11)

Durchführung:

In einem ersten Schritt wurde die CFDA- und die Annexin-V-FLUOS- Färbelösung hergestellt, portioniert und eingefroren.

Beim Arbeiten mit dem Annexin- und CFDA- Fluoreszenzfarbstoff ist es wichtig, dass dies im Dunkeln geschieht und dass die Lagerung ebenfalls lichtgeschützt erfolgt.

Zur Herstellung der CFDA-Färbelösung wurden die sich im Fläschchen befindlichen 25mg mit 25ml DMSO gelöst und in 200µl- Portionen bei -20 °C in Eppendorfgläsern eingefroren.

Die Annexin-Färbelösung setzt sich aus 20µl Annexin-V-FLUOS, 1ml Inkubations-Puffer und 20µl Propidium-Iodide zusammen. Mit 1ml dieser Lösung können 10 Proben á 100µl gefärbt werden, daher wurde die Färbelösung auch in 100µl- Portionen analog der CFDA-Lösung eingefroren.

Die Färbung beginnt damit, dass zunächst 200µl CFDA-Lösung zu der jeweiligen Probe hinzugegeben und diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurde die Probe bei 250 U/min für circa 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert. Nun wurden 100µl der Annexin-Färbelösung dazugegeben und diese Mischung für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe ein weiteres Mal bei 250 U/min für circa

10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet wieder mit Kulturmedium resuspendiert.

Von der so gefärbten Spermienlösung wurden Abstriche gemacht und diese mit Glycerol eingedeckt.

Bis zur schnellstmöglichen Auswertung können die entstandenen Präparate bei -20 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Auswertung:

Von jeder Probe wurden die entsprechenden Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 1000 –facher Vergrößerung mit einer Ölimmersionslinse analysiert.

Die Spermien können auf drei verschiedene Arten gefärbt sein: einmal grün fluoreszierend (CFDA positiv) und damit intakt, grün/rot fluoreszierend (Annexin positiv) und apoptotisch oder schwach rötlich bis ungefärbt und somit avital.

3.9 Induktion der Akrosomenreaktion

3.9.1 Challenging- Test/ ARmax-Concept

Zur Induktion der akrosomalen Reaktion in vitro wurde in dieser Studie das divalente Kation Ionophore verwendet, welches einen massiven Calciumeinstrom in die Zelle induziert und aufgrund der Umgehung intrazellulärer regulatorischer Mechanismen als unphysiologischer Stimulus der Akrosomenreaktion anzusehen ist.

Reagenzien:

- Calcium Ionophore A23187 (5mg Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, C7522)
- Kulturmedium (Herstellung siehe Kap. 3.11)
- DMSO

- Herstellung der Ionophore- Gebrauchslösung:

Zunächst wird eine Stammlösung hergestellt indem 1mg A23187 säurefrei in 382 μ l DMSO zu einer 5mM Lösung gelöst wird. Die benötigte Gebrauchslösung erhält man durch Auffüllen und Mischen von 10 μ l Stammlösung mit 4,99ml Kulturmedium.

Durchführung:

Die mit der Swim-up Methode aufbereiteten Spermien werden mit 500 μ l Ionophore- Lösung versetzt und für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wird die Probe bei 300 U/min für circa 5-10 Minuten zentrifugiert. Danach wird der entstandene Überstand vorsichtig abgehoben und das im Eppendorf-Cup zurückbleibende Pellet mit Kulturmedium resuspendiert.

Von jeder so behandelten Probe wurden Abstriche angefertigt, die mit Paraformaldehyd fixiert und bis zur Färbung mit Concanavalin A in Dunkelheit gelagert wurden.

Auswertung:

Die Auswertung des Challeging-Tests erfolgt nach Färbung mit Concanavalin A, die im folgenden Kapitel genau beschrieben wird.

3.10 Nachweis der Akrosomenreaktion

3.10.1 Concanavalin-A-lectin Färbung

Diese Färbung gibt Auskunft über den Akrosomenstatus. Es handelt sich hierbei um eine Immunfluoreszenzfärbung bei der Concanavalin-A-lectin an die innere Membran des Akrosoms bindet. Bei den Bindungsstellen handelt es sich um die beiden Zucker α -D-Mannose und α -D-Glukose. Diese Bindung ist aber nur möglich, wenn die akrosomale Region vorhanden ist. Somit zeigt eine positive Fluoreszenz des Spermiums ein intaktes Akrosom an. Es wurden von jeder Probe Ausstriche vor und nach Einfrieren sowohl nativ als auch nach swim-up und nach Behandlung mit Ionophore gefärbt.

Reagenzien:

-10mM PBS-Puffer

-150mM PBS-Puffer

(Herstellung der PBS-Lösung siehe Kap.3.9.2)

-Paraformaldehydlösung 4% in PBS, pH 7,4

-Glycerin

-Concanavalin-A-lectin (FITC-labeled from *Canavalia ensiformis*(Jack bean) Type IV),
(Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, C7642) :

•Herstellung der Stammlösung:

Zum Lösen des Stoffes werden 2ml der 10mM PBS-Lösung in das Fläschchen mit 10mg Concanavalin-A-lectin gegeben. Diese Mischung wird in einen Erlenmeyerkolben umgeschüttet und mit weiteren 18ml der 10mM PBS-Lösung vermennt. Diese Stammlösung wird im Kühlschrank lichtgeschützt gelagert.

•Herstellung der Gebrauchslösung:

200µl der Stammlösung werden mit 800µl 10mM PBS-Lösung gemischt. Dies ist ausreichend für etwa 10 Objektträger.

Wichtig ist, mit der Concanavalin-A-lectin –Lösung immer lichtgeschützt zu arbeiten.

Durchführung:

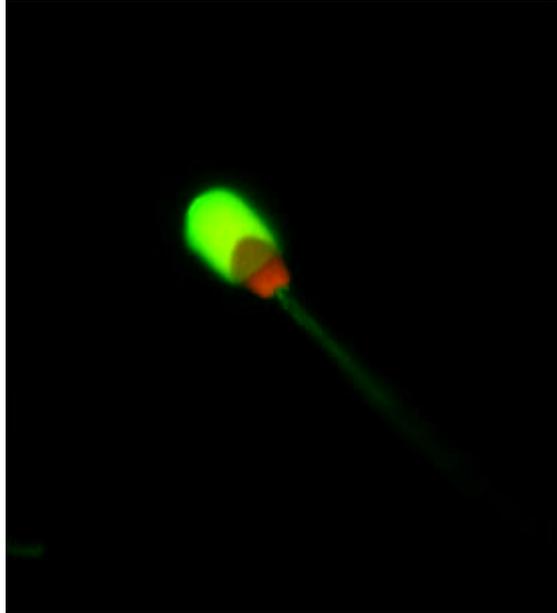
Im ersten Schritt werden die Objektträger für 10 Minuten in der Inkubationskammer mit Formaldehydlösung, jeweils 500µl pro Objektträger, inkubiert. Danach werden die Objektträger in 10mM PBS gewaschen. Für die eigentliche Färbung bringt man auf jedes Präparat nun 100µl der Gebrauchslösung auf und inkubiert diese 20 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer. Im Anschluss werden die Objektträger ein zweites Mal in PBS-Lösung gewaschen und danach luftgetrocknet. Jeder Objektträger wird mit einem Tropfen Glycerin und einem Deckglas versehen.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop mit 100er Objektiv und Immersionsöl. Es werden von jeder Probe 100 Spermatozoen ausgezählt und nach ihrer Färbung in die Gruppen fluoreszierend oder nicht fluoreszierend eingeteilt. Spermien die

fluoreszieren haben ein Akrosom, da der Concanavalin-A-lectin –Farbstoff an die innere Akrosomenmembran gebunden hat.

Abb.3.3 Mit Concanavalin-A-lectin gefärbtes Spermium mit intaktem fluoreszierenden Akrosom



[Quelle: Handbuch Practical Laboratory Andrology Sperm Fertilizing Ability Testing]

3.11 Verwendete Standardlösungen

HAM'S F-10 Lösung (=Kulturmedium)

Zur Herstellung der zur Spermienaufbereitung verwendeten HAM'S F-10 Lösung werden folgende Reagenzien benötigt:

0,308g Calciumlactat ($C_6H_{10}CaO_6 \times 5H_2O$) (Merck, Darmstadt)

2,108g Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) (Merck, Darmstadt)

0,075g Streptomycin (Sigma, St.Louis, USA)

0,030-0,070g Penicillin G sodium salt (Sigma, St.Louis, USA)

9,88g HAM'S F-10 (Seromed, Biochrom AG, Berlin)

Diese Chemikalien werden in 1 Liter Aqua dest. gelöst.

Für die Spermienaufbereitung werden 45ml der fertigen HAM'S F-10 Gebrauchslösung mit 5ml Humanalbumin (20%, Immuno, Baxter, Unterschleißheim) vermischt.

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Folgende Reagenzien werden benötigt um die in den Färbungen verwendete PBS-Lösung herzustellen:

Lösung A: 1,32g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)
in 100ml Aqua dest.

Lösung B: 1,21g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)
80g NaCl (Merck, Darmstadt)
2g KCl (Merck, Darmstadt)
11,5g Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt)
2g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
10g Glucose (Sigma, St.Louis, USA)
0,5g Streptomycinsulfat (Sigma, St.Louis, USA)
0,36g Sodium pyruvat (Sigma, St.Louis, USA)
0,5g Penicillin G sodium salt (Sigma, St.Louis, USA)
in 900ml Aqua dest.

Jeweils 10ml der Lösung A und 90ml der Lösung B werden mit 900ml Aqua dest. Aufgefüllt und ergeben so 1 Liter gebrauchsfertige PBS-Lösung.

Schwelllösung für den HOS-Test

Die Schwelllösung wird aus den unten aufgeführten Reagenzien hergestellt und in Küvetten (500PP-microcentrifuge tube 1,5ml, Greiner Bio.One GmbH, Frickenhausen) zu je 1ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

1,47g Trinatriumzitat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt)

2,75g Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Merck, Darmstadt)

in 200ml Aqua dest.

Spermien- Frierlösung

Die zum Einfrieren der Spermien verwendete Frierlösung wurde wie folgt hergestellt:

Lösung 1:

NaCl	2,9g
KCl	0,2g
CaCl x 2H ₂ O	0,2g
MgCl ₂ x 6h ₂ O	0,05g
Na-Lactat	1,44g = 1,15ml

Lösung 2:

Sacharose	1,711g
Glucose	0,0059g

in 57,46ml Aqua bidest lösen.

Es werden 20ml von Lösung 1 zu Lösung 2 gegeben und folgende Reagenzien noch hinzugefügt:

Glyzerin	15,8g = 13ml
Streptomycin	0,005g
Humanalbumin	2,0g = 2,8ml

Danach wird die Lösung steril filtriert, aliquotiert und bei -20° eingefroren.

3.12 Einteilung der Proben und Statistische Auswertung

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

Fertile Proben:

≥ 20 Mio. Spermien/ml

≥ 50% Spermien mit progressiver und globaler Vorwärtsbeweglichkeit

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

Für alle quantitativen Zielvariablen wurden Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet und präsentiert. Zur Darstellung der Gruppenunterschiede wurden Box-Plots erstellt. Für den Vergleich zweier abhängiger Stichproben wurde der Wilcoxon-Test verwandt und für den Vergleich mehrerer abhängiger Stichproben wurde der Friedman-Test angewendet. p-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant und p- Werte $\leq 0,01$ als hoch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf Dichte und Motilität menschlicher Spermatozoen unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien)

Der folgende Abschnitt beschreibt die Ergebnisse bezüglich der Dichte und Motilität der untersuchten Proben, einmal im Gesamtkollektiv, danach aufgeteilt nach Fertilität gemäß WHO- Kriterien (1999). Die Ergebnisse der fertilen und subfertilen Gruppe werden verglichen vor und nach Aufbereitung sowie vor und nach Kryokonservierung.

4.1.1 Dichte

4.1.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv untersuchter Proben

Die durchschnittliche mittlere Spermiendichte aller in dieser Studie untersuchten Proben beträgt $72,24 \pm 35,65$ Mio./ml. Nach Aufbereitung durch die swim-up Methode hat die mittlere Dichte auf $27,52 \pm 32,56$ Mio./ml abgenommen. Wenn die nativen Proben den Einfrier- und Auftauprozess durchlaufen haben, liegt die durchschnittliche Dichte nur noch bei $42,21 \pm 32,03$ Mio./ml und wird durch die sich anschließende Aufbereitung nochmals auf durchschnittlich $3,20 \pm 2,49$ Mio./ml verringert. Die Abnahme der Dichte durch Aufbereitung und durch Kryokonservierung ist in allen Vergleichen statistisch hoch signifikant mit $p < 0,01$.

Tab. 4.1 Spermiendichte [in Mio/ml]

	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	72,24 ±35,65 (n=39) ▲ ¯	88,42 ±25,10 (n=19) ▶ ◇	56,87 ±37,87 (n=20) ◀ ∞
nach swim-up	27,52 ±32,56 (n=39) ▲ □	39,26 ±37,26 (n=19) ▶ †	16,37 ±23,16 (n=20) ◀ Ω
Gefroren nativ	42,21 ±32,03 (n=39) ● ¯	49,00 ±30,14 (n=19) ■ ◇	35,76 ±33,18 (n=20) ◆ ∞
Gefroren nach swim-up	3,20 ±2,49 (n=39) ● □	3,47 ±2,75 (n=19) ■ †	2,91 ± 2,20 (n=17) ◆ Ω

statistische Auswertung Tab. 4.1: ▲ p <0,01; ● p <0,01; ¯ p <0,01; □ p <0,01; ▶ p <0,01; ■ p <0,01; ◇ p <0,01; † p <0,01; ◀ p <0,01; ◆ p <0,01; ∞ p <0,01; Ω p <0,01.

4.1.1.2 Vergleich der Spermiendichten in der fertilen und der subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

Die mittlere Dichte des ungefrorenen Nativejakulates der fertilen Gruppe beträgt 88,42 ±25,10 Mio. Spermien/ml. Nach Aufbereitung durch die swim-up Methode beträgt die Dichte nur noch durchschnittlich 39,26 ±37,26 Mio. Spermien/ml. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant (p<0,01).

Nach Kryokonservierung und Auftauen des Nativejakulats beträgt die mittlere Dichte der untersuchten fertilen Proben 49 ±30,14 Mio. Spermien/ml. Die Aufbereitung dieser gefrorenen Proben lässt die Dichte auf 3,47 ±2,75 Mio. Spermien/ml zurückgehen. Dieser Rückgang ist ebenfalls mit einem p-wert von <0,01 statistisch hoch signifikant.

In der subfertilen Gruppe ist die mittlere Dichte der nativen Proben mit $56,87 \pm 37,87$ Mio. Spermien/ml deutlich geringer als in der fertilen Gruppe. Nach swim-up beträgt die Dichte $16,37 \pm 23,16$ Mio./ml, was eine statistisch hoch signifikante Abnahme darstellt ($p < 0,01$). Nach der Kryokonservierung liegt die durchschnittliche Dichte der subfertilen Proben bei $35,76 \pm 33,18$ Mio. Spermien/ml. Durch die Aufbereitung nimmt die Zahl der Spermien nochmals statistisch hoch signifikant ab auf $2,91 \pm 2,20$ Mio./ml ($p < 0,01$).

Insgesamt nimmt die Dichte in beiden Gruppen vor und nach Kryokonservierung durch die Aufbereitung mittels swim-up hoch signifikant ab. In der fertilen Gruppe ist diese Abnahme generell im Vergleich noch etwas höher, minus 49,16 Mio./ml vor Einfrieren und minus 45,53 Mio./ml nach Einfrieren, in der subfertilen Gruppe minus 40,5 vor und minus 32,85 Mio./ml nach Einfrieren.

Abb. 4.1 Spermiedichte der ungefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

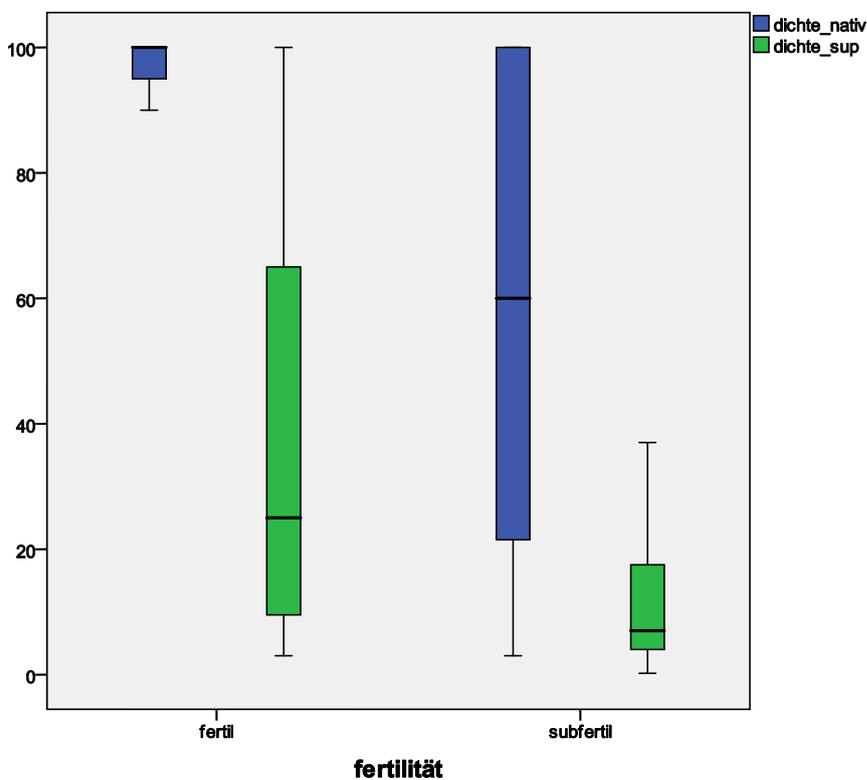
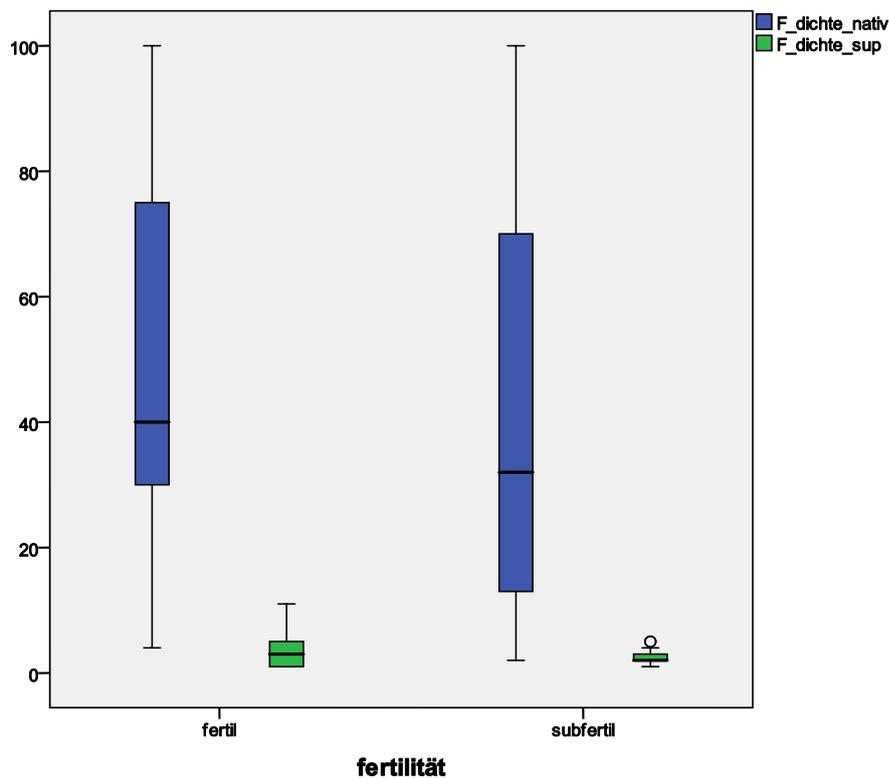


Abb. 4.2 Spermiendichte der gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up



4.1.1.3 Vergleich der Spermiendichte in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

Die durchschnittliche Dichte der nativen Proben in der fertilen Gruppe nimmt durch den Einfrier- und Auftauprozess von $88,42 \pm 25,10$ auf $49,00 \pm 30,14$ um $39,42$ Mio. Spermien/ml ab. Durch swim-up aufbereitete Proben dieser Gruppe zeigen durch die Kryokonservierung eine Abnahme der mittleren Dichte um $35,79$ Mio./ml von $39,26 \pm 37,26$ auf $3,47 \pm 2,75$. Diese Abnahme der Dichten sowohl der nativen als auch der aufbereiteten Proben sind mit p-Werten $<0,01$ statistisch hoch signifikant.

In der subfertilen Gruppe zeigt sich die Abnahme der Dichte der nativen und aufbereiteten Proben nach Kryokonservierung ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$), aber im Vergleich zu den fertilen Proben etwas weniger ausgeprägt. Die Dichte des subfertilen Nativejakulates nimmt im Durchschnitt von $56,87 \pm 37,87$ auf $35,76 \pm 33,18$ Mio. Spermien/ml ab (minus $21,11$ Mio./ml) und die Dichte der mit swim-up aufbereiteten Proben nimmt von $16,37 \pm 23,16$ auf $2,91 \pm 2,20$ Mio./ml ab.

Abb.4.3 Spermiendichte der nativen Proben vor und nach Kryokonservierung

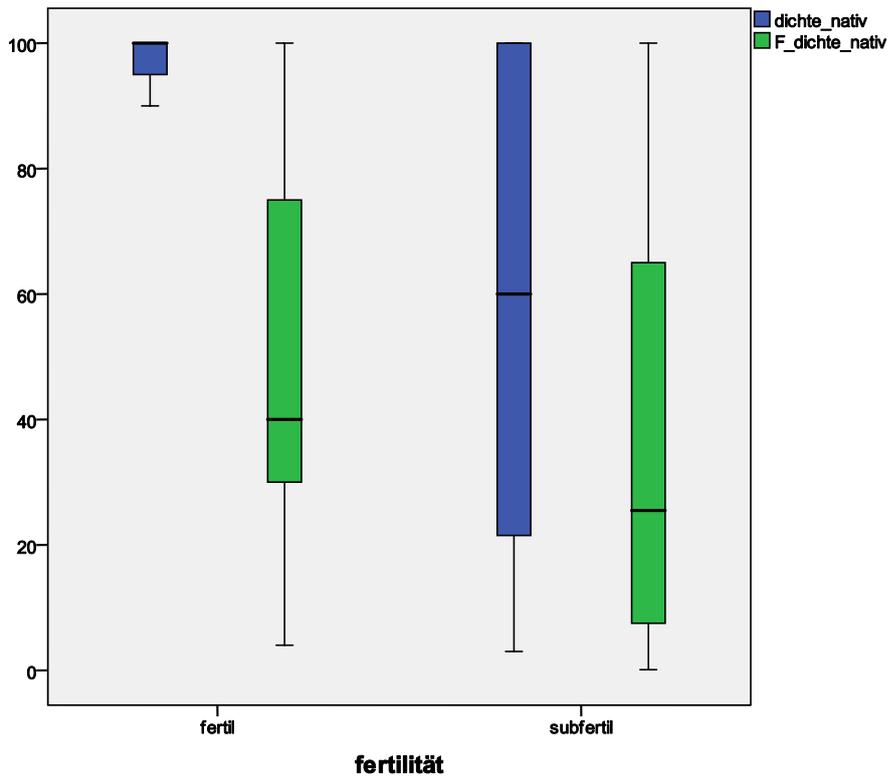
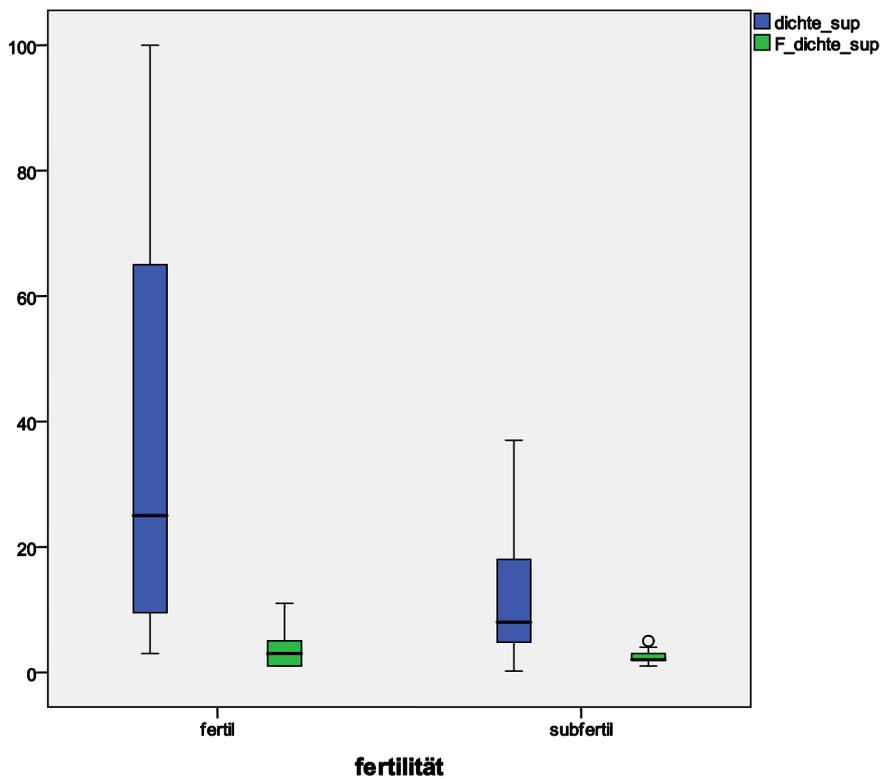


Abb. 4.4 Spermiendichte der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung



4.1.2 Motilität

4.1.2.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Die Motilität der untersuchten Spermatozoen wurde in 4 Gruppen unterteilt. Spermatozoen mit progressiver Vorwärtsbewegung zeigen die höchste gerichtete Beweglichkeit, globale Motilität ist ebenfalls gerichtet, wohingegen sich stationäre Spermatozoen nur auf der Stelle bewegen. Die letzte Gruppe umfasst alle immotilen, unbeweglichen Spermien.

In den Nativejakulaten betrug der durchschnittliche Anteil immotiler Spermatozoen $37,97 \pm 13,75\%$ und der aller beweglicher Spermatozoen zusammen $61,39\%$. Daran hat die Gruppe global beweglicher Spermatozoen mit $30,05 \pm 9,82\%$ den größten Anteil, progressive Motilität zeigten im Mittel $13,16 \pm 10,56\%$ und stationär beweglich waren $18,71 \pm 11,90\%$.

Nach Aufbereitung mittels swim-up nimmt der Anteil unbeweglicher Spermatozoen ab auf $24,48 \pm 25,84\%$, dafür steigt der Anteil motiler Spermatozoen ($76,14\%$). Die Gruppe mit progressiver Beweglichkeit vergrößert sich auf $35,64 \pm 23,34\%$, wohingegen die Anteile global und stationär beweglicher Spermatozoen etwas abnimmt, auf $27,56 \pm 19,08\%$ bzw. $27,53 \pm 18,32\%$.

Die Kryokonservierung wirkt sich negativ auf die Motilität der untersuchten Proben aus. Der Anteil beweglicher Spermien hat sich auf $47,29\%$ reduziert und dementsprechend hat sich die Gruppe immotiler Spermien auf $51,63 \pm 20,31\%$ vergrößert. Besonders deutlich ist die Abnahme in der Gruppe progressiv beweglicher Spermatozoen auf $3,84 \pm 5,43\%$. Im Vergleich zu den Proben im ungefrorenen Zustand hat sich der Anteil global beweglicher Spermatozoen auf $16,53 \pm 13,96\%$ verringert und der Anteil stationärer Spermatozoen auf $27,10 \pm 14,92\%$ vergrößert.

Die Aufbereitung der gefrorenen Proben verschiebt das Verhältnis von beweglichen zu unbeweglichen Spermatozoen nur unwesentlich, der Anteil immotiler Spermien beträgt $49,13 \pm 27,56\%$. Bei der Motilität hat der Anteil progressiv beweglicher Spermien am stärksten zugenommen, auf $17,77 \pm 21,32\%$. Der Anteil global beweglicher Spermien hat sich praktisch nicht verändert, von $16,82 \pm 7,98\%$ vor swim-up auf $17,08 \pm 14,99\%$ nach swim-up und die stationären Spermatozoen machen nach Aufbereitung noch einen Anteil von $17,50 \pm 11,98\%$ aus.

Der überwiegende Teil der beschriebenen Veränderungen der Spermatozoenbeweglichkeit durch Aufbereitung und Kryokonservierung ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant wie in nachfolgender Tabelle 4.6 nachgelesen werden kann.

Tab. 4.2 Spermienmotilität [in %]

	Motilität	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	progressiv	12,94 ±13,51% (n=39) ▲ ○	21,57 ±12,02 (n=19) ◀ ☺	4,75 ±9,10 (n=20) † †
	global	29,74 ±15,80% (n=39) ● ±	42,36 ±10,84 (n=19) ◆ ∩	17,75 ±8,80 (n=20) ■ ^
	stationär	18,71 ±11,90% (n=39) † ♠	22,63 ±7,70 (n=19) ∞ ‖	15,00 ±14,04 (n=20) △ ♥
	immotil	38,58 ±28,49% (n=39) □ ■	13,94 ± 8,09 (n=19) Ω ∂	62,00 ±19,42 (n=20) ∩ ♣
nach swim-up	progressiv	35,64 ±23,34% (n=39) ▲ ▨	45,78 ±22,06 (n=19) ◀ *	26,00 ±24,95 (n=20) † ■
	global	27,56 ±19,08% (n=39) ● ●	26,57 ±12,69 (n=19) ◆ †	28,50 ±23,95 (n=20) ■ ¿
	stationär	12,94 ±11,68% (n=39) † †	13,68 ± 8,13 (n=19) ∞ ð	12,25 ±14,46 (n=20) △ ¢
	immotil	24,48 ±25,84% (n=39) □ †	14,21 ±16,18 (n=19) Ω ã	34,25 ±29,70 (n=20) ∩ ¶
Gefroren nativ	progressiv	3,84 ±5,43% (n=39) ▶ ○	7,10 ±6,08 (n=19) ■ ☺	0,75 ±1,83 (n=20) △ †
	global	16,53 ±13,96% (n=39) ■ ±	28,15 ±9,31 (n=19) ☼ ∩	5,50 ±6,66 (n=20) ∪ ^
	stationär	26,92 ±16,88% (n=39) ◆ ♠	34,21 ±11,21 (n=19) ◼ ‖	20,00 ±18,63 (n=20) ✖ ♥
	immotil	52,17 ±29,64% (n=39) † ■	30,52 ±16,32 (n=19) — ∂	72,75 ±24,30 (n=20) ▼ ♣
Gefroren nach swim-up	progressiv	17,77 ±21,32% (n=36) ▶ ▨	28,15 ±21,61 (n=19) ■ *	6,17 ±14,09 (n=17) △ ■
	global	17,08 ±14,99% (n=36) ■ ●	24,4 ±13,42 (n=19) ☼ †	8,82 ±12,31 (n=17) ∪ ¿
	stationär	17,50 ±11,98% (n=36) ◆ †	15,78 ±7,31 (n=19) ◼ ð	19,41 ±15,70 (n=17) ✖ ¢
	immotil	48,19 ±32,14% (n=36) † †	32,10 ±25,62 (n=19) — ã	66,17 ±29,50 (n=17) ▼ ¶

statistische Auswertung Tab. 4.2: ▲ p <0,01; ● p >0,05; ☐ p <0,01; □ p >0,05; ► p <0,01; ■ p >0,05; ◇ p <0,01; † p >0,05; ◀ p <0,01; ◆ p <0,01; ∞ p <0,01; Ω p >0,05; ■ p <0,01; ☼ p >0,05; ■ p <0,01; — p >0,05; † p <0,01; ■ p >0,05; △ p >0,05; ◊ p <0,01; Δ p >0,05; ∅ p >0,05; ž p >0,05; ▼ p >0,05; ○ p <0,01; ± p <0,01; ♠ p <0,01; ■ p <0,01; ☼ p >0,05; † p >0,05; ¶ p <0,01; ☉ p <0,01; ∩ p <0,01; ‖ p <0,01; ∂ p <0,01; * p <0,01; † p >0,05; ð p <0,01; ã p <0,01; ã p <0,01; ħ p <0,05; ^ p <0,01; ♥ p <0,05; ♣ p >0,05; ■ p <0,01; ÿ p <0,01; ç p <0,05; ¶ p <0,01.

4.1.2.2 Vergleich der Spermienmotilität in der fertilen und der subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

In der fertilen Gruppe verbessert sich durch swim-up der Anteil progressiv beweglicher Spermatozoen von $21,57 \pm 12,02$ auf $45,78 \pm 22,06\%$ ($p < 0,01$). Der Anteil global und stationär beweglicher Spermien nimmt dagegen ab, von $42,36 \pm 10,84$ auf $26,57 \pm 12,69\%$ (global) und von $22,63 \pm 7,70$ auf $13,68 \pm 8,13\%$ (stationär). Diese Abnahme ist ebenfalls mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant. Ohne Eigenbewegung sind in der fertilen Gruppe $13,94 \pm 8,09\%$ der nativen Spermatozoen und nach Aufbereitung $14,21 \pm 16,18\%$ ($p > 0,05$).

Nach Kryokonservierung beträgt der Anteil progressiver Spermien $7,10 \pm 6,08\%$ und verbessert sich durch die Aufbereitung hoch signifikant auf $28,15 \pm 21,61\%$. Auch nach Kryokonservierung nimmt der Anteil der global und stationär beweglichen Spermatozoen ab. Die Abnahme in der Untergruppe globale Beweglichkeit ist mit $p > 0,05$ nicht signifikant (von $28,15 \pm 9,31$ auf $24,47 \pm 13,42\%$), die stationäre Beweglichkeit nimmt jedoch mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant ab (von $34,21 \pm 11,21\%$ auf $15,78 \pm 7,31\%$). Der Anteil immotiler Spermatozoen der fertilen Proben beträgt nach Einfrieren im Mittel $30,52 \pm 16,32\%$ und ändert sich durch die Aufbereitung nicht signifikant ($p > 0,05$).

Der Anteil nativer progressiv beweglicher Spermatozoen beträgt in der subfertilen Gruppe $4,75 \pm 9,10\%$ und kann durch swim-up auf $26,00 \pm 24,95\%$ hoch signifikant verbessert werden ($p < 0,01$). Der Prozentsatz global beweglicher Spermatozoen nimmt durch die Aufbereitung zu von $17,75 \pm 8,80$ auf $26,57 \pm 12,69\%$ ($p > 0,05$) und die Gruppe stationär beweglicher Spermien ändert sich ebenfalls nicht signifikant von $15,00 \pm 14,04$ auf $12,25 \pm 14,46\%$ ($p > 0,05$). Ohne Beweglichkeit sind im Mittel $62,00 \pm 19,42\%$ der untersuchten subfertilen Proben im nativen Zustand, nach Aufbereitung durch swim-up verringert sich dieser Anteil statistisch hoch signifikant auf $34,25 \pm 29,70\%$ ($p < 0,01$).

Nach Kryokonservierung vergrößert sich durch Aufbereitung der Anteil progressiv und global beweglicher Spermatozoen, von $0,75 \pm 1,83\%$ auf $6,17 \pm 14,09\%$ und von $5,50 \pm 6,66\%$ auf $8,82 \pm 12,31\%$. Diese Zunahme ist jedoch mit p-Werten $>0,05$ nicht signifikant. Der Anteil stationärer und immotiler Spermatozoen nimmt durch das swim-up nach Kryokonservierung ab, von $20,00 \pm 18,63\%$ auf $19,41 \pm 15,70\%$ und von $72,75 \pm 24,30\%$ auf $66,17 \pm 29,50\%$ (jeweils $p > 0,05$).

In der Gruppe der nativen fertilen Spermatozoen beträgt der Anteil aller motiler Spermien (progressiv, global und stationär) $86,56\%$ vor Aufbereitung im Gegensatz zu nur durchschnittlich $37,50\%$ motilen Spermatozoen in den untersuchten subfertilen Proben. Durch die Aufbereitung mit der swim-up Methode nimmt insgesamt sowohl vor als auch nach Kryokonservierung der Anteil der beweglichen Spermatozoen, insbesondere der progressiven, zu und der Anteil der immotilen Spermatozoen ab. Vor Einfrieren sind diese Effekte der Aufbereitung in beiden Gruppen höher signifikant als nach dem Frierprozess.

Abb. 4.5 progressive Motilität der ungefrorenen und gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

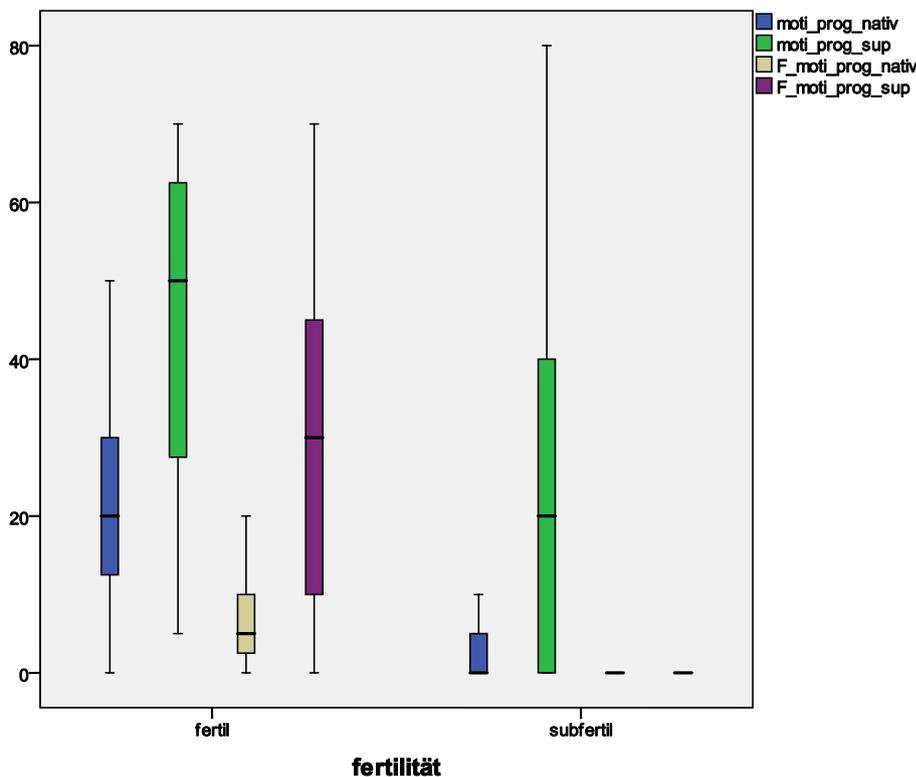


Abb. 4.6 globale Motilität der ungefrorenen und gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

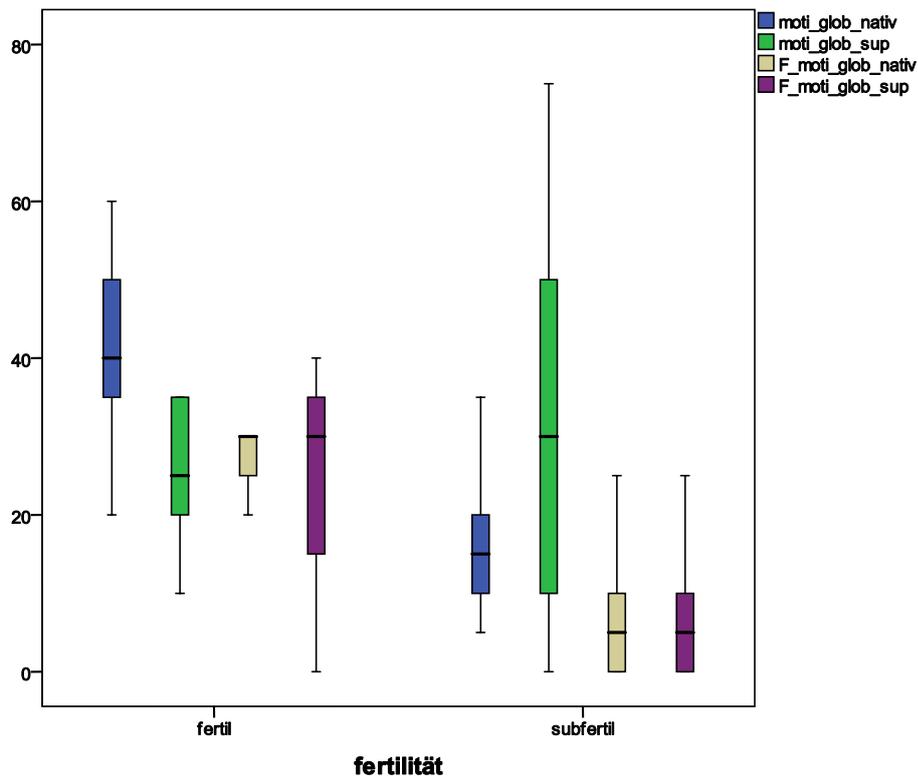


Abb. 4.7 stationäre Motilität der ungefrorenen und gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

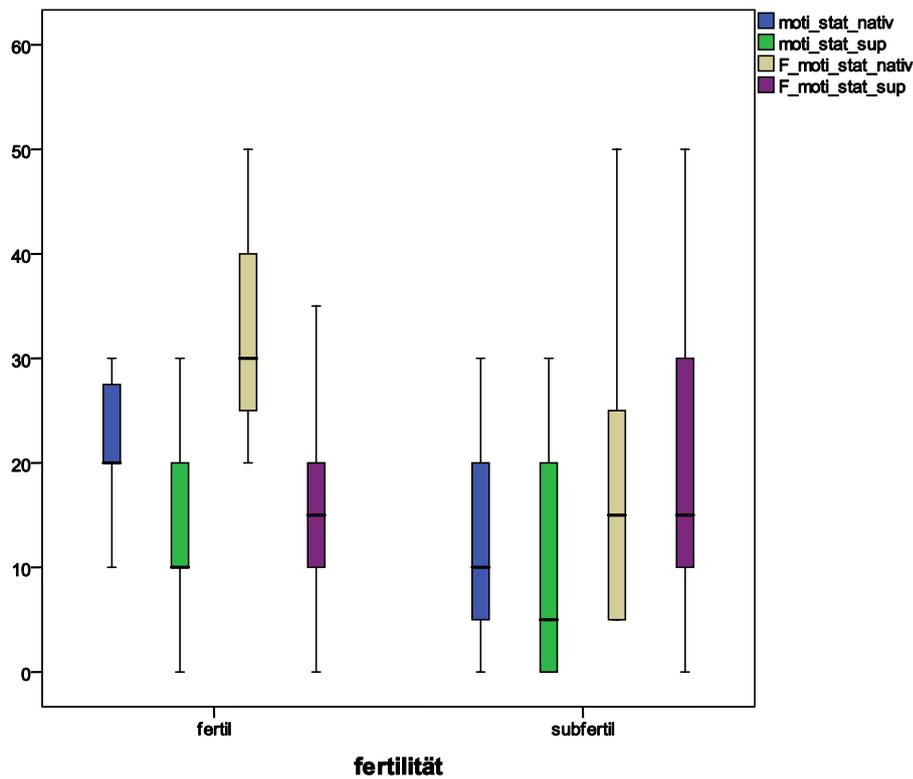
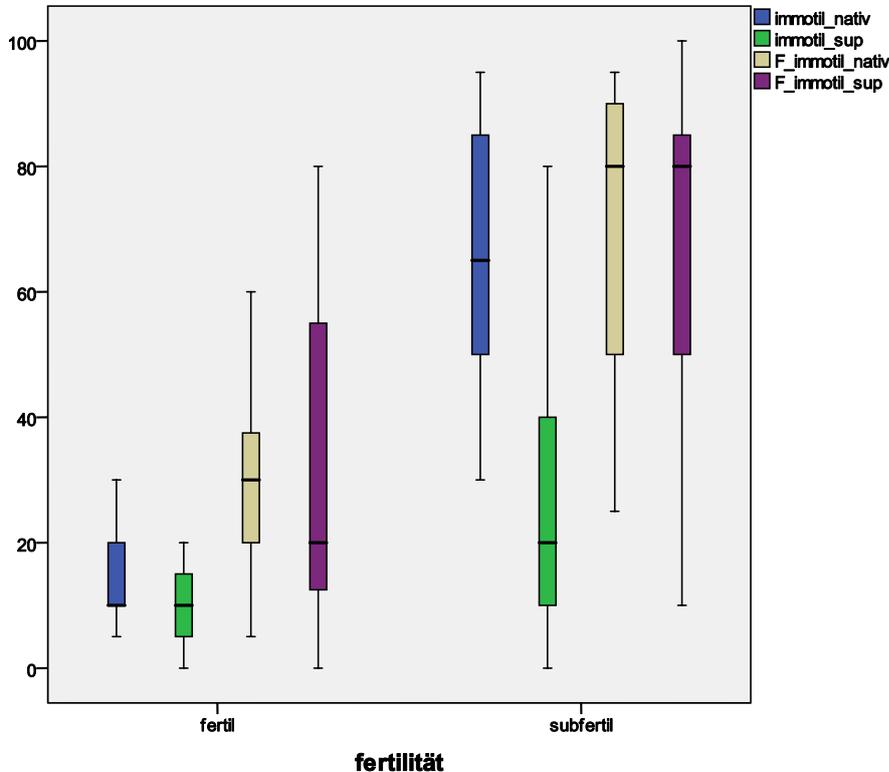


Abb. 4.8 immotile Spermatozoen der ungefrorenen und gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up



4.1.2.3 Vergleich der Spermienmotilität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

Durch die Kryokonservierung kommt es in der fertilen Gruppe zu einer statistisch hoch signifikanten Abnahme des Anteils progressiv beweglicher Spermatozoen sowohl der nativen als auch der aufbereiteten Proben. Die Nativejakulate haben vor Einfrieren im Mittel $21,57 \pm 12,02\%$ progressive Spermien, danach sind es noch $7,10 \pm 6,08\%$ ($p < 0,01$). Bei den aufbereiteten Proben verringert sich der Prozentsatz progressiv beweglicher Spermien von $45,78 \pm 22,06$ vor Kryokonservierung auf $28,15 \pm 21,61\%$ nach Kryokonservierung ($p < 0,01$). Die durchschnittliche globale Motilität nimmt ebenfalls ab, bei den nativen Proben der fertilen Gruppe reduziert sich der Anteil von $42,36 \pm 10,84\%$ auf $28,15 \pm 9,31\%$ und ist mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Bei den durch swim-up aufbereiteten Proben ist die durch Kryokonservierung

bedingte Abnahme des Anteils von Spermatozoen mit globaler Beweglichkeit nicht ganz so ausgeprägt, von $26,57 \pm 12,69$ auf $24,47 \pm 13,42\%$, und mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant. Der Prozentsatz der Untergruppe der stationär beweglichen Spermatozoen nimmt nach Einfrieren und Auftauen bei den nativen und aufbereiteten Proben zu. Die Nativejakulate haben einen mittleren Anteil stationärer Spermatozoen von $22,63 \pm 7,70\%$ und nach Einfrieren von $34,21 \pm 11,21\%$. Bei den fertilen Proben nach swim-up sind es $13,68 \pm 8,13\%$ vor und $15,78 \pm 7,31\%$ nach Einfrieren. Beide Zunahmen sind mit p-Werten $< 0,01$ hoch signifikant. Der Anteil der unbeweglichen Spermatozoen nimmt hoch signifikant zu nach der Kryokonservierung. Die nativen Proben haben durchschnittlich $13,94 \pm 8,09\%$ immotile Spermien und nach Einfrieren sind es $30,52 \pm 16,32\%$ ($p < 0,01$). Bei den aufbereiteten Proben vergrößert sich der Anteil immotiler Spermatozoen von $14,21 \pm 16,18$ auf $32,10 \pm 25,62\%$ nach Kryokonservierung ($p < 0,01$).

In der subfertilen Gruppe nimmt ebenfalls der Anteil progressiv beweglicher Spermatozoen sowohl nativ als auch nach swim-up nach Kryokonservierung ab. Bei den Nativejakulaten nimmt die progressive Motilität von $4,75 \pm 9,10\%$ auf $0,75 \pm 1,83\%$ ab ($p < 0,05$). Die aufbereiteten Proben zeigen einen noch deutlicheren Rückgang des Prozentsatz der progressiv beweglichen Spermien nach Kryokonservierung, von $26,00 \pm 24,95\%$ auf $6,17 \pm 14,09\%$, der statistisch hoch signifikant mit $p < 0,01$ ist.

Der Anteil global beweglicher Spermatozoen der nativen und aufbereiteten Proben nimmt durch den Einfrierprozess hoch signifikant ab (jeweils $p < 0,01$). In den Nativejakulaten sind es vor Einfrieren $17,75 \pm 8,80\%$ und danach $5,50 \pm 6,66\%$. Die aufbereiteten Proben haben vor Einfrieren im Mittel $28,50 \pm 23,95\%$ global bewegliche Spermatozoen und nach Kryokonservierung $8,82 \pm 12,31\%$.

Die stationär beweglichen Spermatozoen nehmen signifikant zu nach Kryokonservierung. Die nativen Proben weisen im Mittel einen Anteil von $15,00 \pm 14,04\%$ auf der sich auf $20,00 \pm 18,63\%$ vergrößert ($p < 0,05$). Nach swim-up der kryokonservierten Proben beträgt der Anteil stationärer Spermien $19,41 \pm 15,70\%$ im Vergleich zu $12,25 \pm 14,46\%$ der ungefrorenen aufbereiteten Proben ($p < 0,05$).

Bei den subfertilen Nativejakulaten ist die Zunahme des Anteils unbeweglicher Spermatozoen von $62,00 \pm 19,42\%$ auf $72,75 \pm 24,30\%$ statistisch nicht signifikant mit $p > 0,05$. Dahingegen ist die Zunahme der Gruppe unbeweglicher Spermien bei den aufbereiteten Proben nach Kryokonservierung mit $p < 0,01$ hoch signifikant (von $34,25 \pm 29,70\%$ auf $66,17 \pm 29,50\%$).

Abb. 4.9 Spermienmotilität ungefrorener nativer Proben

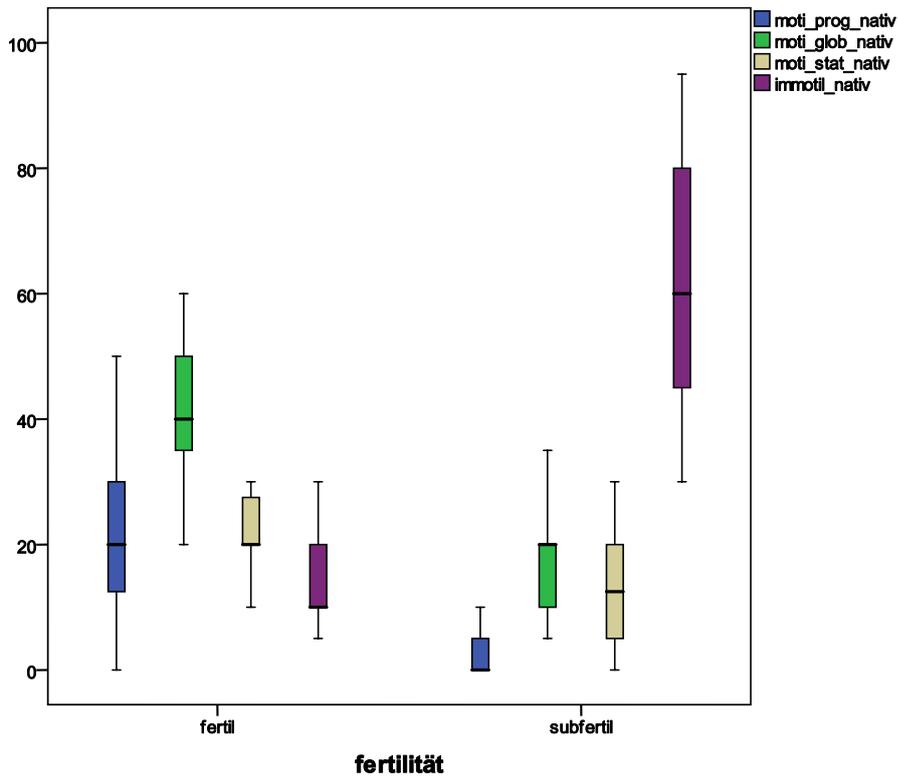


Abb. 4.10 Spermienmotilität gefrorener nativer Proben

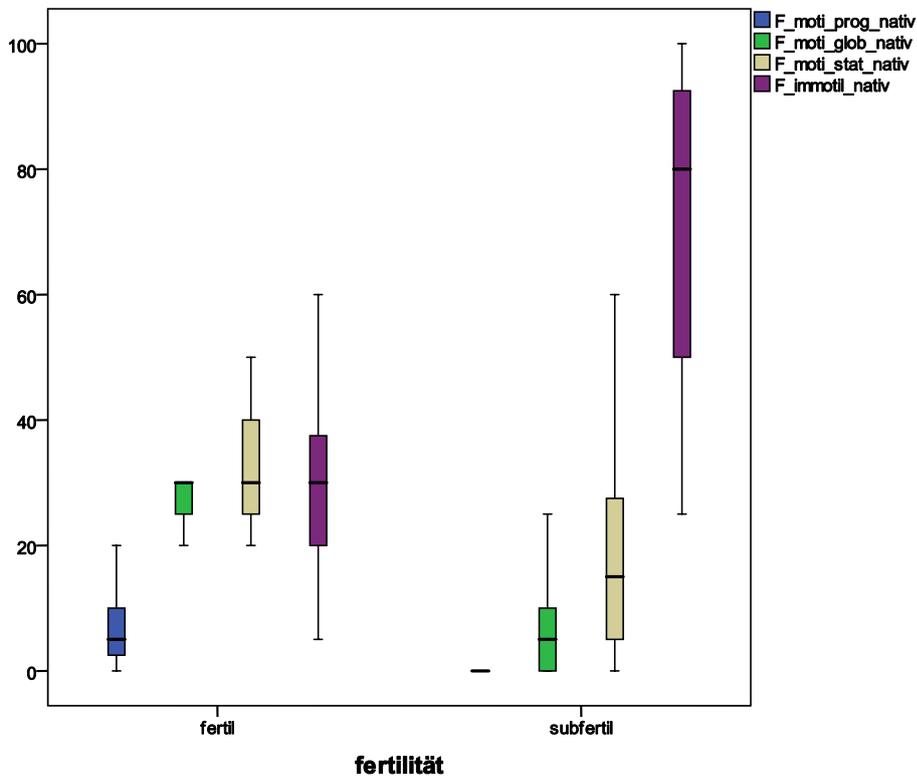


Abb. 4.11 Spermienmotilität ungefrorener aufbereiteter Proben

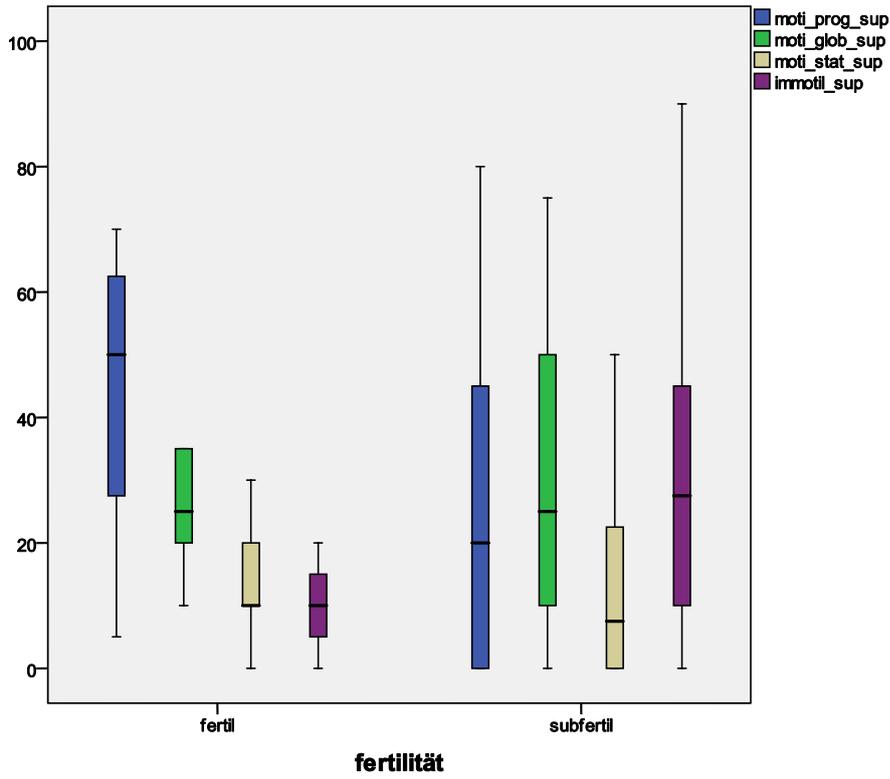
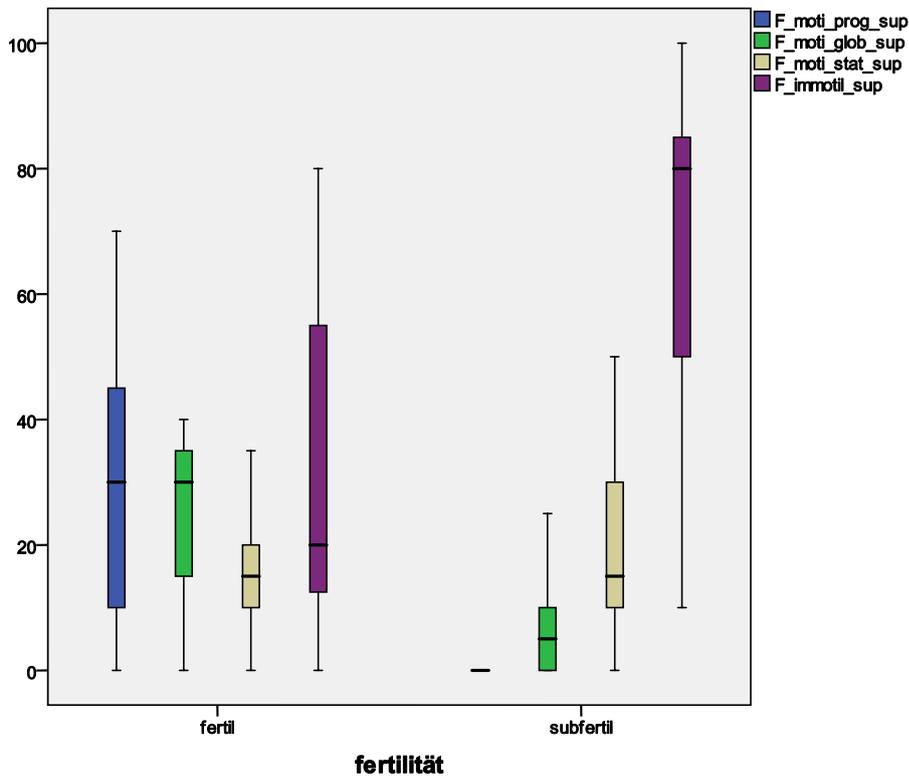


Abb. 4.12 Spermienmotilität gefrorener aufbereiteter Proben



4.2 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die Vitalität (Eosin-Test), Membranintegrität (HOS-Test) und die Morphologie (Färbung nach Papanicolaou) menschlicher Spermatozoen unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999)

Die Ergebnisse und Auswertungen der Eosin- Färbung, des HOS- Tests und der Färbung nach Papanicolaou werden in diesem Unterkapitel dargestellt und erläutert.

4.2.1 Vitalität (Eosin-Test)

Die Eosin- Färbung wurde nur an nativen Spermatozoenproben ohne Aufbereitung vorgenommen.

4.2.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Im Gesamtkollektiv aller untersuchter Nativproben beträgt die Anzahl Eosin negativer, also ungefärbter und somit vitaler Spermatozoen im Mittel $58,76 \pm 23,32\%$. Nach Kryokonservierung waren es noch durchschnittlich $54,33 \pm 21,09\%$ mit intakter Plasmamembran. Dieser Zusammenhang ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Tab. 4.3 Spermiovitalität [Eosin negativ =vital in %]

	Gesamtkollektiv M \pm SD	fertile Proben M \pm SD	subfertile Proben M \pm SD
Nativ	58,76 \pm 23,32% (n=39) ▲	72,36 \pm 9,91 (n=19) ▶	45,85 \pm 25,18 (n=20) ◀
Gefroren nativ	54,33 \pm 21,09% (n=39) ▲	66,57 \pm 9,75 (n=19) ▶	42,70 \pm 22,52 (n=20) ◀

statistische Auswertung Tab. 4.3: ▲ $p < 0,01$; ► $p < 0,01$; ◄ $p > 0,05$.

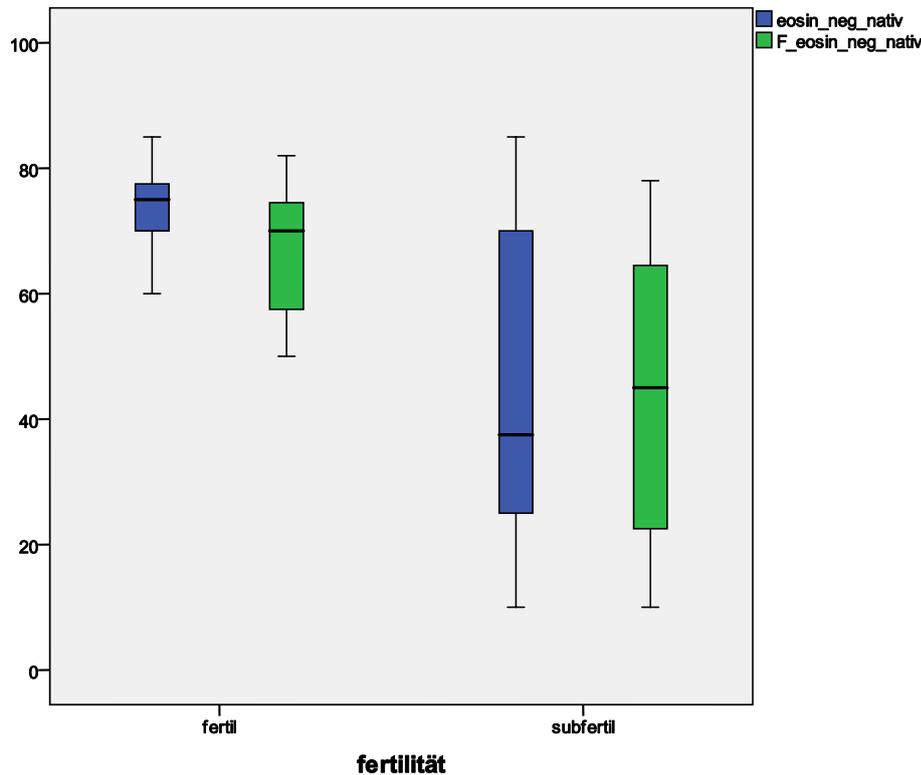
4.2.1.2 Vergleich der Spermiovitalität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

In der fertilen Gruppe beträgt der mittlere Anteil vitaler Spermatozoen $72,36 \pm 9,91\%$. Nach Kryokonservierung haben noch durchschnittlich $66,57 \pm 9,75\%$ der Spermatozoen eine ungefärbte und intakte Plasmamembran. Dies entspricht einer hoch signifikanten Abnahme von $5,79\%$ ($p < 0,01$).

Die Abnahme des Anteils vitaler Spermatozoen in der subfertilen Gruppe von $45,85 \pm 25,18\%$ auf $42,70 \pm 22,52\%$ ist mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant.

Insgesamt weist die fertile Gruppe vor und nach Kryokonservierung im Vergleich zur subfertilen Gruppe einen höheren Prozentsatz vitaler Spermatozoen auf. In beiden Gruppen nimmt der Anteil vitaler Spermatozoen durch das Einfrieren ab, wobei die Abnahme in der fertilen Gruppe in dieser Studie größer und signifikanter ist.

Abb. 4.13 Spermiovitalität vor und nach Kryokonservierung



4.2.2 Membranintegrität (HOS-Test)

4.2.2.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

In allen ungefrorenen nativen Ejakulaten sind $74,74 \pm 13,52\%$ der Spermatozoen HOS positiv, was bedeutet, dass der Schwanz geschwollen und somit die semipermeable Plasmamembran nicht geschädigt ist. Nach Aufbereitung hat der Anteil von Spermatozoen mit intakter Membran auf $80,60 \pm 11,52\%$ zugenommen. Die Kryokonservierung verringert den Anteil HOS positiver Spermatozoen um fast 10% auf $65,02 \pm 12,77\%$. Durch die Aufbereitung der gefrorenen Proben wächst der Anteil von Spermatozoen mit positiver Membranintegrität auf $67,00 \pm 11,79\%$, allerdings fällt diese Steigerung geringer aus als die Steigerung durch swim-up bei den ungefrorenen Proben. Alle beschriebenen Veränderungen sowohl durch Aufbereitung als auch durch Kryokonservierung sind mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Tab. 4.4 Spermienmembranintegrität [HOS positiv =vital in %]

	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	74,74 ±13,52% (n=39) ▲ ¯	72,36 ±12,06 (n=19) ▶ ◇	77,00 ±14,72 (n=20) ◀ ∞
nach swim-up	80,60 ±11,52% (n=38) ▲ □	75,88 ±12,21 (n=18) ▶ †	84,85 ±9,22 (n=20) ◀ Ω
Gefroren nativ	65,02 ±12,77% (n=37) ● ¯	70,15 ±8,35 (n=19) ■ ◇	59,61 ±14,52 (n=18) ◆ ∞
Gefroren nach swim-up	67,00 ±11,79% (n=32) ● □	69,64 ±7,42 (n=17) ■ †	64,00 ±15,05 (n=15) ◆ Ω

statistische Auswertung Tab. 4.4: ▲ p <0,01; ● p <0,01; ¯ p <0,01; □ p <0,01; ▶ p >0,05; ■ p >0,05; ◇ p >0,05; † p <0,01; ◀ p <0,01; ◆ p <0,01; ∞ p <0,01; Ω p <0,01.

4.2.2.2 Vergleich der Spermienmembranintegrität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

In der fertilen Gruppe haben im Mittel 72,36 ±12,06% der nativen Spermatozoen eine intakte Plasmamembran. Nach Aufbereitung durch swim-up steigt dieser Anteil auf 75,88 ±12,21%, jedoch mit p >0,05 nicht statistisch signifikant.

Bei den kryokonservierten Proben verändert sich der Prozentsatz der Spermatozoen mit intakter Membran von 70,15 ±8,35% vor swim-up auf 69,64 ±7,42% nach swim-up nicht signifikant (p >0,05).

Die untersuchten subfertilen Spermaproben zeigen nativ einen Anteil von $77,00 \pm 14,72\%$ Spermatozoen mit positiver Membranintegrität. Die Aufbereitung bewirkt eine Zunahme dieses Anteils auf $84,85 \pm 9,22\%$, der statistisch hoch signifikant ist ($p < 0,01$).

Nach Kryokonservierung kann durch swim-up auch der Prozentsatz von Spermatozoen mit erhaltener Membranintegrität von $59,61 \pm 14,52\%$ auf $64,00 \pm 15,05\%$ hoch signifikant mit $p < 0,01$ gesteigert werden.

Im Vergleich der beiden Gruppen fällt auf, dass die Aufbereitung bei den subfertilen Spermaproben sowohl vor als auch nach Kryokonservierung zu einer statistisch hoch signifikanten Zunahme des Anteils von Spermatozoen mit intakter Plasmamembran führt, bei den fertilen Proben jedoch keine signifikanten Veränderungen nach Aufbereitung zu verzeichnen sind.

Abb. 4.14 Spermienmembranintegrität der ungefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

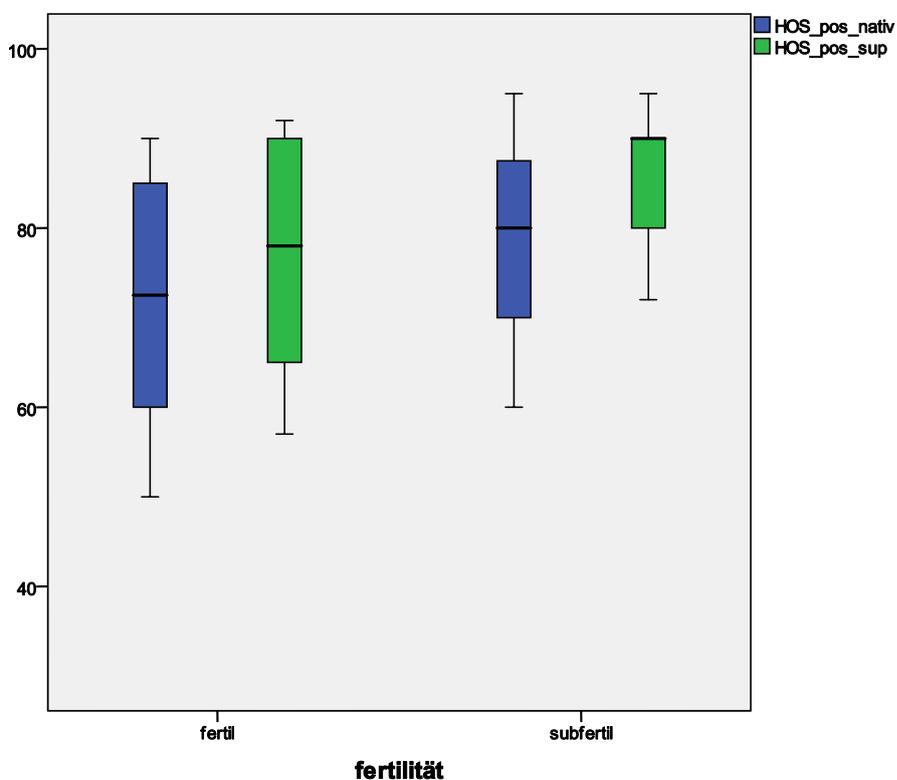
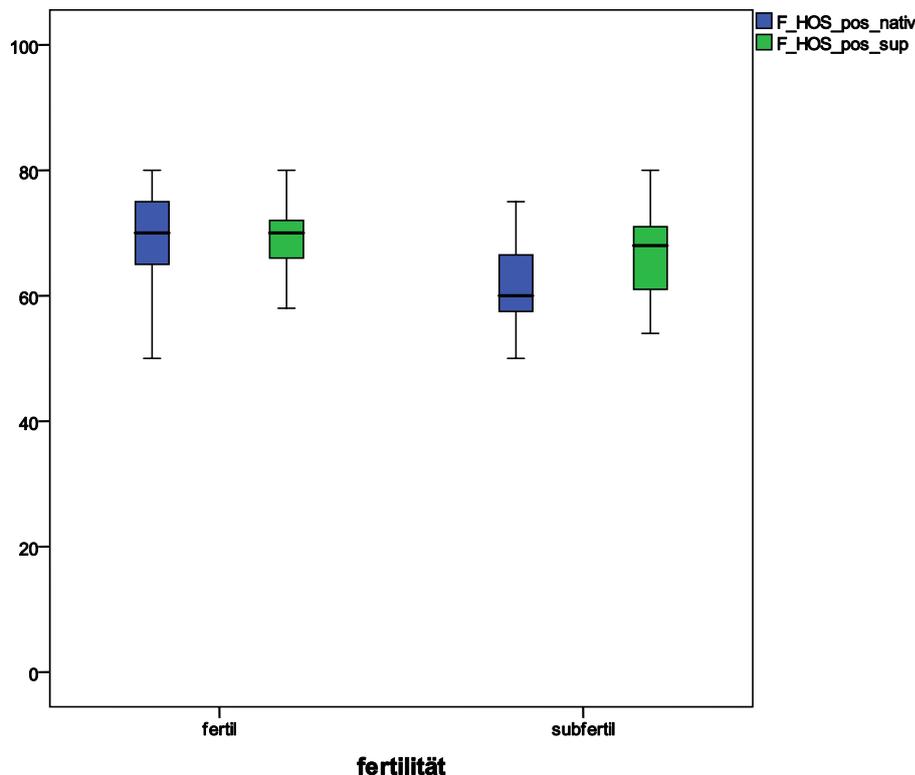


Abb. 4.15 Spermienmembranintegrität der gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up



4.2.2.3 Vergleich Spermienmembranintegrität in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

Vor Kryokonservierung der Nativejakulate beträgt in der fertilen Gruppe der Anteil von Spermatozoen mit intakter Plasmamembran $72,36 \pm 12,06\%$ und danach sind es noch $70,15 \pm 8,35\%$. Diese Abnahme ist jedoch mit $p > 0,05$ nicht signifikant.

Die Veränderung bei den aufbereiteten Proben durch das Einfrieren sind dagegen statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$). Vor Einfrieren haben $75,88 \pm 12,21\%$ der Spermatozoen eine intakte Plasmamembran und danach sind es nur noch $69,64 \pm 7,42\%$.

In der subfertilen Gruppe kommt es bei den nativen und aufbereiteten Ejakulaten durch die Kryokonservierung zu einer statistisch hoch signifikanten Abnahme des Prozentsatzes intakter Spermatozoen mit p -Werten $< 0,01$. Das Nativejakulat hat durchschnittlich $77,00 \pm 14,72\%$ Spermatozoen mit intakter Membran und nach Kryokonservierung sind es $59,61 \pm 14,52\%$.

Bei den aufbereiteten Proben nimmt der Prozentsatz von $84,85 \pm 9,22\%$ im ungefrorenen Zustand auf $64,00 \pm 15,05\%$ nach Einfrieren und Auftauen ab.

Insgesamt ist festzustellen, dass der Anteil von Spermatozoen mit intakter Plasmamembran nach Kryokonservierung gleich ob aufbereitet oder nativ geringer ist als davor, sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe. Der Vergleich der subfertilen mit der fertilen Gruppe zeigt eine durchschnittlich stärkere Abnahme intakter Spermatozoen durch das Einfrieren bei den untersuchten subfertilen Proben nativ und auch aufbereitet.

Abb. 4.16 Spermienmembranintegrität der nativen Proben vor und nach Kryokonservierung

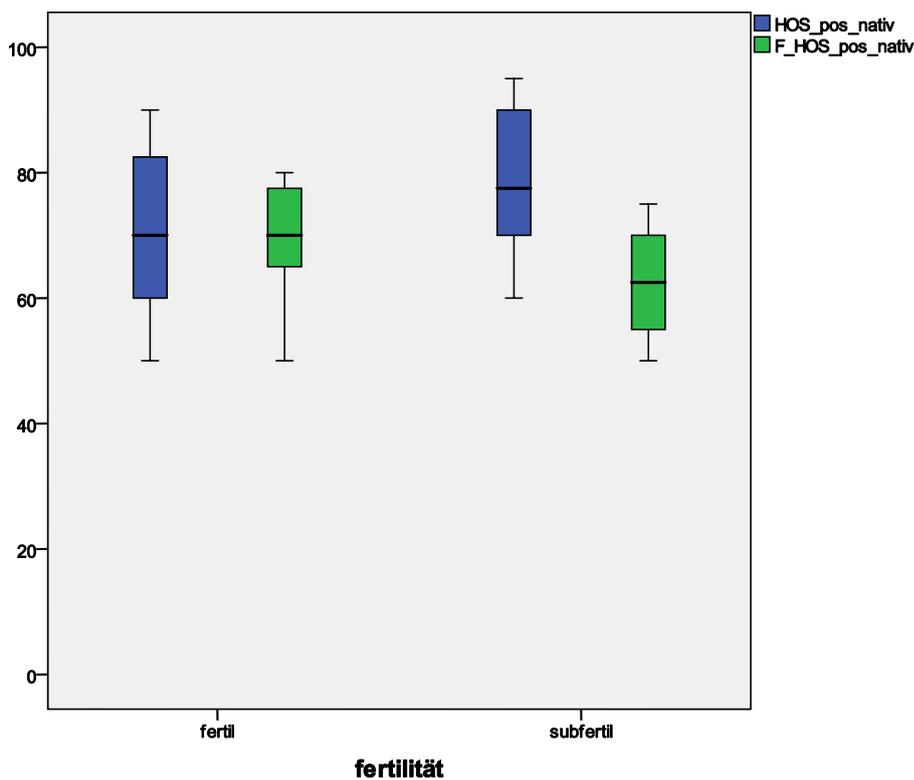
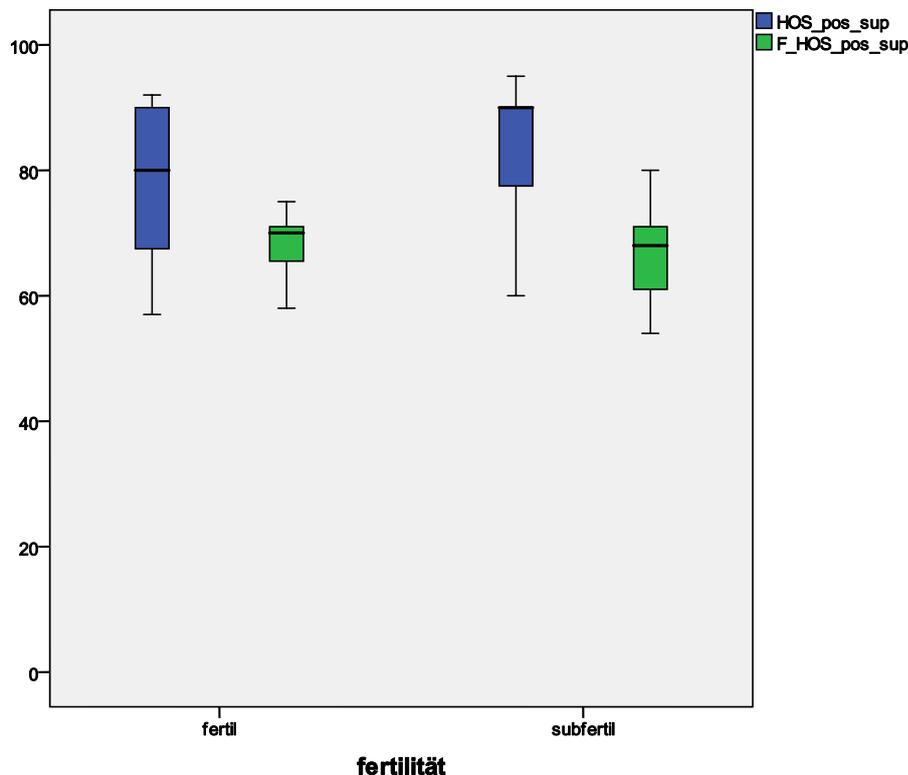


Abb. 4.17 Spermienmembranintegrität der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung



4.2.3 Morphologie (PAP-Färbung)

4.2.3.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Alle Proben wurden unter dem Mikroskop als morphologisch normal beurteilt oder die bestehende Fehlform notiert. In diesem Kapitel wurde nur eine Zuordnung normal oder abnormal getroffen und die entsprechenden Zahlen miteinander verglichen. Im Anhang finden sich die Tabellen in denen alle einzelnen Fehlformen aufgelistet sind und dazugehörige Boxplots.

43,42 ±13,06% der nativen Proben wiesen unter dem Mikroskop eine normale Morphologie auf. Nach Aufbereitung waren 48,62 ±11,58% der Spermatozoen normal geformt was mit $p < 0,05$ einer statistisch signifikanten Zunahme entspricht. Nach Kryokonservierung waren durchschnittlich 35,37 ±10,87% der nativen Proben ohne Fehlform und durch die erneute Aufbereitung der gefrorenen Proben stieg der Anteil statistisch signifikant auf 37,93 ±13,28%

($p < 0,05$). Der Vergleich der Proben vor und nach Kryokonservierung sowohl im nativen als auch im aufbereiteten Zustand zeigt eine Abnahme des Anteils normal geformter Spermien, ist jedoch mit $p > 0,05$ nicht statistisch signifikant.

Tab. 4.5 Spermienmorphologie [normal geformt in %]

	Gesamtkollektiv M \pm SD	fertile Proben M \pm SD	subfertile Proben M \pm SD
Nativ	43,42 \pm 13,06% (n=33) ▲ $\bar{\top}$	42,58 \pm 12,74 (n=17) ▶ \diamond	44,31 \pm 13,75 (n=16) ◀ ∞
nach swim-up	48,62 \pm 11,58% (n=29) ▲ \square	46,53 \pm 10,14 (n=13) ▶ \parallel	50,31 \pm 12,69 (n=16) ◀ Ω
Gefroren nativ	35,37 \pm 10,87% (n=35) ● $\bar{\top}$	35,50 \pm 12,41 (n=18) ■ \diamond	35,23 \pm 9,36 (n=17) ◆ ∞
Gefroren nach swim-up	37,93 \pm 13,28% (n=31) ● \square	44,60 \pm 12,73 (n=15) ■ \parallel	31,68 \pm 10,75 (n=16) ◆ Ω

statistische Auswertung Tab. 4.5: ▲ $p < 0,05$; ● $p > 0,05$; $\bar{\top}$ $p < 0,05$; \square $p > 0,05$; ▶ $p > 0,05$; ■ $p < 0,05$; \diamond $p > 0,05$; \parallel $p > 0,05$; ◀ $p > 0,05$; ◆ $p > 0,05$; ∞ $p > 0,05$; Ω $p > 0,05$.

4.2.3.2 Vergleich der Spermienmorphologie in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

In der fertilen Gruppe waren 42,58 \pm 12,74% der Spermatozoen morphologisch normal geformt und nach Aufbereitung mittels swim-up 46,53 \pm 10,14%. Nach Kryokonservierung der nativen Proben waren 35,50 \pm 12,41% der Spermatozoen ohne Fehlformen und durch Aufbereitung erhöhte sich der Anteil auf 44,60 \pm 12,73%.

Bei den nativen subfertilen Proben waren $44,31 \pm 13,75\%$ der Spermatozoen normal geformt und nach swim-up $50,31 \pm 12,69\%$. Die eingefrorenen subfertilen Proben wiesen nach Auftauen einen Anteil von $35,23 \pm 9,36\%$ auf und nach Aufbereitung dieser Proben waren durchschnittlich $31,68 \pm 10,75\%$ der Spermatozoen normal geformt.

In beiden Gruppen erhöht sich durch Aufbereitung der ungefrorenen Proben der Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen, jedoch mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant. Bei den gefrorenen fertilen Proben erhöht sich ebenfalls durch die Aufbereitung der Anteil normal geformter Spermatozoen und hier ist der Anstieg mit $p < 0,05$ statistisch signifikant. Dagegen nimmt bei den subfertilen gefrorenen Proben nach Aufbereitung statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) die Zahl morphologisch unauffälliger Spermatozoen leicht ab.

4.2.3.3 Vergleich der Spermienmorphologie in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

Durch Kryokonservierung verringert sich in der fertilen Gruppe bei den nativen Proben der Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen von $42,58 \pm 12,74\%$ auf $35,50 \pm 12,41\%$. Die aufbereiteten Proben erfahren durch Kryokonservierung ebenfalls eine Reduktion des Anteils normal geformter Spermatozoen, von $46,53 \pm 10,14\%$ vor Einfrieren auf $44,60 \pm 12,73\%$ nach Einfrieren.

In der subfertilen Gruppe sind $44,31 \pm 13,75\%$ der nativen Spermatozoen ohne Fehlformen und nach Kryokonservierung hat der Anteil auf $35,23 \pm 9,36\%$ abgenommen. Bei den aufbereiteten subfertilen Proben verringert sich der Anteil normal geformter Spermatozoen noch stärker, von $50,31 \pm 12,69\%$ vor Einfrieren auf $31,68 \pm 10,75\%$ nach Einfrieren.

Durch die Kryokonservierung nimmt in beiden Gruppen sowohl bei den nativen als auch bei den aufbereiteten Proben der Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen ab. Allerdings ist nur bei den aufbereiteten subfertilen Proben mit $p < 0,01$ ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang vorhanden, bei den anderen verglichenen Werten ist $p > 0,05$ und somit der Zusammenhang nicht signifikant.

4.3 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf den Chromatinkondensationsstatus (Cromomycin- Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999)

4.3.1 Chromatinkondensationsstatus (Cromomycin-Färbung)

4.3.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Im Gesamtkollektiv ohne Berücksichtigung der Fertilität beträgt die durchschnittliche Anzahl gut kondensierter Spermatozoen vor Aufbereitung und Frieren $63,74 \pm 8,43\%$. Durch die Aufbereitung mittels swim-up vergrößert sich dieser Anteil auf $67,10 \pm 7,36\%$.

Nach Einfrieren und Auftauen hat der Anteil gut kondensierter Spermatozoen in den Nativejakulaten auf durchschnittlich $46,38 \pm 11,31\%$ abgenommen. Das swim-up der kryokonservierten Proben lässt den Prozentsatz von Spermatozoen mit gutem Chromatinkondensationsstatus nochmals ansteigen auf $51,78 \pm 7,66\%$.

Alle Zusammenhänge sind mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Tab. 4.6 Spermienchromatinkondensationsstatus [Cromomycin negativ =gut kondensiert in %]

	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	63,74 ±8,43% (n=39) ▲ ▯	64,63 ±7,89 (n=19) ► ◇	62,90 ±9,03 (n=20) ◀ ∞
nach swim-up	67,10 ±7,36% (n=39) ▲ □	68,05 ±7,81 (n=19) ► †	66,20 ±6,99 (n=20) ◀ Ω
Gefroren nativ	46,38 ±11,31% (n=39) ● ▯	53,26 ±6,95 (n=19) ■ ◇	39,85 ±10,85 (n=20) ◆ ∞
Gefroren nach swim-up	51,78 ±7,66% (n=33) ● □	55,42 ±5,16 (n=19) ■ †	46,85 ±7,88 (n=14) ◆ Ω

statistische Auswertung Tab. 4.6: ▲ p <0,01; ● p <0,01; ▯ p <0,01; □ p <0,01; ► p <0,01; ■ p >0,05; ◇ p <0,01; † p <0,01; ◀ p <0,01; ◆ p <0,05; ∞ p <0,01; Ω p <0,01.

4.3.1.2 Vergleich des Spermienchromatinkondensationsstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

In der fertilen Gruppe sind im nativen Zustand durchschnittlich 64,63 ±7,89% der Spermatozoen gut kondensiert. Die Zunahme auf 68,05 ±7,81% nach Aufbereitung ist mit p<0,01 statistisch hoch signifikant.

Bei den gefrorenen fertilen Proben nimmt der Anteil gut kondensierter Spermatozoen von 53,26 ±6,95% nativ auf 55,42 ±5,16% nach swim-up zu, jedoch ist diese Steigerung statistisch nicht signifikant (p>0,05).

Bei den subfertilen Proben beträgt der mittlere Anteil gut kondensierter Spermatozoen in den Nativejakulaten $62,90 \pm 9,03\%$ und verbessert sich nach Aufbereitung auf $66,20 \pm 6,99\%$. Es handelt sich hierbei um eine hoch signifikante Verbesserung mit $p < 0,01$.

Nach Kryokonservierung sind nativ durchschnittlich $39,85 \pm 10,85\%$ der Spermatozoen gut kondensiert und nach Aufbereitung $46,85 \pm 7,88\%$. Diese Zunahme ist mit $p < 0,05$ signifikant.

In beiden Gruppen nimmt der Prozentsatz gut kondensierter Spermatozoen nach Aufbereitung zu sowohl bei den ungefrorenen als auch bei den gefrorenen Proben. Vor Einfrieren ist der Zusammenhang in beiden Gruppen statistisch hoch signifikant, bei den gefrorenen Proben ist nur in der subfertilen Gruppe ein statistisch signifikanter Zusammenhang berechenbar.

Nachfolgende Tabellen und Grafiken geben einen Überblick über die Ergebnisse bezüglich des Kondensationsstatus der fertilen und subfertilen Gruppe im Vergleich.

Abb. 4.18 Spermienchromatinkondensationsstatus der ungefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

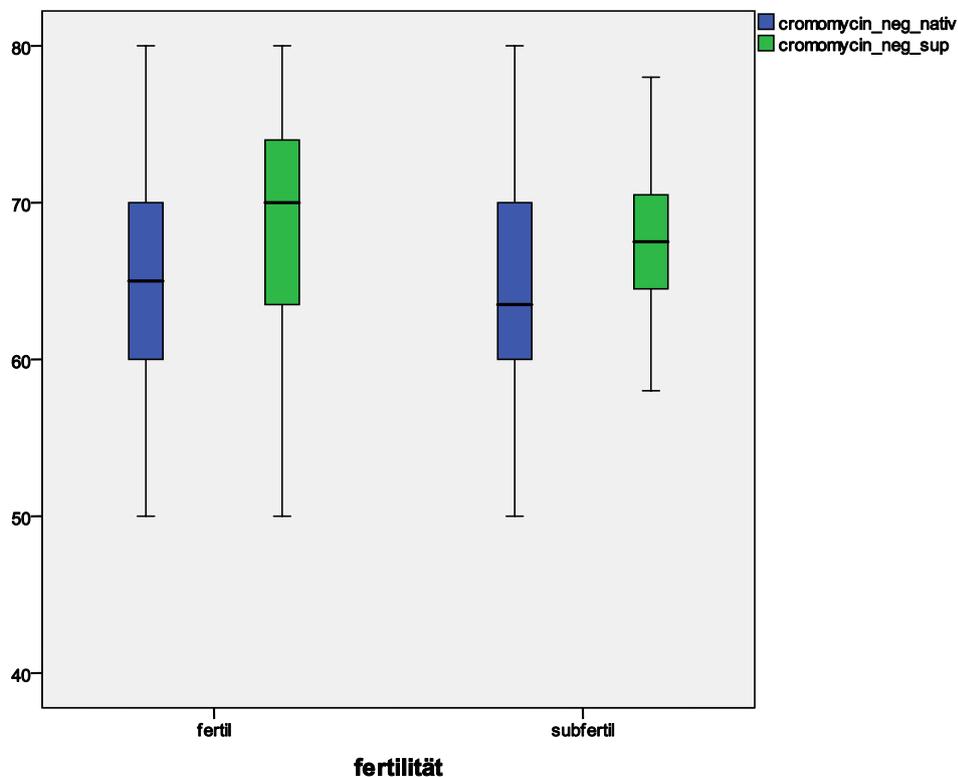
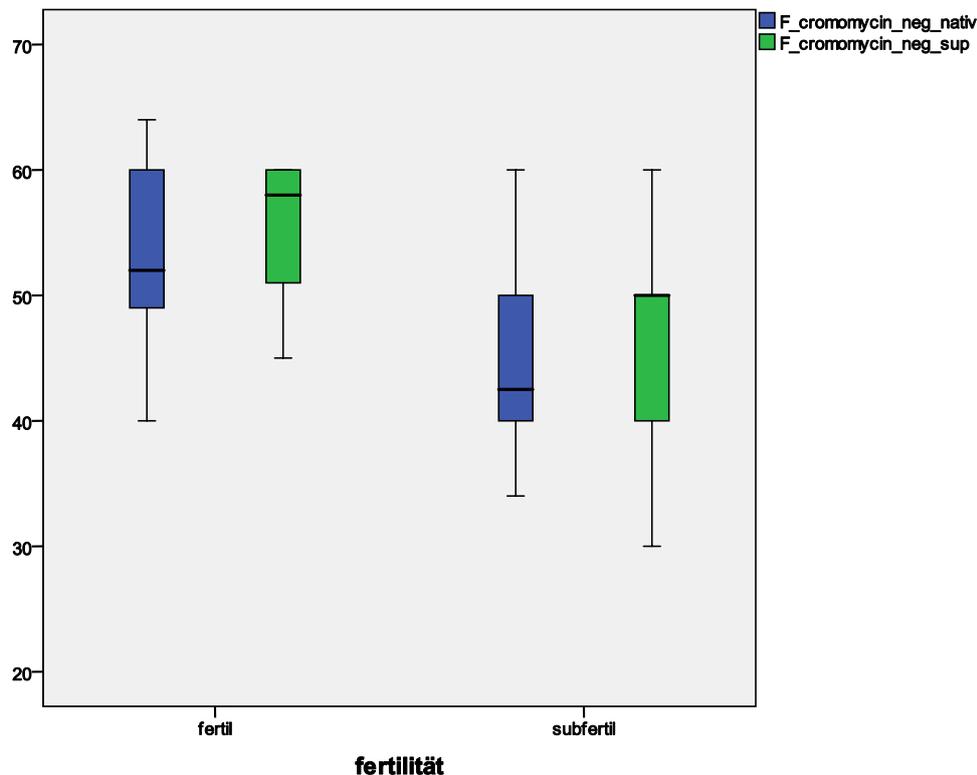


Abb. 4.19 Spermienchromatinkondensationsstatus der gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up



4.3.1.3 Vergleich des Spermienchromatinkondensationsstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

Durch die Kryokonservierung nimmt in der fertilen Gruppe der Anteil gut kondensierter Spermatozoen hoch signifikant ab, sowohl bei den nativen Proben als auch bei den aufbereiteten Proben. Der Prozentsatz gut kondensierter Spermatozoen nimmt in den untersuchten Nativejakulaten von $64,63 \pm 7,89\%$ auf $53,26 \pm 6,95\%$ nach Einfrieren ab ($p < 0,01$). Bei den aufbereiteten Proben nimmt der Anteil von durchschnittlich $68,05 \pm 7,81\%$ vor Einfrieren auf $55,42 \pm 5,16\%$ danach ab ($p < 0,01$).

In der subfertilen Gruppe verringert sich ebenfalls der Anteil von Spermatozoen mit gutem Kondensationsstatus nach Kryokonservierung. Bei den Nativejakulaten ist die Abnahme von im Mittel $62,90 \pm 9,03\%$ vor Einfrieren auf $39,85 \pm 10,85\%$ danach hoch signifikant mit $p < 0,01$. Die aufbereiteten Proben zeigen auch eine statistisch hoch signifikante Abnahme des

Prozentsatzes gut kondensierter Spermatozoen von $66,20 \pm 6,99\%$ auf $46,85 \pm 7,88\%$ ($p < 0,01$).

In beiden Gruppen sieht man die Abnahme des Anteils gut kondensierter Spermatozoen nach Kryokonservierung deutlich und hoch signifikant. Bei den untersuchten subfertilen Proben ist diese Abnahme mit minus 23,05% nativ und minus 19,35% aufbereitet noch ausgeprägter als in der fertilen Gruppe (minus 11,37% und minus 12,63%).

Abb. 4.20 Spermienchromatinkondensationsstatus der nativen Proben vor und nach Kryokonservierung

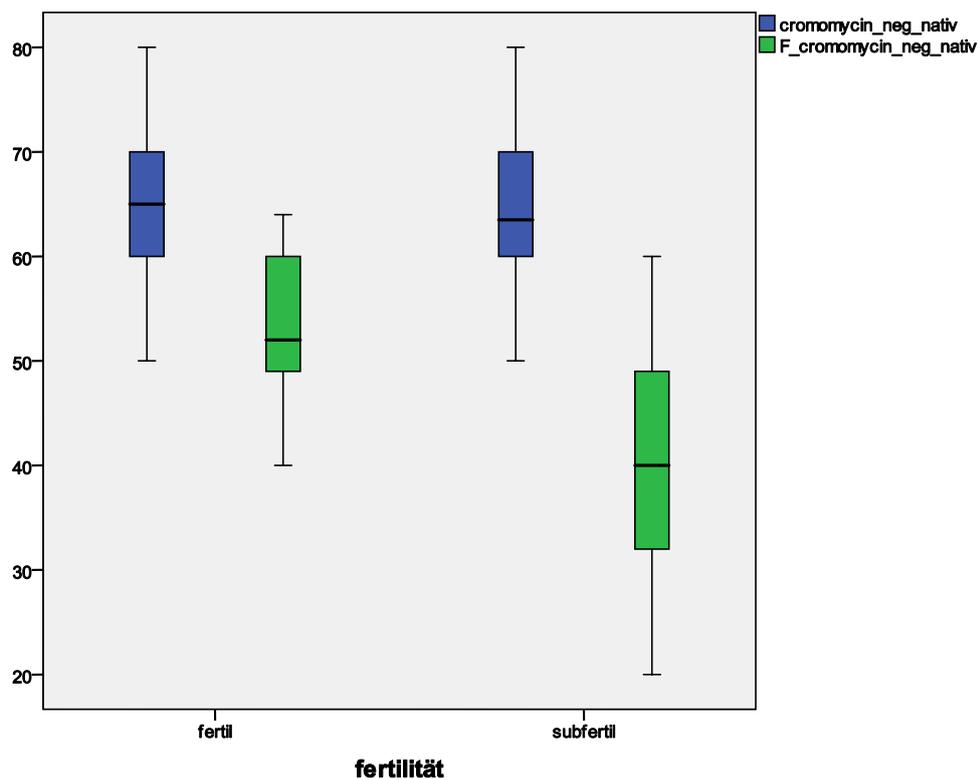
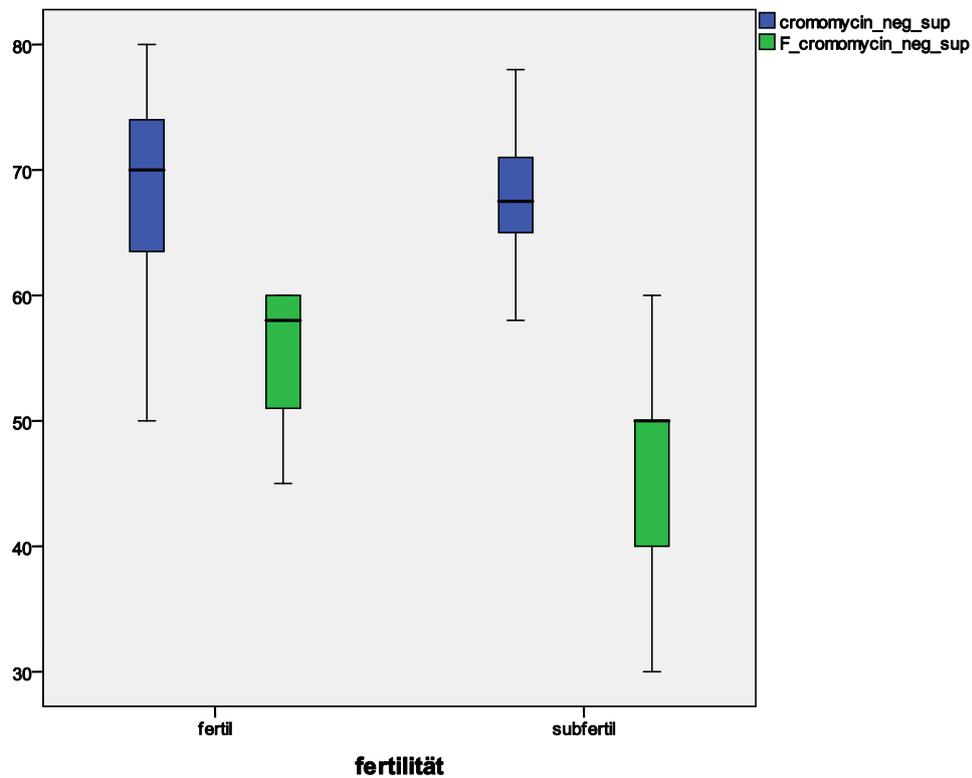


Abb. 4.21 Spermienchromatinkondensationsstatus der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung



4.4 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die DNA-Fragmentation (Tunel-Färbung) und die Apoptose-/Nekroserate (Annexin/CFDA-Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien)

Die Ergebnisse der Tunel-Färbung und der Annexin/CFDA-Färbung werden in einem gemeinsamen Kapitel beschrieben.

4.4.1 DNA-Fragmentation (TUNEL-Färbung)

4.4.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Im Mittel zeigen 77,46 ±10,12% der ungefrorenen Nativejakulate nach Tunel-Färbung keine Fluoreszenz und sind somit nicht in Apoptose befindlich. Nach Aufbereitung der Proben durch swim-up vergrößert sich der Anteil nicht apoptotischer Spermatozoen auf 85,78 ±8,97%. Nach Kryokonservierung hat der Anteil von Spermatozoen mit fragmentierter DNA zugenommen und es sind daher noch durchschnittlich 59,79 ±13,86% der Spermatozoen nicht apoptotisch. Die Aufbereitung der gefrorenen Spermaproben vergrößert den Anteil nicht apoptotischer Spermien nochmals auf 69,58 ±12,15%.

Die Abnahme der Zahl apoptotischer Spermatozoen nach Aufbereitung sowohl bei den ungefrorenen als auch bei den gefrorenen Proben ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant. Ebenfalls hoch signifikant ist die Zunahme der Zahl apoptotischer Spermatozoen beim Vergleich der nativen und aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung ($p < 0,01$).

Tab. 4.7 DNA-Fragmentation [Tunel negativ =nicht apoptotisch in %]

	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	77,46 ±10,12% (n=39) ▲ ▯	77,31 ±10,25 (n=19) ▶ ◇	77,60 ±10,26 (n=20) ◀ ∞
nach swim-up	85,78 ±8,97% (n=38) ▲ □	87,00 ±8,65 (n=18) ▶ †	84,70 ±9,34 (n=20) ◀ Ω
Gefroren nativ	59,79 ±13,86% (n=39) ● ▯	67,78 ±10,93 (n=19) ■ ◇	52,20 ±12,09 (n=20) ◆ ∞
Gefroren nach swim-up	69,58 ±12,15% (n=31) ● □	75,31 ±11,10 (n=19) ■ †	60,50 ±7,39 (n=12) ◆ Ω

statistische Auswertung Tab. 4.7: ▲ p <0,01; ● p <0,01; ☐ p <0,01; □ p <0,01; ► p <0,01; ■ p <0,01; ◇ p <0,05; † p <0,01; ◀ p <0,01; ◆ p <0,05; ∞ p <0,01; Ω p <0,01.

4.4.1.2 Vergleich der DNA-Fragmentationsraten in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik

In der fertilen Gruppe beträgt die Anzahl nicht apoptotischer Spermatozoen in den Nativejakulaten durchschnittlich $77,31 \pm 10,25\%$. Nach Aufbereitung mittels swim-up nimmt die Zahl nicht apoptotischer Spermatozoen auf $87,00 \pm 8,65\%$ hoch signifikant zu mit $p < 0,01$. Nach Kryokonservierung zeigt sich durch die Aufbereitung ebenfalls ein statistisch hoch signifikanter Anstieg des Anteils nicht apoptotischer Spermatozoen, von im Mittel $67,78 \pm 10,93\%$ nativ auf $75,31 \pm 11,10\%$ nach swim-up ($p < 0,01$).

Die untersuchten Nativejakulate der subfertilen Gruppe haben eine durchschnittlicher Anzahl von $77,60 \pm 10,26\%$ nicht apoptotischen Spermatozoen. Durch die Aufbereitung vergrößert sich dieser Anteil auf $84,70 \pm 9,34\%$, was mit $p < 0,01$ hoch signifikant ist.

Der Vergleich der gefrorenen subfertilen Proben vor und nach swim-up zeigt eine signifikante Zunahme von $52,20 \pm 12,09\%$ auf $60,50 \pm 7,39\%$ ($p < 0,05$).

Beide Gruppen profitieren von der Aufbereitung durch swim-up, da der Anteil nicht apoptotischer Spermatozoen sowohl der ungefrorenen als auch der gefrorenen Proben signifikant bis hoch signifikant zunimmt. Der Prozentsatz nicht apoptotischer Spermatozoen nimmt in beiden Gruppen nach Aufbereitung ähnlich zu, um durchschnittlich 7,1 bis 9,69%.

Abb. 4.22 DNA-Fragmentationsraten der ungefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up

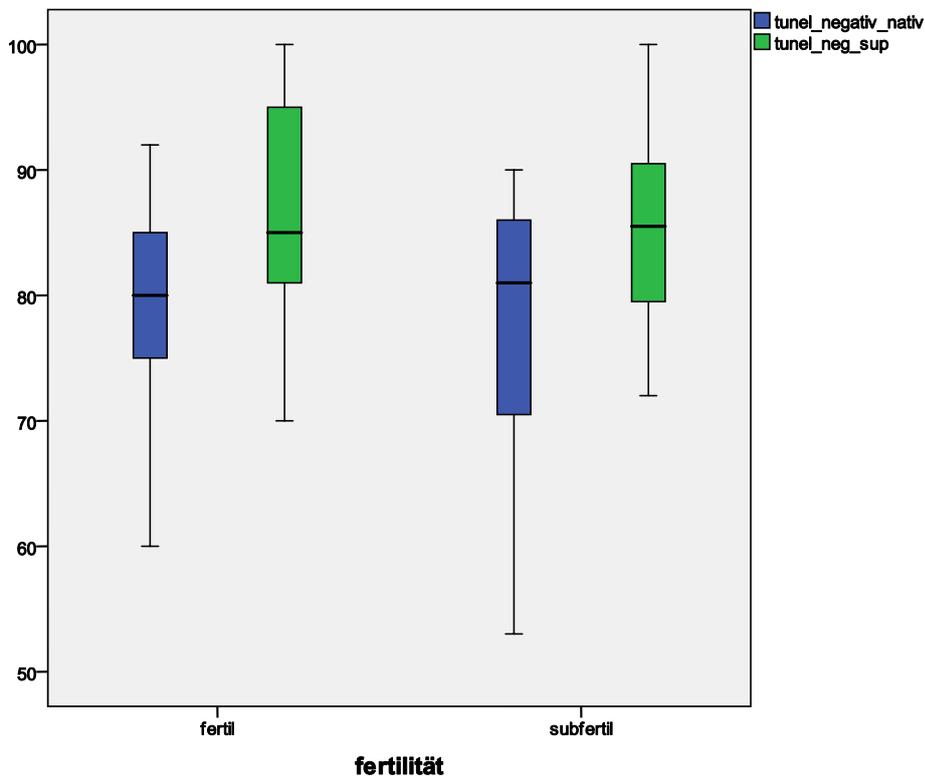
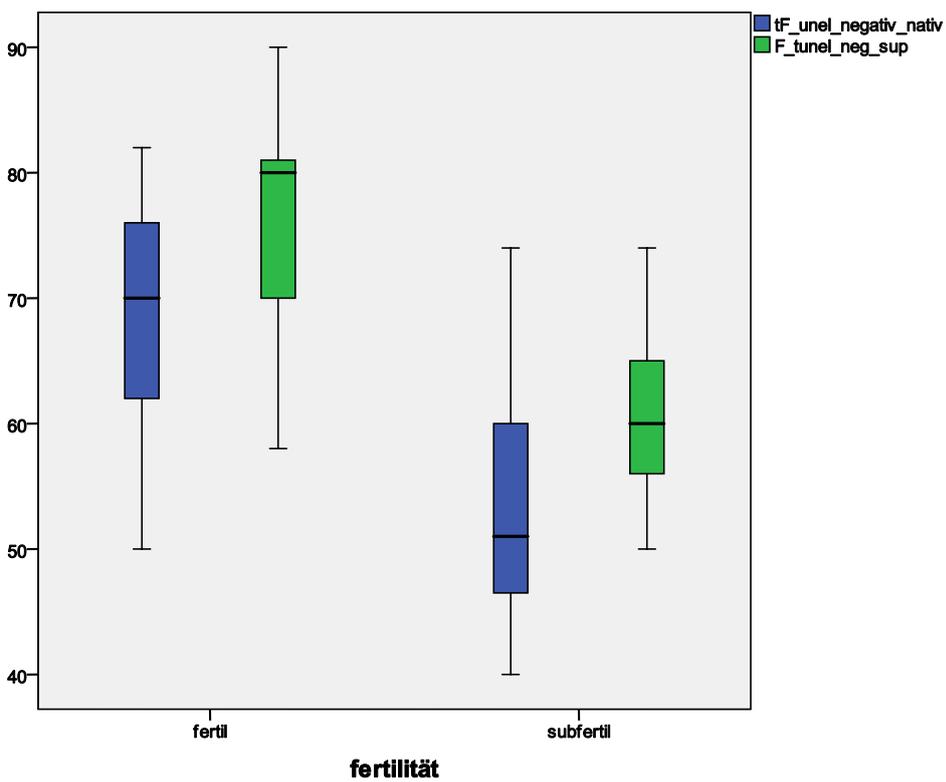


Abb. 4.23 DNA-Fragmentationsraten der gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up



4.4.1.3 Vergleich der DNA- Fragmentationsraten in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

In der fertilen Gruppe verringert sich die Anzahl nicht apoptotischer Spermatozoen nach Kryokonservierung sowohl bei den nativen als auch bei den aufbereiteten Proben.

Die untersuchten Nativejakulate zeigen eine signifikante Abnahme des Anteils nicht apoptotischer Spermatozoen von $77,31 \pm 10,25\%$ vor Einfrieren auf $67,78 \pm 10,93\%$ nach Einfrieren ($p < 0,05$). Bei den aufbereiteten Proben verringert sich der Prozentsatz von $87,00 \pm 8,65\%$ auf $75,31 \pm 11,10\%$ und ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Die untersuchten subfertilen Nativejakulate erfahren durch den Einfrier- und Auftauprozess ebenfalls eine hoch signifikante Abnahme des Anteils nicht apoptotischer Spermatozoen, von $77,60 \pm 10,26\%$ vor Einfrieren auf $52,20 \pm 12,09\%$ nach Einfrieren ($p < 0,01$).

Die aufbereiteten subfertilen Proben haben vor Kryokonservierung durchschnittlich $84,70 \pm 9,34\%$ nicht apoptotische Spermatozoen. Nach Kryokonservierung sind noch $60,50 \pm 7,39\%$ der Spermatozoen nicht in Apoptose befindlich und diese Abnahme ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Die untersuchten fertilen und subfertilen Ejakulate haben im nativen ungefrorenen Zustand eine annähernd gleiche Anzahl nicht apoptotischer Spermatozoen, $77,31 \pm 10,25\%$ in der fertilen Gruppe und $77,60 \pm 10,26\%$ in der subfertilen Gruppe. Durch die Kryokonservierung kommt es in beiden Gruppen bei nativen und aufbereiteten Proben zu einer statistisch signifikanten bis hoch signifikanten Abnahme des Anteils nicht apoptotischer Spermatozoen. In der subfertilen Gruppe ist diese Abnahme stärker, minus $25,4\%$ nativ und minus $24,6\%$ nach swim-up, im Vergleich zur fertilen Gruppe (minus $9,53\%$ und minus $11,69\%$).

Abb. 4.24 DNA-Fragmentationsrate der nativen Proben vor und nach Kryokonservierung

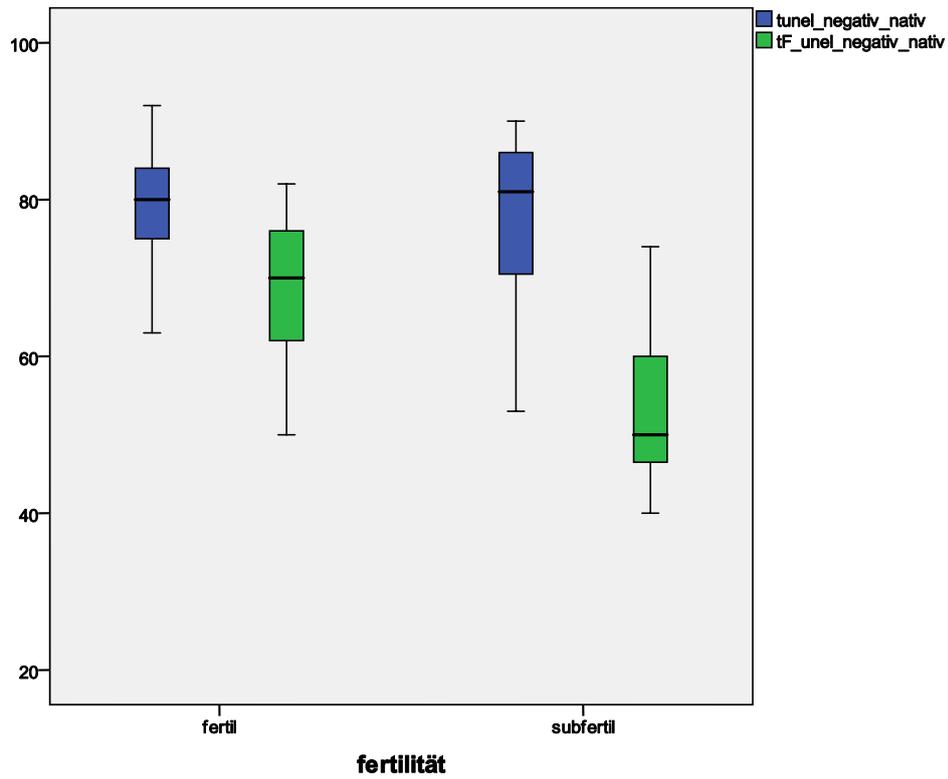
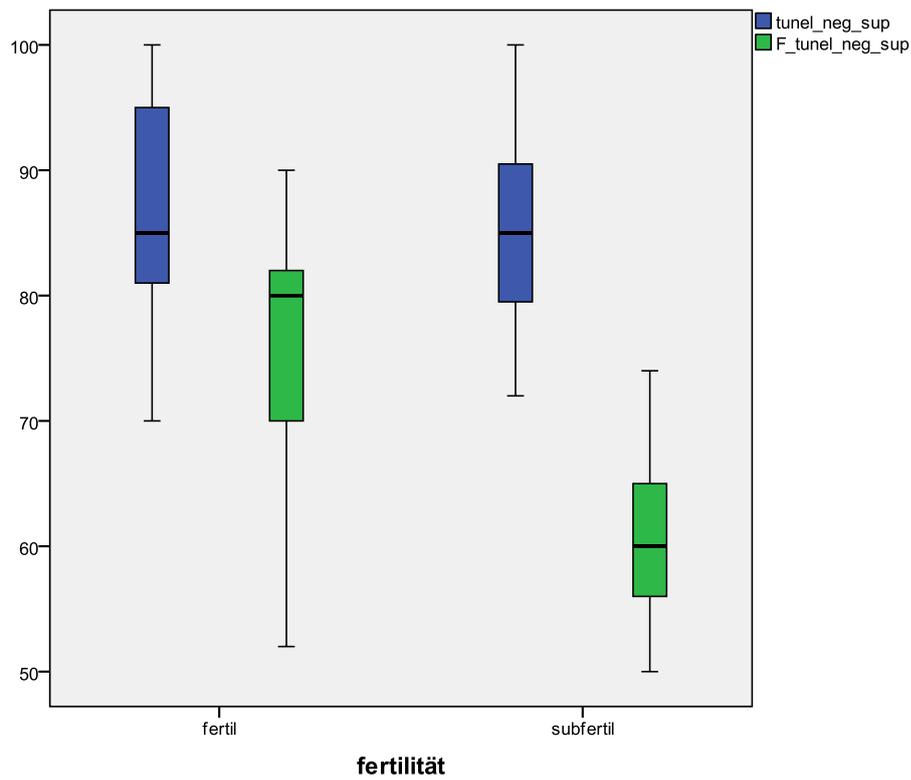


Abb. 4.25 DNA-Fragmentationsrate der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung



4.4.2 Apoptose-/Nekroserate (Annexin/CFDA- Färbung)

Es wurden nur durch swim-up aufbereitete Proben mit Annexin und CFDA gefärbt. Aufgrund ihres Färbeverhaltens sind CFDA positive Spermatozoen definiert als vital, Annexin positive Spermatozoen als nekrotisch und CFDA/Annexin positive Spermatozoen als apoptotisch.

4.4.2.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Insgesamt ist ein großer Prozentsatz der Spermatozoen der Färbung entgangen und konnte somit nicht einer der Gruppen vital, nekrotisch oder apoptotisch zugeordnet werden.

Bei den ungefrorenen aufbereiteten Proben sind im Mittel $19,44 \pm 5,08\%$ der Spermatozoen CFDA positiv und somit vital. Nach Kryokonservierung verringert sich der Anteil vitaler Spermatozoen auf $13,96 \pm 5,03\%$. Annexin positiv und damit definitionsgemäß nekrotisch sind vor Einfrieren $3,18 \pm 2,11\%$ aller Spermatozoen und nach Auftauen noch $2,07 \pm 1,38\%$.

Die Zahl apoptotischer Spermatozoen (CFDA/Annexin positiv) verändert sich von $1,74 \pm 1,19\%$ vor Kryokonservierung auf $0,93 \pm 0,93\%$ danach.

Die Abnahme vitaler Spermatozoen die CFDA positiv sind durch Kryokonservierung ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant. Die Veränderungen beim Vergleich des Anteils nekrotische und apoptotischer Spermatozoen vor und nach Einfrieren sind mit $p > 0,05$ nicht signifikant.

Tab. 4.8 Apoptose-/Nekroserate [in %]

		Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
nach swim-up	- CFDA pos. (=vital) ▲	19,44 ±5,08% (n=27) ▲	18,84 ±4,99 (n=13) ‡	20,00 ±5,29 (n=14) ◄
	- Annexin pos. (=Nekrose) ◆	3,18 ±2,11% (n=27) ◆	3,07 ±2,13 (n=13) ►	3,28 ±2,16 (n=14) Ω
	- CFDA+ Annexin pos. (=Apoptose) ○	1,74 ±1,19% (n=27) ○	1,46 ±1,05 (n=13) ∞	2,00 ±1,30 (n=14) ⌘
Gefroren nach swim-up	- CFDA pos. (=vital) ▲	13,96 ±5,03% (n=26) ▲	15,00 ±5,40 (n=16) ‡	12,30 ±4,11 (n=10) ◄
	- Annexin pos. (=Nekrose) ◆	2,07 ±1,38% (n=26) ◆	2,00 ±1,46 (n=16) ►	2,20 ±1,31 (n=10) Ω
	- CFDA+ Annexin pos. (=Apoptose) ○	0,93 ±0,93% (n=26) ○	0,87 ±1,02 (n=16) ∞	1,00 ±0,81 (n=10) ⌘

statistische Auswertung Tab. 4.8: ▲ p <0,01; ◆ p >0,05; ○ p >0,05; ‡ p >0,05; ► p >0,05; ∞ p >0,05; ◄ p <0,05; Ω p >0,05; ⌘ p >0,05.

4.4.2.2 Vergleich der Apoptose-/Nekroserate in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

In der fertilen Gruppe sind 18,84 ±4,99% der aufbereiteten Spermatozoen CFDA positiv (=vital) und nach Kryokonservierung noch 15,00 ± 5,40%. Der Anteil Annexin positiver (=nekrotisch) Spermatozoen beträgt vor Einfrieren 3,07 ±2,13% und nach Auftauen 2,00

$\pm 1,46\%$. Im Apoptosestadium befindlich, weil Annexin und CFDA positiv, sind $1,46 \pm 1,05\%$ der Spermatozoen vor Kryokonservierung und danach noch durchschnittlich $0,87 \pm 1,02\%$. Diese Abnahme der Prozentsätze ist jedoch mit $p > 0,05$ nicht statistisch signifikant.

In der subfertilen Gruppe sind im Mittel $20,00 \pm 5,29\%$ der aufbereiteten Spermatozoen vital, also CFDA positiv. Nach Kryokonservierung hat der Anteil statistisch signifikant abgenommen auf durchschnittlich $12,30 \pm 4,11\%$ ($p < 0,05$). Annexin positiv sind $3,28 \pm 2,16\%$ der untersuchten subfertilen Proben bevor sie eingefroren wurden und $2,20 \pm 1,31\%$ nach Kryokonservierung ($p > 0,05$). Die Apoptoserate, also CFDA und Annexin positiv, beträgt $2,00 \pm 1,30\%$ und nimmt ab auf $1,00 \pm 0,81\%$ nach Einfrieren und Auftauen. Dies ist jedoch mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant.

In dieser Studie hat die Apoptose- und Nekroserate sowohl in der fertilen und als auch in der subfertilen Gruppe nach Kryokonservierung abgenommen. Diese Verringerung ist jedoch außer in der subfertilen Gruppe bei der Nekroserate statistisch nicht signifikant.

Abb. 4.26 Apoptose-/Nekroserate der ungefrorenen und mittels swim-up aufbereiteten Proben

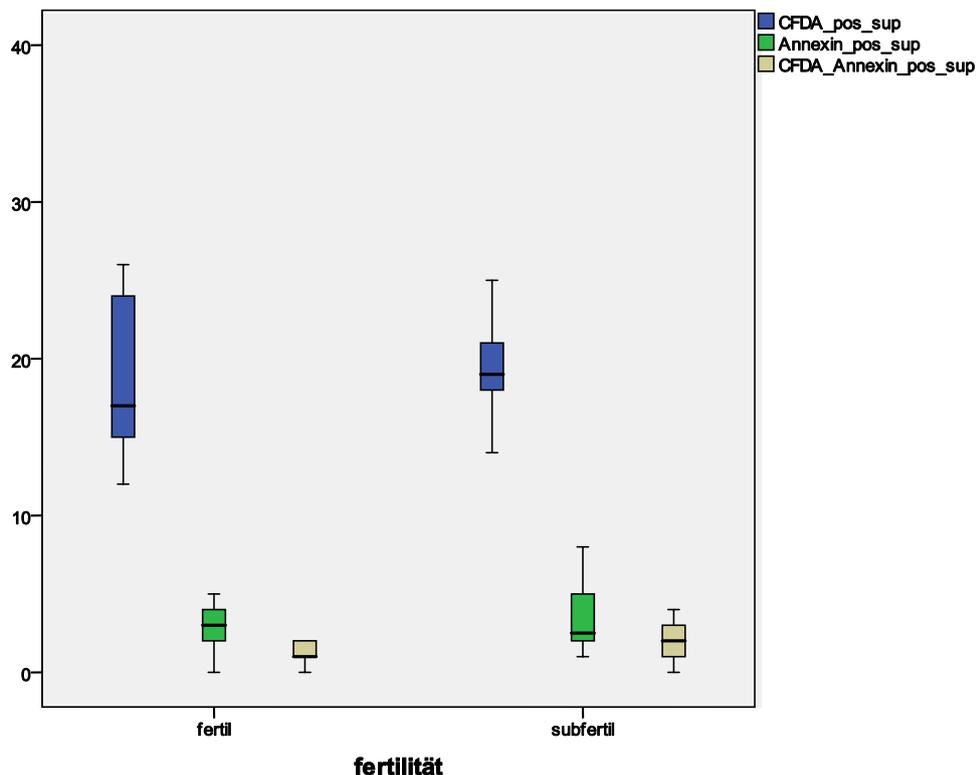


Abb. 4.27 Apoptose-/Nekroserate der gefrorenen und mittels swim-up aufbereiteten Proben

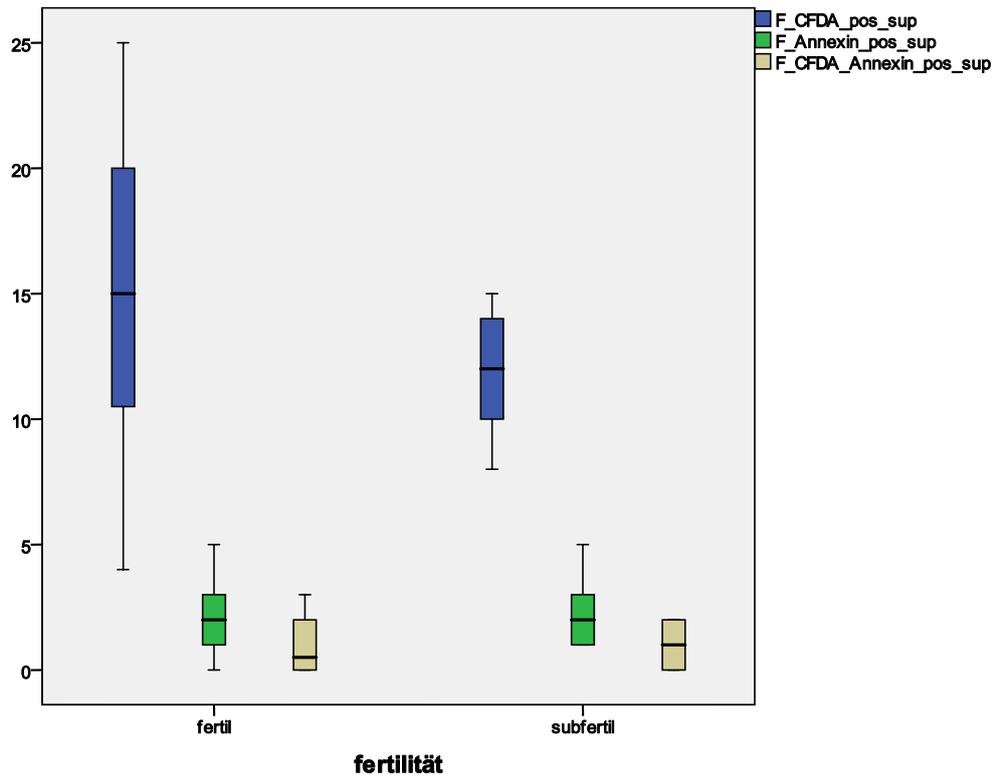


Abb. 4.28 vitale Spermatozoen (CFDA+) vor und nach Kryokonservierung

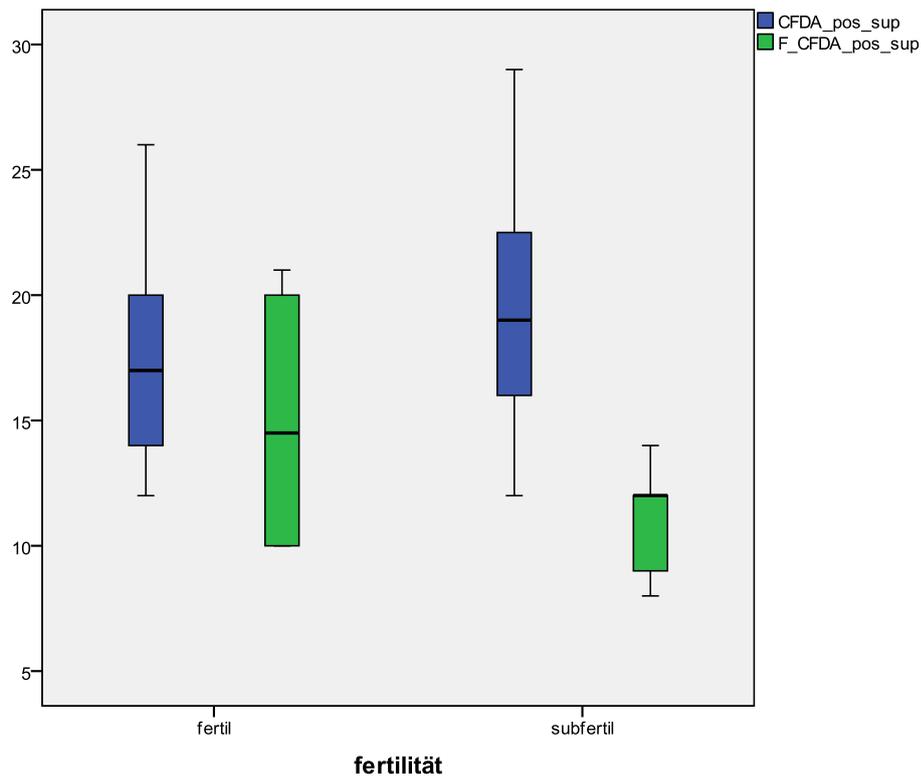


Abb. 4.29 nekrotische Spermatozoen (Annexin+) vor und nach Kryokonservierung

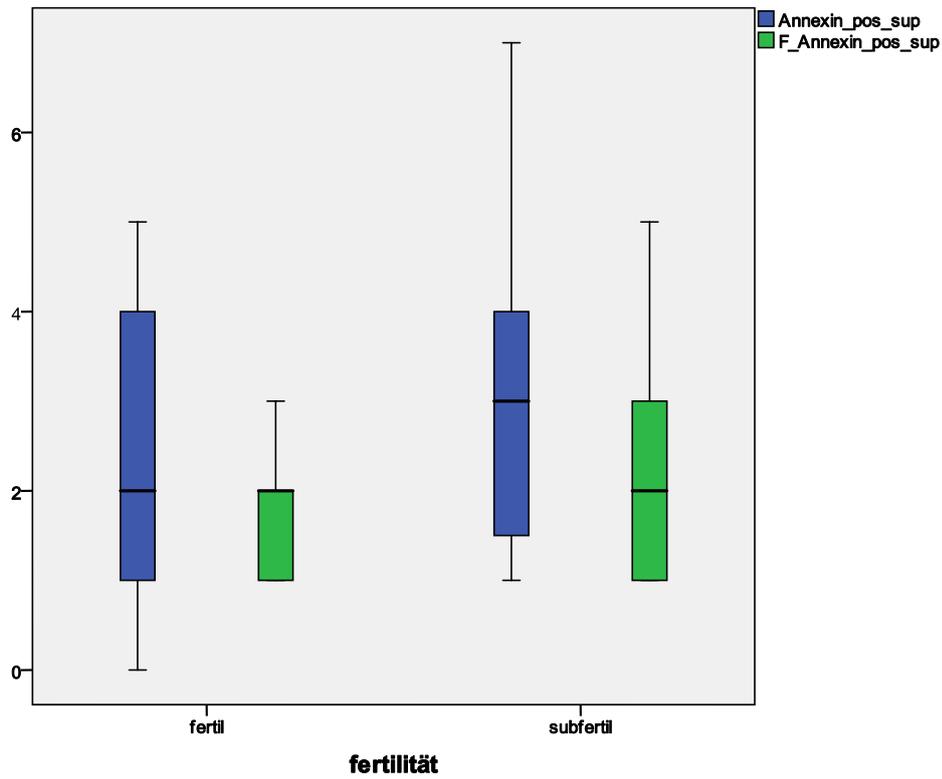
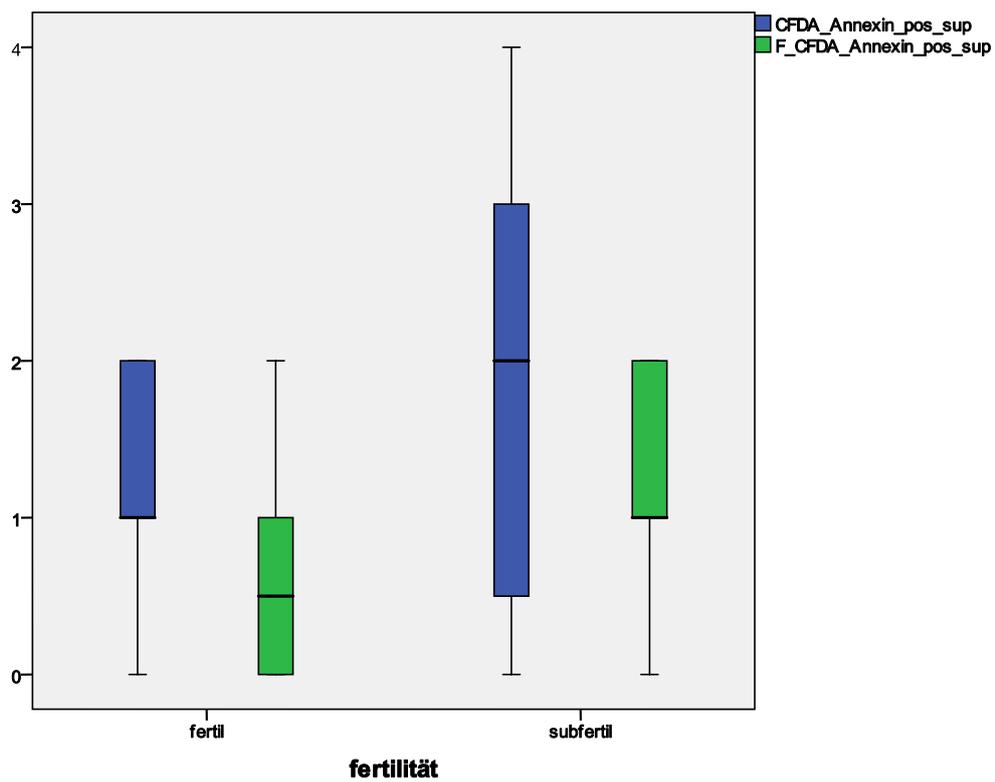


Abb. 4.30 apoptotische Spermatozoen (CFDA+/Annexin+) vor und nach Kryokonservierung



4.5 Einfluss der Aufbereitung und der Kryokonservierung auf die spontane und mittels Ionophore induzierte Akrosomreaktion (Concanavalin A-Lectin- Färbung) unter Berücksichtigung der Fertilität (WHO-Kriterien, 1999)

4.5.1 Akrosomreaktion (Concanavalin-A-Lectin- Färbung)

4.5.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv aller untersuchter Proben

Im Gesamtkollektiv aller untersuchten Proben waren $74,79 \pm 8,13\%$ der nativen Spermatozoen Concanavalin positiv, das heißt die innere Membran ist gefärbt worden und zeigt so an, dass das Akrosom intakt ist. Nach Aufbereitung mittels swim-up steigt der Anteil der Spermatozoen mit intaktem Akrosom auf $78,89 \pm 7,20\%$. Nach Induktion der Akrosomenreaktion durch Ionophore beträgt der Anteil von Spermatozoen mit intaktem Akrosom $45,91 \pm 9,19\%$.

Nach Kryokonservierung der nativen Proben haben nur noch durchschnittlich $57,15 \pm 9,50\%$ der Spermatozoen ein intaktes Akrosom. Die Aufbereitung der gefrorenen Proben lässt diesen Anteil auf $66,30 \pm 6,14\%$ ansteigen. Nach Inkubation der gefrorenen Spermatozoen mit Ionophore beträgt der Anteil mit intaktem Akrosom $45,03 \pm 8,85\%$.

Der Vergleich der nativen, aufbereiteten und mit Ionophore inkubierten Proben zeigt sowohl vor als auch nach Kryokonservierung einen statistisch hoch signifikanten Zusammenhang ($p < 0,01$). Sowohl bei den ungefrorenen als auch bei den gefrorenen Proben steigt durch die Aufbereitung mittels swim-up der Anteil von Spermatozoen mit intaktem Akrosom und die Behandlung mit Ionophore vergrößert erwartungsgemäß den Anteil akrosomenreagierender Spermatozoen.

Durch Kryokonservierung verringert sich der Anteil von Spermatozoen mit intaktem Akrosom und ist bei den nativen und aufbereiteten Proben mit $p < 0,01$ im Vergleich als statistisch hoch signifikant einzustufen. Die geringe Abnahme beim Vergleich der mit Ionophore behandelten Proben vor und nach Einfrieren ist nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 4.9 Akrosomenreaktion [Concanavalin positiv =intaktes Akrosom in %]

	Gesamtkollektiv M ±SD	fertile Proben M ±SD	subfertile Proben M ±SD
Nativ	74,79 ±8,13% (n=39) ▲ Ω	76,52 ±6,20 (n=19) ○ ●	73,15 ±9,49 (n=20) ▶ †
nach swim-up	78,89 ±7,20% (n=37) ▲ †	79,70 ±6,96 (n=17) ○ ▶	78,20 ±7,51 (n=20) ▶ ■
nach Ionophore	45,91 ±9,19% (n=37) ▲ ◀	46,23 ±8,82 (n=17) ○ ¶	45,65 ±9,71 (n=20) ▶ △
Gefroren nativ	57,15 ±9,50% (n=32) ◆ Ω	60,94 ±8,63 (n=18) ‡ ●	52,28 ±8,49 (n=14) ∞ †
Gefroren nach swim-up	66,30 ±6,14% (n=30) ◆ †	69,00 ±5,13 (n=17) ‡ ▶	62,76 ±5,67 (n=13) ∞ ■
Gefroren nach Ionophore	45,03 ±8,85% (n=26) ◆ ◀	44,35 ±9,21 (n=17) ‡ ¶	46,33 ±8,48 (n=9) ∞ △

statistische Auswertung Tab. 4.9: ▲ p <0,01; ◆ p <0,01; ○ p <0,01; ‡ p <0,01; ▶ p <0,01; ∞ p <0,01; Ω p <0,01; † p <0,01; ◀ p >0,05; ● p <0,01; ▶ p <0,01; ¶ p >0,05; † p <0,01; ■ p <0,01; △ p >0,05.

4.5.1.2 Vergleich der spontanen Akrosomenreaktion in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Aufbereitung mittels swim-up Technik und der mittels Ionophore induzierten Akrosomreaktion

In der fertilen Gruppe beträgt der Anteil von Spermatozoen mit intaktem Akrosom im Mittel 76,52 ±6,20%. Nach Aufbereitung durch swim-up nimmt dieser Anteil auf 79,70 ±6,96% zu. Die Inkubation mit Ionophore verringert die Rate von Spermatozoen mit intaktem Akrosom auf durchschnittlich 46,23 ±8,82%. Der Zusammenhang zwischen den nativen, den mit swim-

up aufbereiteten und mit Ionophore behandelten Spermatozoen in der fertilen Gruppe ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Nach Kryokonservierung sind $60,94 \pm 8,63\%$ der nativen Spermatozoen mit intaktem Akrosom ausgestattet. Die Aufbereitung der gefrorenen Proben lässt die Rate intakter Akrosomenkappen auf $69,00 \pm 5,13\%$ zunehmen. Nach Induktion der Akrosomenreaktion mittels Ionophore haben nur noch $44,35 \pm 9,21\%$ der Spermatozoen ein intaktes Akrosom. Auch hier ist der Zusammenhang zwischen den drei Gruppen statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$).

$73,15 \pm 9,49\%$ der nativen Spermatozoen haben in der subfertilen Gruppe ein intakte Akrosom. Nach swim-up sind es $78,20 \pm 7,51\%$ und nach Ionophore $45,65 \pm 9,71\%$. Diese Zunahme nach Aufbereitung und Abnahme nach Induktion der Akrosomenreaktion hängt mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant zusammen.

Nach Kryokonservierung beträgt die Rate von Spermatozoen mit intaktem Akrosom im Mittel $52,28 \pm 8,49\%$. Die Aufbereitung der gefrorenen Proben lässt diesen Anteil auf $62,76 \pm 5,67\%$ steigen und durch die Behandlung mit Ionophore nimmt der Anteil auf $46,33 \pm 8,48\%$ ab. Mit $p < 0,01$ ist dieser Zusammenhang statistisch hoch signifikant.

In der fertilen Gruppe haben mit $76,52 \pm 6,20\%$ mehr Spermatozoen ein intaktes Akrosom im Vergleich zur subfertilen Gruppe ($73,15 \pm 9,49\%$). In beiden Gruppen steigt der Anteil mit intaktem Akrosom nach Aufbereitung mittels swim-up, in der subfertilen Gruppe ist die Zunahme mit plus $5,05\%$ höher als in der fertilen Gruppe mit plus $3,18\%$. Durch die Induktion der Akrosomenreaktion mit Ionophore haben in der fertilen Gruppe $30,29\%$ weniger Spermatozoen ein intaktes Akrosom, in der subfertilen Gruppe ist die Abnahme mit minus $27,5\%$ geringer.

Abb. 4.31 Akrosomenstatus der ungefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up und nach Ionophore

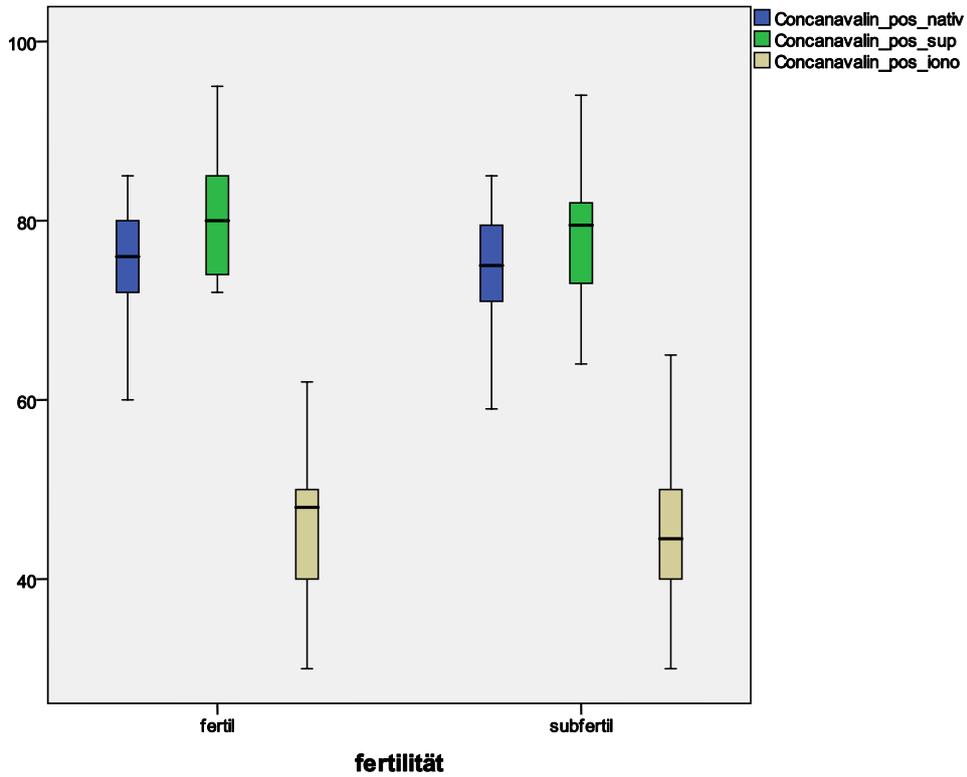
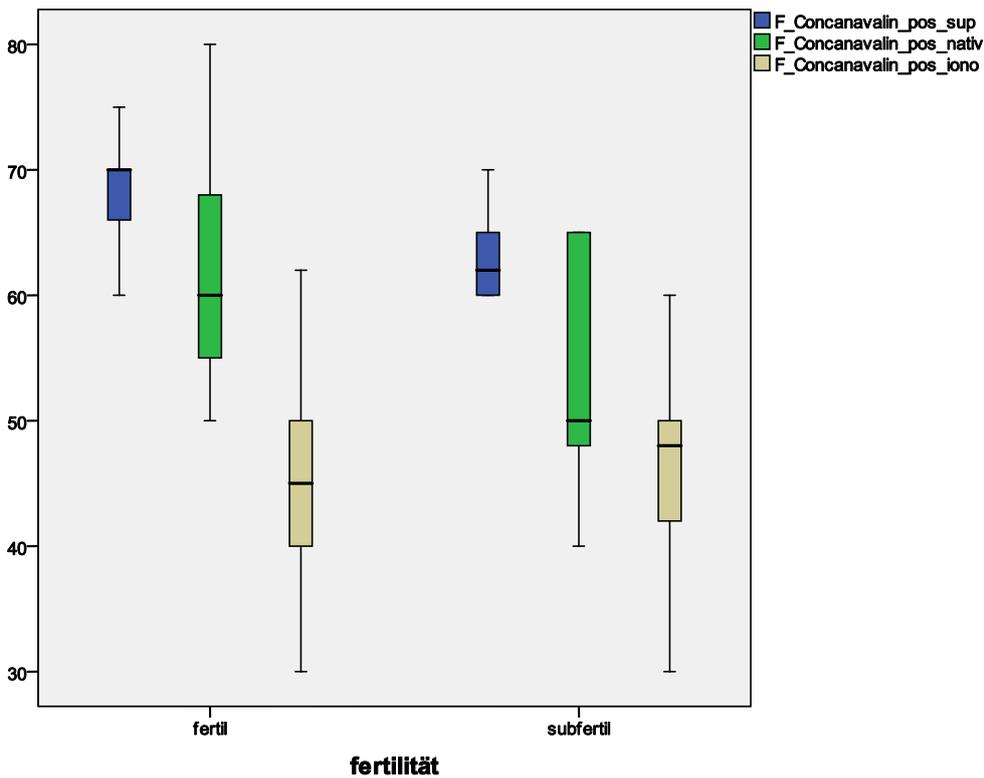


Abb. 4.32 Akrosomenstatus der gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung mittels swim-up und nach Ionophore



4.5.1.3 Vergleich des Akrosomenstatus in der fertilen und subfertilen Gruppe vor und nach Kryokonservierung

In der fertilen Gruppe sind vor Kryokonservierung $76,52 \pm 6,20\%$ der nativen Spermatozoen mit einem intaktem Akrosom ausgestattet und nach Frieren und Auftauen $60,94 \pm 8,63\%$.

Diese Abnahme ist mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant. Der Zusammenhang zwischen den aufbereiteten Proben mit $79,70 \pm 6,96\%$ vor Einfrieren und $69,00 \pm 5,13\%$ nach Einfrieren ist ebenfalls statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$). Die mit Ionophore inkubierten Proben haben im ungefrorenen Zustand einen Anteil von durchschnittlich $46,23 \pm 8,82\%$ Spermatozoen mit intaktem Akrosom. Nach Kryokonservierung ist dieser Anteil mit $44,35 \pm 9,21\%$ etwas geringer, aber es besteht kein statistisch relevanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

In der subfertilen Gruppe nimmt der Prozentsatz von Spermatozoen mit intaktem Akrosom sowohl bei den nativen als auch bei den mit swim-up aufbereiteten Proben durch die Kryokonservierung ab. Bei den nativen Proben von $73,15 \pm 9,49\%$ auf $52,28 \pm 8,49\%$ und bei den aufbereiteten Proben von $78,20 \pm 7,51\%$ auf $62,76 \pm 5,67\%$. In beiden Fällen besteht ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang mit $p < 0,01$. Bei den mit Ionophore behandelten Proben kommt es nach Kryokonservierung zu einem geringen Anstieg des Anteils von Spermatozoen mit intaktem Akrosom, von $45,65 \pm 9,71\%$ auf $46,33 \pm 8,48\%$. Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$).

Der Vergleich der fertilen mit der subfertilen Gruppe zeigt, dass die subfertilen Proben durch die Kryokonservierung eine stärkere Abnahme des Anteils von Spermatozoen mit intaktem Akrosom erfahren. Bei den nativen Proben beträgt die Abnahme in der subfertilen Gruppe durchschnittlich minus $20,87\%$ (minus $15,58\%$ in der fertilen Gruppe) und bei den aufbereiteten Proben minus $15,44\%$ (minus $10,7\%$ in der fertilen Gruppe). Die mit Ionophore behandelten Proben zeigen sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe durch die Kryokonservierung keine nennenswerte Veränderung des Prozentsatzes von Spermatozoen mit intaktem Akrosom (minus $1,88\%$ in der fertilen Gruppe und plus $0,68\%$ in der subfertilen Gruppe).

Abb.4.33 Akrosomenstatus der nativen Proben vor und nach Kryokonservierung

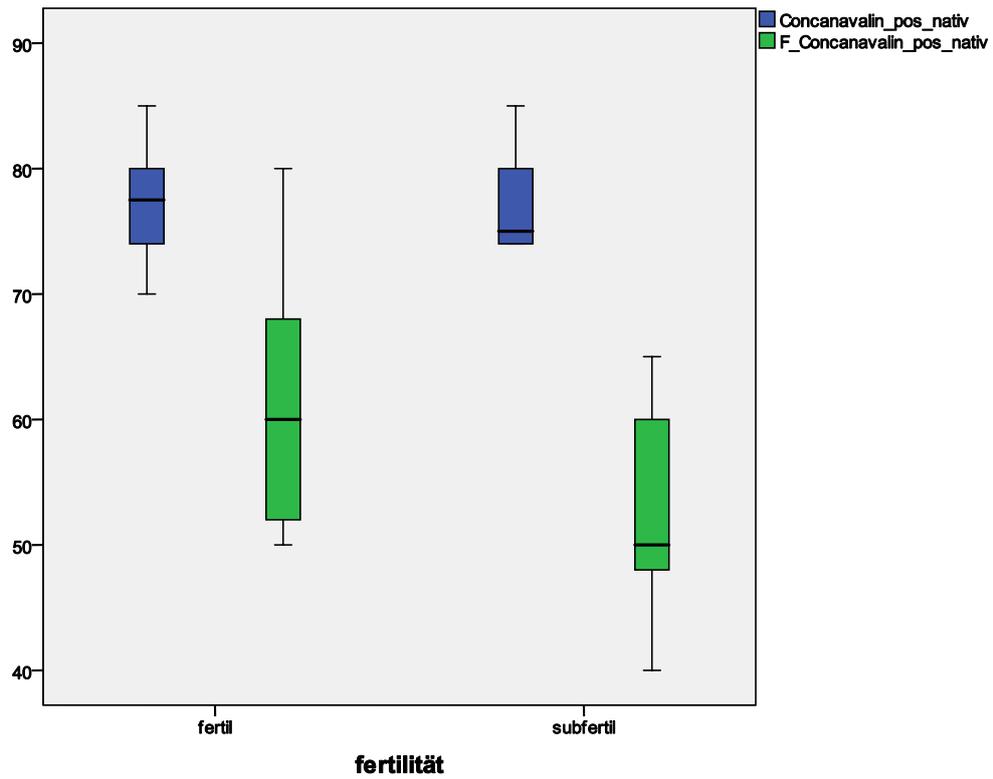


Abb.4.34 Akrosomenstatus der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung

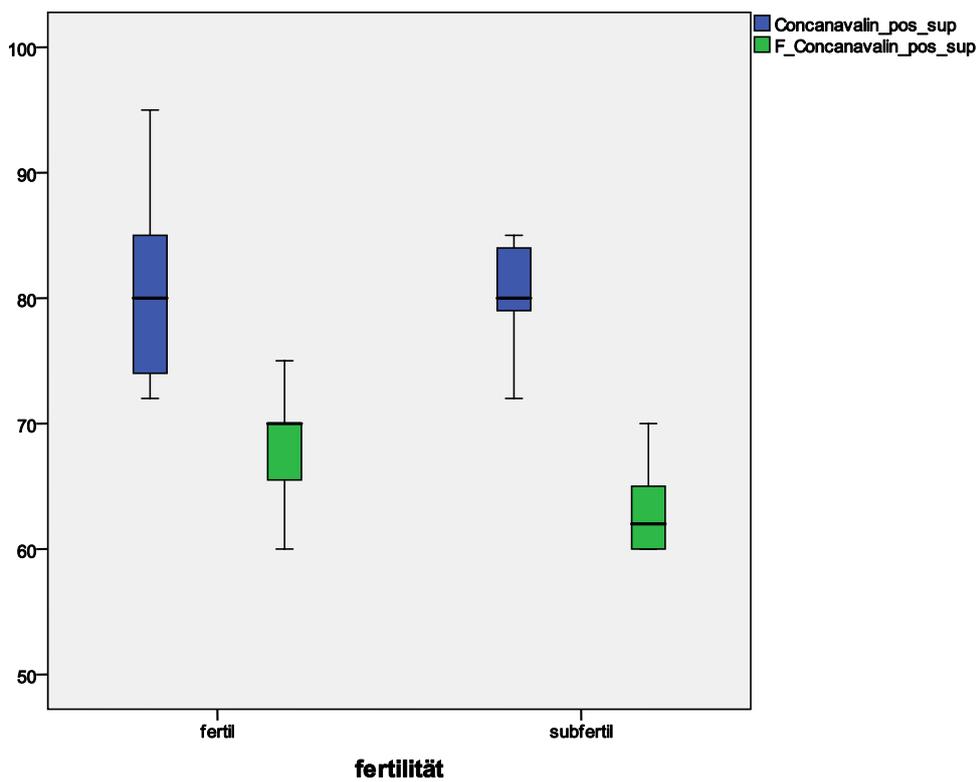
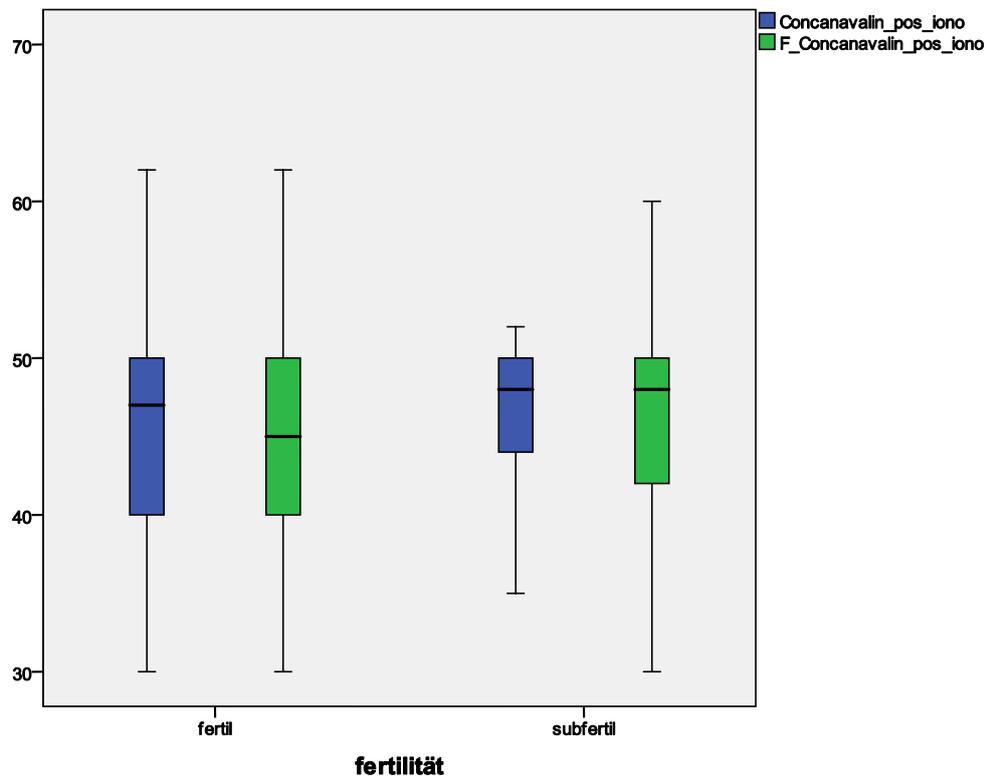


Abb.4.35 Akrosomenstatus der mit Ionophore behandelten Proben vor und nach Kryokonservierung



5. Diskussion

5.1 Einfluss der Aufbereitung und Kryokonservierung auf die untersuchten andrologischen Parameter mit und ohne Berücksichtigung der Fertilität

Nach World Health Organisation (WHO, 1999) ist die konventionelle Spermienanalyse bei der das Ejakulatvolumen, die Spermiedichte, -motilität und morphologie bestimmt wird die wichtigste klinische Laboruntersuchung zur Diagnose einer männlichen Infertilität (WHO, 1999). In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Aufbereitung und Kryokonservierung auf die klassischen Parameter der Spermienanalyse und einige andere ausgesuchte Spermienfunktionstests sowohl bei fertilen als auch subfertilen Spermaproben untersucht. Die schädigenden Auswirkungen des Einfrier-Auftau-Prozesses sind dabei schon lange Zeit in der Forschung der Kryokonservierung bekannt (CRISTER et al., 1987 und 1988; YOSHIDA et al., 1990) und kryokonservierte Spermatozoen verfügen über ein reduziertes Fertilisationspotential (DONNELLY et al., 2001; ANGER et al., 2003). Ebenfalls bekannt ist die Tatsache, dass die Aufbereitung mittels swim-up zu einer Selektion von Spermatozoen führt (HORVATH et al., 1989; CARRERAS et al., 1990; MARTI et al., 1996). Insgesamt muss man bedenken, dass alle Untersuchungen und Funktionstests dieser Studie in vitro gemacht wurden. Damit können sie natürlich nicht exakt die in vivo Bedingungen widerspiegeln und unterliegen dem Einfluss der Aufbereitung, die unter anderem durch häufiges Pipettieren und Zentrifugieren gekennzeichnet ist. Einige Studien deuten darauf hin, dass die Funktionalität der Spermatozoen durch Zentrifugation beeinflusst wird und somit die Ergebnisse der Funktionstests auch schlechter ausfallen könnten als in vivo (ALVAREZ et al., 1993; TWIGG et al., 1998).

5.1.1 Einfluss auf die Dichte

Die Ausgangsdichten der fertilen und subfertilen Gruppe unterscheiden sich erwartungsgemäß deutlich voneinander. Durchschnittlich 88,42 Mio. Spermien/ml weisen die fertilen Proben auf und 56,87 Mio. Spermien/ml die subfertilen Proben. Der Korrelation zwischen Spermienkonzentration im Ejakulat und Fertilisationspotential ist einer der am besten untersuchten Parameter und gehört zu den Grundlagen der Sterilitätsdiagnostik (DAVID et

al., 1979; SILBER, 1989; GUZICK et al., 2001; HAMMADEH et al., 2003; NALLELLA et al., 2006).

Bei der Aufbereitung mittels swim-up werden die motileren Spermatozoen, die nach waschen, zentrifugieren und Inkubationszeit in den Überstand geschwommen sind selektiert und das aus überwiegend unbeweglichen Spermatozoen, anderen Zellen und Detritus bestehende Pellet verworfen. Somit ist die logische Konsequenz, dass die Gesamtspermienkonzentration durch swim-up abnimmt.

In dieser Studie kam es in beiden Gruppen durch die Aufbereitung sowohl der ungefrorenen als auch der gefrorenen Proben zu einer deutlichen statistisch hoch signifikanten Reduktion der Spermiedichte (72,24 Mio./ml vor Aufbereitung versus 27,52 Mio./ml nach swim up sowie bei den gefrorenen Proben 42,21 Mio./ml vor und 3,20 Mio./ml nach swim-up; siehe Tab. 4.1, Abb. 4.1 und 4.2). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die durch die Aufbereitung bedingte Spermienkonzentrationsabnahme in der fertilen Gruppe ausgeprägter ist (fertile Gruppe: minus 49,16 Mio./ml vor Einfrieren und minus 45,53 Mio./ml nach Einfrieren, subfertile Gruppe: minus 40,50 Mio./ml vor und 32,85 Mio./ml nach Einfrieren; siehe Tab. 4.2 und 4.3).

Schon 1989 berichtete HORVATH von einer Konzentrationsabnahme nach Waschen und swim-up und stellte fest, dass der Anteil motiler Spermatozoen durch diese Methode erhöht werden konnte. Zu denselben Feststellungen kamen auch CARRERAS 1990 und PRYOR et al. 2001.

Durch die Kryokonservierung kommt es ebenfalls zu einer deutlichen und statistisch hoch signifikanten Konzentrationsabnahme in den untersuchten nativen und aufbereiteten Proben beider Gruppen (fertile Gruppe: nativ 88,42 Mio./ml vor und 49,00 Mio./ml nach Einfrieren, nach swim-up 39,26 Mio./ml vor und 3,47 Mio./ml nach Einfrieren; subfertile Gruppe: nativ 56,87 Mio./ml vor und 35,76 Mio./ml nach Einfrieren, nach swim-up 16,37 Mio./ml vor und 2,91 Mio./ml nach Einfrieren; siehe Tab. 4.4 und 4.5, Abb.4.3 und 4.4).

In der Geschichte der Kryokonservierung ist schon sehr früh bekannt, dass der Prozess des Einfrierens und Auftauens zu Schäden an lebenden Zellen führt. Durch Kristallisation, osmotische Differenzen und pH-Wert Änderungen, wie sie bei den damit verbundenen Temperaturänderungen auftreten, kann es zum Zerreißen von Plasmamembranen und damit Absterben der Zelle kommen (MAZUR, 1970).

5.1.2 Einfluss auf die Motilität

Da die Motilität der Spermatozoen ebenso wie die Dichte ein Kriterium für die Einteilung (nach WHO, 1999) der untersuchten Proben in die fertile oder subfertile Gruppe war, unterscheiden auch diese sich deutlich voneinander. In der fertilen Gruppe weisen 63,93% der Spermatozoen eine gerichtete Beweglichkeit (progressiv und global) auf und nur 13,94% sind unbeweglich. Der Anteil der Spermatozoen mit gerichteter Vorwärtsbewegung beträgt in der subfertilen Gruppe lediglich 22,5% und durchschnittlich 62% der untersuchten Spermatozoen waren immotil.

Durch die Aufbereitung mittels swim-up konnte in der fertilen Gruppe sowohl bei den gefrorenen als auch bei den ungefrorenen Proben eine statistisch hoch signifikante Zunahme der progressiv beweglichen Spermatozoen beobachtet werden (ungefrorene Proben: 21,57% progressive Motilität vor Aufbereitung und 45,78% nach swim-up, gefrorenen Proben: 7,10% vor und 28,15% nach Aufbereitung; siehe Tab. 4.7). Der Anteil global und stationär beweglicher Spermatozoen verringerte sich dafür signifikant (ungefrorene Proben: 42,36% globale Motilität vor und 26,57% nach Aufbereitung, 22,63% stationäre Motilität vor und 13,68% nach Aufbereitung, gefrorenen Proben: 28,15% globale Motilität vor und 24,47% nach Aufbereitung, 34,21% stationäre Motilität vor und 15,78% nach Aufbereitung; siehe Tab. 4.7). Bei den unbeweglichen Spermatozoen konnte keine relevante Veränderung gesehen werden (ungefrorenen Proben: 13,94% immotile Spermatozoen vor und 14,21% nach Aufbereitung, gefrorenen Proben: 30,52% immotile Spermatozoen vor und 32,10% nach Aufbereitung; siehe auch Tab. 4.7).

In der subfertilen Gruppe kommt es durch die Aufbereitung der ungefrorenen Proben ebenfalls zu einer statistisch hoch signifikanten Zunahme der progressiv beweglichen Spermatozoen (4,75% Spermatozoen mit progressiver Motilität vor Aufbereitung versus 26,00% nach swim-up; siehe Tab.4.8). Bei den unbeweglichen Spermatozoen dagegen ist eine hoch signifikante Abnahme durch die Aufbereitung der ungefrorenen Proben festzustellen (62,00% immotile Spermatozoen vor Aufbereitung und 34,25% nach Aufbereitung; siehe Tab. 4.8). Die Aufbereitung der gefrorenen subfertilen Proben führt zu keinen signifikanten Veränderungen in der Motilität (siehe auch Tab.4.8).

Zahlreiche Studien haben sich mit den verschiedenen Aufbereitungsmethoden für humane Spermatozoen beschäftigt und diese miteinander verglichen (ENGLERT et al., 1992; SANCHEZ et al., 1994; SHALIKA et al., 1995). Es besteht überall Einigkeit darüber, dass eine Aufbereitung mit der swim-up –Technik, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde,

zu einer Erhöhung des Anteils motiler Spermatozoen führt (HAMMADEH et al., 1998; CARRERAS et al., 1990). Die Ausbeute an motilen Spermatozoen ist jedoch nur submaximal, da nicht alle motilen Spermatozoen aus den tieferen Schichten des Pellets die Möglichkeit haben an die Oberfläche und in das Kulturmedium zu gelangen.

Der Zusammenhang zwischen Motilität und Fertilisationspotential der Spermatozoen wird in verschiedenen Studien unterschiedlich bewertet. Sicher ist, dass in vivo neben dem passiven Transport im Uterus eine gewisse Eigenmotilität der Spermatozoen nötig ist um durch den Zervikalmucus und den weiblichen Genitaltrakt bis zur Eizelle zu gelangen. Dort ist wiederum ein bestimmtes Bewegungsmuster erforderlich zur Cumulus- und Zonapenetration (BEDFORD, 1983; KATZ et al., 1993). HORVATH et al. (1989) TOMLINSON et al. (1996) und GUZICK et al. (2001) konnten eine positive Korrelation zwischen Motilität und erfolgreicher Befruchtung erkennen. Im Gegensatz dazu stellten LIU et al. (1989; 1992a) und ZAINI et al (1985) nur geringe Korrelation der Motilität mit der Fertilisation einmal in vitro und einmal in vivo fest. Dies liegt unter anderem daran, dass für assistierte Reproduktionstechniken wie ICSI die Motilität des einzelnen Spermiums keine Rolle spielt und der natürliche Selektionsweg umgangen wird.

Durch die Kryokonservierung kommt es zu einer Verschlechterung der Motilität der Spermatozoen als Folge des physikalischen und chemischen Stresses, der nahezu alle Zellstrukturen schädigen kann (SAWETAWAN et al., 1993; AGCA & CRITSER 2002; ROFEIM et al., 2001; NALLELLA et al., 2004). Dies konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls bestätigt werden. Sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe kommt es zu signifikanten bis hoch signifikanten Abnahmen des Anteils motiler Spermatozoen, insbesondere der progressiv beweglichen Spermatozoen (fertile Gruppe: 21,57% progressive Motilität in den nativen Proben vor Kryokonservierung versus 7,10% nach Kryokonservierung, 42,36% globale Motilität in den nativen Proben vor und 28,15% nach Kryokonservierung, 45,78% progressive Motilität der aufbereiteten Proben vor Kryokonservierung versus 28,15% nach Auftauen, 26,57% globale Motilität in den aufbereiteten Proben vor Kryokonservierung und 24,47% nach Kryokonservierung; siehe Tab. 4.9), (subfertile Gruppe: 4,75% progressive Motilität in den nativen Proben vor Kryokonservierung versus 0,75% nach Kryokonservierung, 17,75% globale Motilität in den nativen Proben vor und 5,50% nach Kryokonservierung, 26,00% progressive Motilität der aufbereiteten Proben vor Kryokonservierung versus 6,17% nach Auftauen, 28,50% globale Motilität in den aufbereiteten Proben vor Kryokonservierung und 8,82% nach Kryokonservierung; siehe Tab. 4.10). Diese relative Abnahme des Anteils progressiv und

global motiler Spermatozoen bedingt natürlich die relative Zunahme des prozentualen Anteils stationär beweglicher und immotiler Spermatozoen, der in beiden Gruppen signifikant bis hoch signifikant ist (fertile Gruppe: 22,63% stationär bewegliche Spermatozoen in den nativen Proben vor Kryokonservierung versus 34,21% nach Kryokonservierung, 13,94% immotile native Spermatozoen vor dem Einfrieren und 30,52% nach Kryokonservierung, 13,68% stationär bewegliche Spermatozoen in den ungefrorenen aufbereiteten Proben versus 15,78% nach Kryokonservierung, 14,21% immotile Spermatozoen in den aufbereiteten Proben vor Einfrieren und 32,10% nach Kryokonservierung; siehe Tab.4.9), (subfertile Gruppe: 15,00% stationär bewegliche Spermatozoen in den nativen Proben vor Kryokonservierung versus 20,00% nach Kryokonservierung, 62,00% immotile native Spermatozoen vor dem Einfrieren und 72,75% nach Kryokonservierung, 12,25% stationär bewegliche Spermatozoen in den ungefrorenen aufbereiteten Proben versus 19,41% nach Kryokonservierung, 34,25% immotile Spermatozoen in den aufbereiteten Proben vor Einfrieren und 66,17% nach Kryokonservierung; siehe Tab.4.10).

5.1.3 Einfluss auf die Vitalität und Membranintegrität

Mit dem HOS-Test und der Eosin-Färbung lässt sich eine Aussage über die Vitalität der untersuchten Spermatozoen treffen (VAN DER SAFFELEN et al., 1992). Der Eosinfarbstoff wird nur durch Zellen aufgenommen deren Zellmembran geschädigt ist und damit nicht mehr als Barriere fungieren kann. Somit gibt diese einfach durchzuführende Färbung Aufschluss über die Membranintegrität und Vitalität der Spermatozoen. Beim HOS-Test wird die Funktionsfähigkeit der Plasmamembran, deren Integrität und damit auch die Vitalität der Spermatozoen untersucht (SCHRADER et al., 1983). Ein Anschwellen des Spermienschwanzes unter hypoosmotischen Bedingungen zeigt bei diesem Test die funktionierende semipermeable Plasmamembran an. Viele Studien haben sich bereits mit dem HOS-Test als prädiktiven Wert für den Erfolg von intrauterinen Inseminationen beschäftigt und konnten einen positiven Zusammenhang feststellen (OMBELET et al., 1997; CHECK et al., 2002; TARTAGNI et al., 2002).

In der untersuchten fertilen Gruppe konnten mit dem Eosin-Test deutlich mehr vitale Spermien mit intakter Membran gefunden werden im Vergleich zur subfertilen Gruppe (72,36% versus 45,85%). Durch die Kryokonservierung hat erwartungsgemäß der Anteil der vitalen Spermatozoen in beiden Gruppen abgenommen, allerdings war dieser Zusammenhang

nur in der fertilen Gruppe auch statistisch hoch signifikant (in der fertilen Gruppe 72,36% vitale Spermatozoen vor Kryokonservierung versus 66,75% nach Kryokonservierung, in der subfertilen Gruppe 45,85% vitale Spermatozoen vor und 42,70% vitale Spermatozoen nach Einfrieren. siehe Tab. 4.12 und 4.13).

Die Untersuchungen mit dem HOS-Test haben ergeben, dass sich durch die Aufbereitung der ungefrorenen Proben der Anteil von Spermatozoen mit intakter Plasmamembran in der fertilen und subfertilen Gruppe erhöht (fertile Gruppe: 72,36% intakte Spermatozoen vor und 75,88% nach Aufbereitung; subfertile Gruppe: 77,00% vor Kryokonservierung versus 84,85% nach Kryokonservierung. siehe Tab. 4.15 und 4.16). In der subfertilen Gruppe war diese Verbesserung sogar statistisch hoch signifikant. Die Aufbereitung der gefrorenen Proben hat nur in der subfertilen Gruppe zu einem höheren Anteil HOS-positiver Spermatozoen geführt (59,61% vor versus 64,00% nach Aufbereitung) und diese Verbesserung war ebenfalls statistisch hoch signifikant (siehe Tab. 4.15 und 4.16).

Wie bereits in den Studien von CRISTER et al. (1987 und 1988) und YOSHIDA et al. (1990) beschrieben wirkt sich der Einfrier- und Auftauprozess negativ auf die Membranintegrität und –funktionsfähigkeit aus. In beiden Gruppen konnte nach Kryokonservierung ein geringerer Anteil vitaler Spermatozoen nachgewiesen werden mit dem HOS-Test. In der subfertilen Gruppe ist diese Reduktion der Vitalität im Vergleich zur fertilen Gruppe noch ausgeprägter und statistisch hoch signifikant (fertile Gruppe: 72,36% native intakte Spermatozoen vor Kryokonservierung und 70,15% nach Kryokonservierung, 75,88% intakte Spermatozoen in den aufbereiteten Proben vor und 69,64% nach Einfrieren; siehe Tab. 4.17. subfertile Gruppe: 77,00% native intakte Spermatozoen vor Kryokonservierung und 59,61% nach Kryokonservierung, 84,85% intakte Spermatozoen in den aufbereiteten Proben vor und 64,00% nach Einfrieren; siehe Tab. 4.18).

5.1.4 Einfluss auf die Morphologie

Die Morphologie der Spermatozoen und ihre Bedeutung ist schon lange Gegenstand zahlreicher unterschiedlicher Studien. Dabei wird die Morphologie allgemein als ein guter Parameter für das Fertilisationspotential angesehen (ROGERS et al., 1983; BOSTOFTE et al., 1985). Auch konnten zahlreiche Autoren eine Korrelation mit IUI- Erfolgen nachweisen (BURR et al., 1996; MENKVELD et al., 2001; GUZICH et al., 2001; LEE et al., 2002). Beim Vergleich von Spermatozoenproben mit wenigen morphologisch normalen Spermatozoen und

Proben mit normaler Morphologie konnten GROW et al. (1995) in IVF-Programmen gleiche Fertilisierungsraten feststellen, jedoch höhere Schwangerschaftsraten bei den Proben mit normaler Morphologie erzielen. Daraus wurde geschlossen, dass morphologisch nicht regelrechte Spermatozoen zwar die Eizelle befruchten können, aber das reproduktive Potential geringer ist. Die in vivo Situation ist dagegen sehr viel schwieriger nachzuvollziehen und die Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der Morphologie weniger klar (HAMMADEH et al., 2008).

Auch der Einfluss der Aufbereitung von Spermatozoenproben auf deren Morphologie wurde bereits im Rahmen mehrerer Studien untersucht (ANDOLZ et al., 1987; LELANOU & BLANCHARD, 1988; ENGLERT et al., 1992). Die darin festgestellte verbesserte Morphologie nach Aufbereitung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. In der fertilen und subfertilen Gruppe konnte durch Aufbereitung der ungefrorenen Proben mittels swim-up eine Zunahme morphologisch normal geformter Spermatozoen festgestellt werden, die jedoch mit $p > 0,05$ statistisch nicht signifikant war (fertile Gruppe: nativ 42,58% normal geformte Spermatozoen, nach swim-up 48,53%; subfertile Gruppe: nativ 44,31% normal geformte Spermatozoen, nach swim-up 50,31%. Siehe Tab.4.20 und 4.21). Bei den gefrorenen Proben konnte nur in der fertilen Gruppe eine signifikant verbesserte Morphologie nach Aufbereitung beobachtet werden (gefroren nativ 35,50% normale Spermatozoen, gefroren nach swim-up 44,60%. Siehe Tab.4.20). In der subfertilen Gruppe kam es zu einer statistisch nicht signifikanten Reduktion der morphologisch normalen Spermatozoen (gefroren nativ 35,23% normale Spermatozoen, gefroren nach Aufbereitung 31,68%. siehe Tab. 4.21).

Durch die Kryokonservierung kommt es zu Schädigungen der Spermatozoen, die natürlich auch die Morphologie betreffen (NALLELLA et al., 2004). Schon SERAFINI et al. (1986) hat eine Verschlechterung der Morphologie humaner Spermatozoen durch Kryokonservierung feststellen können und auch in vorliegender Studie konnte nach dem Einfrier- und Auftauprozess eine Abnahme des Anteil morphologisch regelrecht geformter Spermatozoen in beiden Gruppen beobachtet werden. In der fertilen Gruppe waren diese Veränderungen jedoch statistisch nicht signifikant (nativ 42,58% normale Spermatozoen und gefroren nativ 35,50%, nach swim-up 46,53% normale Spermatozoen und gefroren nach swim-up 44,60%. siehe Tab. 4.22). In der subfertilen Gruppe war die Abnahme der morphologisch regelrecht geformten Spermatozoen der nativen Proben durch Kryokonservierung statistisch nicht signifikant, aber die Abnahme bei den aufbereiteten Proben dafür statistisch hoch signifikant (nativ 44,31% normale Spermatozoen und gefroren nativ 35,23%, nach swim-up 50,31% normale Spermatozoen und gefroren nach swim-up 31,68%. siehe Tab. 4.23). Im Gegensatz

dazu konnten in anderen Studien keine negativen Effekte der Kryokonservierung auf die Morphologie festgestellt werden (STANIC et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001; PETYIN & CHOAVARATANA, 2006).

5.1.5 Einfluss auf die Chromatinkondensation

Die Organisation der menschlichen Spermien- DNA und die Bedeutung der korrekten Chromatinkondensation humaner Spermatozoen wurde bereits in vielen unterschiedlichen Studien herausgestellt (WARD, 2010). Unter anderem postuliert AGARWAL et al. 1993 in einer Übersichtsarbeit, dass eine fehlerhafte DNA- Integrität die männliche Fertilität beeinflusst. Durch die unvollständige Kondensation des Chromatins kann es zu Fehlern bei der Fertilisation kommen (SAKKAS et al., 1998), die, wie SAKKAS et al. 1996 vermutet, unter anderem auf einer verminderten Dekondensationsfähigkeit beruhen. In den Studien von SAKKAS et al. (1996), HAMMADEH et al. (1998) und ESTERHUIZEN et al. (2002) konnte eine Korrelation zwischen schlecht kondensiertem Chromatin und niedrigen Befruchtungsraten nach IVF/ ICSI gezeigt werden. LOLIS et al. (1996), NASR-ESFAHANI et al. (2004) und RAZAVI et al. (2003) verwendeten die auch in dieser Studie verwendete Chromomycin A3- Färbung zum Nachweis unvollständig kondensierten Chromatins. Im Gegensatz dazu konnten HAMMADEH et al. (1996) keinen Einfluss der Chromatinkondensation auf den Erfolg von ICSI sehen und es scheint auch eine Embryonalentwicklung trotz unvollständiger Kondensation/ Dekondensation möglich (DADOUNE 1995). Eine neuere Studie von LIN et al. (2008) beschreibt, dass verschiedene Parameter der Spermienchromatinstruktur in keinem Zusammenhang mit Fertilisationsraten, Embryoqualität und Schwangerschaftsraten nach IVF und ICSI stehen, jedoch mit der spontanen Abortrate zu korrelieren scheinen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch die Studie von THOMSON et al. (2011).

In der subfertilen Gruppe ist der prozentuale Anteil von Spermatozoen mit vollständiger Chromatinkondensation im Vergleich zur fertilen Gruppe sowohl nativ und nach Aufbereitung als auch gefroren nativ und gefroren nach Aufbereitung geringer (fertile Gruppe nativ 64,63% Spermatozoen gut kondensiert versus 62,90% in der subfertilen Gruppe, gefroren nativ 53,26% gut kondensierte Spermatozoen in der fertilen Gruppe versus 39,85% in der subfertilen Gruppe. siehe Tab.4.25 und 4.26). Auch MOLINA et al. (2001) hat bei infertilen Männern mehr Spermatozoen mit schlecht kondensiertem Chromatin gefunden.

Die durchgeführte Aufbereitung der Proben mittels swim-up hat in der fertilen und der subfertilen Gruppe zu einer Zunahme des Anteils gut kondensierter Spermatozoen geführt. Bei den ungefrorenen Proben wurde in beiden Gruppen eine annähernd gleichgroße Verbesserung des Chromatinstatus erzielt der mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant ist (fertile Gruppe: nativ 64,63% gut kondensierte Spermatozoen, nach swim-up 68,05%; subfertile Gruppe: nativ 62,90% gut kondensierte Spermatozoen, nach swim-up 66,20%. siehe Tab.4.25 und 4.26). Die Aufbereitung der gefrorenen Proben hat in der fertilen Gruppe nur zu einer geringfügigen nicht signifikanten Verbesserung geführt (gefroren nativ 53,26% gut kondensierte Spermatozoen, gefroren nach swim-up 55,42%. Siehe Tab. 4.25). In der subfertilen Gruppe war die Zunahme des Anteils von Spermatozoen mit gut kondensiertem Chromatin deutlicher und statistisch signifikant (gefroren nativ 39,85% gut kondensierte Spermatozoen, gefroren nach swim-up 46,85%. siehe Tab.4.26).

Durch die Kryokonservierung hat sich der Anteil von Spermatozoen mit gut kondensiertem Chromatin bei den fertilen und subfertilen Proben hoch signifikant verringert. Besonders deutlich hat sich in der subfertilen Gruppe der Einfrier- und Auftauprozess negativ ausgewirkt. Die Kryokonservierung scheint die Chromatinstabilität negativ zu beeinflussen, so dass es zu DNA- Schäden kommen kann (HAMMADEH et al., 1999; ISACHENKO et al., 2004). Im Vergleich zur fertilen Gruppe war die Abnahme gut kondensierter Spermatozoen hier etwa doppelt so groß (fertile Gruppe: nativ 64,63% gut kondensierte Spermatozoen und nach Kryokonservierung 53,26%, nach swim-up 68,05% gut kondensierte Spermatozoen und gefroren nach swim-up 55,42%; subfertile Gruppe: nativ 62,90% gut kondensierte Spermatozoen und nach Kryokonservierung 39,85%, nach swim-up 66,20% gut kondensierte Spermatozoen und gefroren nach swim-up 46,85 (siehe auch Tab.4.27 und 4.28). Auch HAMMADEH et al.(1999) und ISACHENKO et al.(2004) haben eine reduzierte Chromatinstabilität nach Kryokonservierung und daraus folgende DNA-Schäden beschrieben.

5.1.6 Einfluss auf die DNA-Fragmentation und Apoptose-/Nekroserate

Zur Detektion der Apoptose wurden in dieser Studie zwei unterschiedliche Färbungen beziehungsweise Funktionstests nach Aufbereitung der Proben mittels swim-up durchgeführt und die Ergebnisse vor und nach Kryokonservierung miteinander verglichen.

DNA-Strangbrüche, die zu den späten Veränderungen der Apoptose gehören, wurden mit der TUNEL- Methode detektiert und mit Annexin V konnten frühapoptische Veränderungen

(PS- Expression) der Zelle sichtbar gemacht werden. Da die PS- Expression nicht nur ein Kennzeichen der frühen Apoptose ist, sondern auch im Rahmen der Nekrose, dem Zelluntergang mit Zerstörung der Zellmembran, auftritt, wurde eine Supravitalfärbung mit CFDA durchgeführt, wie sie auch MARTI et al. (2006) angewendet haben. So konnten vitale Spermatozoen (CFDA pos.), apoptotische Spermatozoen (CFDA und Annexin pos.) und avitale/nekrotische Spermatozoen (Annexin pos.) differenziert werden.

Auch OOSTERHUIS et al. (2000) und SHEN et al. (2002) haben in ihren Studien TUNEL- und Annexin V- Färbung miteinander verglichen. Beide haben keine Korrelation zwischen Annexin V positiven und TUNEL positiven Spermatozoen gefunden, was mit den unterschiedlichen Zeitpunkten der Detektion der Apoptose zusammenhängt. OOSTERHUIS et al. (2000) beschreiben, dass beide Färbungen mit geringen Spermienkonzentrationen korrelieren und folgern daraus, dass die erhöhte Apoptoserate eine reduzierte Dichte bedingt. Im Gegensatz dazu konnten SHEN et al. (2002) eine positive Korrelation mit der Spermienkonzentration finden und begründen dies nach der Theorie von SAKKAS et al. (1999b und 2003), die besagt, dass eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen im Ejakulat durch unvollkommene Apoptose während der Keimzellapoptose bedingt ist (sogenannte „abortive“ Apoptose). Beide Forschergruppen haben eine negative Korrelation der Zellrate mit Strangbrüchen mit den Spermienqualitätsparametern gefunden. Durch die TUNEL- Färbung werden wie bereits erwähnt späte Veränderungen des apoptotischen Prozesses festgestellt und erst hier ist eine Beeinflussung der Spermienqualität erkennbar. Eine Korrelation der Annexin V positiven Spermatozoen mit geringer Motilität konnten OOSTERHUIS et al. finden im Gegensatz zu GLANDER & SCHALLER (1999) und zu SHEN et al., die keinen Zusammenhang zwischen Annexin- Bindung und den Routinespermiogrammparametern nachweisen konnten. Allerdings haben OOSTERHUIS et al. keine Unterscheidung zwischen avitalen und vitalen Zellen gemacht und die Studien sind daher aufgrund ihrer unterschiedlichen Methodik in der Definition apoptotischer Zellen nicht einfach zu vergleichen.

Ein Zusammenhang zwischen Apoptosevorgängen und reduzierter männlicher Fertilität konnte schon von zahlreiche Forscher in unterschiedlichen Studien gesehen werden (OOSTERHUIS et al., 2004; OEHNINGER et al., 2003; SAKKAS et al., 2003; TAYLER et al., 2004; SAID et al., 2006). Eine neuere Studie von GRUNEWALD et al. (2008) konnte ebenfalls eine Korrelation von aktiviertem Apoptosesignalweg und der Fertilisationskapazität nachweisen. Eine erhöhte Apoptoserate im Ejakulat geht einher mit geringeren Schwangerschaftsraten (DURAN et al., 2002; HENKEL et al., 2003 und 2004). Keine Korrelation jedoch scheint es

mit der Befruchtungsrate zu geben und GANDINI et al. (2004) beschreiben erfolgreiche Schwangerschaften nach ICSI trotz hoher Raten an DNA-Strangbrüchen. Allerdings steigt die Zahl der Frühaborte bei erhöhten Raten an DNA-Strangbrüchen im Ejakulat (TRASLER et al., 1987; QIU et al., 1995). Es sollte auch bedacht werden, dass bei Ausschaltung der natürlicheren Selektion durch ICSI die entstehenden Kinder potentiell geschädigt werden könnten, da DNA-Defekte auf Nachkommen übertragbar sind (AHMADI et al., 1999). So sieht auch PAASCH et al. (2005) in der Selektion von nichtapoptotischen Spermatozoen mit eine Voraussetzung für gute Ergebnisse nach assistierter Reproduktion.

In dieser Studie konnte bei der Färbung mit Annexin V und CFDA eine hoch signifikante Abnahme der vitalen Spermatozoen nach Kryokonservierung gezeigt werden (nach swim-up 19,44% CFDA positive/vitale Spermatozoen versus 13,96% nach Kryokonservierung und Aufbereitung; siehe Tab.4.33). Die Zahl der apoptotischen und nekrotischen Spermatozoen hat nur geringfügig abgenommen und war mit $p > 0,05$ nicht signifikant (nach swim-up 3,18% Annexin positive/nekrotische und 1,74% CFDA und Annexin positive/apoptotische Spermatozoen, gefroren nach swim-up 2,07% Annexin positive/nekrotische und 0,93% CFDA und Annexin positive/apoptotische Spermatozoen; siehe Tab.4.33). In der fertilen Gruppe konnten vor Kryokonservierung etwas weniger vitale Spermatozoen ausgezählt werden (18,84% versus 20% in der subfertilen Gruppe), dafür waren nach Einfrieren und Auftauen im Vergleich zur subfertilen Gruppe mehr vitale Spermatozoen vorhanden (15% vitale Spermatozoen in der fertilen Gruppe nach Kryokonservierung und Aufbereitung versus 12,30% in der subfertilen Gruppe; siehe Tab. 4.34 und 4.35). In der subfertilen Gruppe gab es vor und nach Kryokonservierung im Vergleich zur fertilen Gruppe mehr apoptotische und nekrotische Spermatozoen (fertile Gruppe: vor Kryokonservierung 3,07% nekrotische Spermatozoen und 1,46% apoptotische Spermatozoen, nach Kryokonservierung 2% nekrotische und 0,87% apoptotische Spermatozoen; subfertile Gruppe: vor Kryokonservierung 3,28% nekrotische Spermatozoen und 2% apoptotische Spermatozoen, nach Kryokonservierung 2,20% nekrotische und 1% apoptotische Spermatozoen. Siehe Tab. 4.34 und 4.35). In beiden Gruppen war somit der Anteil avitaler Spermatozoen größer als der Anteil apoptotischer Spermatozoen.

Bislang ist die Annexin V- Färbung frühapoptotischer Zellen die einzige Methode zur Untersuchung der Apoptose lebender Spermatozoen (RICCI et al., 2002). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass Annexin V- positive Spermatozoen eingeschränkt sind in ihrer Kapazität die Zona pellucida zu penetrieren (SAID et al., 2008; GRUNEWALD et al., 2007). Es ist jedoch sinnvoll die Annexin- Färbung mit einer Supravitalfärbung zu kombinieren um

apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können (MARTI et al., 2006; siehe auch Annexin- V- FLUOS Staining Kit, Roche). Eine weitere Anwendung von Annexin V besteht in dem in dem Annexin V- Magnetic Activated Cell Sorting- Verfahren (MACS) (VAN HEERDE et al., 1995). Damit gelingt es sehr effizient nichtapoptotische von apoptotischen Spermatozoen zu trennen (GRUNEWALD et al., 2001).

Für die Entstehung der in dieser Studie mit der TUNEL-Färbung nachgewiesenen DNA-Fragmentation gibt es drei Theorien (PAASCH et al., 2007). Erste These besagt, dass es sich um unreife Spermatozoen handelt, die noch Lücken in ihrer DNA haben und noch nicht korrekt kondensiert sind (SAKKAS et al., 1996). Weiter werden fehlgeschlagene apoptotische Prozesse für eine erhöhte Rate an DNA-Strangbrüchen verantwortlich gemacht (SAKKAS et al., 1999a und 2002). Beide Thesen werden als Theorie der abortiven Apoptose zusammengefasst. Die dritte These sieht in der Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies mit die Ursache für die Fragmentation (IRVINE et al., 2000; SALEH& AGARWAL 2002; HENKEL et al., 2003; MURATORI et al., 2003; AITKEN et al., 2008 und 2010; THOMSON et al., 2009).

PAASCH et al. (2007) hat in seiner Studie bei infertilen Patienten eine höhere Rate fragmentierter DNA gefunden und konnte zeigen, dass die erhöhte DNA-Fragmentationsrate mit einer Verschlechterung der klassischen Spermioigrammparametern korreliert. Auch TOMLINSON et al. (2001) und SALEH et al. (2002) haben Ejakulate mit reduzierter Dichte, Motilität und schlechterer Morphologie untersucht und eine erhöhte Rate an fragmentierter DNA nachgewiesen. Die Studien von ENCISO et al.(2006) und PEREZ-LLANO et al.(2006) haben in fertilen Spermatozoenproben wie auch in der vorliegenden Arbeit relativ geringe Raten an DNA-Schäden festgestellt. Andere Forscher haben den Zusammenhang von Apoptose mit urologischen Erkrankungen untersucht. BACETTI et al. (1996) konnten mit der TUNEL-Färbung eine geringere Apotoserate bei gesunden Männern feststellen. Wie auch GANDINI et al. (2000) kamen sie zu dem Schluß, dass die Apotoseinduktion aufgrund diverser pathologischer Prozesse auftritt.

Die in dieser Studie untersuchten nativen fertilen und subfertilen Ejakulate haben einen annähernd gleichen Anteil nicht fragmentierter DNA (nativ in der fertile Gruppe 77,31% nicht apoptotische Spermatozoen versus 77,60% in der subfertilen Gruppe). Somit konnten die Ergebnisse von PAASCH et al. (2007) hier nicht bestätigt werden. Jedoch nach Kryokonservierung ist der Anteil nicht apoptotischer Spermatozoen in der fertilen Gruppe mit 67,78% deutlich größer als in der subfertilen Gruppe mit 52,20%. In der fertilen Gruppe ist Zunahme der DNA-Fragmentationsrate nach Kryokonservierung signifikant ($p < 0,05$) und in

der subfertilen Gruppe sogar hoch signifikant ($p < 0,01$). Die Kryokonservation scheint DNA-Schäden zu verursachen (THOMSON et al., 2010) und insbesondere subfertile Spermatozoenproben scheinen anfälliger für Schädigungen zu sein (SION et al., 2004). Der Vergleich der aufbereiteten Proben vor und nach Kryokonservierung zeigt in beiden Gruppen eine Abnahme des Anteils nicht apoptotischer Spermatozoen (fertile Gruppe: nach swim-up 87% nicht apoptotische Spermatozoen, gefroren nach swim-up 75,31%; subfertile Gruppe: nach swim-up 84,70% nicht apoptotische Spermatozoen, gefroren nach swim-up 60,50%. Siehe Tab.4.31 und 4.32).

Die Aufbereitung der ungefrorenen Proben mittels swim-up führt in beiden Gruppen zu einer hoch signifikanten Reduktion des Anteils apoptotischer Spermatozoen (fertile Gruppe: nativ 77,31% nicht apoptotische Spermatozoen und nach swim-up 87%; subfertile Gruppe: nativ 77,60% nicht apoptotische Spermatozoen und nach swim-up 84,70%. Siehe Tab 4.30 und 4.31). Auch bei den gefrorenen Proben konnte nach Aufbereitung in beiden Gruppen eine geringere Rate an Spermatozoen mit fragmentierter DNA nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren in der subfertilen Gruppe signifikant und in der fertilen Gruppe hoch signifikant (fertile Gruppe: gefroren nativ 67,78% nicht apoptotische Spermatozoen, gefroren nach swim-up 75,31%; subfertile Gruppe: gefroren nativ 52,20% nicht apoptotische Spermatozoen, gefroren nach swim-up 60,50%. Siehe Tab. 4.30 und 4.31). Auch YOUNGLAI et al. (2001) fand weniger DNA-Fragmentation nach Aufbereitung der Ejakulate mittels swim-up. Allerdings kann nach der Studie von GRUNEWALD et al. (2010) die Selektion von nichtapoptotischen Spermatozoen noch verbessert werden durch Kombination von swim-up mit Dichtegradientenzentrifugation.

5.1.7 Einfluss auf die spontane und induzierte Akrosomenreaktion

Die Tatsache, dass nur vollständig akrosomreagierte Spermatozoen an die Plasmamembran der Eizelle binden und mit dieser fusionieren können (YANAGIMACHI et al., 1981; TALBOT & CHACON, 1982; BYRD & WOLF, 1986) begründet die hohe Bedeutung, die der Fähigkeit des Spermatozoons zur korrekten Akrosomenreaktion zukommt. Eine Dysfunktion des Akrosoms ist somit assoziiert mit einer reduzierten Fertilität (SCHILL et al., 1980; LIU & BAKER, 1990). CALVO et al. (1989) fanden in ihrer Studie bei allen untersuchten fertilen Männern eine normale Akrosomenreaktion und 6 von 15 infertilen Männern hatten eine pathologische Akrosomenreaktion. Auch TESARIK berichtet in der ESHRE Andrology

Special Interest group (1996) von ca. 5% der infertilen Patienten mit einer gestörten Akrosomenreaktion, die nach seinen Spekulationen zur Hälfte durch eine zu hohe spontane Akrosomenreaktion bedingt ist und zur anderen Hälfte auf einer nicht durch Ionophore induzierbaren Akrosomenreaktion beruht.

In vitro konnte die spontane Akrosomenreaktion bislang nur in geringem und stark schwankendem Prozentsatz nachgewiesen werden (SUAREZ et al., 1986; BYRD & WOLF; 1986; DeJOUNGE et al., 1989; BIELFELD et al., 1994). Die Bedeutung der spontanen Akrosomenreaktion für die Fertilität wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet. Die meisten Autoren fanden keine Korrelation von spontaner Akrosomenreaktion und Fertilisationsraten nach IVF (PLACHOT et al., 1984; VanKOOIJ et al., 1986; LIU & BAKER, 1992a; HENKEL et al., 1993; KRAUSZ et al., 1995 u. 1996). FENICHEL et al. dagegen fanden in ihrer Studie 1991 eine positive Korrelation, jedoch in ihrer Arbeit von 1995 berichten sie, dass die spontane Akrosomenreaktion alleine keine Voraussagekraft für die Fertilisationskapazität hat. So konnten auch ZHANG et al. (2011) keinen Zusammenhang der spontanen Akrosomenreaktion mit den Schwangerschaftsraten nach IUI nachweisen, jedoch eine Korrelation der mittels Ionophore induzierten Akrosomenreaktion mit den Schwangerschaftsraten nach IUI.

Einige Autoren konnten eine erhöhte Rate spontan akrosomal reagierter Spermatozoen bei fertilen Männern finden (REYES et al. 1984; VanKOOIJ et al., 1986; FUSE et al., 1993). Ebenfalls ist nachgewiesen worden, dass mit zunehmender Inkubationszeit in-vitro der Anteil spontan akrosomal reagierter Spermatozoen ansteigt, denen eine Zonabindung und –penetration nicht mehr möglich ist (BARROS et al., 1984; SINGER et al., 1985).

In dieser Studie wurde die spontane Akrosomenreaktion der ungefrorenen und gefrorenen Proben vor und nach Aufbereitung sowie die mittels Ionophore induzierte Akrosomenreaktion mit der Concanavalin A- Lectin –Färbung nachgewiesen, welche sich gut zur Detektion der Akrosomenreaktion eignet (BAKER et al., 2004). Bei der zur Induktion der Akrosomenreaktion verwendeten Calcium- Ionophore handelt es sich um einen unphysiologischen Stimulus, der die intrazellulären regulatorischen Mechanismen und damit den natürlichen Reaktionsweg der Akrosomenreaktion umgeht (WATSON et al., 1992; LIU & BAKER, 1996). Er löst zuverlässig die Akrosomenreaktion bei verschiedenen Spezies aus (HARRISON et al., 1990; WHITE et al., 1990; CUMMINS et al., 1991) und die durch Ionophore induzierte Akrosomenreaktion unterscheidet sich morphologisch nicht von der durch physiologische Stimuli induzierte Akrosomenreaktion (GREEN et al., 1978; PETERSON et al., 1978; RUSSELL et al., 1979). Trotz eventuell falsch positiver Ergebnisse

ist Ionophore von mehreren Autoren vorgeschlagen worden das Routinespermiogramm zu ergänzen (LIU & BAKER, 1996; CALVO et al., 1994b).

Die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion ist die Differenz zwischen maximal (durch einen Stimulus) auslösbarer Akrosomenreaktion und spontaner Akrosomenreaktion. Die meisten Autoren sehen eine normale Akrosomenreaktion und Auslösbarkeit der Akrosomenreaktion als Indikator für eine erfolgreiche Fertilisation und konnten eine positive Korrelation zwischen Akrosomenstatus und IVF- Erfolgen nachweisen (FENICHEL et al., 1991; TAKAHASHI et al., 1992; YOVICH et al., 1994; CALVO et al., 1994b; BRANDELLI et al., 1995; CARVER-WARD et al., 1996; KRAUSZ et al., 1996; AVRECH et al., 1997; LIU & BAKER, 1998). Keine Korrelation fanden PLACHOT et al. (1984) und LANGE et al. (1992). Einige Studien kamen auch zu unterschiedlichen Ergebnissen abhängig vom verwendeten Stimulus (CUMMINS et al., 1991; HENKEL et al., 1993; TASDEMIR et al., 1993; KRAUSZ et al., 1995 und 1996; PARINAUD et al. 1995a und 1995b).

Bei subfertilen Männern beziehungsweise Patienten mit „fertilization failure“ ist die Auslösbarkeit der Akrosomenreaktion signifikant erniedrigt oder eingeschränkt wie verschieden Studien zeigen konnten. Dabei wurden zur Induktion der Akrosomenreaktion einmal physiologische Stimuli verwendet (CALVO et al., 1989; OEHNINGER et al., 1994; CALVO et al., 1994a) und zu anderen auch unphysiologische Stimuli wie Ionophore (CUMMINS et al., 1991, PILIKIAN et al., 1992; PARINAUD et al., 1995b; RUFAS et al., 1998) und Kälte (HENKEL et al., 1993). ALLGEYER et al. (2006) konnten in ihrer Studie eine reduzierte Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion bei Patienten mit Fertilisationsstörungen unter Verwendung von Ionophore und Progesteron/ Prostaglandin nachweisen. Allerdings berichten die Autoren, wie schon in früheren Studien beschrieben, dass die Kapazität zur Akrosomenreaktion eines Patienten variieren kann zu verschiedenen Zeiten und daher der Akrosomenreaktionstest erst am Tag der IVF/ ICSI gemacht werden sollte (BENOFF et al., 1996; JACOB et al., 1998).

Einige Studien konnten dagegen keine Korrelation zwischen der spontanen/ induzierten Akrosomenreaktion und Fertilisationsraten in-vitro nachweisen (WHITE et al., 1990; SMULLEN et al., 1992, Pampiglione et al., 1993).

Interessant ist die Vorhersagekraft der Akrosomenreaktion vor allem für den IVF-Erfolg, denn im Falle einer ICSI- Behandlung ist die Akrosomenreaktion nicht notwendig für den Fertilisationserfolg (SILBER et al., 1994). In ihrer Meta-Analyse favorisieren OEHNINGER et al. (2000) den Akrosomenreaktionstest und den Zona-pellucida- Bindungstest als im Vergleich beste Alternativen der in-vitro- Tests um den Fertilisationserfolg vorherzusagen.

Allerdings schließen sie auch die Forderung nach physiologischeren Bedingungen und einer Standardisierung der Methodik an. Bei der Identifizierung von akrosomreagierten Spermatozoen besteht neben der auch in dieser Studie zur Anwendung gekommenen fluoreszenzmikroskopischen Auswertung auch die Möglichkeit der Auswertung mittels Flowcytometrie. Der Nachteil der Flowcytometrie besteht darin, dass keine so detaillierten Informationen über Spermatozoen in verschiedenen Stadien der Akrosomenreaktion möglich sind. Dafür ist diese Auswertungsmethode objektiv und nicht so anwenderabhängig. NIKOLAEVA et al. (1998) konnten jedoch in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Flowcytometrie und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung nachweisen. In dieser Studie war der Anteil der nicht akrosomal reagierten Spermatozoen in den nativen Proben der fertilen Gruppe höher als in der subfertilen Gruppe (76,52% versus 73,15%), das heisst in der subfertilen Gruppe ist damit die Rate spontan akrosomal reagierter Spermatozoen höher im Vergleich zur fertilen Gruppe. Nach Aufbereitung mittels swim-up steigt in beiden Gruppen die Anzahl nicht akrosomal reagierter Spermatozoen beziehungsweise die Rate spontaner Akrosomenreaktionen ist in den aufbereiteten Proben fertiler und subfertiler Männer geringer (fertile Gruppe: nativ 76,52% Spermatozoen mit intaktem Akrosom, nach swim-up 79,70%; subfertile Gruppe: nativ 73,15% Spermatozoen mit intaktem Akrosom, nach swim-up 78,20%. siehe Tab. 4.37 und 4.38). Es ist festzustellen, dass die Auswirkung der Aufbereitung in der subfertilen Gruppe etwas größer ist (fertile Gruppe: plus 3,18% Spermatozoen mit intaktem Akrosom, subfertile Gruppe: plus 5,05%). Nach Induktion der Akrosomenreaktion mittels Ionophore beträgt der Spermatozoenanteil mit intaktem Akrosom in der fertilen Gruppe noch 46,23% und in der subfertilen Gruppe 45,65%. Diese Veränderungen des Anteils akrosomal reagierter Spermatozoen durch Aufbereitung mittels swim-up und nach Behandlung mit Ionophore stellen sich auch beim Vergleich der gefrorenen Proben so dar (fertile Gruppe: gefroren nativ 60,94% Spermatozoen mit intaktem Akrosom, gefroren nach swim-up 69%, gefroren nach Ionophore 44,35%; subfertile Gruppe: gefroren nativ 52,28% Spermatozoen mit intaktem Akrosom, gefroren nach swim-up 62,76%, gefroren nach Ionophore 46,33%. Siehe Tab. 4.37 und 4.38). In beiden Gruppen sowohl bei Betrachtung der ungefrorenen als auch der gefrorenen Proben ist der Zusammenhang mit $p < 0,01$ statistisch hoch signifikant.

Verschiedene Studien haben bereits die Korrelation der Akrosomenreaktion mit den klassischen SpermioGrammparametern untersucht. Keine Korrelation der Progressivmotilität und Morphologie mit der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion haben BRANDELLI et al. (1995) gefunden. Auch bei SCHILL et al. (1988) haben die untersuchten Patienten mit

Teratozoospermie eine annähernd gleiche Anzahl akrosomreagerter Spermatozoen. Dagegen zeigt die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion signifikante Unterschiede zwischen Ejakulaten gut und schlecht fertilisierender Patienten in der Studie von HENKEL et al. (1992). Eine Korrelation zwischen induzierter Akrosomenreaktion und Spermioogrammparametern wie Motilität und Morphologie konnte unter Verwendung von Ionophore (REYES et al., 1984; CUMMINS et al., 1991; PILIKIAN et al., 1992; AITKEN et al., 1994; PARINAUD et al., 1995b) als auch Follikularflüssigkeit (FUKUDA et al., 1989; CALVO et al., 1994a) und Progesteron (CONTRERAS et al., 1999; OEHNINGER et al., 1994) in diesen Studien gefunden werden.

Die negative Auswirkung der Kryokonservierung auf Spermatozoen konnte auch im Hinblick auf den Akrosomenstatus in dieser Studie bestätigt werden. Durch das Einfrieren und Auftauen ist es in der fertilen und subfertilen Gruppe sowohl beim Vergleich der nativen als auch der aufbereiteten Proben zu einer hoch signifikanten Abnahme des Prozentsatzes von Spermatozoen mit intaktem Akrosom gekommen (fertile Gruppe: nativ 76,52% Spermatozoen mit intaktem Akrosom und nach Kryokonservierung 60,94%, nach swim-up 79,70% und gefroren nach swim-up 69%; subfertile Gruppe: nativ 73,15% Spermatozoen mit intaktem Akrosom und nach Kryokonservierung 52,28%, nach swim-up 78,20% und gefroren nach swim-up 62,76%. Siehe Tab. 4.39 und 4.40). Dabei war diese Verringerung akrosomal intakter Spermatozoen in der subfertilen Gruppe ausgeprägter festzustellen. Dies bestätigt die schon in frühen Studien von SCHILL et al. (1984 und 1986) beschriebene verminderte Gefrierfähigkeit von qualitativ schlechten Ejakulaten und die insgesamt schlechtere Kryotoleranz der Spermatozoen (COHEN et al., 1981; MAHADEWAN et al., 1983; SAWETAWAN et al., 1993; SRISOMBUT et al., 1998).

Die Rate an mittels Induktion durch Ionophore akrosomal reagierten Spermatozoen zeigt sowohl im Vergleich zwischen fertiler und subfertiler Gruppe als auch im Vergleich vor und nach Kryokonservierung keine signifikanten Veränderungen. In der fertilen Gruppe sind vor Kryokonservierung 53,77% der Spermatozoen akrosomal reagiert und nach Kryokonservierung 55,65%. Ähnliche Ergebnisse konnten in der subfertilen Gruppe festgestellt werden, in der vor Kryokonservierung 54,35% und danach 53,67% der Spermatozoen akrosomal reagiert waren. Somit konnte in dieser Studie kein signifikanter Einfluss der Kryokonservierung auf die induzierte Akrosomenreaktion fertiler und subfertiler Ejakulate nachgewiesen werden (siehe auch Tab. 4.39 und 4.40). VADNAIS & ALTHOUSE (2011) dagegen haben in ihrer Arbeit eine erhöhte Rate an Membranschäden und einen

höheren Prozentsatz akrosomal reagierter Spermatozoen nach Kryokonservierung nachgewiesen, wobei hier ebenfalls Ionophore zur Induktion verwendet wurde.

5.1.8 Fazit

Diese Studie konnte zeigen, dass die Aufbereitung mittels swim-up nicht nur zu einer deutlichen Verbesserung der Routinespermiogrammparameter wie Dichte, Motilität, Vitalität/Membranintegrität und Morphologie führt, sondern auch geeignet ist die Rate an nichtapoptotische Spermatozoen, akrosomal intakten Spermatozoen und Spermatozoen mit guter Chromatinkondensation zu erhöhen.

Es ist festzustellen, dass insbesondere die subfertilen Proben nach Kryokonservierung deutlich von einer Aufbereitung profitieren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Kryokonservierung negativ auf alle untersuchten Parameter auswirkt. Besondere die subfertilen Spermatozoen weisen im Vergleich zur fertilen Gruppe eine größere Rate an Schädigungen auf.

Deshalb benötigen die subfertilen Spermatozoen sowohl beim Prozess des Einfrierens und Auftauens als auch bei der Aufbereitung mehr Aufmerksamkeit, da sie im Vergleich zu fertilen Spermatozoenproben wesentlich fragiler sind. In Anlehnung an diese und andere Studien muss weiter nach möglichen Verbesserungen für den Umgang mit subfertilen Spermatozoen gesucht werden.

8. Publikation

Teile dieser Arbeit fanden Eingang in folgende Veröffentlichungen:

Hammadeh ME, Krämer K, Solomayer EF (2013) Chromatin condensation, DNA fragmentation and apoptosis before freeze and post thaw of spermatozoa of fertile and subfertile men. *15th world congress on human reproduction 13-16.03.2013*.

Giornale Italiano di ostetricia e ginecologia, Vol.XXXV (No.1), 2013 Gennaio- Febbraio, pp 221 ff

7. Literaturverzeichnis

Agarwal A, Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update* 9, 331-45

Agca Y, Critser JK (2002) Cryopreservation in assisted reproduction. *Semin Reprod Med* 20, 15-2

Ahmadi A, Ng SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284, 696-704

Aitken RJ (1990) Evaluation of human sperm function. *Br Med Bull* 46, 654-674

Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D (1994) Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assays of the acrosome reaction and sperm-oocyte fusion. *Hum Reprod* 9, 1867-1874

Aitken RJ, Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.*, 636, 154-71.

Aitken RJ, De Iuliis GN (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.*, 16(1), 3-13.

Allgeyer M, Kirschenhofer N, Mann U, Brucker C (2006) Measurement of induced acrosome reactions in human sperm using physiologic stimuli- relevance for the prediction of fertilization outcome. *Andrologia* 38, 99-105

Aloia RC, Curtin CC, Godron LM (1988) Lipid Domains and the relationship to the membrane funktions. *Alan R. Liss, New York*

Alvarez JG, Storey BT (1992) Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1, 232-241

Alvarez JG, Storey BT (1993) Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerols and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 1, 199-208

- Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez R, Heyner S, Caballero PP, Storey BT (1993) Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reprod.* 8, 1087-1092
- Amann PP (2008) The cycle of the seminiferous epithelium: A need to revisit?. *J Androl.* 29, 469- 487
- Andolz, P., Bielsa, M.A., Genesca, A., Benet, J., Egozcue, J. (1987) Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum. Reprod.* 2, 99-101
- Anger, JT, Gilbert, BR, Goldstein, M (2003) Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 170, 1079-1084
- Armand Zini, Ashon Agarwal (eds.) (2009) Sperm Chromatin Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted reproduction. *Springer New York Dordrecht Heidelberg London*
- Arver S, Elliason 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, 217-24
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 28, 1305–8
- Austin, C.R. (1960) Capacitation and release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1, 310-311
- Avrech, O., Fisch, B., Shalgi, R. (1997) Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilizing capacity in vitro. *Andrologia* 29, 97-101
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 28, 587-96
- Baker S, Monzy T, Thaler C.D. (2004) Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J. Andrology* 25 (5), 744-751

Balhorn R (1989) Mammalian protamines: structures and molecular interaction. In: Adolph WK (ed). Molecular biology of chromosome function. *Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg*. 366-395

Balhorn R, Brewer L, Corzett M (2000) DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.* 56, 230-234

Ballachey BE, Hohenbrocken WD, Evenson DP (1987) Heterogeneity of sperm nucleus chromatin structure and its relation to bull fertility. *Biol. Reprod.* 863, 915-925

Baltz JM, Williams PO, Cone RA. (1990) Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod* 43, 485-491

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human reproduction* 15, 1338-44

Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gavino F, Oehninger S (2006) Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 85, 149 - 154

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 80, 1413-9

Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol* 34, C1-C5

Barros, C., Jedlicki, A., Bize, I., Aguire, E. (1984) Relationship between the length of sperm preincubation and zona penetration in the golden hamster: A scanning electron microscopy study. *Gamete Res* 9, 31-43

Bedford, J.M. (1983) Form and function of eutherian spermatozoa in the relation of the nature of egg vestments. In: *Fertilization of the human egg in vitro*. Beier, H.M., Lindner, H.R. (eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 133-146

Bellve, A.R., O'Brien, D. (1983) The mammalian spermatozoon. Structure and temporal assembly. In: Mechanism and Control of Animal Fertilization. *Hartmann JF (ed.), New York Academic, 55-137*

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hanj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod 18, 1023-8*

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Guerin JF. (2007) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril 87, 93-100*

Benoff S, Barcia M, Hurley IR, Cooper GW, Mandel FS, Heyner S, Garside WT, Gilbert BR, Heshlag A (1996) Classification of male factor infertility relevant to in- vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Human Reprod 11, 1905-1918*

Benoff S, Hurley IR, Mandel FS (1997) Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol Hum Reprod 3, 827-837*

Bielfeld P, Anderson RA, Mack SR, De Jonge CJ, Zaneveld LJD (1994) Are capacitation or calcium ion influx required for the human sperm acrosome reaction? *Fertil Steril 6, : 536-541*

Bielsa MA, Andolz P, Gris JM, Martinez P, Egozcue J (1994) Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples? *Hum Reprod. 9, 1887-90*

Bizzaro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Mariethoz E, Sakkas D (1998) In situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol. Hum. Reprod. 4, 127-132*

Björndahl L (1986) On sperm nuclear zinc and chromatin decondensation. *Thesis, Stockholm, Karolinska Institute*

Björndahl L, Kvist V (1990) Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int. J. Androl. 13, 232-237*

Blanco-Rodriguez J. (1998) A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int. J. Androl. 21, 236-48*

Blackmore, P.F., Beebe, S.I., Danforth, D.R., Alexander, N. (1990). Progesterone and 17 α -Hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265, 1376-1380

Bosman E, du Toit D, Wessels PH, Bornman MS, du Plessis DJ (1994) Sperm adenosine triphosphate concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis. *Arch Androl* 3, 7-10

Bostofte E, Serup J, Rebbe H (1985) The clinical value of morphological rating of human spermatozoa. *Int J Fertil* 30, 31-37

Brandelli, A., Miranda, P.V., Anon-Vazquez, M.G., Marin-Brigiler, C.I., Sanjurjo, C., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J.A., Tezon, J.G. (1995) A new predictive test for in-vitro fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by Nacetylglucosamine- neoglycoprotein. *Hum Reprod* 10 (7), 1751-1756

Burkman LJ. (1990) Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implication for fertility. In: Gagnon C (Hrsg.). *Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects*. Boca Raton: CrC Press, 303-329

Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP et al.(1996) The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril*; 65, :127-132

Byrd, W. und Wolf, D. P. (1986) Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol Reprod* 34, 859-869

Calvin HI, Bedford JM (1971) Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 13 (Suppl.) 65-75

Calvo, L., Vantman, D., Banks, S. M., Tezon, J., Koukoulis, G. N., Dennison, L., Sherins, R., J. (1989) Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 52, 1048-1054.

Calvo, L., Dennison-Lagos, L., Banks, S. M., Sherins, R., J. (1994a) Characterization and frequency distribution of sperm acrosome reaction among normal and infertile men. *Hum Reprod* 9, 1875-1879

Calvo L, Dennison L, Lagos L, Banks SM, Dorfmann A, Thorsell LP, Bustillo M, Schulmann JD; Sherins RJ (1994b) Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 9, 1880-1886

Carreras A, Palma A, Mendoza C (1990) Hypoosmotic swelling test in normo-, oligo-, asthenoand oligoasthenozoospermic men before and after swim-up separation of spermatozoa. *Andrologia* 22, 313-317

Carver-Ward, J.A., Jaroudi, K.A., Hollanders, J.M., Einspinner, M. (1996) High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum Reprod* 11 (9), 1923-1928

Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH (1992) Cryopreservation of human sperm. Comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw. *J Androl* 13, 283-288

Chang, M.C. (1984). The meaning of sperm capacitation. *J. Androl.* 5, 45-50.

Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R et al.(1989) Hypoosmotic swelling test in the prediction of male fertility. *Arch Androl* 23, 131-138

Cohen J, Felten P, Zeilmarker GH (1981) In vitro fertilization capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: A comparative study of freezing and thawing procedures. *Fertil Steril* 36: 356-362

Cohen, J., Weber, R.F.A., van der Vijver, J.C.M., Zeimaker, G.H. (1982) In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertil. Steril.* 37, 565-572

Contreras HR, Roa J, Ramirez MA (1999) Effect of progesterone on acrosome reaction, hypoosmotic swelling test, and DNA stability in human spermatozoa. *Arch Androl* 42, 97-104

Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD (1987) Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 47(6), 980-4

- Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 5, 314-320
- Cross NL, Hanks SE (1991) Effect of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum. Reprod.* 6, 1279-1283
- Cummins, J. M., Pember, S. M., Jequier, A. M., Yovich, J. L., Hartmann, P. E. (1991) A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12, 98-103
- Dadoune JP (1995) The nuclear status of human sperm cells. *Micron.* 26, 323-345
- David, G., Jouannet, P., Martin-Boyce, A., Schwartz, D. (1979) Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 31, 453-455
- DeJonge, C.J., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1989a) Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. *Gamete Res.* 23, 387-397
- De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJD (1989b) Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. *J Androl* 10, 232-239
- De Jonge, C. J., Han, H. L., Lawrie, H., Mack, S. R., Zaneveld, L. J. D. (1991a) Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* 258, 113-125
- De Jonge, C. J., Han, H. L., Mack, S. R., Zaneveld, L. J. D. (1991b) Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J Androl* 12, 62-70
- De Jonge CJ, Barrat CLR, Radwanska E, Cooke ID (1993) The acrosome reaction inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 14, 359-365
- Delgado, N.M., Reyes, R., Mora-Galindo, J., Rosado, A. (1988) Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Sci.* 42, 2177-2183

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. (1998) Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved human spermatozoa. *International journal of fertility and women's medicine* 43, 235-42

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240 , 1131- 1133

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. (2002) Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. *J Androl* 23, 25–43

Farrant J (1965) Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature* 205, 1284

Farrant J (1980) General principles of cell preservation. In: Richardson, DW, Symond, JD(eds). *Frozen human semen. Martinus Nijhoff, Boston*

Fawcett, D.W. (1975) The Mammalian Spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394-436

Fénichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL (1991) Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 55, 994-999

Fénichel, P. (1995) Acrosomal function and sperm fertilizing ability. Human sperm acrosome reaction. Fénichel, P. und Parinaud, J. Montrouge, John Libbey. *Eurotext. Colloque Inserm Vol. 236, 315-325*

Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A (1992) Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in Spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 15, 330- 337

Fukuda M, Morales P, Overstreet JW (1989) Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 24, 59-65

Fuse, H., Okumura, M., Sakamoto, M., Kazama, T., Katayama, T. (1993) Acrosomereacted sperm in infertile and fertile men using the triple-stain technique. *Arch Androl* 30, 41-45

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C et al. (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction* 15, 830-839

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Human Reproduction* 19, 1409-17

Gibbons, I.R. (1981) Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell. Biol.* 91, 107-124

Glander HJ, Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular human reproduction* 5, 109-15

Goodpasture JC, Zavos PM, Cohen MR Zaneveld LJD (1981) Effect of various conditions of sperm storage on the acrosin system of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 63, 387-405

Green, D. P. L. (1978) The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci* 32, 137-151

Green DR, Reed JC.(1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309–12

Green S, Fishel S, Rowe P (1999) The incidence of spontaneous acrosome reaction in homogeneous populations of hyperactivated human spermatozoa. *Human reproduction*; 14, 1819-22

Grizard G, Lombard-Vignon N, Boucher D (1992) Changes in carnitine and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. *Hum Reprod* 7, 1245-1248

Grow D, Oehninger S (1995) Strict criteria for the evaluation of human sperm morphology and its impact on assisted reproduction. *Andrologia*; 27, 325-333

Grunewald,S, Paasch,U, Glander,HJ (2001) Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank.* 2, 127-133

Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A (2007) Relationship between sperm apoptosis signaling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl (Onlinepublikation)*

Grunewald S, Said, TM, Paasch, U, Glander, HJ, Agarwal, A (2008) Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int. J. Androl* 31, 325-330

Grunewald S, Reinhardt M, Blumenauer V, Hmeidan FA, Glander HJ, Paasch U (2010) Effects of post density gradient swim-up on apoptosis signaling in human sperm. *Andrologia* 42(2), 127-131

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. (2001) Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345(19), 1388-1393

Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Küpker D, Diedrich K, Schmidt W (1996) The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilisation, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 11, 2468-2471

Hammadeh ME, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W (1997) Chromatin and morphology alteration in human spermatozoa affected by freezing and thawing. *Assist. Reprod. Rev.* 8, 131-139

Hammadeh ME, Nkemayim DC, Georg T et al. (1998a) Sperm morphology and chromatin condensation before and after semen processing. *J Assist Reprod Genet* 15(6), 359-364

Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998b) Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia* 30, 29-35

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. *Int. J. Androl.* 22, 155-162

Hammadeh ME (2000) Der Einfluß verschiedener Friermethoden bezüglich der Morphologie und der Chromatinintegrität auf menschliche Spermatozoen von fertilen und subfertilen Männern. *J.Urol. Gynäkol.* 6, 2-8

Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W (2001) Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl.*, 22(6), 1012-8.

Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Rosenbaum P, Schmidt W (2002) Zusammenhang zwischen Kryokonservierungstechnik und Spermienmorphologie, sowie Chromatinintegrität von fertilen und subfertilen Männern. *J. Fertil. Reprod.* 1: 7-14

Hammadeh ME, Molaen S, Rosenbaum P et al.(2003) Einfluss der Spermienkonzentration im Ejakulat und nach Spermienpräparation auf die Schwangerschaftsrate nach intrauteriner Insemination (IUI). *Reproduktionsmedizin* 19, 236

Hammadeh ME, Strehler E, Sterzik K, Hamad M, Schmidt W, Fischer-Hammadeh C (2008) The impact of sperm morphology on the outcome of assisted reproduction techniques. *In Sperm Morphology and Pathology*, 75-8

Hammamah S, Royere D, Nicolle JC, et al (1990) Effect of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 30, 59–64

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11, 73-88

Harrison RAP, Roldan ERS, Lander DJ, Irvine RF (1990) Ram spermatozoa produce inositol 1,4,5-Triphosphate but not inositol 1,3,4,5- Tetrakisphosphate during the Ca²⁺/Ionophore-induced acosome reaction. *Cell Signal* 2, 277-284

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, 151-93*

Hecht NB (1989) Molecular biology of structural chromosomal proteins of the mammalian testis. *In: Adolph WK (ed) Molecular biology of chromosome function. Springer, New York, USA, 396-420*

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Schill, W. B., Gips, H. (1992) Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion in der andrologischen Diagnostik und ihre prognostische Bedeutung für die IVF. *Fertilität 8, 27-30*

Henkel R, Stalf T, Miska W. (1992) Isolation and partial characterization of outer dense fiber proteins from human spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler 373, 685-689*

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Gips, H., Schill, W. B. (1993) Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod 8, 2128-2132*

Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online 7, 477-484*

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil. Steril. 81, 965-972*

Holstein AF, Roosen-Runge EC (1981) Atlas of Human Spermatogenesis. *Grosse, Berlin*

Horvath PM, Bohrer M, Shelden RM et al. (1989) The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril; 52(2), 288-294*

Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F (1999) DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. 78, 336-339*

Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F (1999) DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 78, 622-625

Ibrahim ME, Moussa M, Dedersen H (1990) Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor. *Int. J. Androl.* 13, 352-360

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21, 33-44

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F (2004) DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod.*, 19(4), 932-9.

Jacob A, Hurley I, Mandel FS, Hershlag A, Cooper GW, benoff S (1998) Human sperm non-nuclear progesteron receptor expression is a new marker for fertilization outcome. *Mol Human Reprod* 4, 533-542.

Jamil, K., White, G. (1981) Induction of the acrosome reaction with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Androl.* 7, 283-292

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-54

Kaden R, Donnerhack A, Katzorke T (1983) Spermadeponierung in zentraler Kryosperma-Bank. *Fortschr Med* 101, 1322-1326

Katz DF, Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW (1993) Sperm motility measurement and hyperactivation. *Semin Reprod Endocrinol* 11, 27-39

Kopf, G. S. und Gerton, G. L. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. Elements of Mammalian Fertilization. Wassarman, P. M. Boca Raton, Florida, CRC Press. 1, 153-203

Krausz C, Bonaccorsi L, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E (1995) Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10, 120-124 75

Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E (1996) Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 11 1661-1667

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619-42

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46, 1118-1123

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al.(1987) New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology.*30, 248-251

Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K (1998) Physiologie der Befruchtung. In: *Diedrich K (ed.): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Heidelberg* 356-379

Kvist U, Björndahl L, Kjellberg S (1987) Sperm nuclear zinc, chromatin stability and male fertility. *Scan. Electron. Microsc.* 1, 1241-1247

Lange, R., Schneider, K., Bockel, B., Michelmann, H. W. (1992) Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion und des Spermatozoenreifegrades im Ejakulat. *Fertilität* 8, 107-113

Langlais, J., Roberts, K.D. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.*, 12: 183-224

Leberl F, Stadler A, Bulfon S, Boschi A (2008) Samen-TUNEL-Untersuchung: Ein wichtiger Test für ein IVF-Institut? *Journal für Gynäkologische Endokrinologie* 2 (3) (Österreich), 19-22

Lee RKK, Hou JW, Ho HY et al.(2002) Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Andro*, 25:277-280

Lee VMS, Wong JSY, Loh SKE et al.(2002) Sperm motility in the semen analysis affects the outcome of superovulation intrauterine insemination in the treatment of infertile Asian couples with male factor infertility. *BJOG* 109, 115-120

Leibo SP (1977) Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. *Elliott K, Whealan, J. (eds) The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series) Amsterdam, Elsevier North-Holland*

Leibo SP, Mazur, P (1978) Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. *Daniel JC (ed). Methods in mammalian reproduction. New York, San Francisco, London, Academic Press*

Le Lannou, D., Blanchard, Y (1988) Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Reprod. Fertil.* 84, 551-556

Lin MH, Morshedi M, Srisombut C, Nassar A, Oehninger S (1998) Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: An investigation on the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertil Steril* 70, 1148-1155

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril.*, 90(2), 352-9.

Liu, D.Y., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1989) Human sperm-zona binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 4, 696-701.

Liu DY, Baker HWG (1990) Relationship between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 5: 298-303

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992a) Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58, 465

Liu DY, Backer HWG (1992b) Sperm nuclear Chromatin normality: relationship between sperm morphology , sperm - zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil. Steril.* 58: 1178-1184

Liu DY, Baker HW (1996) Relationship between the zona pellucida (ZP) and the ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril* 66, 312-315

Liu DY, Baker HW (1998) Calcium ionophor-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Hum Reprod* 13, 905-910

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, 23-7

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69, 528-532

Ludwig G, Frick J (1987) *Spermatology. Atlas and Manual.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Ludwig M, Al-Hasani S, Küpker W, Diedrich K (1998) Kryokonservierung menschlicher Eizellen im Pronukleusstadium: Prinzipien und Ergebnisse. *Diedrich, K (ed) Weibliche Sterilität: Ursachen, Diagnostik und Therapie, 1. Aufl.* Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio

Mack SR, Zanefeld LJ (1987) Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res* 18, 375-383

Mahadevan MM, Trounson AO (1983) Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 15: 355-366

Mahadevan M, Trounson AO (1984) Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 1, 52-60

Marti E, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-perez JA (2006) Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J Andrology* 27, 746-751

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM et al. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine* 182, 1545-56

Matsuda Y, Yamada T, Tobar I (1987) Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation I. Chromosome aberrations in sperm after x-irradiation. *Mutat. Res.* 148, 113-117

Mazur P (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. General Phys.* 47, 347

Mazur P (1970) Cryobiology. The freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949

Mazur P (1977a) Slow-freezing injury in mammalian cells. Elliott K, Whealan J (eds.) *The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series), Amsterdam, Elsevier North-Holland: 19-4R*

Mazur P (1977b) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rate. *Cryobiology* 14, 251-272

McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG (1992) Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 95: 527-534

Meizel, S., Working, P.K. (1980) Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reaction by catecholamines in vitro. *Biol. Reprod.* 22, 211-216

Meizel, S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.*, 195, 137-144

- Meizel, S. (1985) Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174, 285-302
- Meizel, S. (1995) Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone. Human sperm acrosome reaction. Fénelon, P. und Parinaud, J. Montrouge, John Libbey Eurotext. *Colloque Inserm Vol. 236, 151-164*
- Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, Van Zyl JA (1990) The evaluation of morphologically characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human. Reprod.* 5, 586-592
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ et al. (2001) Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 16(6), 1165-1171
- Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinez L (2001) Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum Reprod.* 16, 534-9
- Muldrew K, McGann LE (1994) The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys. J. Androl.*, 66, 532-541
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E (2003) Spontaneous DNA Fragmentation in Swim-Up selected Human Spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 24, 253-262
- Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E (2006) Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci.* 11, 1491-1499
- Nagae T, Yanagimachi R, Srivastava PN, Yanagimachi H (1986) Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 45, 701-707
- Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A (2004) Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril.* 82(4), 913-8.

- Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A (2006) Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril.*, 85(3), 629-34
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H (2004) Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia.* 36, 95-100
- Nikolaeva MA, Golubeva EL, Kulakov VI, Sukhikh GT (1998) Evaluation of stimulus-induced acrosome reaction by two-colour flow cytometric analysis. *Mol Human Reprod* 4(3), 243-250
- Oehninger S, Sueldo C, Lanzendorf S (1994) A sequential analysis of the effect of progesterone on sperm functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. *Hum Reprod* 9, 1322-1327
- Oehninger, S., Blackmore, P., Morshedi, M., Sueldo, C., Acosta, A. A., Alexander, N. J. (1994) Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil Steril* 61, 349-354
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P (2000) Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy : a meta-analysis. *Human Reprod* 6, 160-168
- Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 7, 469 - 476
- Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 174, 269-283
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen M et al.(1997) Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod*; 12(5), 987-993
- Ombelet W, Wouters E, Boels L et al.(1997) Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *J Androl*; 29, 367-372
- Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and sterility* 74, 245-50

Oosterhuis GJ, Vermes I (2004) Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *J Biol Regul Homeost Agents* 18, 115 -119

Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D., Meizel, S. (1989) Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 828-833

Paasch U., Grunewald S., Glander H.-J. (2005) Aktivierung von Apoptose-Signalkaskaden in ejakulierten Spermatozoen: ein biologischer Faktor der männlichen Infertilität. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* 2 (3), 136–47

Paasch U, Grunewald S, Glander HJ (2007) DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 4 (3), 124-139

Pampiglione, J.S., Tan, S.L., Campbell, S. (1993) The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 59, 1280

Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, Labal B (1995a) Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability. *Fertil Steril* 63, 598-603

Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, Labal B (1995b) Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and in-vitro fertilization results. *Hum Reprod* 10, 2085-2089

Pérez-Llano B, Enciso M, García-Casado P, Sala R, Gosálvez J (2006) Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology.*, 66(9), 2137-43.

Peterson, R. N., Russel, L., Bundman, D., Freund, M. (1978) Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing to acrosome reaction. *Biol Reprod* 19, 459

Petyim S, Choavaratana R (2006) Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai.*, 89(3), 306-13.

Pilikian, S., Guerin, J. F., Adeleine, P., Ecochard, R., Czyba, J. C. (1992) Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in asthenozoospermic infertile semen. *Hum Reprod* 7, 991-993

Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM (1984) Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42, 418-423

Pryor JL, Kuneck PH, Blatz S et al. (2001) Delayed timing of intrauterine insemination results in a significantly improved pregnancy rate in female partners of quadriplegic men. *Fertil Steril* 76(6), 1130-1135

Qiu J, Hales BF, Robaire B (1995) Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamid exposure. *Biol Reprod* 53, 1465-1473

Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A (2003) Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 35, 238-243

Rehman AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ (CLINICAL RESEARCH ED.)* 322, 1536-1538

Reyes, A., Martinez, R., Luna, M., Chavarria, M. E., Merino, G. (1984) Quantitative evaluation of the human spermatozoal motility and acrosome reaction in infertile oligozoospermic and fertile euspermic men. *Arch Androl* 12, 187-194

Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C et al. (2002) Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction* 17, 2665-2672

Rofeim O, Brown TA, Gilbert BR (2001) Effects of serial thaw-refreeze cycles on human sperm motility and viability. *Fertil Steril.*, 75(6),1242-3.

Rogers BJ, Bentwood BJ, Van Campen M (1983) Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J. Androl.* 4, 119-125

Rufas O, Gilman A, Fisch B, Shalgi R (1998) Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 5, 84-89

Russell, L., Peterson, R. N., Freund, M. (1979) Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 32, 87-92

Said T, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Liang Li, Glander HJ, Thomas Jr. AJ, Paasch U (2006) Selection of Nonapoptotic Spermatozoa As a New Tool for Enhancing Assisted Reproduction Outcomes: An In Vitro Model. *Biol Reprod* 74, 530 - 537

Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U (2008) Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 29, 134 -142

Sánchez, R. und Schill, W. B. (1991a). Influence of incubation time/temperature on acrosome reaction/sperm penetration assay. *Arch Androl* 27, 35-42

Sánchez, R. und Schill, W. B. (1991b). Induction of the acrosome reaction in sperm by exposure to low temperature increases their rate of fusion with zona-free hamster oocytes. *Int J Androl* 14, 423-431

Sakkas D, Umer F, Bianche PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm infection. *Hum. Reprod.* 11, 837-843

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999a) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 4,31-7

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC (1999b) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res.* 251,350-5

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 66,1061-1067

Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC (2003) Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7, 428 - 432

Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr., Sharma RK (2002) Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility* 78, 313-8

- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ Jr. (2003) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 79, 1597-605
- Sawetawan C, Bruns ES, Prins GS (1993) Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. *Fertil Steril* 60, 706-710
- Schill, W.-B. (1975). Significance of proteolytic sperm enzymes for fertility. *Hautarzt* 26, 514-523
- Schill WB, Trotnow S (1984) Verwendung von Kryosperma für die In-vitro-Fertilisation (IVF). *Hautarzt* 35: 313-315
- Schill WB, Töpfer-Petersen E, Hoffmann R, Michalopoulos M, Rübkeil H (1986) Untersuchungen zur Schädigung von Kryosperma, Spermakonservierung, Insemination, In-vitro-Fertilisation. *Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore*, 35-50
- Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E (1988) The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum. Reprod.* 3, 139-14
- Schrader, S.M., Jeyendran, R.S., Perez-Pelaez, M., Zaneveld, L.J.D. (1983) Evaluation of the physical and functional integrity of the human sperm membrane. *J. Androl.* 4, 48
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254:, 439–59
- Serafini PC, Hauser D, Moyer D, Marrs RP (1986) Cryopreservation of human Spermatozoa correlation of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona free hamster ova. *Fertil. steril.* 46, 691- 695
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human reproduction* 17, 1266-1273
- Silber SJ (1989) The relationship of abnormal semen parameters to male infertility. *Human. Reprod.* 4, 947-953

Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem A (1994) Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Human Reprod* 9, 1705-1709

Singer SJ, Nicolson, GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 75, 720 –731

Singer, S.L., Lambert, H., Overstreet, J.W., Hanson, F.W., Yanagimachi, R. (1985) The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. *Gamete Res* 12, 29-39

Sion B, Janny L, Boucher D, Grizard G (2004) Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int J Androl.*, 27(2), 108-14.

Smullen, L.A., Taylor, C.T., Ankers, L., Kingsland, C.R. (1992) Acrosome reaction and failed fertilization. *Hum Reprod* 7 (2), 198

Srisombut C, Morshedi M, Lin MH, Nassar A, Oehninger S (1998) Comparison of various methods of processing human cryopreserved-thawed semen samples. *Hum Reprod* 13, 2151-215.

Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E (2000) Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000, 91(1), 65-70.

Stock, C. E. und Fraser, L. R. (1987) The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod* 2, 109-119

Storey BT. (1995) Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod Fertil Dev* 7, 927-942

Suarez SS, Wolf DP, Meizel S (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 14, 107-121

- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm (correlation with fertilization in vitro). *Biol Reprod* 56, 602–7.
- Sun F, Ko E, Martin RH (2006) Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol.* 4, 1
- Swan MA, Linck RW, Fawcett DW (1980) Structure and function of the undulating membrane in spermatozoan propulsion in the toad *Bufo marinus*. *J Cell Biol* 85, 866-880
- Takahashi K, Wetzels AMM, Goverde HJM, Bastiaans BA, Janssen HJG, Rolland R (1992) The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 57, 889-894
- Talbot, P., Summers, R. G., Hylander, B. L., Keough, E. M., Franklin, L. E. (1976) The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A 23187. *J Exp Zool* 198, 383-392
- Talbot, P. und Chacon, R. S. (1980) A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human spermatozoa. *Gamete Res* 3, 211-216
- Talbot P, Chacon RS (1982) Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona-pellucida-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 37: 240-248
- Tartagni M, Schonauer MM, Cicinelli E et al.(2002) Usefulness of the hypo-osmotic swelling test in predicting pregnancy rate and outcome in couples undergoing intrauterine insemination. *Arch Andro;* 23(4), 498-502
- Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T (1993) Penoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. *Hum Reprod* 8, 2102-2107
- Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 10, 825 - 834

Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 42(1), 87-91

Tesarik J. (1985). Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 74, 383-388

Tesarik J. (1989) Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum. Reprod.*, 4, 957-961

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM (2009) Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod.*, 24(9), 2061-70.

Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. (2010) The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril.*, 93(4), 1147-56.

Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM (2011) Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.*, 96(4), 843-7.

Tomlinson MJ, Amissah-Arthur JB, Thompson KA et al.(1996) Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Hum Reprod* 11(9), 1892-1896

Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D (2001) Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* 16, 2160-2165

Töpfer-Petersen, E., Ensslin, M., Waberski, D. (1996). Kapazitation. *Fertilität* 12, 183-189

Trasler JM, Hales BF, Robaire B (1987) A time course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment of rats: effects on pregnancy outcome and the male reproductive and haematologic systems. *Biol Reprod* 37,317–326

Twigg J, Irvine DS, Houston P et al.(1998) Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*; 4(5), 439-445

Urch UA, Wasrdrip NJ, Hedrick JL. (1985) Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. *J Exp Zool* 236, 239-243

Vadnais ML, Althouse GC. (2011) Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*. 76(8), 1508-16.

Van den Saffele, J., Vermeulen, L., Schoonjans, F., Comhaire, F.H. (1992) Evaluation of the hypo-osmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. *Andrologia* 24, 213-217

Van der Ven, H.H., Kaminski, J., Bauer, L., Zaneveld, L.J.D. (1985) Inhibition of human sperm penetration into zona-free hamster oocytes by proteinase inhibitors. *Fertil. Steril.* 43 (4), 609-616

Van Deurs, B., Lastein, U. (1973) Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. *J. Ultrastruct. Res.* 42, 517-533

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9

Van Kooij Rj, Balerna M, Roatti A, Campana A (1986) Oocyte penetration and acrosome reactions of human spermatozoa II: Correlations with other seminal parameters. *Andologia* 1, : 503-508

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* 184, 39-51

Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80, 531–5

- Ward WS (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.*, 16(1), 30-6.
- Watson PF, Plummer JM, Jones PS (1992) The ionophore-induced acrosome reaction differs structurally from the spontaneous acrosome reaction. *J Exp Zool* 264, 231-235
- Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000, 2, 60-61.
- White DR, Phillips DM, Bedford JM (1990) Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fert* 90, 71-80
- WHO- World Health Organisation (1999) Laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*; 68, 251–306
- Yanagimachi R (1981) Mechanism of fertilization in mammals. *Fertilization and Embryonic Development In vitro. Mastroianni L, Biggers JD (Hrsg) New York, Academic Press: 81*
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. The physiology of reproduction. *Knobil, E. und Neill, J. D. New York, Raven Press. 1, 189-316*
- Yao, Y., Ho, P., Yeung, W. S. (2000) Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 73, 680-686
- Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T, Yajima A (1990) Fertilization of fresh and frozen human spermatozoa. *Assist. Reprod. Technol. Androl. 1, 164-172*
- Younglai, EV, Holt, D, Brown, P, Jurisicova, A, Casper, RF (2001) Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum. Reprod* 16, 1950-1953
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL (1994) Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 61, 902-910

Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S (1988) Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Tes* 2, 11-24

Zaini, A., Jennings, M.G., Baker, H.W.G. (1985) Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertil men? *Int. J. Androl.* 8, 427- 435

Zhang K, Fan L, Gong F, Zhu W. (2011) Sperm acrosome reaction detection in intrauterine insemination. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 36(7):687-91. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.07.018

8. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Dr. Hammadeh danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und darüber hinaus besonders für seine Hilfsbereitschaft, sein Interesse, seine Geduld in allen Phasen dieser Dissertation. Als mein Betreuer und unmittelbarer Ansprechpartner stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und lies mich an seinem großen Fachwissen teilhaben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Schmidt und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Solomayer danke ich für die uneingeschränkte Nutzungsmöglichkeit der Laborräume der Universitätsfrauenklinik sowie der benötigten Ausrüstung und Materialien.

Herrn PD Dr. med. Gräber und Frau Dr. Ong danke ich für Ihre Hilfe bei der Anfertigung der statistischen Auswertung und Herrn PD Dr. med. Gräber nochmals insbesondere für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen des IVF-Labors für die freundliche Aufnahme im Labor, die praktischen Tipps und Tricks und ihr jederzeit offenes Ohr in schwierigen Situationen.

Meiner Familie und insbesondere meinem Mann gilt mein größter Dank für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, das wesentlich zum Gelingen des Studiums und dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich an dieser Stelle ganz besonders dafür, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

10. Anhang:

10.1. Muster des im Rahmen der Arbeit verwendeten Spermogrammes:

Name des Patienten: Vorname: ID.:

[Name der Ehefrau: Vorname:]

Untersuchung / Datum						
Volumen [>2ml]						
pH [7,2-7,8]						
Viskosität						
Spermatozoen- dichte [>20 Mio/ml]						
Motili- tät [%]	glob. [>50]					
	progr. [>25]					
Vitali- tät	Eosin					
	HOS					
Mor- pholo- gie [%]	normal					
	Fehl- form					
	Rund- zellen					
Cyturtest						
MAR-Test [+/-]						
Aufbereitungs- methode						
Dichte						
Motilität						

SKP, Seyfried

10.2 Morphologie (Vergleich der morphologischen Fehlformen):

Fertile-Gruppe						
	Nativ M±SD (n=17)	nach swim-up M±SD (n=13)	P-wert	<i>Gefroren nativ</i> M±SD (n=18)	<i>Gefroren nach swim- up</i> M±SD (n=15)	P-wert
Morphologie						
- normal	42,58 ±12,74	46,53 ±10,14	>0,05	35,50 ±12,41	44,60 ±12,73	<0,05*
- amorph	21,41 ±5,85	21,76 ±6,93	>0,05	24,94 ±13,24	25,53 ±6,16	>0,05
- hyper	7,23 ±5,55	5,38 ±3,04	>0,05	11,83 ±7,77	5,60 ±4,23	<0,05*
- hypo	0,58 ±0,79	1,69 ±2,68	>0,05	2,72 ±6,16	1,20 ±1,93	>0,05
- elongiert	7,94 ±8,10	7,07 ±6,82	>0,05	6,44 ±4,68	6,06 ±3,51	>0,05
- doppel	1,76 ±2,16	1,61 ±2,14	>0,05	2,11 ±2,56	0,26 ±0,59	<0,01**
- schwanz	8,64 ±3,40	6,61 ±4,89	>0,05	10,50 ±5,63	8,26 ±5,65	<0,05*
- loose heads	2,64 ±2,14	3,61 ±3,01	>0,05	3,22 ±4,08	4,80 ±2,24	<0,05*
- cyt.abnorm	7,17 ±5,29	5,69 ±5,02	>0,05	4,00 ±3,97	3,66 ±2,63	>0,05

Subfertile-Gruppe						
	Nativ M±SD (n=16)	nach swim-up M±SD (n=16)	P-wert	<i>Gefroren nativ</i> M±SD (n=17)	<i>Gefroren nach swim- up</i> M±SD (n=16)	P-wert
Morphologie						
- normal	44,31 ± 13,75	50,31 ± 12,69	>0,05	35,23 ± 9,36	31,68 ± 10,75	>0,05
- amorph	18,25 ± 7,08	19,93 ± 5,33	>0,05	20,29 ± 6,16	21,50 ± 6,17	>0,05
- hyper	6,18 ± 4,90	3,81 ± 3,16	>0,05	9,23 ± 5,12	7,87 ± 5,41	>0,05
- hypo	1,06 ± 1,69	1,68 ± 1,85	>0,05	0,76 ± 1,30	0,43 ± 0,72	>0,05
- elongiert	6,93 ± 7,74	7,81 ± 7,18	>0,05	7,64 ± 6,48	11,62 ± 10,10	>0,05
- doppel	0,93 ± 0,92	0,81 ± 1,47	>0,05	1,50 ± 1,75 (n=16)	1,62 ± 2,39	>0,05
- schwanz	10,62 ± 7,91	6,56 ± 3,50	>0,05	15,35 ± 9,15	11,56 ± 9,33	<0,05*
- loose heads	3,56 ± 2,92	4,18 ± 3,54	>0,05	4,94 ± 3,89	9,50 ± 7,04	<0,05*
- cyt.abnorm	8,37 ± 6,67	5,00 ± 4,61	>0,05	5,11 ± 2,97	4,12 ± 3,18	>0,05

Fertile-Gruppe						
	Nativ M±SD (n=17)	Gefroren <i>nativ</i> M±SD (n=18)	P-wert	nach swim-up M±SD (n=13)	Gefroren <i>nach swim-</i> <i>up</i> M±SD (n=15)	P-wert
Morphologie						
- normal	42,58 ±12,74	35,50 ±12,41	>0,05	46,53 ±10,14	44,60 ±12,73	>0,05
- amorph	21,41 ±5,85	24,94 ±13,24	>0,05	21,76 ±6,93	25,53 ±6,16	>0,05
- hyper	7,23 ±5,55	11,83 ±7,77	<0,05*	5,38 ±3,04	5,60 ±4,23	>0,05
- hypo	0,58 ±0,79	2,72 ±6,16	>0,05	1,69 ±2,68	1,20 ±1,93	>0,05
- elongiert	7,94 ±8,10	6,44 ±4,68	>0,05	7,07 ±6,82	6,06 ±3,51	>0,05
- doppel	1,76 ±2,16	2,11 ±2,56	>0,05	1,61 ±2,14	0,26 ±0,59	<0,05*
- schwanz	8,64 ±3,40	10,50 ±5,63	>0,05	6,61 ±4,89	8,26 ±5,65	>0,05
- loose heads	2,64 ±2,14	3,22 ±4,08	>0,05	3,61 ±3,01	4,80 ±2,24	>0,05
- cyt.abnorm	7,17 ±5,29	4,00 ±3,97	>0,05	5,69 ±5,02	3,66 ±2,63	>0,05

Subfertile-Gruppe						
	Nativ M±SD (n=16)	Gefroren <i>nativ</i> M±SD (n=17)	P-wert	nach swim-up M±SD (n=16)	Gefroren <i>nach swim- up</i> M±SD (n=16)	P-wert
Morphologie						
- normal	44,31 ± 13,75	35,23 ± 9,36	>0.05	50,31 ± 12,69	31,68 ± 10,75	<0,01**
- amorph	18,25 ± 7,08	20,29 ± 6,16	>0.05	19,93 ± 5,33	21,50 ± 6,17	>0.05
- hyper	6,18 ± 4,90	9,23 ± 5,12	>0.05	3,81 ± 3,16	7,87 ± 5,41	>0.05
- hypo	1,06 ± 1,69	0,76 ± 1,30	>0.05	1,68 ± 1,85	0,43 ± 0,72	<0.05*
- elongiert	6,93 ± 7,74	7,64 ± 6,48	>0.05	7,81 ± 7,18	11,62 ± 10,10	>0.05
- doppel	0,93 ± 0,92	1,50 ± 1,75 (n=16)	>0.05	0,81 ± 1,47	1,62 ± 2,39	>0.05
- schwanz	10,62 ± 7,91	15,35 ± 9,15	<0,01**	6,56 ± 3,50	11,56 ± 9,33	>0.05
- loose heads	3,56 ± 2,92	4,94 ± 3,89	>0.05	4,18 ± 3,54	9,50 ± 7,04	<0.05*
- cyt.abnorm	8,37 ± 6,67	5,11 ± 2,97	>0.05	5,00 ± 4,61	4,12 ± 3,18	>0.05

