

**Entwicklung eines optimierten Protokolls zur
Kryokonservierung humaner Spermien zur
Vermeidung verfahrensbedingter DNA-Schäden der
Spermien**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Emilia Lula Eugenie Kruschel
aus
Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Stefan Schneider

Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Armin Soave

Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Armin Soave

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Kai Rothkamm

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Andreas Block

Datum der mündlichen Prüfung: 13.04.2026

1. Einleitung	8
1.1. Männliche Fertilität	8
1.2. Anatomie der Spermien.....	9
1.3. Physiologische Spermatogenese und Spermio-genese	10
1.4. Aufbau der DNA	15
1.5. Ursachen von Fertilitätsstörungen des Mannes	17
1.5.1. Prätestikuläre Ursachen	17
1.5.2. Testikuläre Ursachen.....	17
1.5.3. Posttestikuläre Ursachen	17
1.6. Entstehung von DNA-Schäden in menschlichen Spermien.....	18
1.6.1. Apoptose	18
1.6.2. Chromatinkondensationsdefekte.....	18
1.6.3. Reaktive Sauerstoffspezies.....	19
1.6.4. DNA-Reparaturmechanismen	20
1.6.5. Umwelteinflüsse	21
1.7. Untersuchungen zur Detektion von DNA-Fragmentation in Spermien.....	22
1.7.1. Direkte Detektion der DNA-Fragmentation mittels TUNEL-Assay	23
1.7.2. Direkte Detektion der DNA-Fragmentation mittels Comet Assay.....	24
1.7.3. Analyse der DNA-Fragmentierung mittels SCSA und AO-Test.....	25
1.7.4. Analyse der DNA-Fragmentierung mittels SCD-Assay.....	26
1.8. Stellenwert der DNA-Fragmentations-Analyse.....	27
1.9. Spermogramm nach WHO	28
1.10. Zusammenhang zwischen konventionellen Spermogrammparametern und DNA-Fragmentation	29
1.11. Kryokonservierung humaner Spermien	30
1.11.1. Grundlagen der Kryokonservierung	30
1.11.2. Kryoprotektive Medien	31
1.11.3. Kryokonservierungsmethoden von Spermien.....	32
1.12. Stellenwert Künstlicher Intelligenz in der Medizinischen Forschung	32
1.13. Automatisierte Spermienerkennung.....	33
1.14. Zielsetzung der Doktorarbeit	34
2. Materialien und Methoden.....	35
2.1. Materialien.....	35
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.2. Kryoprotektive Medien	35
2.1.3. Puffer und Lösungen	36
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.5. Geräte	37
2.1.6. Computeranwendungen	38
2.1.7. Präparate.....	38
2.2. Methoden	39
2.2.1. Ejakulat-Ausstriche.....	39
2.2.2. Vergleich verschiedener Verflüssigungszeiten des Ejakulates	39
2.2.3. Vergleich verschiedener Techniken zur Kryokonservierung von Spermien	40
2.2.4. Spermienmotilität nach WHO	42
2.2.5. Vitalitätsbestimmung von Spermien durch Eosin-Färbung.....	43

2.2.6.	Färbungs-Reaktionen zur Untersuchung der DNA-Integrität der Spermien	43
2.2.7.	Kryokonservierung der Ejakulatproben und Verwendung verschiedener Kryokonservierungsmedien	45
2.2.8.	Auftauen der Ejakulatproben	46
2.2.9.	High-Content Screening-System zur Detektion fragmentierter DNA humaner Spermienköpfe 46	
2.2.10.	Assay Optimierung	47
2.2.11.	Statistische Methoden	48
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Werteveränderung durch Kryokonservierung	48
3.2.	Einfluss unterschiedlicher Verflüssigungszeiten auf die DNA-Integrität.....	52
3.3.	Bestätigung des DFI bei gesunden Probanden.....	54
3.4.	Wertever schlechterung durch Kryokonservierung: Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten	56
3.5.	Vergleich verschiedener Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich der Spermienqualität.....	60
3.6.	Vergleich dreier Kryokonservierungsmedien hinsichtlich ihrer potenziell protektiven Kapazität für die Spermienqualität	67
3.7.	Spearman-Korrelationsanalyse	73
3.8.	Ergebnisse Assay Optimierung.....	84
4.	Diskussion	85
4.1.	Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermienparameter: Veränderungen und Implikationen	85
4.2.	Optimale Verflüssigungszeit von Ejakulaten: Einfluss auf DNA-Integrität und Kryokonservierung.....	88
4.3.	Der DNA-Fragmentationsindex als Marker der männlichen Fertilität: Validierung und klinische Relevanz.....	89
4.4.	Einfluss der Kryokonservierung auf die DNA-Integrität: Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten	91
4.5.	Auswirkungen unterschiedlicher Kryokonservierungsmethoden auf die Spermienqualität.....	92
4.6.	Bewertung und Schutzwirkung verschiedener Kryokonservierungsmedien auf die Spermienqualität.....	95
4.7.	Spearman-Korrelationsanalyse	97
4.8.	Optimierung der Automatisierten Spermienanalyse: Fortschritte durch Künstliche Intelligenz.....	99
4.9.	Zusammenfassung.....	102
4.10.	Abstract	103
5.	Ausblick.....	104
6.	Referenzliste.....	104
7.	Anhang	125

8.	<i>Danksagung</i>	<i>140</i>
9.	<i>Erklärung des Eigenanteils.....</i>	<i>141</i>
10.	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	<i>142</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Spermatozoon.....	10
Abb. 2: Querschnitt eines menschlichen Hodens	11
Abb. 3: Keimepithel und Keimzellreifung.....	12
Abb. 4: Keimzelltypen.....	14
Abb. 5: DNA-Doppelhelixstruktur.....	16
Abb. 6: Chromatinkomposition im menschlichen Spermium.....	16
Abb. 7: Angriffsorte von Sauerstoffradikalen im Spermium	20
Abb. 8: Ursachen der DNA-Fragmentation und Reparaturmechanismen	21
Abb. 9: Ursachen der DNA-Fragmentation in Spermien, Übersicht	22
Abb. 10: TUNEL-Färbung	24
Abb. 11: Comet-Assay	25
Abb. 12: AO-Färbung	26
Abb. 13: SCD-Assay.....	27
Abb. 14: Altersverteilung der 60 Patienten	39
Abb. 15: Temperaturkurve Kryoplaner.....	41
Abb. 16: Vitrifikationsmethode, Skizze	42
Abb. 17: DNA-Integrität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung	50
Abb. 18: Motilität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung.....	51
Abb. 19: Vitalität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung	51
Abb. 20: Auswirkung unterschiedlicher Verflüssigungszeiten auf die DNA-Integrität.....	53
Abb. 21: Bestätigung des DFI durch die Analyse von 13 fertilen Probanden.....	55
Abb. 22: Individuelle Verschlechterung der Probanden nach Kryokonservierung	57
Abb. 23: Individuelle Verschlechterung der 16 Patienten nach Kryokonservierung...58	
Abb. 24: Individuelle Wertever schlechterung	59
Abb. 25: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden mittels TUNEL- und AO-DNA-Färbung.....	62
Abb. 26: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich a) Motilität a und b) Motilität b der Spermien	63
Abb. 27: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich a) Motilität c und b) Motilität d der Spermien	64

Abb. 28: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich Vitalität, Eosin-Färbung.....	65
Abb. 29: Vergleich der kryoprotektiven Medien mittels TUNEL-Färbung	67
Abb. 30: Vergleich der kryoprotektiven Medien mittels AO-Färbung.....	68
Abb. 31: Vergleich der kryoprotektiven Medien bezüglich a) Motilität a und b) Motilität b der Spermien	69
Abb. 32: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich a) Motilität c und b) Motilität d der Spermien	70
Abb. 33: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich des Eosin-Tests	71
Abb. 34: Signifikante Ergebnisse der Spearman-Korrelationsanalyse: Daten aus der Analyse frischer Ejakulate: Spermioграммparameter und Patientenalter	74
Abb. 35: Signifikante Zusammenhänge zwischen Spermienkonzentration und Spermienbeweglichkeit in frischen Ejakulaten	76
Abb. 36: Morphologie, Beweglichkeit und DNA-Fragmentation in frischen Ejakulaten	77
Abb. 37: Korrelationen in mit SF kryokonservierten Ejakulaten: Spermienkonzentration, Beweglichkeit, Eosin und TUNEL	78
Abb. 38: Morphologie in kryokonservierten SF-Proben: Zusammenhänge zwischen Motilität und Vitalität.....	79
Abb. 39: Spermienkonzentration in SFM kryokonservierten Proben in Korrelation mit Motilität und Zell- bzw. DNA-Integrität	80
Abb. 40: Korrelationsanalyse von in SFM kryokonservierten Ejakulaten; Morphologie im Vergleich zur Motilität und der Zellintegrität	81
Abb. 41: Zusammenhänge zwischen Spermienkonzentration und Motilität sowie Eosin in TYB-kryokonservierten Proben	82
Abb. 42: Zusammenhänge zwischen der Morphologie und der Motilität, Eosin und TUNEL in TYB-kryokonservierten Ejakulaten.....	83
Abb. 43: Zusammenhang zwischen Hodenvolumen links und progressiver Motilität a in TYB kryokonservierten Ejakulaten	84
Abb. 44: Scan-R Analyse, Gates zur Spermienkopferkennung des optimierten Assays.....	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Spermogrammwerte nach WHO	29
Tab. 2: Vergleich Kryokonservierungsmethoden bezüglich TUNEL und AO	65
Tab. 3: Vergleich Kryokonservierungsmethoden bezüglich Motilität und Eosin	66
Tab. 4: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich TUNEL und AO	71
Tab. 5: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich Motilität und Eosin	72

Abkürzungsverzeichnis

AO	Acridine Orange
ART	Assistierte Reproduktionstechnologie
BG	Background
Bidest.	Bidestilliertes Wasser
ca.	circa
CASA	Computer-aided sperm analysis
CPA	Cryoprotective Agent/ Kryoprotektivum
DFI	DNA-Fragmentationsindex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= deoxyribonucleic acid)
F	Frisch
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethansulfonsäure
IVF	In-vitro-Fertilisation
KI	Künstliche Intelligenz
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Mot.	Motilität
Morph.	Morphologie
mtDNA	mitochondriale DNA
nDNA	nukleäre DNA
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannte
OT	Objekträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rili-BÄK	Richtlinie zur Qualitätssicherung der Laboratoriumsdiagnostik der Bundesärztekammer
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
R	Rapid Freezing
S	Slow Freezing
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SF	Sperm Freeze

SFM	Sperm Freeze Medium
Sig	Signifikanz
SpKonz	Spermienkonzentration
SSC	Saline Sodium Citrate
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL (T)	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
TYB	Test Yolk Buffer
V+	Vitrifikation mit Kryoprotektivum
V-	Vitrifikation ohne Kryoprotektivum
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Männliche Fertilität

Männliche Infertilität ist ein weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem, das die reproduktive Gesundheit von Männern betrifft. Im klinischen Kontext bezeichnet männliche Infertilität das Ausbleiben einer Schwangerschaft der Partnerin nach 12 Monaten trotz regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehrs und ohne Hinweis auf eine medizinische Ursache bei der Partnerin (WHO 2024; Leslie et al., 2023; Rowe et al., 2000; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). Schätzungen gehen davon aus, dass es weltweit etwa 48 Mio. infertile Paare gibt – in Deutschland betrifft dies jedes zehnte Paar mit Kinderwunsch (WHO, 2018). 20-30 % dieser Fälle werden allein auf den männlichen Faktor zurückgeführt (Agarwal et al., 2015; Hull et al., 1985; Leaver, 2016; Leslie et al., 2023; Nosrati et al., 2017; Thonneau et al., 1991). Eine eindeutige Punktprävalenz für Deutschland liegt aktuell nicht vor. Eine Untersuchung von über 2000 Frauen und Männern im Alter von 39-41 Jahren ergab jedoch einen Wert von 6,5 % bei Männern (Passet-Wittig et al., 2016).

Dies spiegelt sich unter anderem in einem starken Abwärtstrend der Ejakulatqualität in den letzten Jahrzehnten wider (Levine et al., 2017; Cescon et al., 2020). Ein aktueller WHO-Bericht gibt einen Überblick über die globale und regionale Unfruchtbarkeitsprävalenz durch Analyse aller relevanten Studien von 1990 bis 2021 unter Berücksichtigung verschiedener Studienansätze. Die Gesamtprävalenz von Unfruchtbarkeit über die gesamte Lebenszeit lag hier bei 17,5 % (Cox et al., 2022).

Hinsichtlich der tatsächlichen Häufigkeit von männlicher Infertilität herrscht jedoch nach wie vor Unsicherheit, da männliche Unfruchtbarkeit nicht als meldepflichtige Krankheit gilt und die Prävalenzen in einigen Studien auf Schätzungen beruhen (Winters and Walsh, 2014).

Die Ursachen männlicher Infertilität können vielfältig sein und reichen von genetischen Faktoren über hormonelle Störungen bis hin zu anatomischen Anomalien und Umweltfaktoren (Nallella et al., 2006; Nieschlag et al., 2009, 2020; Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG, 2019).

Auf einige dieser Faktoren wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden. Die Diagnose und Behandlung der männlichen Infertilität erfordert eine umfassende Beurteilung der Spermienparameter. Dazu gehören die Spermienzahl, die Spermiovitalität und die Spermienmotilität. Die von der WHO vorgeschlagenen Referenzwerte für diese Parameter bieten jedoch keine eindeutigen Grenzwerte zur Unterscheidung von Fertilität und Infertilität (Nallella et al. 2006). Deshalb sollten für eine umfassende Fertilitätsabklärung neben den

klassischen Spermienparametern auch weitere Untersuchungen, wie die DNA-Integrität der Spermien, herangezogen werden. Die Bedeutung der Spermien-DNA wurde bereits in den 1940er Jahren erkannt (Pollister & Mirsky, 1946). Weitere Studien über den Zusammenhang zwischen der Chromatinintegrität menschlicher Spermien und männlicher Infertilität wurden in den folgenden Jahren veröffentlicht (Ringertz et al., 1970), bis in den 1980er Jahren der erste DNA-Fragmentationstest, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), entwickelt wurde (Evenson et al., 1980). Inzwischen existieren zahlreiche Indizien, die darauf hinweisen, dass die Unversehrtheit der DNA in den Spermien eine bedeutende Funktion sowohl bei der gelungenen Befruchtung, als auch während der Schwangerschaft einnimmt (Muriel et al., 2006; Simon et al., 2014; Simon et al., 2017b; Zheng et al., 2018).

Trotz des anhaltenden wissenschaftlichen Interesses gibt es bis heute keine standardisierte Methode zur Untersuchung der DNA-Integrität (Agarwal et al., 2024; Rex et al., 2017; Evenson, 2016).

Diese Arbeit soll einen Überblick über den aktuellen Wissensstand zu den Ursachen der männlichen Infertilität und neuen Beurteilungs- und Untersuchungsmethoden geben. Zudem sollen aktuelle Methoden der Kryokonservierung sowie die Wahl der Kryoprotektiva, die für menschliche Spermien verwendet werden, verglichen werden. Es soll außerdem der Stellenwert des DNA-Fragmentationsindex (DFI) diskutiert und das Potenzial der automatisierten Spermienerkennung mit Hilfe der Bildgebungsplattform ScanR bewertet und eingeordnet werden.

1.2. Anatomie der Spermien

Beim Spermium handelt es sich um die reife Keimzelle des Mannes. Abbildung 1 zeigt den detaillierten Aufbau eines Spermiums anhand eines elektronenmikroskopischen Bildes in unterschiedlichen Schnittebenen (Abb. 1). Im ersten Abschnitt eines Spermiums, dem Spermienkopf (Caput), findet man, neben dem Zellkern, der die kondensierte nukleäre DNA beinhaltet, auch das Akrosom. Dieses ist entscheidend für die Penetration und Befruchtung der Eizelle, da es wichtige Enzyme (z.B. Hydrolasen) enthält und als Lysosom fungiert (Fawcett, 1975; Ito & Toshimori, 2016; Schünke et al., 2009). Der zweite Abschnitt besteht aus dem Flagellum, dem Schwanz des Spermiums, mit dem Schwanzfaden (Axonema), der wiederum in die Abschnitte Hals (Pars conjugens), Mittelstück (Pars intermedia), Hauptstück, (Pars principalis), und Endstück (Pars terminalis) unterteilt ist. Das Axonema ist entscheidend für die Motilität des Spermiums. Die Energie hierfür bekommt es durch die Mitochondrien bereitgestellt, die sich im Mittelstück des Axonemas befinden. Es ist zu beachten, dass Mitochondrien eine Hauptquellen von Sauerstoffradikalen darstellen. Ein Übermaß an

Reaktiven Sauerstoff Radikalen (ROS) kann oxidativen Stress induzieren, der durch Lipidperoxidation der Spermienmembran und DNA-Schäden zu einer verminderten Infertilität führen kann (Aitken, 2017; Aitken et al., 1998; Cassina et al., 2015; Sabeti et al., 2016).

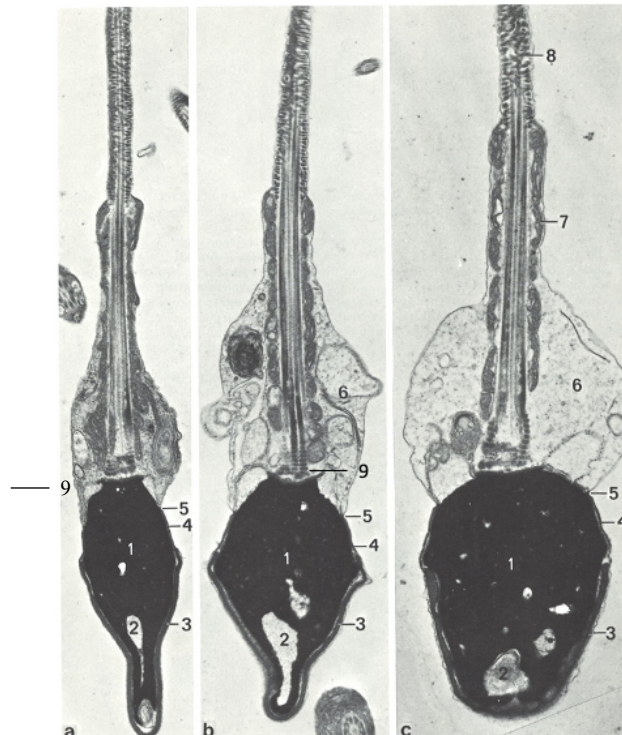


Abb. 1: Spermatozoon

Die Abbildung zeigt drei Längsschnitte eines Spermiums. A) ein Schnitt parallel zum schmalen Profil des Spermienkerns, c) senkrecht zu a). b) zeigt einen Querschnitt. Zu erkennen ist ein dichtes Karyoplasma (1) mit vereinzelt Vakuolen (2), das Akrosom (3), welches den Kern kappenartig bedeckt. Plasma und Kernmembran bilden die postakrosomale dichte Lamina (4), welche durch eine Vertiefung (5) vom zytoplasmatischen Tröpfchen (6) abgegrenzt ist. Der Schwanz beginnt mit dem Hals (9), es folgt das Mittelstück mit den Mitochondrien (7) und Ringfasern (8). Aus: A.F. Holstein und E.C. Roosen-Runge (1981).

1.3. Physiologische Spermatogenese und Spermiogenese

Die Spermatogenese ist von grundlegender Bedeutung für die männliche Fortpflanzungsfunktion. Hierunter werden alle Prozesse gefasst, die zur Bildung reifer männlicher Keimzellen beitragen, also die Proliferation von spermatogonialen Stammzellen bis zur Entwicklung der reifen Spermatozoen. Dieser gesamte Vorgang dauert ca. 74 Tage (Heller & Clermont, 1963; Neto et al., 2016).

Mit dem Eintritt der Pubertät beginnt die durch LH und FSH stimulierte Produktion von Testosteron bzw. Inhibin, die wiederum die Produktion geschlechtsreifer Spermien in den Hodenkanälchen anregen (Wistuba et al., 2022; Ramaswamy und Weinbauer, 2014; Smith und Walker, 2014).

Die Spermatogenese findet im tubulären Kompartiment des Hodens statt, welches ca. 60-80 % des Organs ausmacht (Abb. 2). Zu Beginn der Spermatogenese teilen sich die Stammzellen, die in einem bestimmten Muster in den Samenkanälchen angeordnet sind, anhand derer die Stadien der Spermatogenese bestimmt werden können (Abb. 3).

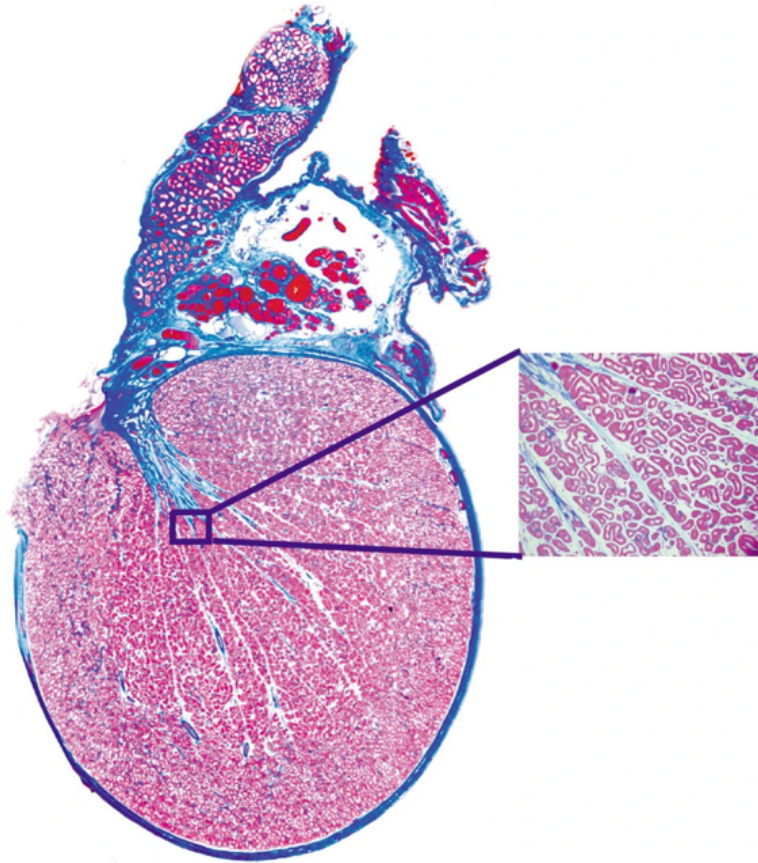


Abb. 2: Querschnitt eines menschlichen Hodens

Die Samenkanälchen sind in Lobuli angeordnet, die durch Bindegewebssepten begrenzt sind. Zwischen den Kanälchen befindet sich das interstitielle Kompartiment (Interstitium). Kaudal ist der Nebenhoden zu sehen. Aus: Wistuba et al. (2023), Präparat zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. A. Friedrich Holstein, Anatomisches Institut der Universität Hamburg.

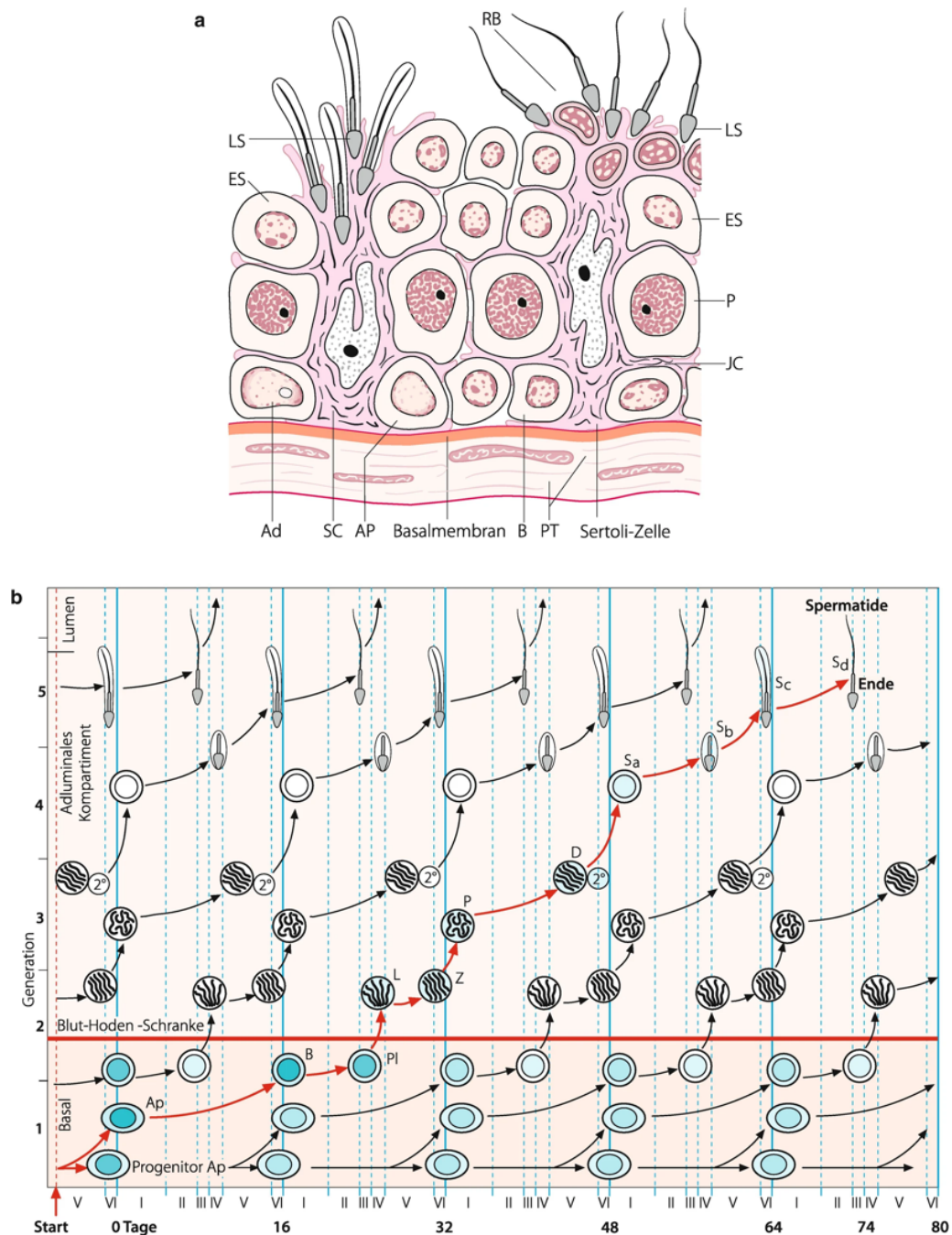


Abb. 3: Keimepithel und Keimzellreifung

a) Mehrschichtige Wand der Tubuli bestehend aus einer Basallamina (BL) und peritubulären Zellen (PT). Angrenzend lassen sich Typ B-Spermatogonien, Typ A dark- und A pale- Spermatogonien (Ad, Ap), sowie Sertoli-Zellen (SC), die durch Kontaktstellen (JC) verbunden sind und die Blut-Hoden-Schrank bilden, erkennen. Weiter apikal sind zuerst die Spermatozyten (P) dargestellt, dann die Spermatischen in ihren unterschiedlichen Reifegraden (ES = frühe, runde Spermatischen, LS = späte, elongierte Spermatischen), sowie die Residualkörper (RB). b) Keimzellreifung. Beginn der Spermatogenese durch Teilung einer Typ A-pale Spermatogonie (Ap), sowie Bildung von Klonen. Wiederholung des Teilungszyklus ca. vier- bis fünfmal, bis ein reifes Spermium (Sd2) gebildet ist. Aus: Wistuba et al. (2023).

Grundsätzlich lässt sich die Keimzellreifung wie folgt gliedern:

- Proliferation und mitotische Teilung der Spermatogonien (diploide Keimzellen) sowie deren Differenzierung,
- Reifeteilung der Spermatozyten (tetraploide Keimzellen) während der Meiose,
- Prozess der Spermiogenese (Umwandlung der Spermatiden in Spermien),
- Spermiation (reife Spermien verlassen das Keimepithel und gelangen in das tubuläre Lumen).

Die Spermatogonien lassen sich morphologisch in Typ A und Typ B klassifizieren. Bei den A-Spermatogonien wird wiederum zwischen verschiedenen Typen unterschieden, z.B. zwischen A dark- und A pale- Spermatogonien. Die Unterscheidung zwischen A dark und A pale bezieht sich unter anderem auf die Proliferationsaktivität. So wurde bereits in den 1960er Jahren von Clermont beschrieben, dass die A dark-Spermatogonien als „inaktivere“ „Reserve-Stammzellen“ (Clermont, 1966) fungieren, die sich entweder zu weiteren A dark-Spermatogonien teilen, oder zu A pale-Spermatogonien entwickeln. Aus diesen entstehen wiederum entweder weitere A pale-Spermatogonien, sodass weiterhin Zellen für die Spermatogenese verfügbar sind, oder es erfolgt die Differenzierung zu B-Spermatogonien (Clermont, 1966; S. Sharma et al., 2019).

Die B-Spermatogonien differenzieren weiter zu Spermatozyten, die verschiedenen Phasen der meiotischen Reifeteilung (Meiose I & II) durchlaufen. Die Chromatinkonfiguration verändert sich und schlussendlich entwickeln sich die Zellen zu haploiden Spermatiden. Es folgt die Differenzierung der Spermatiden zu reifen Spermatozoen, die Spermiogenese (Abb. 4).

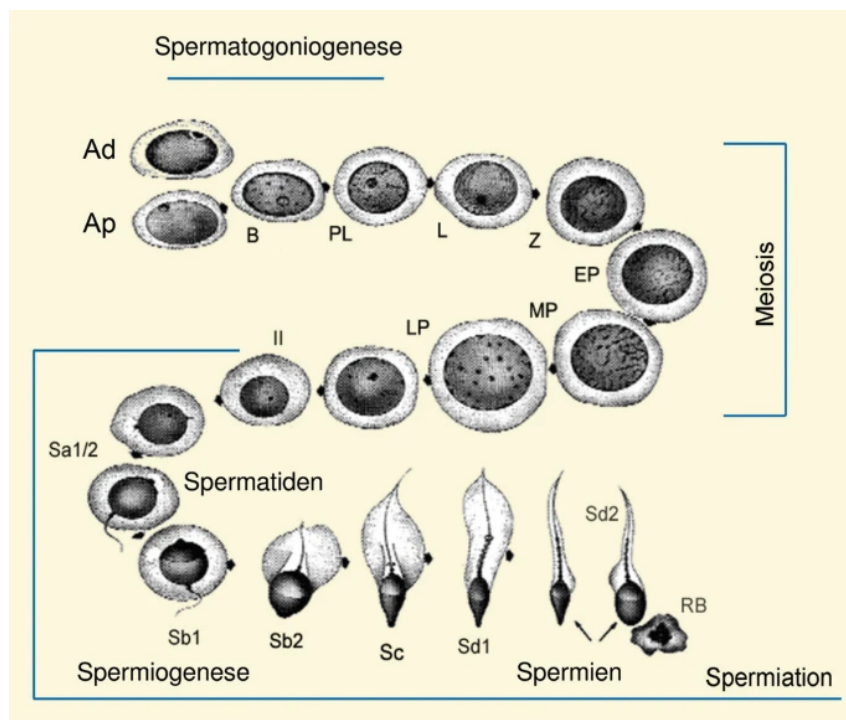


Abb. 4: Keimzelltypen

Zellentwicklung vom Spermatogonium über die Spermatozyten bis hin zum reifen Spermium. Ad, A dark-Spermatogonie; Ap, A pale-Spermatogonie; B, B-Spermatogonie; PL, präleptotener Spermatozyt; L, leptotäner Spermatozyt; EP, früher pachytäner Spermatozyt; MP, mittlerer pachytäner Spermatozyt; LP, später pachytäner Spermatozyt; II, zweite meiotische Teilung; RB, Residualkörper; Sa1–Sd2, Spermatidenreifungsstadien. Aus: Wistuba et al. (2023).

Hierbei findet eine Kondensierung des Zellkerns auf ca. 10 % des Ausgangsvolumens statt. Die DNA liegt in einer hochkomprimierten Konformationsform vor. Im Anschluss wird über mehrere Phasen das Akrosom gebildet. In der Golgi-Phase fusionieren Lysosome zum Akrosombläschen, das im Verlauf abflacht und sich als Kappe an den elongierten Zellkern auflegt (Kappenphase).

Während der Akrosomphase wird das Akrosom finalisiert, der Zellkern kondensiert und es werden notwendige Enzyme für die Kapazitation bereitgestellt (Krause et al., 2011).

Am Ende werden die reifen Spermatozoen aus den Hodenkanälchen freigesetzt und gelangen in den Nebenhoden, wo sie weiter reifen und gelagert werden (Krause et al., 2011).

Diese komplexe Abfolge gewährleistet die kontinuierliche Produktion von reifen Spermatozoen, die für die männliche Fortpflanzungsfunktion von elementarer Bedeutung sind (Neto et al., 2016; Nieschlag et al., 2009).

1.4. Aufbau der DNA

Die DNA ist die Grundlage des genetischen Codes, der die Vererbungsvorgänge kontrolliert und die grundlegenden Baupläne und Anweisungen für die Entwicklung, Funktion und Erhaltung eines Organismus enthält. Es handelt sich bei der DNA um eine Doppelhelix, ähnlich einer spiralförmigen Leiter, die sich im Zellkern fast aller Zellen unseres Körpers befindet. Die Bausteine der DNA sind die Nukleotide. Sie bestehen aus einem Zucker, einer Base (Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G)) und einem Phosphatrest. Die Basen sind in vorgegebenen Paaren (A und T sowie C und G) durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. So entstehen in der **nukleären DNA (nDNA)** zwei DNA-Stränge, die in antiparalleler Richtung vorliegen. Dies bedeutet, dass an einem Ende des Stranges entweder die 5'-Phosphorsäuregruppe frei ist, oder die 3'-OH-Gruppe des Zuckermoleküls freiliegt (Höhn et al., 2017, Abb. 5). Im Verlauf der Spermiogenese werden Histone infolge posttranslationaler Modifikationen weitgehend (zu 85–90 %) durch kleinere Protamine ersetzt (Marchiani et al., 2020; Abb. 6). Hieraus ergibt sich ein kompaktes Chromatin, welches in den kleinen Zellkern der Spermien passt und während der Passage durch den männlichen und weiblichen Genitaltrakt gut vor äußeren Einflüssen geschützt ist (Agarwal & Said, 2003; Fuentes-Mascorro et al., 2009; Marchiani et al., 2020; Ward, 2010). Dennoch gibt es Faktoren, die zu einer fehlerhaften DNA-Integrität führen und somit einen negativen Einfluss auf die männliche Fertilität haben können (Cescon et al., 2020; Evenson & Wixon, 2006; Leslie et al., 2023; Nieschlag et al., 2020; Simon et al., 2017a; Trottmann & Weidner, 2023). Auf einige dieser Einflüsse wird im Verlauf dieser Arbeit eingegangen.

In den Mitochondrien, die im Mittelstück des Spermiums lokalisiert sind, befindet sich die ringförmige doppelhelikale **mitochondriale DNA (mtDNA)**. In Zusammenarbeit mit der nDNA kodieren die mtDNA Proteine, die für die ATP-abhängige Spermienfortbewegung nötig sind. Die mtDNA ist instabiler und weniger geschützt als die nDNA, und verfügt über weniger Reparaturmechanismen als die nDNA. Auch die Nähe zur Produktionsstätte der ROS, führt zu einer hohen Mutationsrate der mtDNA (Song et al., 2014). So können Deletionen oder Defekte der mtDNA in einer gestörten Motilität der Spermien resultieren und somit zur männlichen Infertilität beitragen (Karimian & Babaei, 2020).

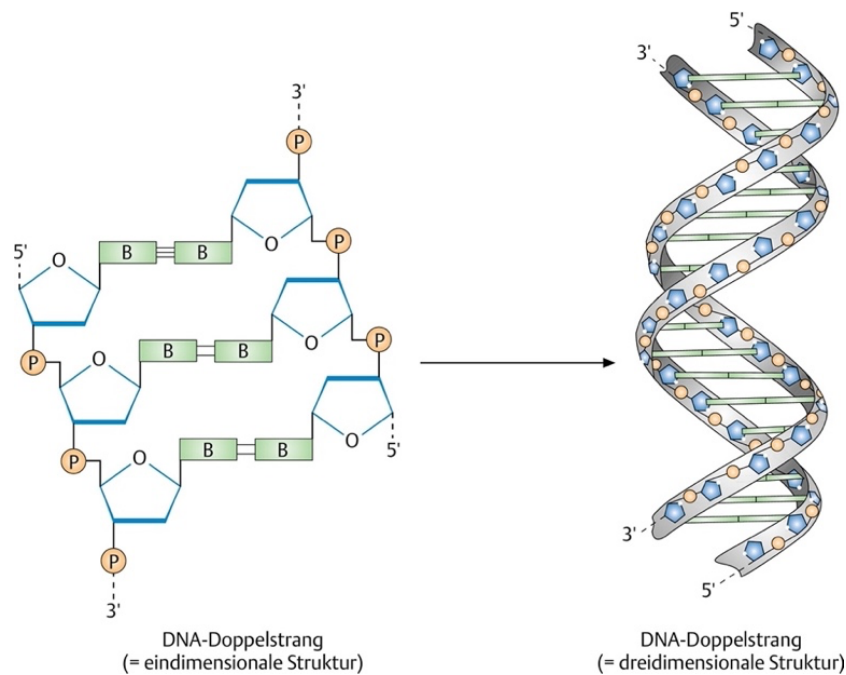


Abb. 5: DNA-Doppelhelixstruktur

Zwei DNA-Stränge die antiparallel zueinander verlaufen. Wasserstoffbrückenbindungen verbinden die komplementären Basenpaare (B), während die Zucker (blau) durch Phosphatbrücken (P) verknüpft, das Rückgrat der Doppelhelix bilden. Aus: Grundlagen der Genetik, Aufbau des Genoms und Weitergabe der genetischen Information, Höhn et al. in: Taschenlehrbuch, Humangenetik, Thieme (2017).

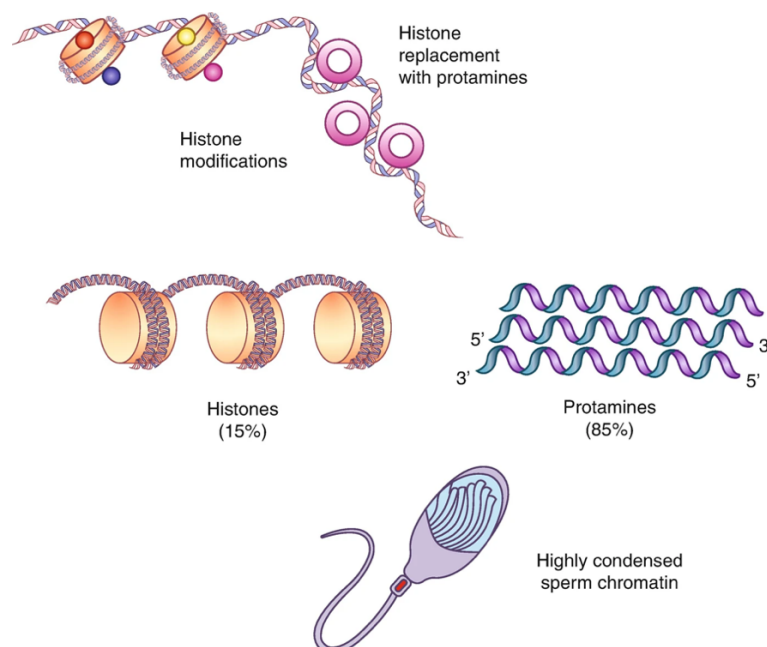


Abb. 6: Chromatinkomposition im menschlichen Spermium

Durch Modifikationen nach der Translation werden Histone zu circa 85 % durch kleinere Moleküle, die Protamine, ersetzt. Das Resultat ist ein hochkomprimiertes Chromatin im Nukleus des Spermiums. Aus: Marchiani et al. (2020).

1.5. Ursachen von Fertilitätsstörungen des Mannes

Die Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen lassen sich vielfältig klassifizieren (Lokalisation, Art der Störung, etc.) und ein großer Anteil dieser ist multifaktorieller Genese. Circa 1/3 der Fälle weisen keine eindeutige Ursache auf, dies wird als idiopathische Infertilität bezeichnet (Nieschlag, 2023; Trottmann & Weidner, 2023).

1.5.1. Prätestikuläre Ursachen

Ätiologisch lassen sich sowohl genetische als auch endokrine Krankheitsbilder als Ursache für eine prätestikuläre Fertilitätsstörung feststellen. Etwaige Störungen in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse können zu einer gestörten Hodenfunktion führen. Beispielhaft lassen sich hier das Kallmann-Syndrom (kongenitaler hypogonadotroper Hypogonadismus) oder die Hyperprolaktinämie nennen (Nieschlag et al., 2020; Trottmann & Weidner, 2023).

1.5.2. Testikuläre Ursachen

Ursachen, die die Testis als solche betreffen, können unter anderem (epi-)genetischer, kongenitaler, entzündlicher oder onkologischer Genese sein. Krankheiten wie das Klinefelter-Syndrom, das Kartagener-Syndrom, andere chromosomale Aberrationen, oder auch schädliche Umwelteinflüsse (Strahlung, Medikamente, Rauchen) können die Ursache für einen ausbleibenden Kinderwunsch darstellen (Cescon et al., 2020; Leslie et al., 2023). Testikuläre Tumore, ein Maldecensus testis, Varikozele, Orchitis, oder andere Ursachen, die die Hoden direkt betreffen, machen zusammen ca. 20 % der Ursachen männlicher Infertilität aus (Trottmann & Weidner, 2023; Nieschlag et al., 2009).

1.5.3. Posttestikuläre Ursachen

In diesem Fall ist es nicht die Hodenfunktion, die gestört ist, sondern vielmehr der Transportweg aus dem Hoden heraus. Ursachen hierfür können z.B. obstruktiver, entzündlicher oder immunologischer Genese sein. Auch genetische Veränderungen, wie die kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD), können zu einer Transportstörung der Samenflüssigkeit und somit zu männlicher Infertilität führen (Nieschlag et al., 2009; Schuppe et al., 2015; Trottmann & Weidner, 2023).

1.6. Entstehung von DNA-Schäden in menschlichen Spermien

Die Entstehung von DNA-Schäden in Spermien ist ein Prozess, der von einer Vielzahl endogener und exogener Faktoren beeinflusst werden kann. Es ist bekannt, dass eine eingeschränkte DNA-Integrität zur Beeinträchtigung der Fertilität und Schwierigkeiten der Konzeption führen kann, weshalb es von Bedeutung ist, die zugrundeliegenden Ursachen näher zu beleuchten (Agarwal et al., 2020; Esteves et al., 2021; Robinson et al., 2012).

1.6.1. Apoptose

Die Apoptose in Spermienzellen ist ein regulierter Zelltodmechanismus, der eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Qualität und Funktionalität des männlichen Fortpflanzungssystems spielt und einen physiologischen Prozess der Spermatogenese darstellt. Spermien werden kontinuierlich produziert, wobei nicht alle die volle Reife erreichen, oder genetisch intakt sind. Durch den Vorgang der Apoptose werden abnorme oder beschädigte Spermien eliminiert, sowie die Überproduktion vermieden.

Der Vorgang der Apoptose wird durch verschiedene intrinsische und extrinsische Signale gesteuert und durch Caspasen ausgelöst.

Der intrinsische Weg wird von Initiator-Caspasen gestartet, die, nach dem Empfangen eines Signals der Zellschädigung, wiederum Effektor-Caspasen aktivieren. Hierdurch werden weitere Enzyme, wie die Nukleasen, aktiviert, die die DNA spalten (Grunewald et al., 2005).

Die Aktivierung der Caspasen über den extrinsischen Weg erfolgt durch den Fas-Rezeptor (Todesrezeptor) und den Fas-Liganden (Nieschlag et al., 2009; Agarwal & Said, 2003; Abb. 9). Bei infertilen Männern oder Patienten mit funktionell geschädigten Spermien können diese Rezeptoren auf circa der Hälfte der Zellen zu finden sein, bei gesunden Männern ist diese Zahl deutlich geringer (Agarwal & Said, 2003; Muratori et al., 2015; Panner Selvam et al., 2021; Sakkas et al., 2003).

1.6.2. Chromatinkondensationsdefekte

Eine weitere Ursache für erhöhte Spermien-DNA-Fragmentation kann eine defekte Chromatinkondensation sein. Im Rahmen der Spermiogenese erfolgt hierzu ein Austausch der Histone gegen kleinere Protamine, die eine dichtere Verpackung der DNA ermöglichen (Marchiani et al., 2020; Ni et al., 2016).

In diesem Prozess werden durch das Enzym Topoisomerase II (TOP2) gezielt vorübergehende DNA-Doppelstrangbrüche induziert, um die DNA zu entwirren, und damit die für den Histon-Austausch notwendige verringerte Supercoiling-Rate der DNA zu erreichen (Ward et al., 2011). Die TOP2 besitzt auch eine Ligase-Funktion, mit der DNA-Strangbrüche wieder repariert werden können (Panner Selvam et al., 2020). Gibt es einen Defekt in diesem Reparaturmechanismus, bleiben die Strangbrüche bestehen, und es entwickeln sich unreife, geschädigte Spermien (Marchiani et al., 2020). Ein Mangel an Protamin und ein Überschuss an Histonen, spiegelt sich in einer erhöhten DNA-Fragmentation wider. Dies kann zu männlicher Infertilität führen und sich auch durch schlechte Ergebnisse bei den assistierten Reproduktionstechnologien zeigen (Marchiani et al., 2020; McPherson & Longo, 1993; Rousseaux et al., 2011).

1.6.3. Reaktive Sauerstoffspezies

Es ist bekannt, dass reaktiver oxidativer Stress (ROS) eine weitere Ursache für DNA-Fragmentation in menschlichen Spermien darstellt (Agarwal et al., 2016b; Aitken, 2017; Thomson et al., 2009a; Twigg et al., 1998). Es wird berichtet, dass ROS in 30 bis 80 % der unfruchtbaren Männer ein beitragender Faktor sein können (Wagner et al., 2018; Agarwal et al., 2014). ROS sind hochreaktive Moleküle, die unter anderem als Nebenprodukt des aeroben Metabolismus produziert werden. In normalen Mengen werden sie für verschiedene zelluläre Prozesse benötigt.

Faktoren, die zu einem Überschuss an ROS in Spermien führen können, sind beispielsweise Infektionen, (Umwelt-)Gifte, Entzündungen, Wärme, Rauchen oder schlechte Lebensgewohnheiten, die zu hyperglykämischen Stoffwechsellagen führen (Hoeijmakers, 2009).

Eine übermäßige ROS-Produktion führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Oxidations- und Reduktionsreaktionen. Die Spermienmembran, mit ihrer hohen Dichte an Fettsäuren, ist, ebenso wie die Nukleinsäuren der Spermien-DNA und die Mitochondrien, besonders anfällig für oxidativen Stress (Wagner et al., 2018; Agarwal & Said, 2003; Abb.7).

Solche fragmentierten DNA-Stränge können bei der Befruchtung einer Eizelle zu genetischen Fehlern führen oder die Befruchtungsfähigkeit eines Spermiums insgesamt beeinträchtigen. Auch kann das Risiko an Fehlgeburten erhöht werden (Agarwal & Said, 2003; Agarwal et al., 2016b).

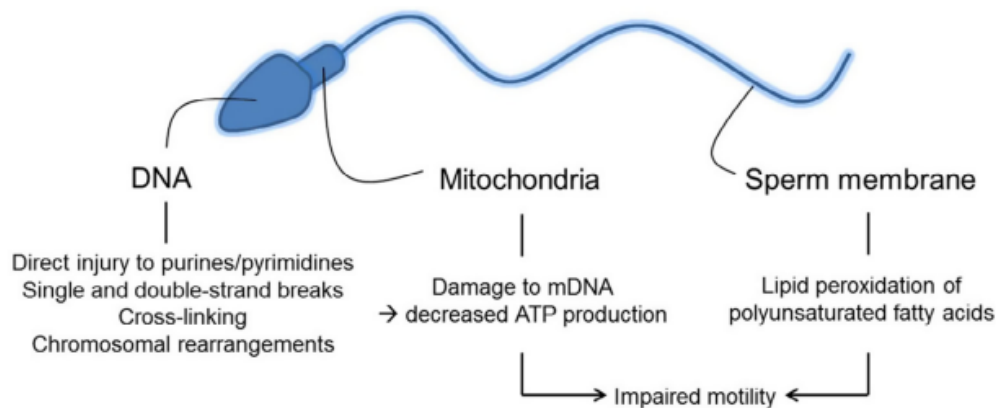


Abb. 7: Angriffsorte von Sauerstoffradikalen im Spermium

Drei Orte des Spermiums sind besonders anfällig für Schäden durch ROS: 1) Die DNA, durch direkte Schädigung der Basen durch toxische Nebenprodukte und mangelhafte Protaminierung; 2) die Mitochondrien, durch exzessive intrinsische Produktion von ROS als Nebenprodukt des aeroben Metabolismus; 3) die Spermien-membran, durch hohe Suszeptibilität der Fettsäuren gegenüber oxidativem Stress. Aus Wagner et al. (2018).

1.6.4. DNA-Reparaturmechanismen

Relevante Reparaturmechanismen humaner Spermien-DNA sind unter anderem die Nukleotidexzisions-, die Basenexzisions-, die DNA-Fehlpaarungs-, die Doppelbruch- und die Postreplikationsreparatur. Diese Mechanismen sind wichtig, um die häufigen (10^5), spontan auftretenden Schäden der Spermien-DNA zu revertieren (Gunes et al., 2015; Hoeijmakers, 2009; Kuchakulla et al., 2021). Jeder dieser Prozesse ist spezifisch für einen der auf unterschiedliche Weise verursachten DNA-Schäden (Abb. 8). Defekte in diesen Reparaturmechanismen führen zu eingeschränkter Spermienqualität und können damit einen negativen Effekt auf die Reproduktionsfähigkeit eines Mannes ausüben (Kuchakulla et al., 2021; Gunes et al., 2015; Newman et al., 2022). Die Reparaturkapazität der Spermien nimmt nicht nur während der Spermiogenese, sondern auch mit dem Alter ab. In den Spermatozoen ist sie kaum noch vorhanden, sodass dieser Zelltyp besonders suszeptibel für DNA-Schäden ist (Brinkworth & Toppari, 2020).

Interessanterweise finden DNA-Reparaturmechanismen nicht nur im Spermium selbst statt. Auch Oozyten sind in der Lage, paternal entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Diese Fähigkeit sinkt allerdings ebenso mit steigendem maternalen Alter (Horta et al., 2020; Newman et al., 2022).

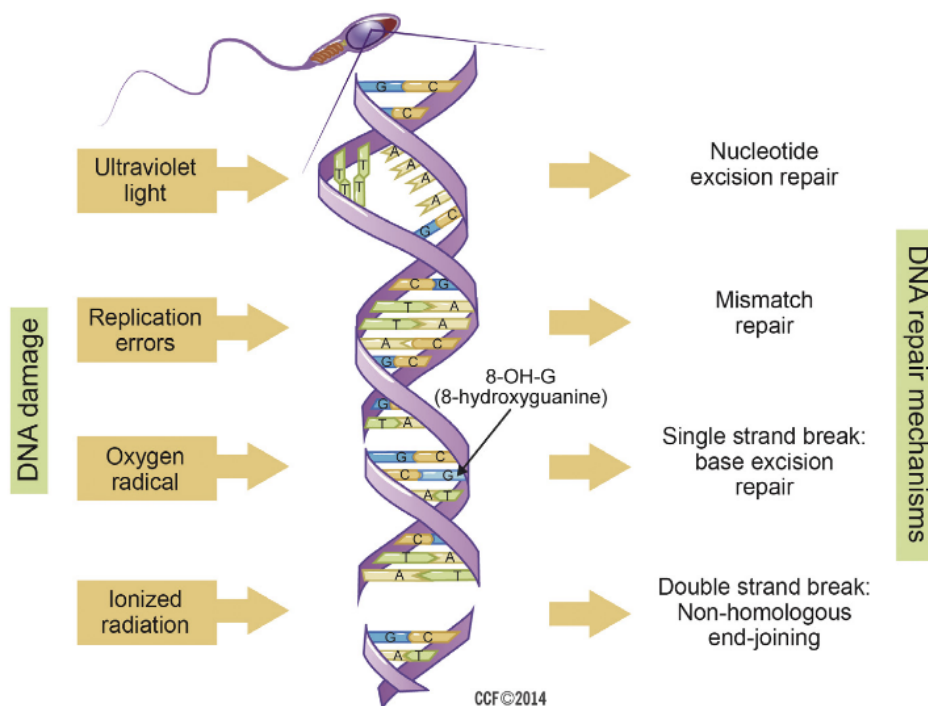


Abb. 8: Ursachen der DNA-Fragmentation und Reparaturmechanismen

Ätiologie der DNA-Schäden und individuelle Reparaturmechanismen. Aus Gunes et al. (2015).

1.6.5. Umwelteinflüsse

Eine Vielzahl von Umwelteinflüssen kann zu erhöhtem oxidativem Stress und zu einer geschädigten Spermien-DNA führen (R. Sharma et al., 2013). Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass ionisierende Strahlung einer dieser schädigenden Einflüsse ist (Clifton & Bremner, 1983). Ab welchen Werten sich diese toxische Wirkung genau zeigt, ist nicht gesichert. Es wird jedoch beschrieben, dass es ab Werten von mehr als 4 Gy zu einer dauerhaften Azoospermie kommen kann (Brinkworth & Toppari, 2020). Sowohl ionisierende, als auch nicht-ionisierende Strahlung kann einen negativen Einfluss auf die Spermienqualität, insbesondere die Spermien-DNA, ausüben (Kesari et al., 2018). Auch der Einfluss vom Zigarettenrauch hat negative Auswirkungen auf die Spermienqualität. Potts und Kollegen beschrieben bereits 1999 die vermehrte ROS-Bildung und auffällige Chromatinveränderungen, wie DNA-Strangbrüche, im Ejakulat von Rauchern (Potts et al., 1999). Dies wurde, ebenso wie der negative Effekt von Alkohol (Aboulmaouahib et al., 2018; Harlev et al., 2015) auf die Spermienqualität, in Studien der letzten Jahre bestätigt (Aitken, 2020; R. Sharma et al., 2016b).

Krebsbehandlungen, wie Chemotherapien, sind eine weitere Ursache toxischer DNA-Schäden. Abhängig von ihrem Angriffsort können diese eine erhöhte DNA-Fragmentation hervorrufen, oder zu einer irreversiblen Azoospermie führen (Brinkworth & Toppari, 2020). Auch ein erhöhtes paternales Alter scheint die Spermienqualität negativ zu beeinflussen

(Colasante et al., 2019; Gonzalez et al., 2022, Kadoch et al., 2024). Dies ist von Bedeutung, da das Alter der Väter in den letzten Jahren immer weiter zugenommen hat (Brandt et al., 2019; Gonzalez et al., 2022). Insbesondere die erhöhte Spermien-DNA-Fragmentation konnte ab einem Lebensalter von 40 Jahren nachgewiesen werden (Alshahrani et al., 2014; Colasante et al., 2019). In der folgenden Abbildung sind die schädigenden Umwelteinflüsse, wie Hitze, Übergewicht, ein ungesunder Lebensstil, sowie Infektionen, als weitere Ursachen einer potentiellen Spermenschädigung zusammengefasst (Panner Selvam et al., 2021; Abb. 9).

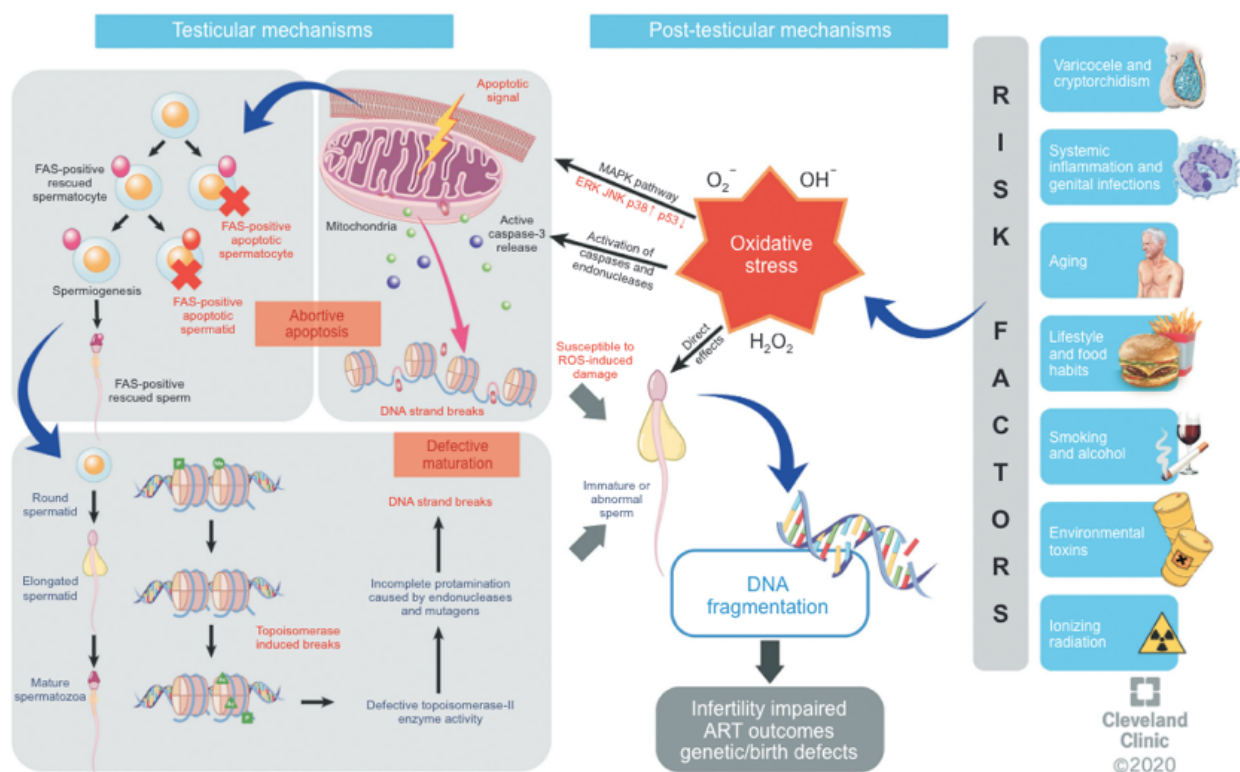


Abb. 9: Ursachen der DNA-Fragmentation in Spermien, Übersicht

Oxidativer Stress, abortive Apoptose, und defekte Chromatinverpackung werden beschrieben. Rechts: verschiedene Umweltfaktoren, die zu erhöhter DNA-Fragmentation führen. MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), ERK (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase), JNK (c-JUN N-terminale Kinase). Aus Agarwal et al., 2020.

1.7. Untersuchungen zur Detektion von DNA-Fragmentation in Spermien

Es existieren verschiedene Untersuchungstechniken, um die DNA-Integrität humaner Spermien zu analysieren. Unterschieden wird hierbei vor allem zwischen direkten und indirekten Tests. Direkte Tests analysieren das tatsächliche Ausmaß der DNA-Schädigung. Zu den direkten Tests gehören der Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)-Assay und der Comet-Assay. Indirekte Tests, wie der Sperm

Chromatin Structure Assay (SCSA), der AO-Test und der Sperm Chromatin Dispersion (SCD)-Assay, untersuchen die Empfindlichkeit der Spermien-DNA gegenüber denaturierenden Bedingungen (Agarwal et al., 2016a).

Die genannten Tests können nicht gleichzeitig zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen differenzieren. Für diesen Zweck muss der zweiseitige Comet-Assay herangezogen werden (Agarwal et al., 2020; Cortés-Gutiérrez et al., 2017).

1.7.1. Direkte Detektion der DNA-Fragmentation mittels TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay gehört zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Detektion von DNA-Fragmentation (Agarwal et al., 2024; Baskaran et al., 2019). Er wird als besonders sensitiv angesehen (Panner Selvam & Agarwal, 2018; Ribeiro et al., 2017). Im Rahmen der TUNEL-Färbung werden die durch Fragmentierung entstandenen freien OH-Enden der DNA detektiert und mithilfe einer Transferase markiert. Die Transferase katalysiert den Vorgang, indem ein Fluoreszein-markiertes Nukleotid-Molekül an die freien DNA-Enden ligiert wird (Nordhoff, 2023; R. Sharma et al., 2021). Im Anschluss kann der Prozentwert der fluoreszierenden Spermienköpfe fluoreszenzmikroskopisch oder mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Bei fluoreszierenden Spermien handelt es sich um TUNEL-positive, bei nicht-fluoreszierenden um TUNEL-negative Zellen (Abb. 10). Es gibt keinen einheitlichen Referenzwert für die TUNEL-Untersuchung. Die Werte variieren je nach Labor und Auswertungsmethode. In der Literatur werden je nach Untersuchungsmethode Grenzwerte zwischen 12-36 % beschrieben (Agarwal et al., 2024; Agarwal et al., 2016b; Benchaib et al., 2003; Ribas-Maynou et al., 2013; Sergerie et al., 2005; R. Sharma et al., 2016a). Häufig wird jedoch mit Werten um 20 % als Grenzwert gearbeitet.

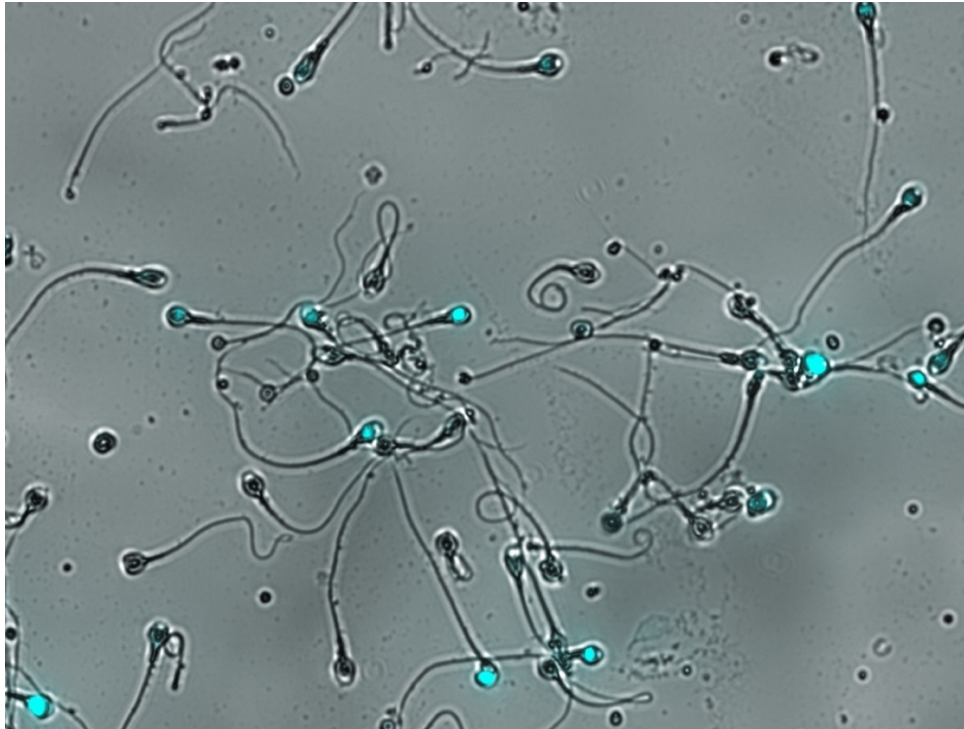


Abb. 10: TUNEL-Färbung

Blau fluoreszierende Spermienköpfe, TUNEL-positiv, fragmentierte Spermien-DNA; nicht fluoreszierende Spermienköpfe, TUNEL-negativ, intakte Spermien-DNA. Foto aufgenommen am ScanR (Olympus; 40er Objektiv), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

1.7.2. Direkte Detektion der DNA-Fragmentation mittels Comet Assay

Bei dem Comet-Assay handelt es sich um einen Test, der mittels Gel-Elektrophorese die Migration von fragmentierter DNA quantifiziert. Die Spermienzellen werden in einem Agarosegel eingebettet und lysiert, um das Chromatin zugänglich zu machen und die eng gebundenen Protamine und Histone zu lösen (Evenson, 2016). Die Elektrophorese kann in neutralen oder alkalischen Bedingungen durchgeführt werden, um zwischen Doppelstrangbrüchen und Einzelstrangbrüchen in der DNA zu unterscheiden (Singh et al., 1988). Die fragmentierte DNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Migrieren diese Bruchstücke nun im elektrophoretischen Feld, entsteht unter einem Fluoreszenzmikroskop das Bild des namensgebenden Kometenschweifes (Evenson, 2016; Abb. 11). Die Länge dieses Kometenschwanzes dient als Indikator zur Evaluation der DNA-Fragmentationsrate (Dutta et al., 2021; Nordhoff, 2023; Simon et al., 2017b). Der modifizierte zweiseitige Comet-Assay ermöglicht die gleichzeitige Detektion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in einem Spermium (Agarwal et al., 2020; Cortés-Gutiérrez et al., 2017).

Die DNA-Analyse durch den Comet-Assay lässt sich insbesondere verwenden, um im Falle einer ungeklärten Unfruchtbarkeit die Entwicklung der Embryonen nach ART vorherzusagen

und kryobedingte DNA-Schäden zu analysieren (Casanovas et al., 2019; Duty et al., 2003; Simon et al., 2011).

Der Comet-Assay wird in der Literatur als sensitive, unkomplizierte Möglichkeit zur Detektion von DNA-Fragmentation beschrieben (Agarwal et al., 2020; Nordhoff, 2023; Panner Selvam et al., 2021; Simon et al., 2011). Es gilt jedoch zu beachten, dass es ein subjektiver Test bleibt, der von geschultem Personal ausgewertet werden sollte (Panner Selvam et al., 2021).

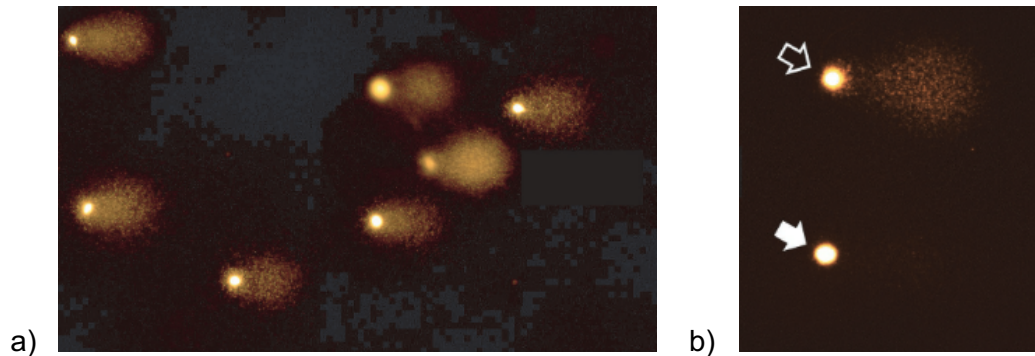


Abb. 11: Comet-Assay

Fluoreszenzmikroskopische Fotos. a) Die Länge und die Intensität der Kometenschweife korreliert mit der DNA-Fragmentation, b) Oben Spermium mit charakteristischem Kometenschweif durch DNA-Fragmentation. Unten: Ein Spermium mit einem minimal sichtbaren Schweif durch einen geringen Anteil an DNA-Fragmentation, der in nahezu jedem Spermium (auch bei fertilen Männern) zu finden ist. Aus Esteves et al. (2021), modifiziert.

1.7.3. Analyse der DNA-Fragmentierung mittels SCSA und AO-Test

Der SCSA ist ein indirekter Test, der die Anfälligkeit von Spermien-DNA zur Denaturierung, z.B. durch Säure, untersucht. Es ist die durchflusszytometrische Version des AO-Tests, das Prinzip der DNA-Färbung ist dasselbe, weshalb im Folgenden beide Tests zusammen beschrieben werden. Nachdem die Spermien-DNA durch eine kurze kontrollierte Behandlung mit einer Säure (s. 2.2.6.2) zugänglich gemacht wurde, bindet der AO-Farbstoff an die DNA. Aufgrund der metachromatischen Eigenschaften von Acridinorange fluoreszieren Spermien mit intakter, doppelsträngiger DNA grün, während solche mit denaturierter, einzelsträngiger DNA eine orange bis rote Fluoreszenz aufweisen (Evenson, 2016; Agarwal et al., 2016b; Barbăroșie et al., 2021; Sharma et al., 2021; Abb. 12).

Die Analyse der AO-Färbung kann subjektiv unter einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen, jedoch kann eine deutlich höhere Anzahl an Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden (Evenson, 2016; Nordhoff, 2023). Unabhängig davon, welche Auswertungsmethode gewählt wird, wird abschließend der DNA-Fragmentationsindex (DFI) bestimmt. Der DFI beschreibt das Verhältnis von rot gefärbten Spermienköpfen (fragmentierte DNA) zur Gesamtfluoreszenz (roten und grünen Köpfen) (Evenson et al., 2002).

In der Literatur werden nach zu untersuchendem Ergebnis verschiedene Grenzwerte für den DFI beschrieben. Die detaillierten Werte sind in dem Review von Esteves und Kollegen zusammengefasst (Esteves et al., 2021). Zur Diagnostik der Infertilität werden Werte zwischen 20-25 % postuliert (Evenson, 2022; Santi et al., 2018, Sergerie et al., 2005).

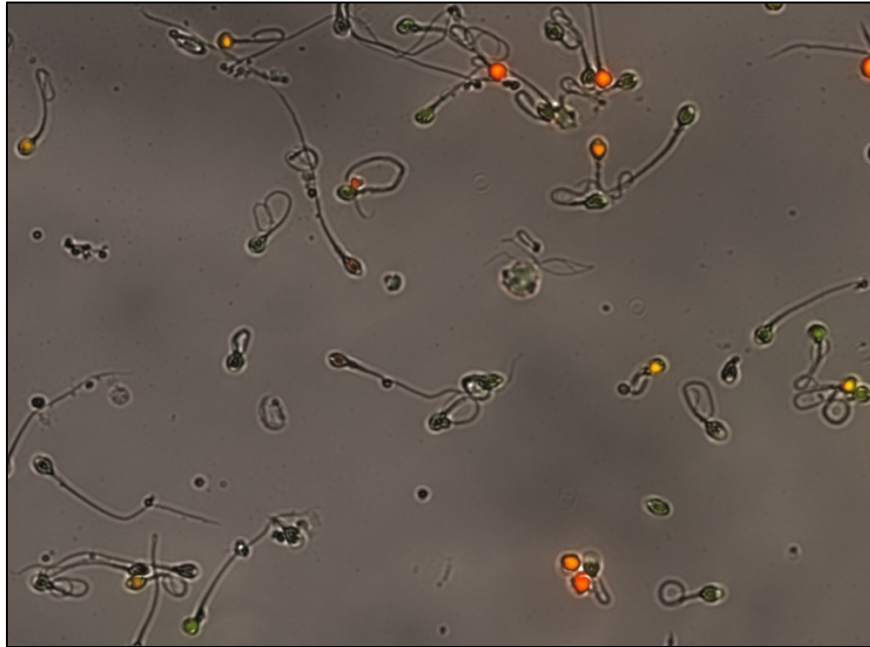


Abb. 12: AO-Färbung

Rot/orange fluoreszierende Spermienköpfe, AO-positiv, fragmentierte Spermien-DNA; grün fluoreszierende Spermienköpfe: AO-negativ, intakte Spermien-DNA. Foto aufgenommen am ScanR (Olympus; 40er Objektiv), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

1.7.4. Analyse der DNA-Fragmentierung mittels SCD-Assay

Der SCD-Assay, auch als Halo-Test bekannt, ist ein indirekter Test, der insbesondere den Anteil der Spermien mit schlecht gepacktem Chromatin untersucht und die Streuung von DNA-Fragmenten beurteilt (Dutta et al., 2021). Die Spermien werden in einem sauren Medium denaturiert. Daraufhin zeigen diejenigen mit intaktem Chromatin charakteristische DNA-Schleifen (Halos) um den Spermienkopf herum (Barbăroșie et al., 2021; Esteves et al., 2021; Abb. 13). Fragmentierte oder defekte DNA bildet keine, oder nur kleine Halos aus (Barbăroșie et al., 2021; Esteves et al., 2021; Nordhoff, 2023; Abb. 13). Ebenso wie bei den anderen Tests, variieren die in der Literatur beschriebenen DFI-Grenzwerte für dem SCD-Assay (Barbăroșie et al., 2021; Ribas-Maynou et al., 2013).

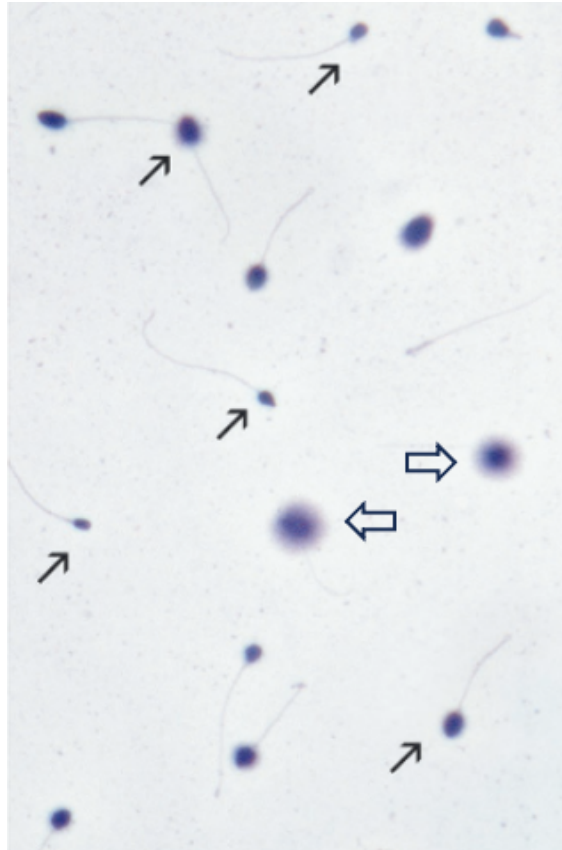


Abb. 13: SCD-Assay

Spermienzellen unter dem Hellfeldmikroskop. Die schmalen Pfeile zeigen auf fragmentierte Spermien, die nach Säuredenaturierung kein charakteristisches „Halo“ ausbilden. Breite Pfeile verweisen auf intakte Spermien. Aus Esteves et al. (2021), modifiziert.

1.8. Stellenwert der DNA-Fragmentations-Analyse

Zusätzlich zu den routinemäßig untersuchten Spermienparametern werden immer häufiger auch Tests zur Bestimmung des DFI in die Beurteilung der Ejakulatqualität einbezogen, auch wenn ihr Stellenwert noch kontrovers diskutiert wird (Agarwal et al., 2023; Nordhoff & Kliesch, 2019). Die European Association of Urology (EAU) spricht jedoch unter bestimmten Voraussetzungen eine Indikation zur DNA-Untersuchung aus (Minhas et al., 2021; Ribas-Maynou et al., 2013; Tharakan et al., 2022). Der prädiktive Wert der DNA-Untersuchungen scheint zudem für die klinische Diagnostik relevant zu sein (Agarwal et al., 2016b). So zeigen Studien eine negative Korrelation zwischen erhöhtem DFI und der Rate an Lebendgeburten nach In-vitro-Fertilisation (IVF) (Osman et al., 2015; Simon et al., 2013; Ribas-Maynou et al., 2021, Zheng et al., 2018). Diese These wurde ebenfalls von Henkel und Kollegen in ihrer Studie untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhöhte DNA-Fragmentation nicht direkt mit der Befruchtungsrate korrelierte, jedoch die Schwangerschaftsrate bei IVF-Patienten signifikant reduzierte. Dies deutet darauf hin, dass Spermien mit beschädigter DNA zwar eine Eizelle

befruchten können, die embryonale Entwicklung jedoch möglicherweise beeinträchtigt ist, sobald das väterliche Genom aktiviert wird (Henkel et al., 2003).

So zeigten auch Horta und Kollegen, dass trotz eines hohen DFI eine IVF-Befruchtung normal verlaufen kann. Dies kann auf den oben bereits angesprochenen Reparaturmechanismus der Eizellen hindeuten (Horta et al., 2020).

Auch wird die Durchführung einer DNA-Analyse bei Patienten mit Varikozele und grenzwertigen SpermioGrammparametern empfohlen. Ein hoher DFI kann als Indikator zur Durchführung einer testikulären Spermienextraktion (TESE), sowie zur Varikozelektomie dienen (Agarwal et al., 2016b).

Es wird deutlich, dass zur Erkennung der männlichen Infertilität die aktuelle routinemäßige Ejakulatanalyse nicht ausreichend ist. Mit den Untersuchungen der DNA-Integrität kommt ein weiteres nützliches Diagnoseinstrument hinzu. Dennoch bleibt die mangelnde Vergleichbarkeit zwischen den etablierten Untersuchungsmethoden ein wesentlicher Nachteil. Es gilt, einheitliche Protokolle zu etablieren, um die Fertilitätsdiagnostik zu verbessern (Agarwal et al., 2024; Esteves et al., 2021; Nordhoff et al., 2023).

1.9. SpermioGramm nach WHO

Die routinemäßig erfolgende SpermioGramm-Analyse stellt die Basisdiagnostik für jedes andrologische Labor dar. Es handelt sich um eine standardisierte Untersuchung, die nach den aktuellen WHO-Richtlinien durchgeführt wird und zur Abschätzung des Fruchtbarkeitspotentials dient. Sie ist gemäß der Richtlinie zur Qualitätssicherung der Laboratoriumsdiagnostik der Bundesärztekammer geregelt (RiLiBÄK, 2022). Die untersuchten Parameter und ihre Grenzwerte sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach Gewinnung des Ejakulates und ausreichend Verflüssigungszeit (30 min bei 37°C), wird dieses von geschultem Fachpersonal unter 400-facher Vergrößerung untersucht. Laut WHO wird eine Verflüssigungszeit von 30 bis 60 Minuten bei 37°C nach Gewinnung der Ejakulatprobe empfohlen (WHO, 2021). Eine Lagerung über 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) führen zu einer verminderten Motilität der Spermien, während nach 120 Minuten die Vitalität der Spermien negativ beeinflusst wird (Ouitrakul et al., 2018). Es erfolgt immer eine Doppelbestimmung und die Berechnung des Mittelwertes.

Ejakulatparameter	Unterer Referenzwert WHO 2010	Unterer Referenzwert WHO 2021+
Ejakulatvolumen (ml)	≥1,5	≥1,4
pH-Wert	>7,2	–
Spermienkonzentration (Mio./ml)	≥15	≥16
Gesamtspermienzahl (Mio./Ejakulat)	≥39	≥39
Spermiengesamtmotilität (PR+NP, %)	≥40 % motile Spermien (PR + NP)	≥42 % (PR + NP)
Progressive Spermienmotilität (PR, %)	≥32 %	≥30 %
Spermienmorphologie (%)	≥4 % normale Spermien	≥4 % normale Spermien
Peroxidasepositive Leukozyten (Mio./ml)	<1	–
MAR-Test	<10 % motil an Erythrozyten (oder Latexpartikel) gebundene Spermien	–
Vitalität (Eosin-Test)	≥58 % vitale (Eosin-negative) Spermien	≥53 % vitale (Eosin-negative) Spermien
Alpha-Glukosidase (mU/Ejakulat)	≥20	–
Fruktose (µmol/Ejakulat)	≥13	–
Zink (µmol/Ejakulat)	≥2,4	–

Tab. 1: Spermogrammwerte nach WHO

Grenzwerte der herkömmlichen Ejakulatparameter. PR = progressiv motil, NP = nicht progressiv motil, MAR = mixed antigen reaction. Aus Kliesch (2021), modifiziert.

1.10. Zusammenhang zwischen konventionellen Spermogrammparametern und DNA-Fragmentation

Eine Vielzahl von Studien hat in den letzten Jahren die Korrelation zwischen der DNA-Fragmentation und herkömmlichen Spermogrammparametern untersucht (Agarwal & Said, 2003; Barbăroşie et al., 2021; Campos et al., 2021; Ganzer et al., 2017; Le et al., 2019; Majzoub et al., 2018; Pozzi et al., 2023; Zini et al., 2001). Eine erhöhte Spermien-DNA-Fragmentation korreliert invers mit diversen Spermienparametern, wie Konzentration, Spermienzahl, progressiver Motilität und Morphologie (Ganzer et al., 2017).

Eine aktuelle Studie von Pozzi und Kollegen zeigte einen negativen Zusammenhang zwischen einem erhöhten DFI (SCSA >30 %) und der Gesamtmotilität der Spermien (Pozzi et al., 2023). Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von Campos und Kollegen, die zudem nachweisen konnten, dass nicht nur die Motilität, sondern auch die Morphologie und die Spermienkonzentration negativ mit der DNA-Fragmentation korrelieren (Campos et al., 2021). Einige Autoren konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen erhöhter DNA-Fragmentation und auffälligen Spermogrammparametern feststellen (Le et al., 2019; Muratori et al., 2015; Saleh et al., 2002). Ein unauffälliger Spermogrammbefund schließt eine DNA-Schädigung der Spermien also nicht aus. Deshalb empfiehlt es sich, bei der Untersuchung der männlichen Fruchtbarkeit einen zusätzlichen Test zur DNA-Fragmentation der Spermien durchzuführen.

1.11. Kryokonservierung humaner Spermien

Die Kryokonservierung ist ein wesentlicher Bestandteil vieler andrologischer Labore und eine bedeutende Technologie in der Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen in der modernen assistierten Reproduktionsmedizin. Sie ermöglicht die Lagerung von Ejakulaten bei extrem niedrigen Temperaturen. Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts fanden erste Untersuchungen zur Kryokonservierung von menschlichen Spermien statt (Ackerman, 1968; Polge et al., 1949). Heutzutage ist der Einsatz der Kryokonservierung humaner Spermien vielfältig. Die Indikationen können medizinischer Natur sein, wie z.B. bei Patienten, die im Rahmen einer onkologischen Erkrankung gonadotoxische Therapien erhalten oder nicht-medizinischer Natur, beispielsweise im Rahmen des „social freezing“ (Kliesch et al., 2023; Bier & Kliesch, 2024; Yang et al., 2024).

1.11.1. Grundlagen der Kryokonservierung

Die Vorgaben zur Kryokonservierung sind im WHO-Laborhandbuch festgehalten (WHO, 2021). Zudem gibt es aktuelle Kryo-Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK, 2022). Unter der Kryokonservierung versteht man die Lagerung vitaler Zellen und Gewebe in flüssigem Stickstoff. Es existieren unterschiedliche Techniken und Protokolle, um das Ejakulat einzufrieren. Eine der Hauptherausforderungen der Kryokonservierung ist die intrazelluläre Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses, sowie die Gefahr der Dehydrierung der Zellen (Gao et al., 1995; Watson, 1995; Mazur 1963). Ein geringer Wasseranteil, sowie die hohe Membranfluidität, machen die Spermienzellen jedoch weniger anfällig für Schäden durch den Prozess der Kryokonservierung als andere Zellen (Clarke et al., 2003). Zahlreiche Studien zeigen trotzdem einen negativen Einfluss der Kryokonservierung auf die Spermienqualität (Aliakbari et al., 2022; Isachenko et al., 2011; Nijs et al., 2009; Tamburrino et al. 2023). Durch das Einfrieren und die hierbei entstehende Eiskristallbildung entsteht ein osmotisches Ungleichgewicht, das zu irreversiblen Konformationsveränderungen der Zellen führen kann (Huang et al., 2022; Sieme et al., 2016). Die Geschwindigkeit, in der die Zellen heruntergekühlt werden, spielt hier eine relevante Rolle. Bei zu schnellen Abkühlungsraten fehlt den Zellen die Zeit, um genug Wasser zu verlieren, sodass dieses intrazelluläre Wasser gefriert und zu der o.g. Eiskristallbildung führt. Die Dehydration der Zelle tritt insbesondere bei langsameren Kühlraten auf (Mazur, 1963). Tamburrino et al. zeigten zudem, dass besonders nach einer längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff eine zunehmende Fragmentierung der DNA und eine reduzierte Chromatin-Kompaktheit beobachtet wurde (Tamburrino et al., 2024).

Kryoprotektive Medien und die richtigen Kryokonservierungstechniken sollen solche Schäden minimieren und sind Gegenstand der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet (Hezavehei et al., 2018; Slabbert et al., 2015; Stanic et al., 2000; Tamburrino et al., 2023).

1.11.2. Kryoprotektive Medien

Es existieren verschiedene Kälteschutzmittel, die zur Kryokonservierung von Ejakulaten verwendet werden. Der Großteil der Inhaltsstoffe lässt sich in durchlässige und nicht-durchlässige Kryoprotektiva einteilen, die sich hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften unterscheiden (Aliakbari et al., 2022; Di Santo et al., 2011; Huang et al., 2022). Sie wirken, indem sie den Gefrierpunkt des intra- und extrazellulären Wassers senken und so mechanische Zellschäden durch Eiskristalle während des Gefrier- und Auftauprozesses minimieren. Gleichzeitig regulieren sie den osmotischen Druck der Flüssigkeiten und schützen die Spermien vor Schäden durch starke osmotische Schwankungen (Huang et al., 2022). Es ist wichtig, die richtige Konzentration der kryoprotektiven Medien zu verwenden, da sie in hohen Mengen toxisch wirken und die Zellen schädigen können (Aliakbari et al., 2022; Hezavehei et al., 2018; Hö et al., 2011; Huang et al., 2022; Isachenko et al., 2004; Thomson et al., 2009b).

Durchlässige kryoprotektive Mittel, wie Glycerol, Formamid und Dimethylsulfoxid (DMSO), spielen eine entscheidende Rolle bei der erfolgreichen Kryokonservierung von Spermienzellen. Diese Substanzen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, die Zellmembran zu durchdringen, sodass die Zellen während des Einfrierens einen Phasenwechsel erleben, ohne dass sich schädliche Eiskristalle im Inneren ausbilden. Sie ersetzen das Wasser in den Spermien und verhindern so Schäden durch Dehydration. Darüber hinaus schützen sie die intrazelluläre Umgebung und stabilisieren die Zellen während der Lagerung bei niedrigen Temperaturen (Aliakbari et al., 2022; Donnelly et al., 2001; Sieme et al., 2016).

Nicht-durchlässige Kryoprotektiva bestehen aus osmotisch aktiven kleineren Molekülen und osmotisch inaktiven Makromolekülen. Beispiele für solche Mittel sind Laktose, Eigelb-Citrat, Albumin, Saccharose und Trehalose. Diese Substanzen können die Zellmembran nicht passieren. Sie wirken als Schutzmittel, indem sie die Zellen vor Dehydration während des Einfrierens bewahren, die Zellmembran stabilisieren und die Osmolalität des Kryokonservierungsmediums erhöhen. Durch den Ausstrom von Wasser während des Einfrierens verkleinert sich die Zelle und die intrazelluläre Eiskristallbildung wird weitestgehend verhindert.

Zum Beispiel enthält Eigelb Lipoproteine niedriger Dichte, die einen Lipidaustausch ermöglichen und die Membranfluidität aufrechterhalten, wodurch die Bildung von Eiskristallen und Phasenwechsel in den Zellen verringert wird und die Membran stabilisiert wird (Aliakbari et al., 2022; Nalella et al., 2004; Sieme et al., 2016).

Zusätzlich werden Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E, Glutathion und Melatonin zu den Medien hinzugefügt, um oxidativen Stress und Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu reduzieren (Huang et al., 2022).

1.11.3. Kryokonservierungsmethoden von Spermien

Es existieren eine Vielzahl an Methoden und Protokollen zur Kryokonservierung humaner Spermien. Das aktuelle WHO-Manual empfiehlt ein Standardprotokoll, bei dem das Gemisch aus Ejakulat und kryoprotektivem Mittel mithilfe eines programmierten Einfriergerätes langsam und kontrolliert auf -170°C heruntergekühlt wird (WHO, 2021). In andrologischen Laboren werden jedoch unterschiedliche Verfahren zur Kryokonservierung verwendet. Es gibt händisch kontrollierte Slow Freezing Verfahren sowie Rapid Freezing Verfahren, wie beispielsweise die Vitrifikationsmethode (Hezavehei et al., 2018; Isachenko et al., 2011; O'Neill et al., 2019; Stanic et al., 2000; Satirapod et al., 2012). Die Vitrifikationsmethode scheint insbesondere für kleinere Spermienmengen interessant zu sein (Berkovitz et al., 2018; Isachenko et al., 2003).

1.12. Stellenwert Künstlicher Intelligenz in der Medizinischen Forschung

Die Verwendung von künstlicher Intelligenz (KI) in der medizinischen Forschung hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. KI ist ein übergeordneter Begriff, der verschiedene Technologien und Ansätze zur Simulation menschlicher Intelligenz umfasst, darunter auch Machine Learning und Deep Learning. Unter Machine Learning versteht man eine Methode, bei der Computer Algorithmen anhand großer Datenmengen trainieren, um Muster und Zusammenhänge zu erkennen. Deep Learning hingegen ist eine spezielle Form des Machine Learning, bei der tiefe neuronale Netzwerke verwendet werden, um komplexe Aufgaben zu bewältigen (Choi et al., 2020). Beispielsweise wird eine auf Deep Learning basierende Methode zur Bewertung von Spermienqualität mithilfe von DFI-markierten Hellfeldbildern verwendet, um die Auswahl von hochwertigen Spermien für die ICSI zu ermöglichen (McCallum et al., 2019).

Die in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendete modulare, mikroskopbasierte Bildgebungsplattform ScanR ermöglicht die vollautomatische Bilderfassung und Datenanalyse biologischer Proben mittels Deep-Learning-Technologie.

1.13. Automatisierte Spermienerkennung

Im Rahmen einer andrologischen Untersuchung wird das Ejakulat in der Regel manuell untersucht. Diese Untersuchungen sind zeit- und kostenintensiv und erfordern zudem qualifiziertes Fachpersonal. Zur automatisierten Spermienzellererkennung wurden CASA (Computer-aided sperm analysis)-Systeme entwickelt (WHO, 2021), die eine automatische Detektion und Analyse von Spermien ermöglichen. Die komplexe und nicht einheitliche Benutzung dieser Systeme ist jedoch der Grund, warum sie nicht in die routinemäßige Analyse des Ejakulates integriert wurden (Agarwal et al., 2019). In den letzten Jahren wurden weitere Systeme zur automatischen Analyse mithilfe von computer-basierten Technologien und künstlicher Intelligenz getestet, ohne dass ein Standard etabliert wurde (Agarwal et al., 2019; Bijar et al., 2012; Chang et al., 2017; Engel et al., 2019; Kumar et al., 2023; McCallum et al., 2019). In der Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wird die automatisierte High-Content-Screening-Station ScanR von Olympus routinemäßig für die Detektion von DNA-fragmentierten Spermien verwendet.

1.14. Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss der Kryokonservierung auf die DNA-Integrität humaner Spermien zu untersuchen, verschiedene Kryokonservierungsmedien hinsichtlich ihrer protektiven Wirkung zu vergleichen und auf dieser Grundlage ein optimiertes Protokoll zur Kryokonservierung von Spermien zu entwickeln. Zudem soll ein in der Routine bereits verwendetes Assay, welches zur automatisierten Spermienerkennung und Messung der DNA-Integrität durch den ScanR dient, verbessert und etabliert werden. Die Voruntersuchungen im Rahmen des Promotionsprojekts haben gezeigt, dass kryokonservierte Spermien im Vergleich zu frischen Ejakulaten signifikant höhere DFI Werte aufweisen. Ein erhöhter DFI kann die Reproduktionsfähigkeit der Spermien beeinträchtigen und möglicherweise zu Fruchtbarkeitsproblemen führen.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob durch die Entwicklung eines optimierten Kryokonservierungsprotokolls (Kryokonservierungsmethode und Kryokonservierungsmittel) die verfahrensbedingten DNA-Schäden in den Spermien minimiert werden können. Dabei soll das seit 1995 in der Andrologie des UKE verwendete Kryokonservierungsprotokoll für ejakulierte Spermien überarbeitet und verbessert werden. Die Ergebnisse dieser Forschung könnten nicht nur dazu beitragen, die Fruchtbarkeit von Patienten zu verbessern, sondern auch die Effizienz und Qualität der Kryokonservierungstechniken insgesamt steigern.

Darüber hinaus ist die Arbeit darauf ausgerichtet, den diagnostischen Stellenwert des DFI zu untermauern. Da die Bedeutung des DFI in der Andrologie immer noch kontrovers diskutiert wird und die Vergleichbarkeit verschiedener Analysemethoden eine Herausforderung darstellt, sollen die gesammelten Daten dazu beitragen, die Relevanz dieses Parameters für die Fruchtbarkeitsdiagnose zu bestätigen.

Insgesamt zielt diese Doktorarbeit darauf ab, einen Beitrag zur Verbesserung der Spermienkryokonservierung und zur Klärung der Rolle des DFI in der Andrologie zu leisten, sowie die automatisierte Spermienerkennung in der Abteilung der Andrologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorfs zu optimieren.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Acridin-Orange-Hydrochlorid-Lösung	Sigma-Aldrich Co.
Disodiumhydrogenphosphatdihydrat	Merck
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (TUNEL Kit)	Promega Corporation
Eosin	Merck
Essigsäure, 100 %	Carl Roth GmbH + Co.KG
Ethanol absolut	Merck
Methanol	Merck
NaCl	Merck
PBS, pH 7,4	Sigma-Aldrich Co.
SSC	Ventana
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co.
Zitronensäure, >99,5 %	Carl Roth GmbH +Co. KG

2.1.2. Kryoprotektive Medien

Sperm Freeze	FertiPro
Sperm Freezing Medium	Cooper Surgical, Origio
Test Yolk Buffer	Fujifilm, Irvine Scientific

2.1.3. Puffer und Lösungen

AO-Lösung 1	0,1 M Zitronensäure 9,6 g / 500 ml
AO-Lösung 2	0,2 M Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 17,8 g / 500 ml
AO-Lösung 3	1 ml Lösung 1 + 63 µl Lösung 2 + 2,5 µl AO (10 mg / ml) und 1 µl Triton X-100
Carnoy	1,5 ml Methanol + 0,5 ml Eisessig
Eosin 0,5 %	0,5 g Eosin + 1 l isotonisches NaCl
0,1x PBS	100 ml 1x PBS + 900 ml Aqua dest.
1x PBS	100 ml 10x PBS + 900 ml Aqua dest.
2x SSC	100 ml 10x SSC + 400 ml Aqua dest.
0,2 % Triton X-100	1x PBS +2 ml Triton X-100

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Aqua dest.	Chemsolute
Deckgläser 24x24 mm	Labsolute
Deckgläser 18x18 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Fixogum (säurefreier, elastischer Klebstoff)	Marabu GmbH
Handschuhe Peha-soft	Paul Hartmann
Kryovials 1,8 ml	Thermo Scientific
Objektträger	Thermo Scientific, Carl Roth GmbH + Co. KG
Objektträgerkasten	Carl Roth GmbH + Co. KG

Pasteurpipetten, 1 ml	Labsolute
Pipettenspitzen, unsteril 50 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen, steril 100 µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen, steril 100-1000 µl	Sorenson, BioScience Inc.
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Labsolute

2.1.5. Geräte

Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
Fluoreszenzmikroskop AX10	Carl Zeiss
Gefrierschrank Premium (-20°C)	Liebherr
KryoPLANER, 360-3.3	Cryotherm
Kühlschrank Glasline	Liebherr
Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech
Mikroskop, Axiostar	Carl Zeiss
Mikroskop, BX35	Olympus LS
Pipetten	Eppendorf AG
ScanR High-Content-Screening-Station	Olympus LS
Stickstofftonne, GT 50	Cryotherm
Thermoschrank 37, Julabo	Biotherm
Vorfriergerät, Nicool LM 10	Airliquide

Vortex Genie 2

Scientific Industries

Zählgerät Counter AC15

Hecht Assistent

Zentrifuge Megafuge 10R

Heraeus Sepatech

2.1.6. Computeranwendungen

CellSens

Olympus LS

Online- Statistikprogramme für

Social Science Statistics

Kolmogorov-Smirnov-Test,

<https://www.socscistatistics.com/tests/kolmogorov/default.aspx>

unpaired t-Test, Wilcoxon Signed-

<https://www.socscistatistics.com/tests/ttestdependent/default2.aspx>

Rank Test und Spearman's Rho

<https://www.socscistatistics.com/tests/signedranks/default2.aspx>

Calculator

<https://www.socscistatistics.com/tests/spearman/default2.aspx>

2.1.7. Präparate

Bei den analysierten Proben der Patienten im Alter von 15 bis 56 Jahren handelte es sich um Ejakulat-Reste aus der Laboruntersuchung innerhalb der Sprechstunde der Andrologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider). Die Ejakulate wurden routinemäßig durch Masturbation gewonnen und anschließend im Rahmen eines Spermioграмms nach WHO-Richtlinien untersucht. Alle Ejakulate mit einer Spermienzahl von über 3,5 Millionen Spermien wurden inkludiert. Präparate, die zähflüssig waren, oder aufgrund einer zu geringen Ejakulatmenge (< 1 ml) nicht für den Versuch geeignet waren, wurden ausgeschlossen.

Für die Überprüfung der bisher in der Literatur beschriebenen DFI-Normwerte wurden Ejakulate von gesunden Männern (n=13) verwendet. Diese Probanden waren im Alter zwischen 18 und 39 Jahren, zeugungsfähig, hatten bereits mindestens ein Kind auf natürlichem Wege gezeugt und hatten keine bekannten relevanten Vorerkrankungen.

Für die Untersuchung der Proben, die Datenanalyse und Datennutzung lagen die schriftlichen Zustimmungen der Patienten und Probanden sowie der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg vor (IB24-81/04; 2024-300455-WF). Die Auswertung der Daten erfolgte in anonymisierter Form.

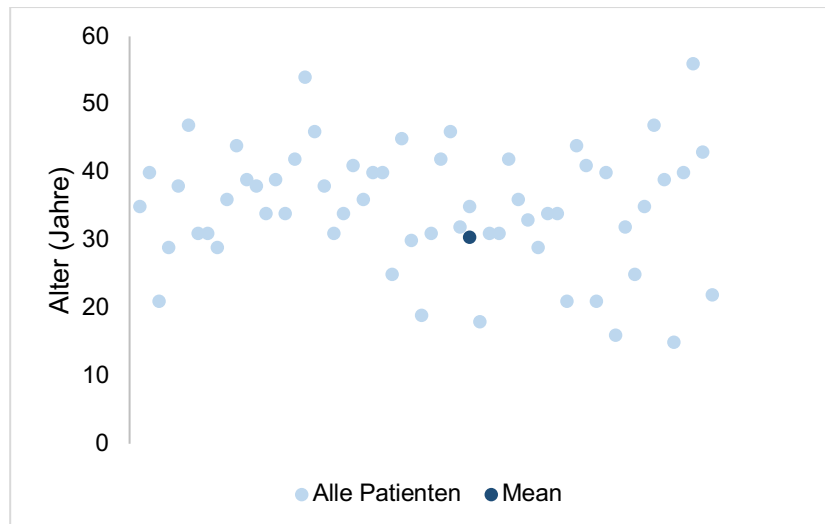


Abb. 14: Altersverteilung der 60 Patienten

Das Streudiagramm veranschaulicht die Altersverteilung der insgesamt 60 untersuchten Patienten. Jeder Punkt repräsentiert das Alter eines einzelnen Patienten zum Zeitpunkt der Probenabgabe.

2.2. Methoden

2.2.1. Ejakulat-Ausstriche

Für die Herstellung der Ejakulat-Ausstriche wurden 250 µl Ejakulat verwendet. Das Ejakulat wurde mit 750 µl PBS verdünnt und anschließend in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die Proben wurden danach in einer Kühlzentrifuge bei 300G und bei 25°C für 20 Minuten gewaschen. Auf diese Weise trennt sich der Überstand vom Sediment, sodass der Überstand abgenommen werden konnte und das Sediment anschließend mit einer Pipette in 0,1x PBS resuspendiert wurde. Bei Vorliegen eines kleinen Sedimentes, wurde dieses in 400 µl PBS resuspendiert, und im Falle eines größeren Sedimentes in 800 µl PBS. Jeweils 50 µl des Sediments wurden nach dem WHO-Standard (WHO-Manual, 2021) auf einer Fläche von etwa 2x2 cm auf den Objektträgern ausgestrichen und für eine Stunde bei RT zum Trocknen stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Vor der Färbung wurden die 2x2 cm-Ausstriche mit einem Klebestift begrenzt, sodass die Färbelösung beim Auftragen nicht vom Objektträger fließt.

2.2.2. Vergleich verschiedener Verflüssigungszeiten des Ejakulates

Im Rahmen einer Vorversuchsreihe im Labor der Andrologie wurde unter anderem untersucht, inwiefern sich die Verflüssigungszeit des Ejakulates auf dessen Qualität auswirkt. Hierfür wurde bei einem Kollektiv gesunder Probanden (n=13) die DNA-Integrität der Spermien verglichen. Es wurde analysiert, inwiefern sich der TUNEL- und der AO-Wert verändert, wenn die Proben 30 min, 1 h, oder 24 h bei RT stehen gelassen werden und welche Veränderung sich durch eine slow freezing Kryokonservierung der Proben zeigen lässt. Die Proben wurden

nach 2.2.1 vorbehandelt, nach den u. g. Färbemethoden (2.2.9) weiterbearbeitet und mittels ScanR analysiert.

2.2.3. Vergleich verschiedener Techniken zur Kryokonservierung von Spermien

In einem weiteren Vorversuch wurden verschiedene Techniken zur Optimierung der Kryokonservierung von Spermien und Vermeidung verfahrensbedingter DNA-Schäden verglichen.

Hierfür wurde das Ejakulat von insgesamt 16 Patienten aus der Abteilung für Andrologie untersucht. Dabei wurden die Proben nach den Methoden des slow Freezing, rapid Freezing und der Vitrifikation mit und ohne kryoprotektivem Mittel behandelt. Das Ziel des Vorversuchs war es, die Auswirkungen der unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden auf die Spermieigenschaften, Motilität, Vitalität und DNA-Integrität zu evaluieren und eine potenzielle geeignete Methode zur Kryokonservierung zu identifizieren.

2.2.3.1. Slow Freezing

300 µl Ejakulat wurden für 30 Minuten zur Verflüssigung stehen gelassen. Anschließend wurde das Kryokonservierungsmittel SpermFreeze (FertiPro) im Verhältnis von 3:2 zum Ejakulat hinzugegeben. Die Mischung wurde für fünf Minuten bei RT stehen gelassen, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Danach wurde die Probe in das automatische Einfriergerät (Kryoplaner) gegeben, und langsam auf -125°C heruntergekühlt (ca. 60min), bevor sie in einem Container mit flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert wurde (Probenlagerung in der Gasphase des Stickstoffs).

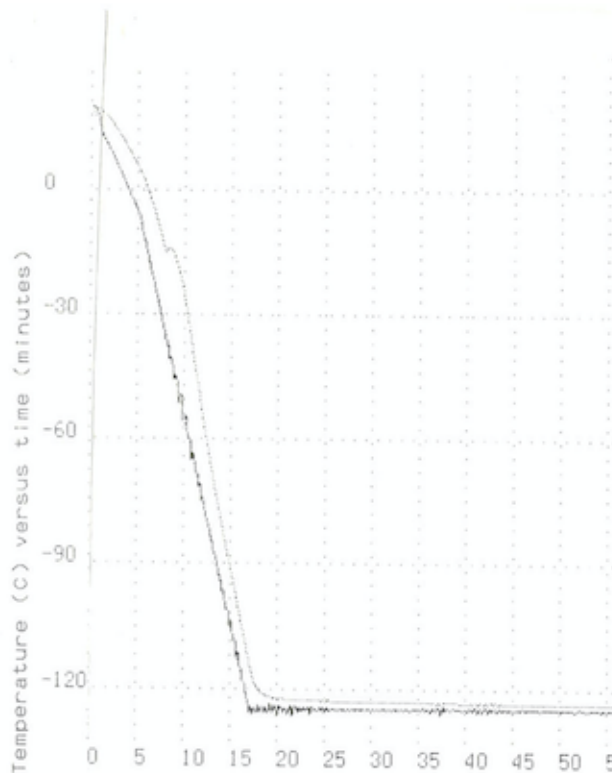


Abb. 15: Temperaturkurve Kryoplaner

Einfrierdauer- und Temperatur der Ejakulate im Kryoplanergerät. Es findet eine kontinuierliche Temperatursenkung statt bis -125°C erreicht sind.

2.2.3.2. Rapid Freezing

Bei dem rapid freezing Verfahren wurde für den Versuch ebenfalls 300 µl Ejakulat verwendet. Das Ejakulat wurde für 30 Minuten zur Verflüssigung stehen gelassen. Anschließend wurde ebenfalls SpermFreeze (FertiPro) im Verhältnis von 3:2 zum Ejakulat hinzugegeben.

Wie auch bei der slow freezing Methode wurde die Mischung für fünf Minuten bei RT stehen gelassen. Danach wurde die Probe in eine Metallhalterung (Kryovialständler) platziert und direkt in eine Vorrichtung mit flüssigem Stickstoff eingetaucht. Die Halterung mit der Probe wurde dort für fünf Minuten belassen, bevor sie, wie bekannt, im Container mit flüssigem Stickstoff eingelagert wurde.

2.2.3.3. Vitrifikation

Bei der Vitrifikationsmethode wurden ebenfalls 300 µl Ejakulat verwendet, das für 30 Minuten zur Verflüssigung stehengelassen wurde. In ein Kryovial wurde SpermFreeze (FertiPro) im bekannten Verhältnis von 3:2 zum Ejakulat hinzugefügt, während in ein weiteres Kryovial kein Kryoprotektivum gegeben wurde. Die Mischung wurde, wie gewohnt, für fünf Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde ein 20 µl-Tropfen der Mischung direkt in ein leeres Kryovial gegeben, das bereits in flüssigem Stickstoff platziert war (Abb. 14). Insgesamt wurden

nach und nach fünfzehn 20 µl-Tropfen dieser Mischung in das Kryovial gefüllt. Anschließend wurden die Kryovials im Stickstoffcontainer eingelagert.

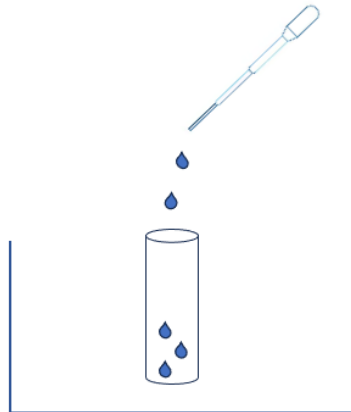


Abb. 16: Vitrifikationsmethode, Skizze

Ein Kryovial wird in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff positioniert. Mit einer Pipette werden fünfzehn 20 µl-Tropfen Ejakulat-Kryoprotektivum-Gemisch direkt in das Kryovial pipettiert.

2.2.4. Spermienmotilität nach WHO

Die Ejakulatproben wurden zunächst für ca. zwei Sekunden gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Spermien zu gewährleisten. Aus der Probe wurden mit einer Pipette 6,5 µl Ejakulat entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Der Objektträger wurde auf eine Wärmeplatte gelegt, die eine Temperatur von 37 °C aufwies. Der Ejakulattropfen wurde mit einem 18x18 mm-Deckglas abgedeckt und für eine Minute sedimentieren gelassen. Während dieser Zeit setzten sich die Spermien auf dem Objektträger ab, sodass sie im Anschluss besser analysiert werden konnten. Die Spermienzählung wurde gemäß den Empfehlungen der Richtlinie der Bundesärztekammer (RiLiBÄK, 2022) durchgeführt. Dabei wurden zwei Doppelbestimmungen vorgenommen, wobei jeweils 200 Spermien unter einer 400-fachen Vergrößerung eines Zeiss-Lichtmikroskops gezählt wurden. Die Differenzierung der Spermien erfolgte basierend auf den Kategorien gemäß der WHO-Definition (WHO, 2021). Hierbei wird klassifiziert in:

- a) schnell progressiv = schnelle Vorwärtsbewegung;
- b) progressiv = langsame, träge Vorwärtsbewegung;
- c) nicht progressiv = nur lokale Beweglichkeit, Kreisschwimmer;
- d) immotil = keine Beweglichkeit.

Eine normale Beweglichkeit liegt vor, wenn sich 25 % der Spermatozoen schnell progressiv (a) oder mindestens 50 % (a+b) progressiv bewegen. Diese Kategorien dienen der Bewertung

der Spermienmotilität und geben Aufschluss über mögliche Abweichungen von der Norm. Die Durchführung der Spermienzählung und -differenzierung nach den WHO-Richtlinien ermöglicht eine standardisierte und vergleichbare Bewertung der Spermienmotilität.

2.2.5. Vitalitätsbestimmung von Spermien durch Eosin-Färbung

Die Eosin-Färbung ist eine etablierte Methode, um die Vitalität von Spermien zu bestimmen. Das Verfahren erfolgt in folgenden Schritten: Zunächst wird die Probe für etwa zwei Sekunden gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Spermien zu gewährleisten. Aus der Probe werden dann 6,5 µl Ejakulat mit einer Pipette entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Mit der Pipettenspitze werden 6 µl Eosin mit den 6,5 µl Ejakulat auf dem Objektträger vermischt. Anschließend wird das Gemisch mit einem 18x18 mm-Deckglas abgedeckt, um die Spermien vor äußeren Einflüssen zu schützen. Nach einer Wartezeit von 30 Sekunden wird der Objektträger unter einem Lichtmikroskop betrachtet und 2 x 200 Spermien werden unter Zuhilfenahme eines elektronischen Zähl-/Speichergerätes (Counter) ausgezählt. Aus den ermittelten Werten wurde der Prozentsatz aus lebenden und toten Spermien berechnet. Lebende Spermien haben eine intakte Zellmembran, bleiben somit ungefärbt und erscheinen weiß. Tote Spermien nehmen Eosin auf und sind rot gefärbt. Ein Wert von $\geq 53\%$ ungefärbter (vitaler) Spermien gilt als Normalwert (Tamburrino et al., 2023).

2.2.6. Färbungs-Reaktionen zur Untersuchung der DNA-Integrität der Spermien

2.2.6.1. TUNEL-Färbung

Zur Durchführung der TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Färbung wurden die Proben verwendet, die nach 2.2.1 behandelt wurden. Die TUNEL-Färbung ist eine etablierte Methode, um DNA-Schäden in Spermien zu detektieren (R. Sharma et al., 2021). Sie basiert auf der Markierung von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen und ermöglicht somit die Untersuchung der DNA-Integrität und -Fragmentierung von Spermien.

Zuerst wurden die Reagenzien (Equilibrium Buffer (EB) und der Nucleotid-Mix) aus dem Gefrierschrank genommen und bei RT aufgetaut. Gleichzeitig wurde der Wärmeschrank auf 37°C vorgeheizt. Die aufgrund der Größe der TUNEL-Moleküle nötige Permeabilisierung der Spermien erfolgte durch Zugabe von 200 µl 0,2% Triton X-100 in 1x PBS pro Objektträger für zehn Minuten. Auf diese Weise wurde die Spermienmembran durchlässig gemacht, um den Zugang der Färbereagenzien zur DNA sicherzustellen. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser kurz abgespült und für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden leicht abgeschüttelt und kurz zum Trocknen stehen gelassen.

Anschließend wurden die Ausstriche mit 100 µl EB pro Objektträger für fünf Minuten inkubiert und danach abgeklopft.

Für die eigentliche TUNEL-Färbung wurde ein kommerzielles TUNEL-Assay-Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Dieses Kit enthält einen Nukleotid-Mix und eine Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT), die mit einem fluoreszierenden Marker gelabeltes dUTP (Desoxyuridintriphosphat) an die Enden der DNA-Fragmente bindet. Sie bindet spezifisch an durch die Fragmentierung entstandenen 3'-OH-Enden und fügt dort die markierten Nukleotid-Moleküle hinzu.

Für den TdT-Mix werden pro Objektträger 45 µl EB, 5 µl Nucleotid-Mix und 1 µl TdT-Enzym verwendet. Das TdT-Enzym konnte direkt verwendet werden, da es aufgrund des enthaltenen Glycerols nicht einfriert. Im Folgenden wurden 50 µl von dem angefertigten TdT-Mix pro Objektträger aufgetragen, horizontal in einer dunklen, feuchten Objektträgerkiste gelagert und für vier Stunden bei 37°C im Wärmeschränk inkubiert, der zusätzlich, zur Vermeidung des Eintrocknens der Reaktionslösung auf dem Objektträger, eine Wanne mit destilliertem Wasser enthielt.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus dem Wärmeschränk entnommen und für 15 Minuten in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen und bei 37°C im Trockenschränk getrocknet.

Um die DNA-Färbung zu visualisieren, wurde im Folgenden die automatisierte mikroskopbasierte Bildgebungsplattform ScanR (Firma Olympus) verwendet. Diese ermöglicht die vollautomatische Bilderfassung und Datenanalyse biologischer Proben mittels Deep-Learning-Technologie. Die DNA-Fragmentierung in den Spermien wurde durch das Auftreten von fluoreszierenden Signalen im Zellkern nachgewiesen. Eine höhere Anzahl von fluoreszierenden Signalen deutet auf eine erhöhte DNA-Fragmentierung hin, während eine geringere Anzahl von Signalen auf eine geringere Fragmentierung hinweist.

2.2.6.2. Acridin-Orange (AO)-Färbung

Die AO-Färbemethode wird zum Nachweis der DNA-Fragmentierung in Spermien verwendet. Sie beruht auf der Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs Acridinorange (AO), der an die DNA bindet. Bei intakter, doppelsträngiger DNA emittiert AO grünes Licht, während denaturierte, einzelsträngige DNA rot fluoresziert.

Zur Durchführung der AO-Färbung wurden ebenfalls die Proben verwendet, die nach 2.2.1 vorprozessiert wurden. Zunächst wurden die Objektträger mit 300 µl Carnoy-Lösung, bestehend aus 75 % Methanol und 25 % Eisessig, behandelt. Mit diesem sauren Medium

wurden die Objektträger für 15 min aufbereitet, um eine teilweise Denaturierung der DNA zu bewirken und die DNA für das AO zugänglich zu machen.

Anschließend wurden die Proben leicht mit destilliertem Wasser abgespült und für fünf Minuten in diesem gewaschen. Die Objektträger wurden abgeschüttelt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Danach wurden die Objektträger für zwei Minuten bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

In der Zwischenzeit wurde aus 1 ml Lösung 1 (0,1 M Zitronensäure, 9,6 g/500 ml), 63 µl Lösung 2 (0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat 17,8 g/500 ml), 2,5 µl AO-Farbstoff (10 mg/ml) und 1 µl Triton X-100 die Lösung 3 hergestellt. Etwa 100 µl dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger gegeben, die dann für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben leicht mit destilliertem Wasser abgespült, gefolgt von zwei 2-minütigen Waschgängen in destilliertem Wasser. Die Objektträger wurden danach für zwei bis fünf Minuten bei 37°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend, wie bei dem o.g. TUNEL-Test, mittels ScanR analysiert, wobei defekte DNA rotes/oranges Licht emittiert, während intakte DNA grün erscheint.

2.2.7. Kryokonservierung der Ejakulatproben und Verwendung verschiedener Kryokonservierungsmedien

Zur Kryokonservierung der Ejakulatproben wurden 1 ml Ejakulat (n=60) gleichmäßig auf vier Kryokonservierungsröhrchen aufgeteilt, sodass jedes Röhrchen 250 µl Ejakulat enthielt.

Eines der Röhrchen wurde direkt nach o. g. Protokoll verarbeitet (2.2.1), für die DNA-Analyse vorbereitet und im Folgenden mit „F“, frisch, gekennzeichnet. Das Ejakulat in den verbleibenden drei Röhrchen wurde jeweils mit einem der zu vergleichenden Kryokonservierungsmitteln vermischt. So erhielt man drei Kryovials mit je 250 µl Ejakulat und 750 µl des entsprechenden Kryokonservierungsmittels (Sperm Freeze (SF), Sperm Freezing Medium (SFM), Test Yolk Buffer (TYB)). Die verwendeten Kryokonservierungsmedien unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Anschließend wurden die Proben kurz gevortext und für ca. fünf Minuten ruhen gelassen, bevor sie mit Hilfe des Kryoplaners eingefroren wurden.

Dieses Vorfriergerät sorgt für eine kontrollierte schrittweise Abkühlung. Die Proben werden innerhalb von etwa 14 Minuten auf -125°C heruntergekühlt und anschließend für ca. 40 Minuten bei dieser Temperatur gehalten (Abb. 6). Im Anschluss an die Zeit im Kryoplaner wurden die Proben im Container mit flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.8. Auftauen der Ejakulatproben

Die Proben wurden für mindestens sieben Tage bei -196°C in einer Stickstofftonne eingefroren. Zum Auftauen wurden sie dem Container entnommen und für 15 Minuten bei RT gelagert. Anschließend wurden die Proben für weitere 15 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank aufgetaut. Die Spermioogramm-Analyse wurde gemäß den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) durchgeführt, wobei die Motilität und Vitalität der Spermien bewertet wurden. Nach der Analyse wurden die Proben nach 2.2.1 weiterverarbeitet, und für die Untersuchung der DNA-Integrität vorbereitet.

2.2.9. High-Content Screening-System zur Detektion fragmentierter DNA humaner Spermienköpfe

Zur Detektion fragmentierter DNA in humanen Spermienköpfen wurde der ScanR, eine High-Content-Screening-Station (Olympus), verwendet. Diese wird in der Abteilung für Andrologie des UKE standardmäßig zur Analyse von Patientenproben eingesetzt. Im Rahmen dieser Analyse werden 100 Bilder unter 40-facher Vergrößerung mit Hilfe der Acquisition-Software aufgenommen. Die Objektdetektion erfolgt durch die selbstlernende Mikroskopie auf Basis von Deep-Learning-Technologie. Das zugrundeliegende Neuronale Netzwerk wurde mit fluoreszenzgefärbten Spermien als Ground-Truth-Daten trainiert, so dass Objekte in Durchlicht-Aufnahmen erkannt und mit Hilfe der Analyse-Software ausgezählt werden. Die Abgrenzung der Spermienköpfe von anderen Objekten (Zellbruchstücke und andere Verunreinigungen) erfolgte mittels Gating nach Objektgröße und optischen Parametern (s. Tabelle A01-A04).

Zur Untersuchung der DNA-Fragmentation wurden zwei verschiedene Färbungen durchgeführt (s. 2.2.6.1, 2.2.6.2). Die Analyse-Software bestimmt automatisiert den Anteil der fluoreszierenden Spermien an der Gesamtpopulation. Hierbei wurden verschiedene Intensitäten der Fluoreszenz als Schwellenwert verwendet, um zwischen fluoreszierendem Kopf und Hintergrundfluoreszenz zu differenzieren: Spermienköpfe wurden als TUNEL-positiv erkannt, wenn sie eine zweifach höhere Fluoreszenz als der Hintergrund aufwiesen. Spermienköpfe wurden als AO-positiv erkannt, wenn die Fluoreszenz das Hintergrundsignal um mindestens 25 % überstieg.

Im Rahmen der Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurde der bestehende Assay optimiert, wobei die Schwellenwerte angepasst wurden (TUNEL 1,5-fach, AO 30%). Dabei wurden sowohl Patienten-individuelle Gates zur Erkennung der Spermienpopulation, als auch verschiedene Schwellenwerte für die Fluoreszenzintensitäten getestet. Alle Analysen in der Arbeit wurden nachfolgend mit dem optimierten Assay durchgeführt (Tabelle A016, A017).

2.2.10. Assay Optimierung

Eine zufällige Stichprobe von 40 Patienten aus der routinemäßigen Sprechstunde der Abteilung für Andrologie des UKE bildete die Basis zur Optimierung der Assay-Settings. Für diese 40 Patienten lagen manuell ausgewertete Daten vor. Hierfür wurden 2000 Spermienzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (AX10, Zeiss) in einem abgedunkelten Raum ausgezählt. Die manuelle Auszählung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm (grün) und 640 nm (rot), während bei der TUNEL-Färbung bei gleicher Vergrößerung eine Anregungswellenlänge von 490 nm, verwendet wurde. Die Belichtungszeit für die Helfeldaufnahmen betrug 50 ms. Es wurde der AO- bzw. TUNEL-positive Anteil an Spermien bestimmt. Die manuellen Ergebnisse dienten als Richtwert zur Anpassung des Assay. Es wurde angestrebt, eine möglichst geringe Abweichung zwischen den manuellen Ergebnissen und der ScanR-Messung zu erlangen.

Ausgehend von den bisher verwendeten Werten des ScanR wurden zusätzliche Messungen ausgeführt:

- Für die AO-Färbung wurden zusätzliche 25 Schwellenwerte im Bereich von 15-40% definiert.
- Für die TUNEL-Färbung wurden zusätzlich 15 Schwellenwerte im Bereich von 1,5-fach bis 2,5-fach definiert.

Dies bedeutet, dass die Fluoreszenz der positiven Objekte das Hintergrundsignal um den o.g. Wert übersteigt. Zudem wurde untersucht, ob ein festgelegtes Gate hinsichtlich der Spermienerkennung, oder ein für jede Probe individuell angepasstes Gate die höhere Übereinstimmung liefert (Tabelle A01-A04).

Um einen geeigneten Schwellenwert zu finden, wurden je nach Höhe des Messwertes eine akzeptierte Abweichung von dem Laborwert in beide Richtungen festgelegt. Für die AO-Untersuchung wurde für Werte unter 5 eine Abweichung von ± 5 akzeptiert, wobei kleinere Abweichungen möglich waren, diese jedoch diagnostisch keine wesentliche Relevanz hatten. Werte zwischen 5 und 20 unterlagen ebenfalls einer Toleranz von ± 5 . Für den Bereich von 20 bis 35 wurde eine erweiterte Schwankungsbreite von $\pm 7,5$ angewendet. Bei Werten über 35 betrug die zulässige Abweichung ± 10 . Für die allgemeine Werteakzeptanz im TUNEL galten leicht abweichende Grenzen: Werte unter 5 hatten eine Toleranz von ± 2 , während der Bereich von 5 bis 10 eine Akzeptanz von $\pm 2,5$ aufwiesen. Werte zwischen 10 und 15 durften um ± 3 schwanken, während für den Bereich von 15 bis 20 eine Abweichung von ± 4 vorgesehen war. Werte über 20 wurden mit einer Toleranz von ± 5 akzeptiert.

Anschließend wurde kontrolliert, welche ScanR-Werte in diesem Range lagen. Der Schwellenwert mit den meisten Überschneidungen zu den initial manuell ausgezählten Werten wurde im optimierten Assay für alle weiteren Analysen verwendet (Tabelle A016,

A017). Dieser betrug für AO 30% mit vordefiniertem Gate und für TUNEL >1,5% mit individuell angepasstem Gate.

2.2.11. Statistische Methoden

Zunächst wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet, um zu prüfen, ob die Daten einer Normalverteilung folgen. Anschließend wurde für normalverteilte Proben der paired t-test, sowie für nicht-normalverteilte Proben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet, um die Mittelwerte der gepaarten Stichproben zu vergleichen. Diese Tests wurden eingesetzt, um festzustellen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Datenpaaren gibt, welche anhand des p-Wertes angegeben werden.

Zur Analyse von Zusammenhängen zwischen verschiedenen Parametern wurde eine Spearman-Korrelationsanalyse (Spearman's Rho) als nichtparametrisches Verfahren durchgeführt. Untersucht wurden dabei einerseits Korrelationen zwischen verschiedenen Tests an frischen Proben sowie andererseits Abhängigkeiten zwischen den Ergebnissen frischer und kryokonservierter Proben innerhalb desselben Tests, einschließlich des Einflusses des Patientenalters.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen werden jeweils mit dem Korrelationskoeffizienten "rs" und dem entsprechenden p-Wert dargestellt. Es wurden ebenfalls eine Korrelation zwischen der Körpergröße, dem Körpergewicht, Hodenvolumen, Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration und Morphologie einiger Patienten berechnet, bei denen diese Informationen vorlagen.

3. Ergebnisse

3.1. Werteveränderung durch Kryokonservierung

In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass die Kryokonservierung von Spermien einen negativen Einfluss auf die Spermienqualität hat (Aliakbari et al., 2022; Isachenko et al., 2011; Nijs et al., 2009, Tamburrino et al. 2023). Eine unzureichende Chromatinkondensation wurde beispielsweise als Faktor für erhöhte DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung identifiziert (Hallam et al., 2024).

Im Rahmen der Forschungsarbeit wurde daher ebenfalls die Veränderung der Spermienqualität nach Kryokonservierung mit dem slow freezing Protokoll näher betrachtet. Je nach Versuchsreihe wurden die Parameter Motilität, Vitalität und DNA-Integrität analysiert (s. 2.2.4, 2.2.5, 2.2.6).

In einer Untersuchung von Ejakulaten von gesunden Probanden (s. 2.1.7) hinsichtlich der DNA-Fragmentation zeigte sich insbesondere in der TUNEL-Färbung ein fast dreimal so hoher Wert (2,7-fach) nach Kryokonservierung im Vergleich zu nicht-eingefrorenen Ejakulatproben (Abb. 17a, links). In der AO-Färbung konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden (Faktor 1,1, Abb. 17a, rechts).

Die weiteren Untersuchungen zur Kryokonservierung von Ejakulaten der insgesamt 76 Patienten (n=16 aus dem Methodenvergleich, n=60 aus dem Vergleich der kryoprotektiven Medien, Abb. 17b) konnten diese initiale Beobachtung jedoch unterstreichen: In beiden Färbungen zur Evaluation der DNA-Integrität (TUNEL und AO) zeigte sich ein signifikant schlechteres Ergebnis nach der Kryokonservierung im Vergleich zu frisch analysierten Präparaten (Vgl. A06). In der TUNEL-Färbung ließ sich bei den kryokonservierten Präparaten insgesamt ein doppelt so hoher Wert darstellen (Abb. 17b, links). In der AO-Färbung zeigte sich bei diesem größeren Patientenkollektiv (n=76) ein Faktor von 1,4 hinsichtlich der Werteveränderung (Abb. 17b, rechts).

Mögliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (gesunde Probanden versus Patienten) werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

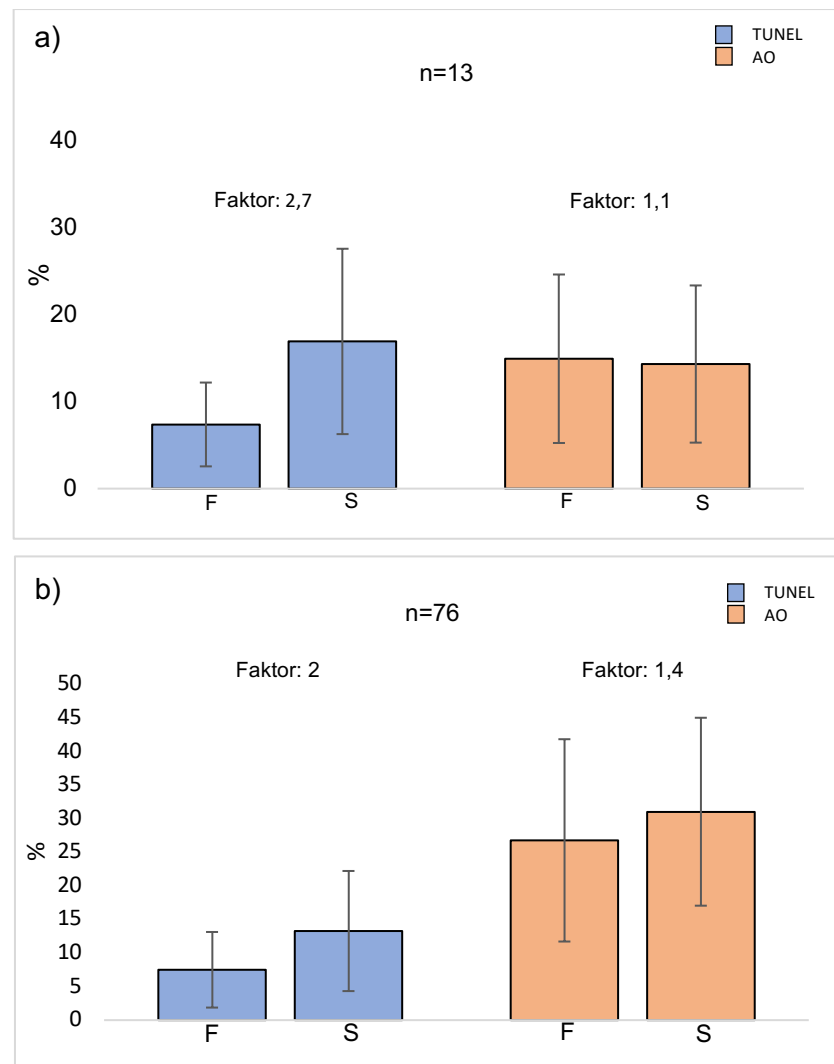


Abb. 17: DNA-Integrität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung

- a) Vergleich aller frisch-analysierten Ejakulate von Probanden (F) zu kryokonservierten Ejakulaten (S). In der TUNEL-Färbung zeigte sich eine 2,7-fache Verschlechterung der Werte.
- b) Vergleich aller frisch-analysierten Ejakulate von Patienten (F) zu kryokonservierten Ejakulaten (S). Insbesondere in der TUNEL-Färbung zeigte sich eine 2-fache Verschlechterung der Werte.

Hinsichtlich der Veränderung der Motilität und Vitalität nach Kryokonservierung konnten ebenfalls 76 Ejakulate untersucht werden. Die Anzahl schnell progressiver Spermien verringerte sich nach Kryokonservierung um ca. das 4-fache, die der beweglichen um circa das Doppelte. Gleichzeitig stieg die Zahl der nicht progressiven Spermien um das 1,6-fache und die der unbeweglichen um das 1,4-fache nach Kryokonservierung (Abb. 18).

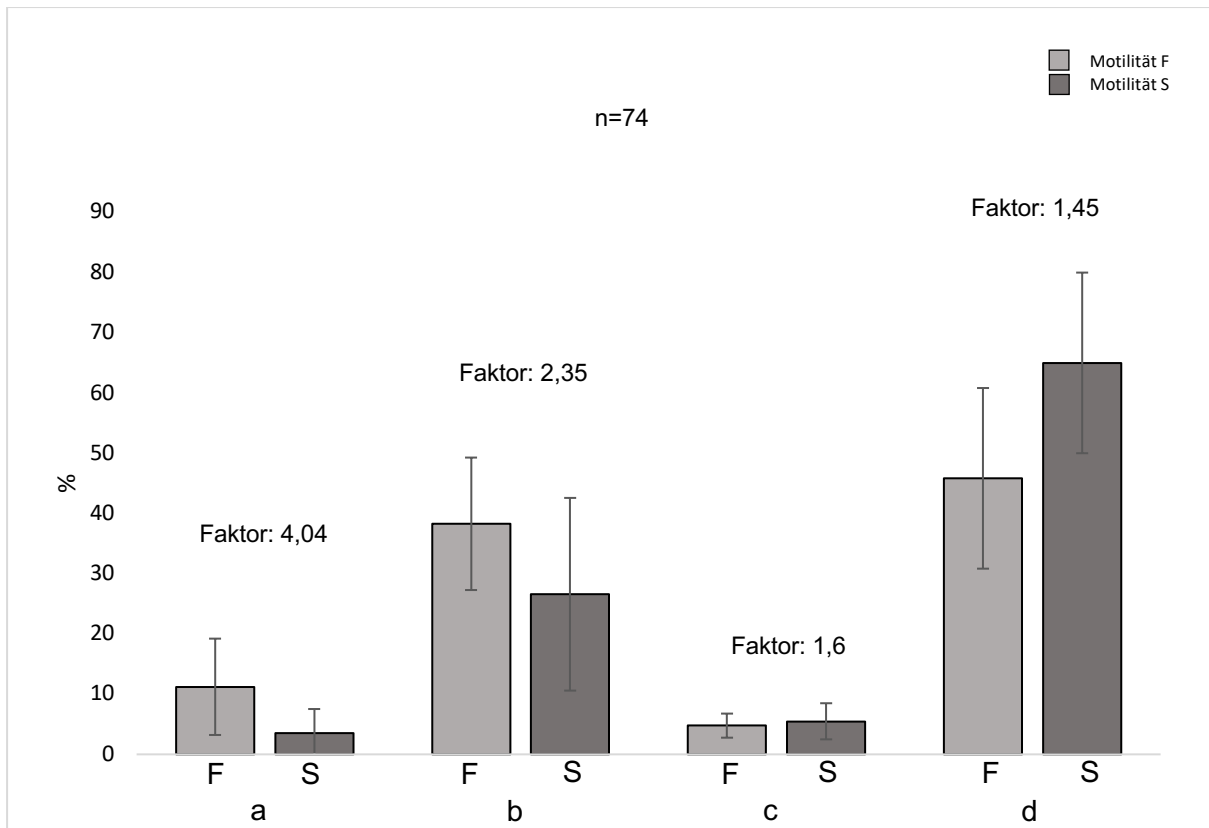


Abb. 18: Motilität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung

Die Abbildung zeigt eine deutliche Verschlechterung der Beweglichkeit humaner Spermien nach Kryokonservierung. Insbesondere zeigt sich eine 4-fache Abnahme der progressiv motilen Spermien nach dem Einfrieren.

Auch die Vitalität verschlechterte sich nach der Kryokonservierung. Der Eosin-Test der frischen Ejakulate ergab einen etwa doppelt so hohen Wert, wie der der kryokonservierten Proben (Abb. 19).

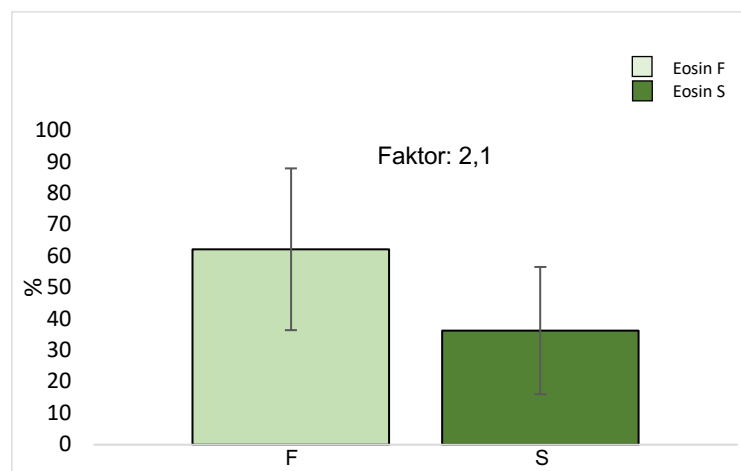


Abb. 19: Vitalität: Wertever schlechterung durch Kryokonservierung

Über 2-fach erhöhter Wert im Eosin-Test der frisch analysierten Spermien im Vergleich zu den kryokonservierten Ejakulatproben.

3.2. Einfluss unterschiedlicher Verflüssigungszeiten auf die DNA-Integrität

Nach den Empfehlungen der WHO sollte die Verflüssigung des Ejakulats bei 37°C zwischen 30 und 60 Minuten nach der Entnahme erfolgen. Eine längere Lagerungszeit wirkt sich negativ auf die Spermienqualität aus (WHO, 2021). Unter Berücksichtigung dieser Annahme wurden verschiedene Verflüssigungszeiten der Ejakulate vor Kryokonservierung verglichen. Hierbei wurde die DNA-Integrität sowie die Spermienzahl nach 30 Minuten, 60 Minuten, 24 Stunden und nach Kryokonservierung verglichen. Die DNA wurde mithilfe der AO- und TUNEL-Färbung untersucht und an der automatischen mikroskopbasierten Bildgebungsplattform ScanR ausgewertet. Beim TUNEL-Test zeigte sich ein signifikant besseres Ergebnis nach 30 Minuten im Vergleich zu dem Wert nach 24 Stunden ($p = 0,02$) bzw. nach der Kryokonservierung ($p = 0,00014$). Ebenso zeigten sich signifikant bessere Ergebnisse nach 60 Minuten, verglichen zu 24 Stunden und nach Kryokonservierung ($p = 0,008$; $p = 0,00011$). Zwischen 30 und 60 Minuten Verflüssigungszeit ließ sich kein signifikanter Qualitätsunterschied hinsichtlich der DNA-Fragmentation feststellen (A05).

Darüber hinaus wurden bei diesen Proben AO-Analysen durchgeführt. Hier konnte das Ergebnis der TUNEL Färbung insofern bestätigt werden, als dass die Analysen nach 30 und 60 Minuten wiederum signifikant bessere Ergebnisse lieferten als nach 24 Stunden ($p = 0,03$; $p = 0,0018$, A05), und ebenfalls zwischen 30 und 60 Minuten Verflüssigungszeit kein signifikanter Unterschied zu detektieren war. Diese Ergebnisse zeigen, dass für eine Ejakulatanalyse Verflüssigungszeiträume zwischen 30 und 60 Minuten geeignet sind (Abb. 20).

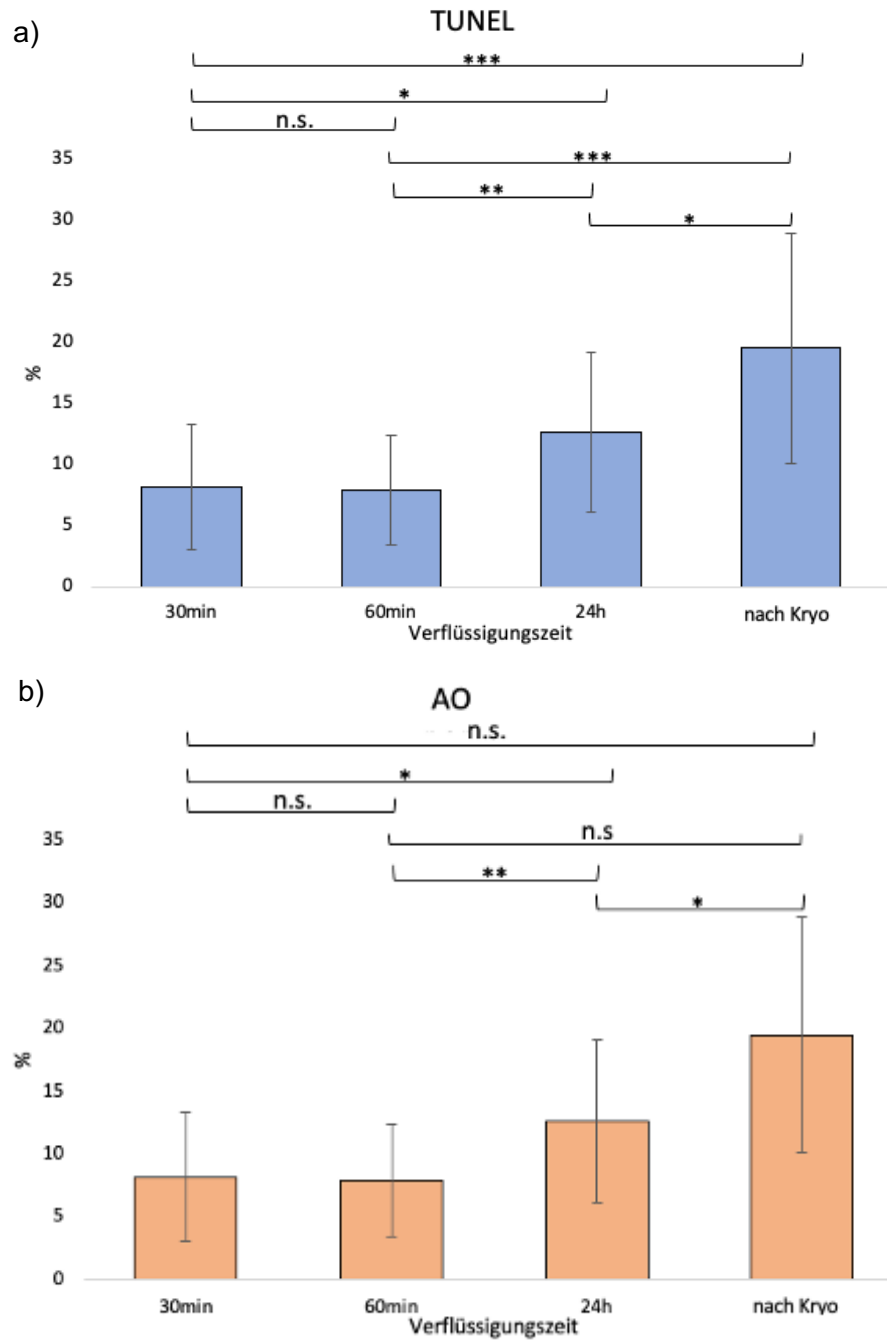


Abb. 20: Auswirkung unterschiedlicher Verflüssigungszeiten auf die DNA-Integrität

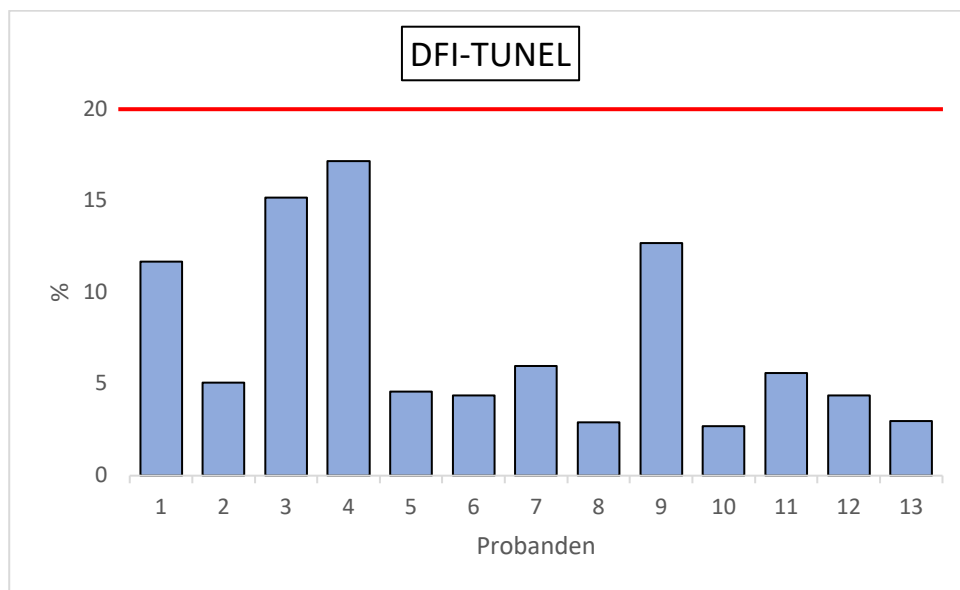
a) TUNEL- und b) AO-Ergebnisse nach 30 min, 60 min, 24h Verflüssigung und nach Kryokonservierung. Im TUNEL-Test lassen sich signifikant bessere Werte nach 30 min als nach 24h und nach Kryokonservierung darstellen. Keine signifikante Differenz zeigt der Vergleich von 30 und 60 min. Alle Zeiten schneiden jedoch besser ab als nach Kryokonservierung.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. b) Im AO-Test zeigt sich insbesondere ein signifikanter Unterschied zwischen 30 min und 24 h, sowie 60 min und 24h. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.3. Bestätigung des DFI bei gesunden Probanden

Im Rahmen einer Untersuchung wurde das Ejakulat gesunder und fertiler Probanden analysiert (siehe 2.1.7). Es galt, die in der Literatur beschriebenen Grenzwerte des DFIs mittels TUNEL- und AO-Färbung zu überprüfen. Als Grenzwerte wurden die in der Literatur etablierten Schwellenwerte von 25 % für den AO-Test und 20 % für die TUNEL-Färbung herangezogen. In der TUNEL-Färbung lagen bei allen 13 Probanden die Werte unterhalb des Grenzwerts, in der AO-Färbung traf dies auf 11 von 13 Probanden zu (Abb. 21). Der Mittelwert der TUNEL-Werte betrug 7,3 % und lag damit deutlich unter dem Referenzwert. Auch der mittlere AO-Wert lag mit 16 % klar unterhalb des literaturbasierten Grenzwerts.

a)



b)

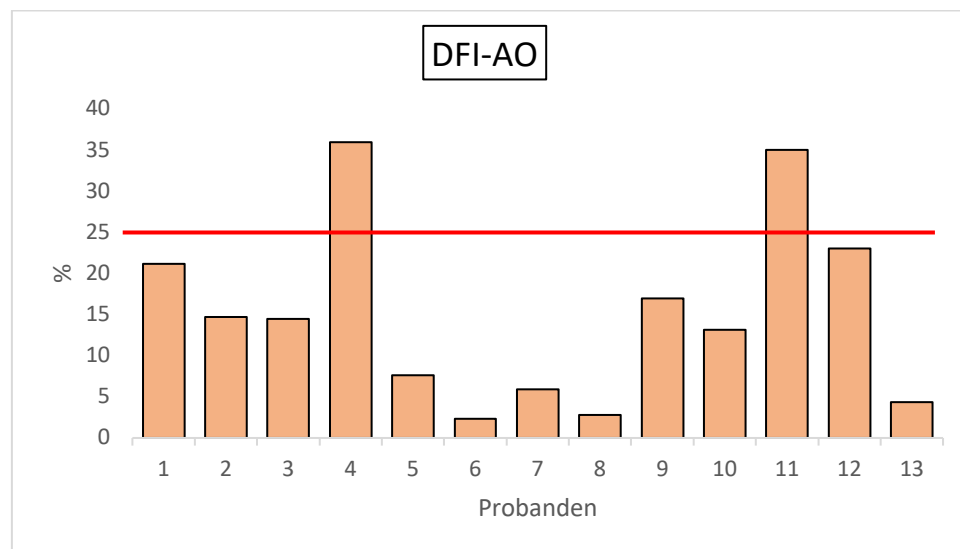


Abb. 21: Bestätigung des DFI durch die Analyse von 13 fertilen Probanden

a) TUNEL- und b) AO-Werte der Probanden. Die akzeptierten Grenzwerte der jeweiligen Tests sind mit einer roten Linie gekennzeichnet.

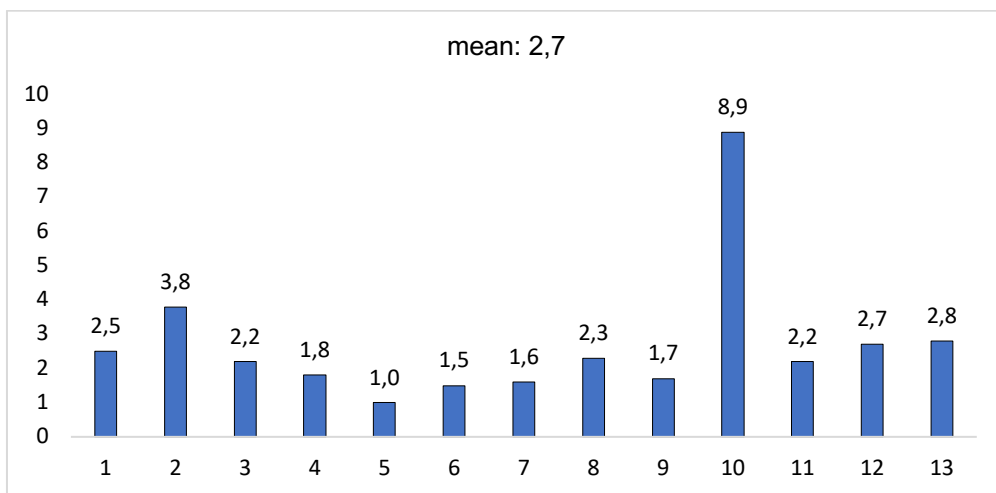
3.4. Wertever schlechterung durch Kryokonservierung: Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten

Im Rahmen der Versuchsreihe zur Bestätigung des DFI wurden Ejakulate gesunder Probanden untersucht (s. 2.1.7.; 3.3). Dies war Anlass zur Fragestellung, ob sich die DNA-Fragmentation nach Kryokonservierung zwischen gesunden Probanden und Patienten unterscheidet.

In Abfolge der Versuche wurden zunächst die Ergebnisse der 13 Probanden mit den Ergebnissen der 16 Patienten aus dem Vorversuch bezüglich der Kryokonservierungsmethode verglichen. Im Rahmen des Vergleichs der drei kryoprotektiven Medien wurde das Patientenkollektiv auf insgesamt 60 erweitert, sodass ein zweiter Vergleich mit größerem Patientenkollektiv, durchgeführt werden konnte.

In der Versuchsreihe der 13 gesunden Probanden zeigte sich in der TUNEL-Färbung eine durchschnittliche Wertever schlechterung von 2,7 nach Kryokonservierung (Abb. 22a). Der mittlere Faktor der Wertever schlechterung in der AO-Färbung der Probanden lag bei 1,1 (Abb. 22b).

a)



b)

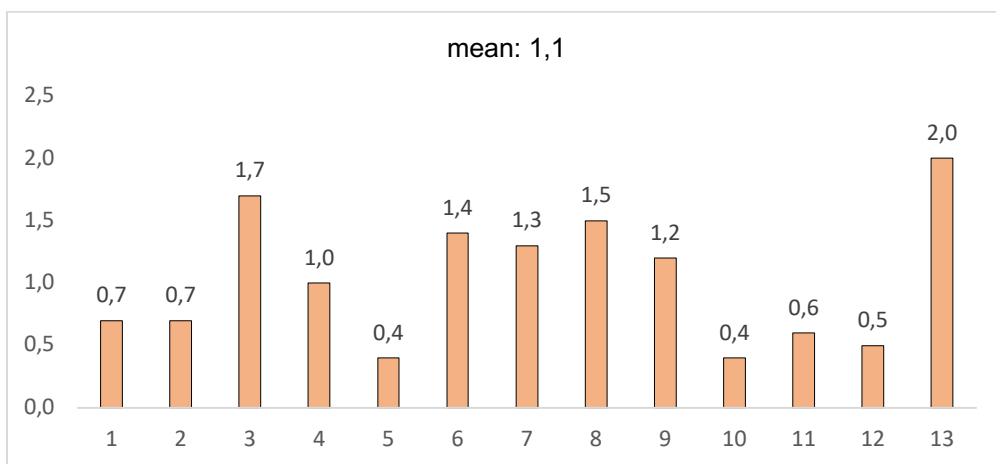
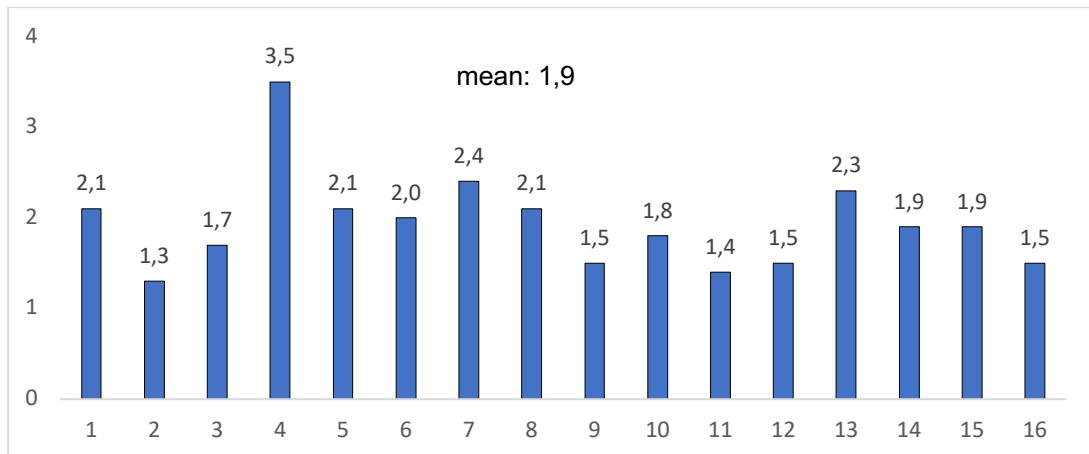


Abb. 22: Individuelle Verschlechterung der Probanden nach Kryokonservierung

Die durchschnittlichen Werte der a) TUNEL- und b) AO-Färbung nach Kryokonservierung der Ejakulate der 13 Probanden. Insbesondere TUNEL zeigt nach Kryokonservierung signifikant höhere Werte mit einem Durchschnitt von 2,7.

Die Ejakulate der 16 Patienten, die zu Beginn der Untersuchungen für den Vergleich der Kryokonservierungsmethoden verwendet wurden, zeigten in der Untersuchung der direkten DNA-Fragmentation (TUNEL) eine durchschnittliche Wertever schlechterung von 1,9 nach Kryokonservierung (Abb. 23a). Der Faktor der Wertever schlechterung von frischen Proben nach Kryokonservierung in der AO-Färbung ergab bei dem Patientenkollektiv einen Wert von 1,6 (Abb. 23b).

a)



b)

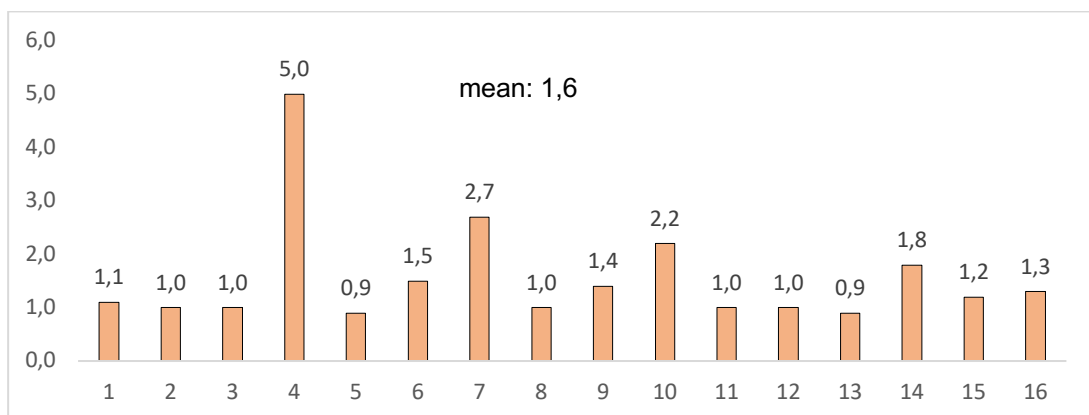


Abb. 23: Individuelle Verschlechterung der 16 Patienten nach Kryokonservierung

Die Wertever schlechterung der Ejakulate der 16 Patienten aus dem Vorversuch betrug im Durchschnitt für a) TUNEL 1,9 und für b) AO-Färbung 1,6.

Es lässt sich also festhalten, dass die Ejakulate der gesunden Probanden hinsichtlich der TUNEL-Färbung einen 1,4-fach höheren Wert aufweisen als die Proben der Patienten (2,7 vs. 1,9). Beleuchtet man die AO-Färbung, so verhält sich dieses Ergebnis invers: Das Kollektiv der Probanden zeigt einen 1,5-fach niedrigeren Wert in der AO-Färbung nach Kryokonservierung als der der Patienten.

Im Rahmen der Versuchserweiterung zum Vergleich dreier kryoprotektiver Medien, ergab sich ein Patientenkollektiv von 60 Patienten. Die individuelle Wertever schlechterung dieser Patienten ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Als mittlerer Wert konnte für die TUNEL-Färbung eine Wertever schlechterung von 2,0 und für die AO-Färbung eine Wertever schlechterung von 1,4, gezeigt werden (Abb. 24). Hinsichtlich beider Färbungen wurde somit die initiale Beobachtung des Vergleiches zwischen den Probanden und den 16 Patienten unterstrichen: Auch bei dem größeren Patientenkollektiv von 60 Patienten zeigte sich ein 1,4-fach höherer TUNEL-Wert nach Kryokonservierung bei den gesunden Probanden im Vergleich zu den Patienten. In der AO-Färbung bestätigte sich ebenfalls die oben

dargestellte Annahme: Die Probanden weisen einen 1,3-fach niedrigeren Wert nach Kryokonservierung als die Patienten auf.

Zusammenfassend lässt sich also anhand dieser Versuchsreihe feststellen, dass die Ejakulate der Probanden eine ausgeprägtere direkte DNA-Schädigung (TUNEL) nach Kryokonservierung aufweisen als die Proben der Patienten. Dieses ist jedoch ein Ergebnis, welches durch die AO-Färbung nicht bestätigt werden konnte. Hier verhielt es sich konträr: Die Proben der Probanden zeigten geringere DNA-Schäden durch Kryokonservierung als diejenigen der Patienten. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass der Vergleich auf unterschiedlich großen Kohorten basiert und somit nur eingeschränkt vergleichbar ist.

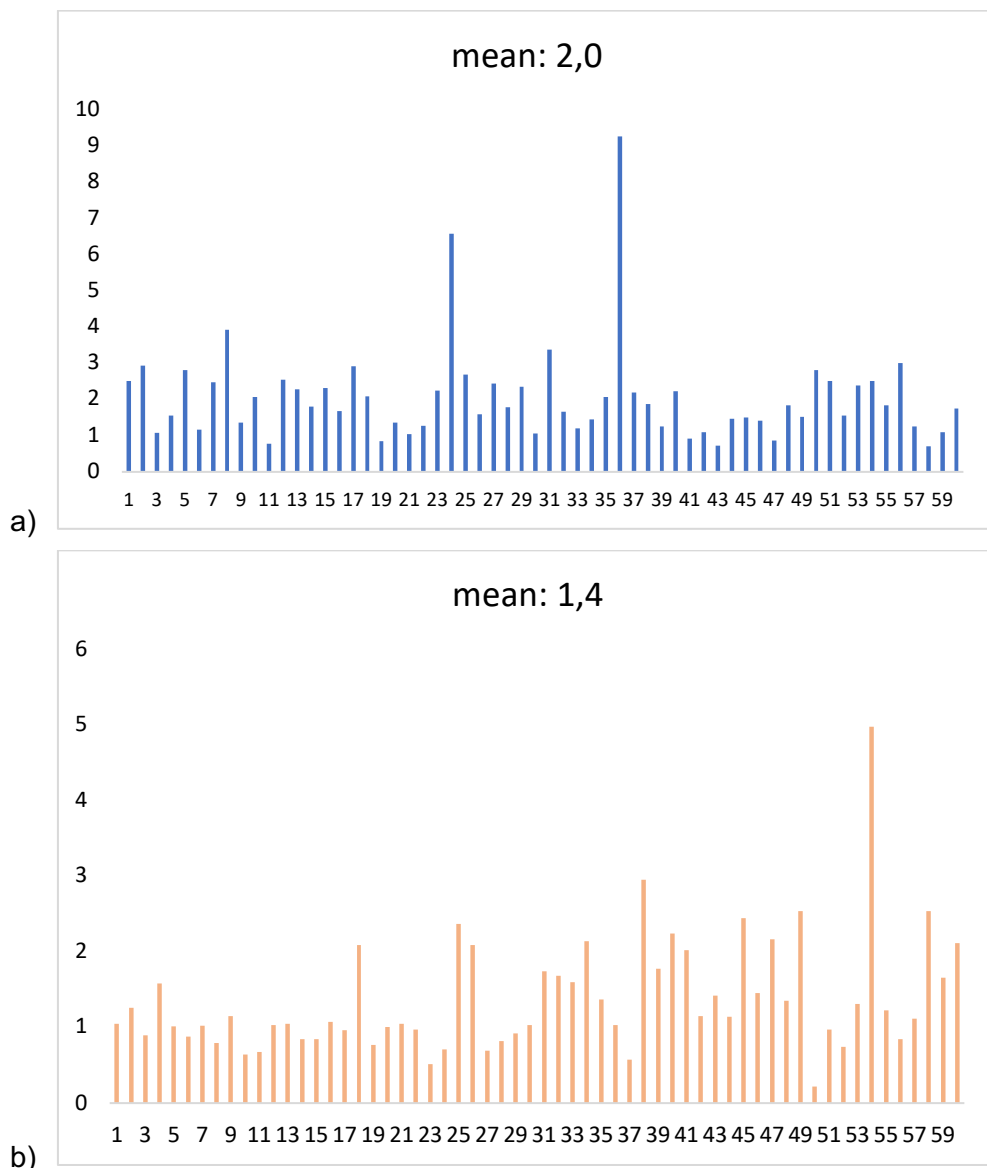


Abb. 24: Individuelle Wertever schlechterung

Eine Übersicht über die Wertever schlechterung jedes einzelnen der 60 Patienten nach Kryokonservierung. In der TUNEL-Färbung (a) zeigte sich ein durchschnittlicher Wert von 2,0, in der AO-Färbung (b) ein Wert von 1,4.

3.5. Vergleich verschiedener Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich der Spermienqualität

Ein weiteres Experiment diente dem Vergleich verschiedener Methoden zur Kryokonservierung von Spermien. Ziel war es, eine Methode zu finden, die insbesondere zu einer Reduktion der verfahrensbedingten DNA-Schäden führt. Aber auch die Motilität und Vitalität wurden mithilfe von vier unterschiedlichen Einfriermethoden untersucht (s. 2.2.3).

In Bezug auf beide DNA-Färbungen (T und AO) zeigte sich, dass das frische Ejakulat (F) signifikant bessere Werte aufwies als alle kryokonservierten Ejakulate (S, R, V+, V-). Im Falle der TUNEL-Analyse (Abb. 25 a) stellte sich zudem bei der Vitrifikation mit Kryoprotektivum (V+) ein signifikant schlechteres Ergebnis heraus als bei der Methode der Vitrifikation ohne Kryoprotektivum (V-; $p = 0,01503$). Zwischen den restlichen Methoden gab es sowohl bei der TUNEL-, als auch bei der AO-Untersuchung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der DNA-Integrität (Abb. 25; Tab. 2).

In Bezug auf die Beweglichkeit schnell progressiver Spermien (Motilität a) wurden für die frischen Ejakulatproben (F) ebenfalls signifikant bessere Ergebnisse als für die kryokonservierten Proben festgestellt (Abb. 26). Die nach dem Slow Freezing Protokoll (S) kryokonservierten Ejakulatproben wiesen eine signifikant bessere schnell progressive Motilität auf, als die Ejakulatproben, die nach den anderen Methoden (R, V+ und V-) eingefroren wurden ($p_R = 0,002$; $p_{V+} = 0,0001$; $p_{V-} = 0,0006$).

Die Einfriermethode ohne Kryoprotektivum (V-) zeigte im Vergleich zu den drei weiteren Methoden eine signifikant niedrigere Zahl schnell progressiver Spermien.

Zwischen der Rapid Freezing Methode (R) und der Vitrifikationsmethode mit Kryoprotektivum (V+) hingegen fiel kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Motilität a auf (Abb. 26 a).

Ebenso wie die Motilität a zeigte sich auch bei den progressiven Spermien (Motilität b) ein signifikant besseres Ergebnis vor Kryokonservierung als nach Slow Freezing, Rapid Freezing oder Vitrifikation mit und ohne Kryoprotektivum. Die Slow Freezing Methode erwies sich erneut hinsichtlich der anderen untersuchten Protokolle überlegen ($p_R = 0,00008$; $p_{V+} = 0,0008$; $p_{V-} < 0,00001$). Die Rapid Freezing Methode zeigte lediglich gegenüber der Vitrifikation ohne Kryoprotektivum (V-) signifikant bessere Ergebnisse, während sich kein signifikanter Unterschied zwischen ihr und der Vitrifikation mit kryoprotektivem Mittel (V+) feststellen ließ. V+ zeigte ebenfalls signifikant höhere progressive Motilitätswerte als V- ($p = < 0,00001$; Abb. 26 b; Tab. 3).

Die Untersuchung der Motilität c, die sich auf nicht progressive Spermien bezieht, lieferte gemischte Ergebnisse. Die frischen Ejakulatproben wiesen keine signifikant besseren Ergebnisse auf als die Proben, die mit Kryoprotektivum eingefroren wurden. Lediglich V-

schnitt signifikant schlechter ab ($p = 0,0001$). Insgesamt ließ sich im Vergleich der Methoden, mit einem kryoprotektiven Medium (S, R, V+) kein signifikanter Unterschied feststellen. Allerdings wiesen diese Methoden allesamt ein eindeutig signifikant besseres Ergebnis auf, als die Spermien die ohne Kryoprotektivum (V-) eingefroren wurden (Abb. 27 a).

Im Hinblick auf immotile Spermien (Motilität d) zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen zur Motilität a. Frisch analysierte Spermien (F) erwiesen sich als signifikant besser im Vergleich zu den vier Kryokonservierungsmethoden (S, R, V+ und V-). Auch zeigte sich hier erneut die Slow Freezing Methode als signifikant besser im Vergleich zu den restlichen Methoden ($p_R = <0,00001$; $p_{V+} = 0,0001$; $p_{V-} = <0,00001$). Kein bedeutsamer Unterschied konnte zwischen den Methoden Rapid Freezing und Vitrifikation mit Kryoprotektivum festgestellt werden. Jedoch waren sowohl R als auch V+ erneut signifikant effektiver im Vergleich zur Vitrifikation ohne kryoprotektivem Medium (beide $p = <0,00001$; Abb. 27 b; Tab. 3).

Abschließend wurde die Vitalität der Spermien anhand der Eosin-Färbung verglichen. Frische, nicht-kryokonservierte Proben zeigten erneut signifikant bessere Werte als kryokonservierte Ejakulate. Die Slow Freezing Methode wies im Vergleich zu den anderen Methoden (R, V+ und V-) die höchsten Vitalitätswerte der Spermien auf. Die Rapid Freezing Methode (R) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Vitrifikationsmethode mit kryoprotektivem Medium (V+). Jedoch schnitten beide Methoden (R und V+) signifikant besser ab als die Vitrifikationsmethode ohne Kryoprotektivum (V-; $p < 0,00001$; Abb. 28; Tab. 3).

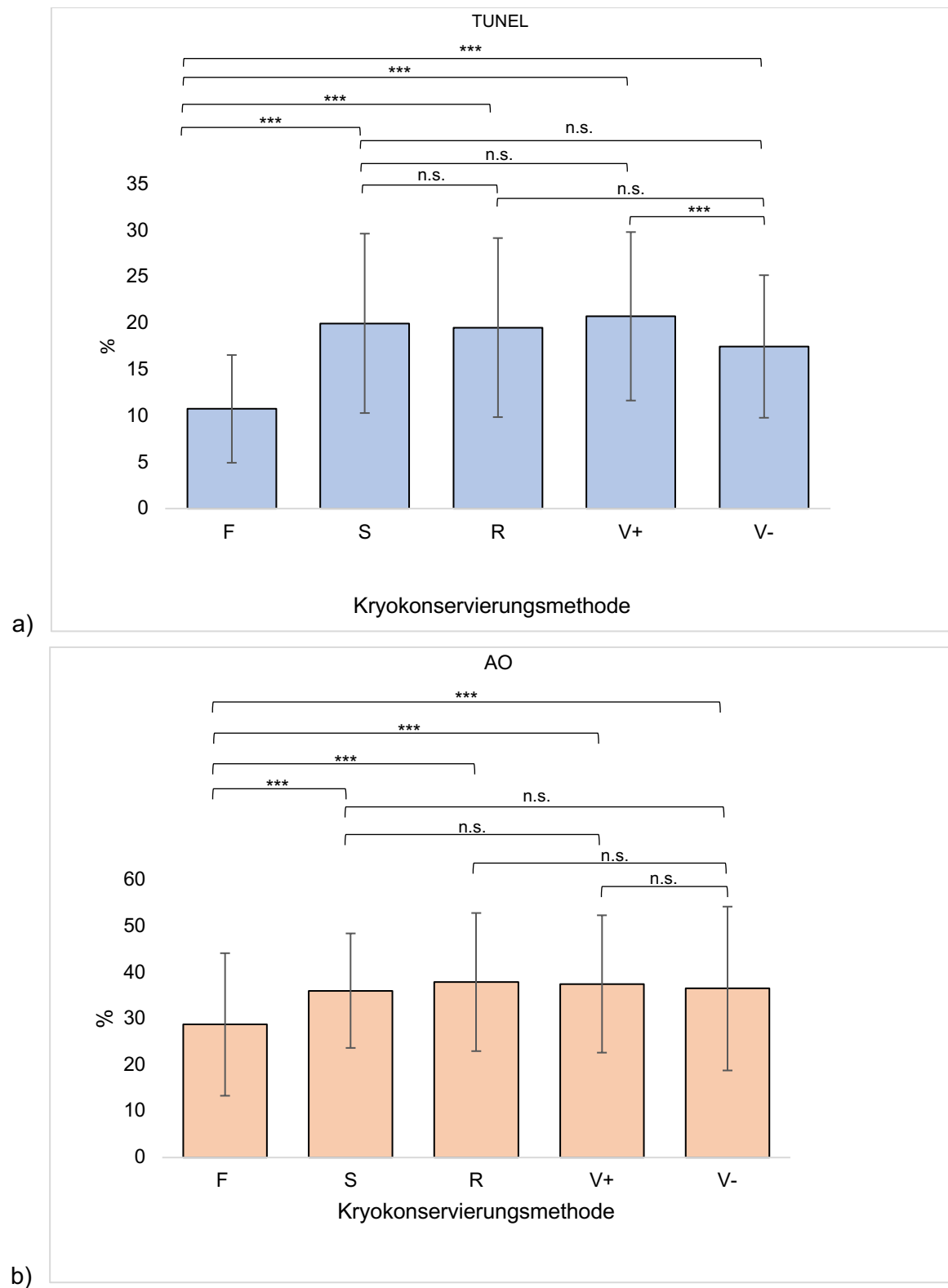


Abb. 25: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden mittels TUNEL- und AO-DNA-Färbung
 Untersuchung der DNA-Fragmentation mittels a) TUNEL- und b) AO-Färbung nach dem Einfrieren der Ejakulate mit vier unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden. Bis auf ein signifikant besseres Ergebnis der V+ Methode in der TUNEL-Färbung, ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden feststellen.

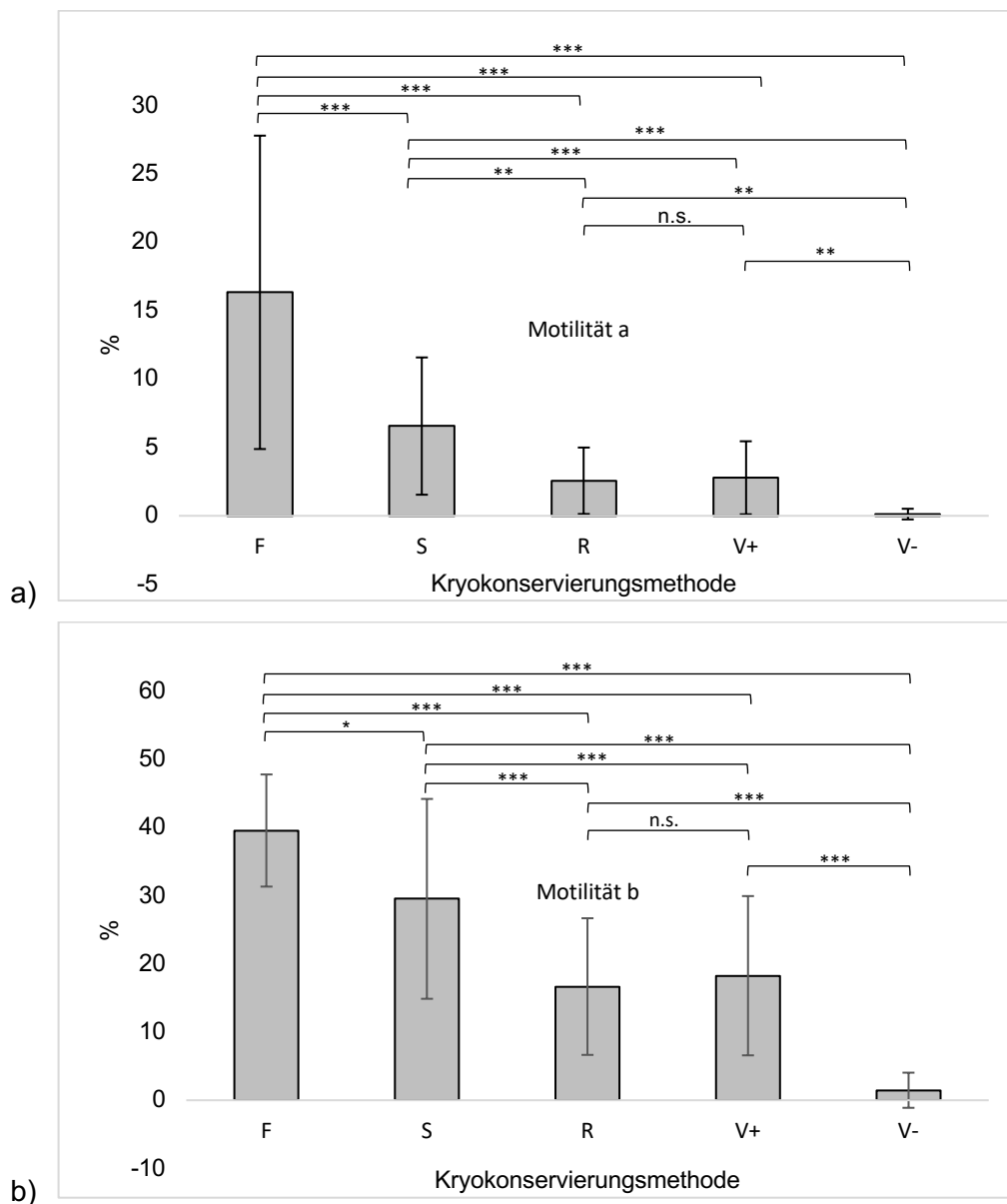


Abb. 26: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich a) Motilität a und b) Motilität b der Spermien

Untersuchung der Spermienmotilität nach dem Einfrieren der Ejakulate mittels vier verschiedener Kryokonservierungsmethoden. Das slow Freezing zeigt sich in beiden Motilitätsuntersuchungen als signifikant besser im Vergleich zum rapid Freezing und zur Vitrifikation mit und ohne Kryoprotektivum. Motilität a = schnell progressive Spermien, Motilität b = progressive Spermien.

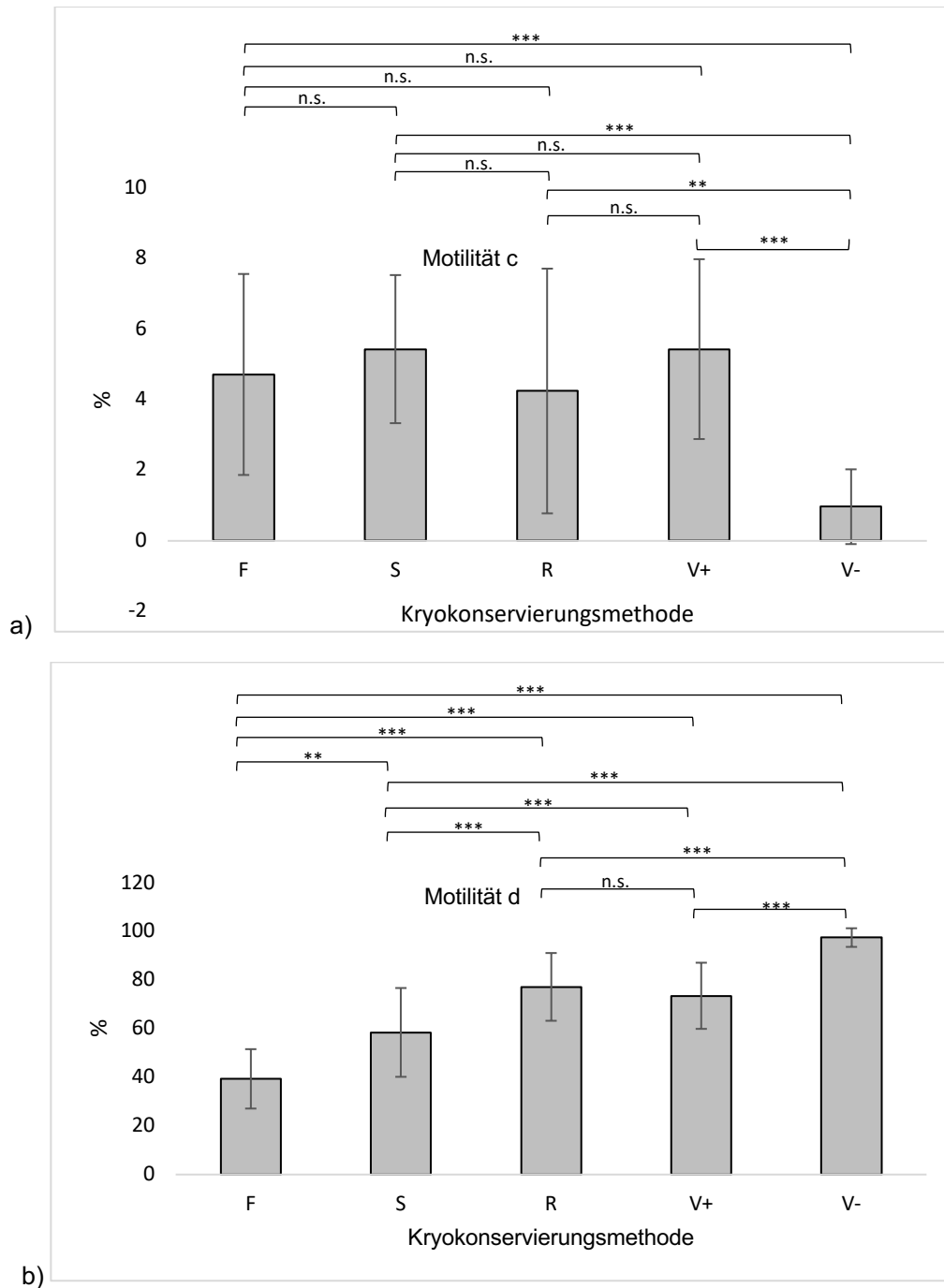


Abb. 27: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich a) Motilität c und b) Motilität d der Spermien

Die Spermienmotilität c und d repräsentieren die nicht progressiven, respektive immotilen Spermien. So zeigt sich insbesondere in der Untersuchung der immotilen Spermien (d) ein signifikant schlechterer Wert bei der Methode ohne Kryoprotektivum (V-) im Vergleich zu den restlichen drei Methoden. Gleichfalls schneidet das slow freezing signifikant besser ab als R, V+ und V-.
Motilität c = nicht progressive Spermien, Motilität d = immotile Spermien.

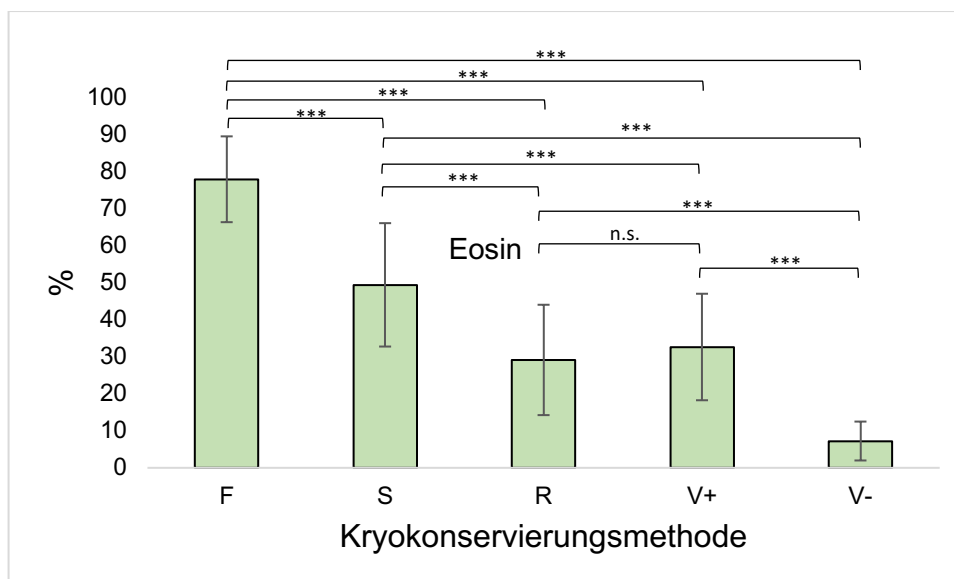


Abb. 28: Vergleich der Kryokonservierungsmethoden hinsichtlich Vitalität, Eosin-Färbung

Im Rahmen der Vitalitäts-Untersuchung mittels Eosin Färbung zeigten sich eindeutig signifikante Unterschiede zwischen allen Methoden, mit Ausnahme des Vergleichs zwischen auf R vs. V+. Ansonsten schnitten alle frischen Ejakulatproben signifikant besser ab als die kryokonservierten Proben ($p < 0,00001$). Gleich verhält es sich mit der slow freezing Methode. R und V+ schneiden besser ab als V-, zeigen jedoch untereinander keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,31$).

TUNEL										
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	<0,00001	0,00003	<0,00001	0,00011	0,68073	0,51373	0,15431	0,18297	0,19907	0,01503
Sig	***	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

AO										
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	0,00619	0,00026	0,00366	0,00327	0,34727	0,56159	0,8779	0,87837	0,54618	0,66837
Sig	**	***	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 2: Vergleich Kryokonservierungsmethoden bezüglich TUNEL und AO

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der p-Werte sowie der Signifikanzniveaus aus den TUNEL- und AO-Untersuchungen zum Vergleich der vier Kryokonservierungsmethoden. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Motilität a										
Methode	aF vs. aS	aF vs. aR	aF vs. aV+	aF vs. aV-	aS vs. aR	aS vs. aV+	aS vs. aV-	aR vs. aV+	aR vs. aV-	aV+ vs. aV-
p	0,00043	0,00016	0,00008	0,00044	0,00185	0,00029	0,00064	0,73422	0,00148	0,00338
Sig	***	***	***	***	**	***	***	n.s.	**	**

Motilität b										
Methode	bF vs. bS	bF vs. bR	bF vs. bV+	bF vs. bV-	bS vs. bR	bS vs. bV+	bS vs. bV-	bR vs. bV+	bR vs. bV-	bV+ vs. bV-
p	0,01982	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00008	<0,00001	0,40756	<0,00001	<0,00001
Sig	*	***	***	***	**	***	***	n.s.	**	**

Motilität c										
Methode	cF vs. cS	cF vs. cR	cF vs. cV+	cF vs. cV-	cS vs. cR	cS vs. cV+	cS vs. cV-	cR vs. cV+	cR vs. cV-	cV+ vs. cV-
p	0,44499	0,70948	0,51879	0,00029	0,21665	1	<0,00001	0,10395	0,00288	0,00001
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	**	***

Motilität d										
Methode	dF vs. dS	dF vs. dR	dF vs. dV+	dF vs. dV-	dS vs. dR	dS vs. dV+	dS vs. dV-	dR vs. dV+	dR vs. dV-	dV+ vs. dV-
p	0,00124	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00014	<0,00001	0,21995	<0,00001	<0,00001
Sig	**	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***

Eosin										
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00018	<0,00001	0,31566	<0,00001	<0,00001
Sig	***	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***

Tab. 3: Vergleich Kryokonservierungsmethoden bezüglich Motilität und Eosin

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der p-Werte sowie der Signifikanzniveaus aus den Untersuchungen zum Vergleich der vier Kryokonservierungsmethoden. Es wurden die Vitalität sowie die Motilität untersucht. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.6. Vergleich dreier Kryokonservierungsmedien hinsichtlich ihrer potenziell protektiven Kapazität für die Spermienqualität

Kryoprotektive Medien stellen einen wichtigen Bestandteil aktueller Forschung zur Kryokonservierung menschlicher Spermien dar. Ein zentraler Versuch dieser Forschungsarbeit beschäftigte sich mit dieser Fragestellung. Dazu wurden drei herkömmliche kryoprotektive Medien hinsichtlich ihrer potenziell protektiven Auswirkungen auf die Spermienqualität verglichen (s. 2.2.7).

Im Rahmen der Untersuchungen zur DNA-Integrität der Spermien zeigte sich in der TUNEL-Färbung ein signifikant besseres Ergebnis unter Verwendung des TYB-Mediums im Vergleich zum SFM ($p = 0,003$; Abb. 29, Tab. 5). Bei der AO-Färbung konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$) zwischen dem Test-Yolk Buffer (TYB) und dem Sperm Freeze Medium (SFM) dargestellt werden (Abb. 30; Tab. 4).

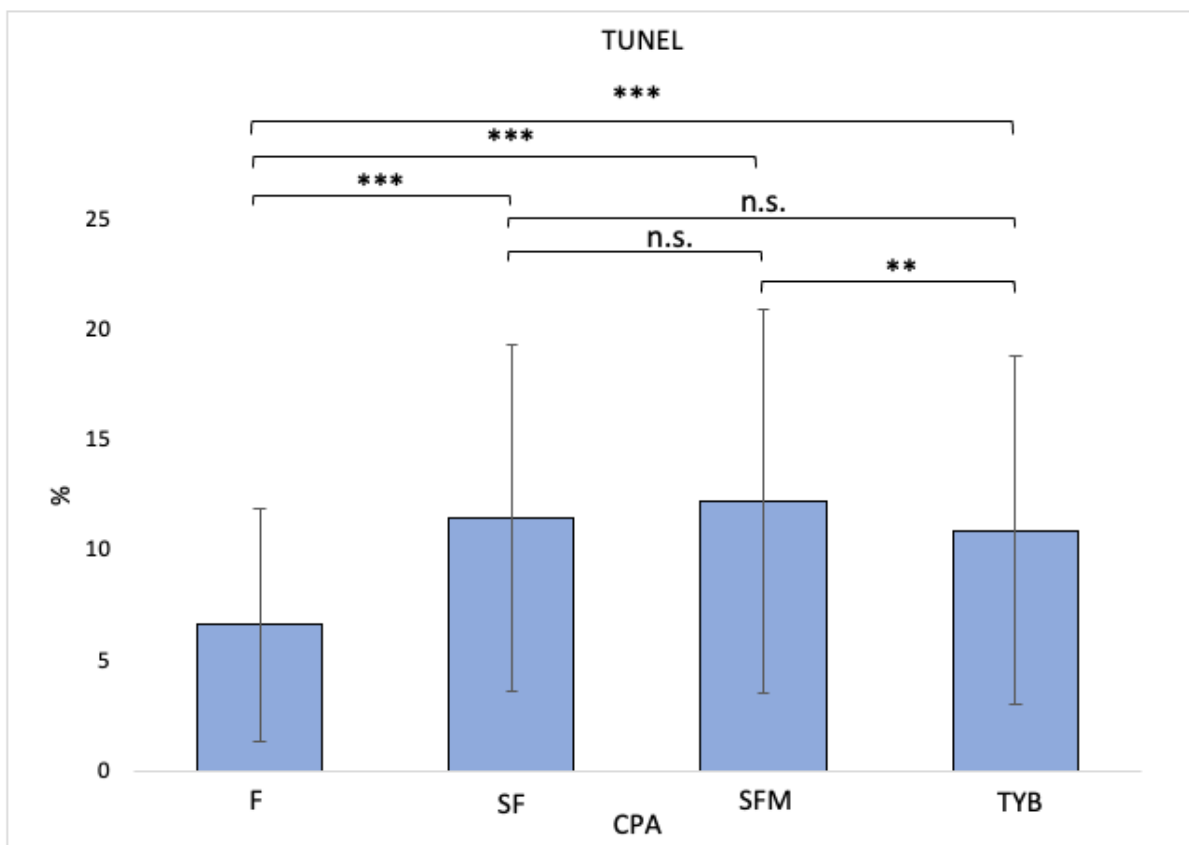


Abb. 29: Vergleich der kryoprotektiven Medien mittels TUNEL-Färbung

In der TUNEL-Färbung zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten kryoprotektiven Medien. Ejakulate, die mit dem TYB-Medium kryokonserviert wurden, zeigten signifikant bessere Ergebnisse als diese, die mit SFM eingefroren wurden ($p = 0,003$).

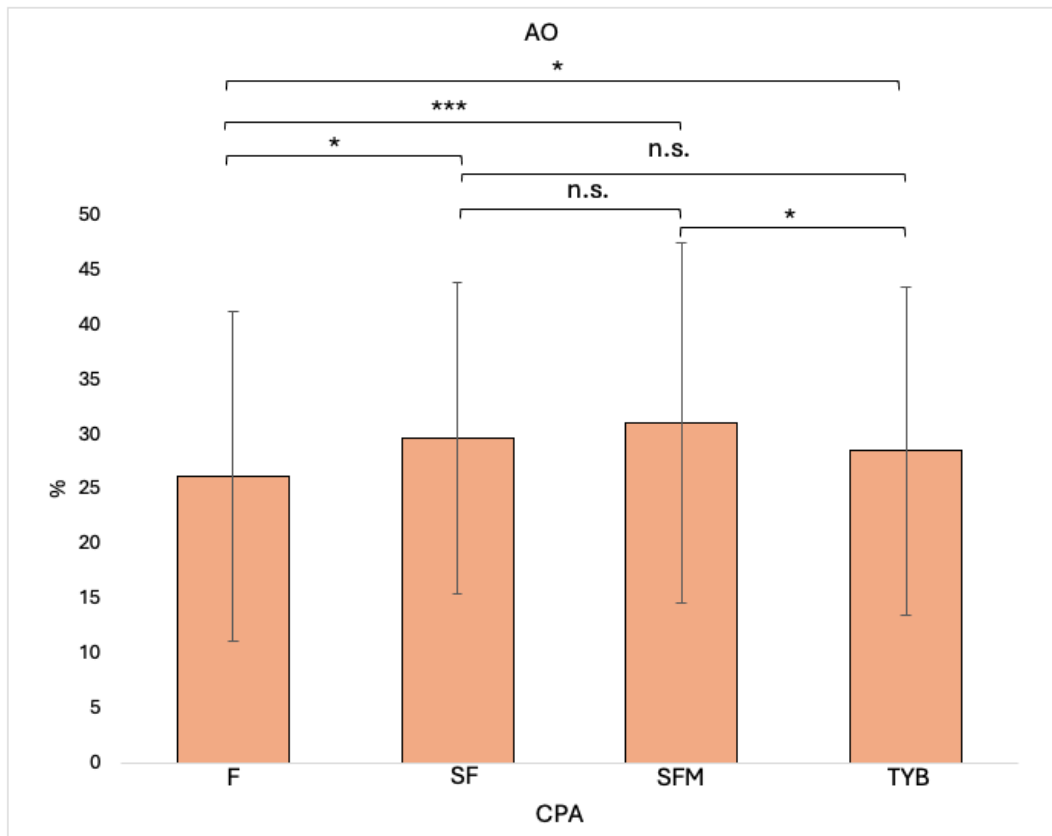


Abb. 30: Vergleich der kryoprotektiven Medien mittels AO-Färbung

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten kryoprotektiven Medien. Das TYB-Medium schnitt auch in der AO-Färbung signifikant besser ab als SFM ($p = 0,012$).

Auch bei der Analyse der protektiven Kapazität der Kryokonservierungsmittel auf die Spermienmotilität zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den drei zu vergleichenden kryoprotektiven Medien, insbesondere im Hinblick auf die Motilität a.

Die Untersuchung der schnell progressiven Spermien bestätigte die bisherigen Resultate, dass die frisch untersuchten Spermienproben von deutlich besserer Qualität sind als die kryokonservierten Proben. Im Vergleich der Kryokonservierungsmedien schnitt insbesondere das TYB-Medium gut ab: Proben, die mit dem TYB-Medium eingefroren wurden, wiesen eine signifikant höhere Anzahl an schnell progressiven Spermien auf als Ejakulatproben, bei denen SF und SFM verwendet wurden ($p = 0,002$ und $p = 0,009$). Zwischen den Medien SF und SFM konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Motilität der schnell progressiven Spermien festgestellt werden (Abb. 31 a; Tab. 5).

Die Auszählung der langsam progressiven Spermien (Motilität b) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei kryoprotektiven Medien (Abb. 31 b; Tab. 5). Hinsichtlich der nicht progressiven Spermien (Motilität c) zeigte sich ein signifikant besserer Wert bei den Proben mit TYB-Medium im Vergleich zu den Proben, die mit SF eingefroren wurden ($p =$

0,02; Abb. 32 a; Tab. 5). Zwischen TYB und SFM konnte hier jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, und auch der Vergleich zwischen SF und SFM blieb knapp unter dem niedrigsten Signifikanzlevel ($p = 0,07$). Des Weiteren zeigte die Analyse der immotilen Spermien (Motilität d) keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Kryokonservierungsmedien (Abb. 32 b; Tab 6). Mittels des Eosin-Tests wurde auch der Einfluss der drei kryoprotektiven Medien auf die Spermiovitalität untersucht. Hier ließ sich jedoch keines der drei verwendeten Kryoprotektiva als signifikant besser darstellen (Abb. 33, Tab. 5).

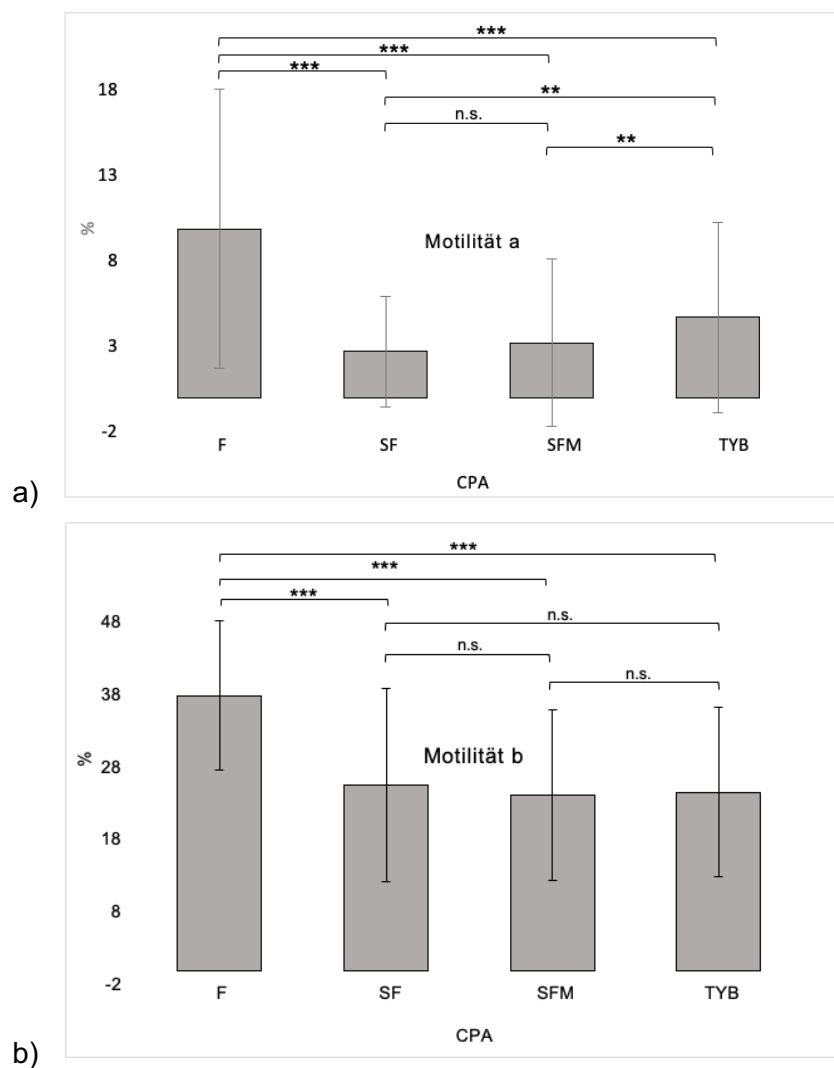


Abb. 31: Vergleich der kryoprotektiven Medien bezüglich a) Motilität a und b) Motilität b der Spermien

Hinsichtlich der Motilität a schnitt das TYB-Medium signifikant besser ab als SF und SFM ($p = 0,002$ und $p = 0,009$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei kryoprotektiven Medien hinsichtlich der Motilität b.

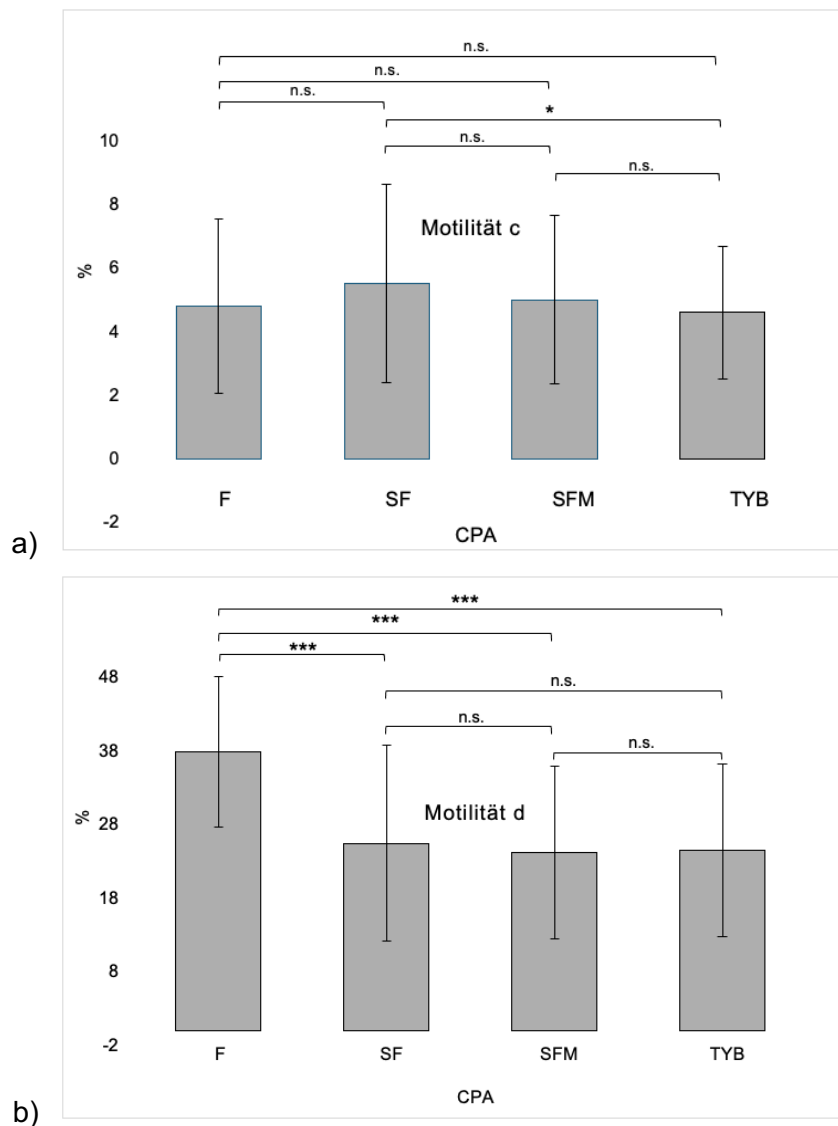


Abb. 32: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich a) Motilität c und b) Motilität d der Spermien

- a) Das TYB-Medium zeigte signifikant weniger nicht progressive Spermien im Vergleich zum SF ($p=0,02$). Zwischen dem SFM und dem TYB-Medium ließ sich kein relevanter Unterschied darstellen; b) Hinsichtlich der immotilen Spermien (Motilität d) konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

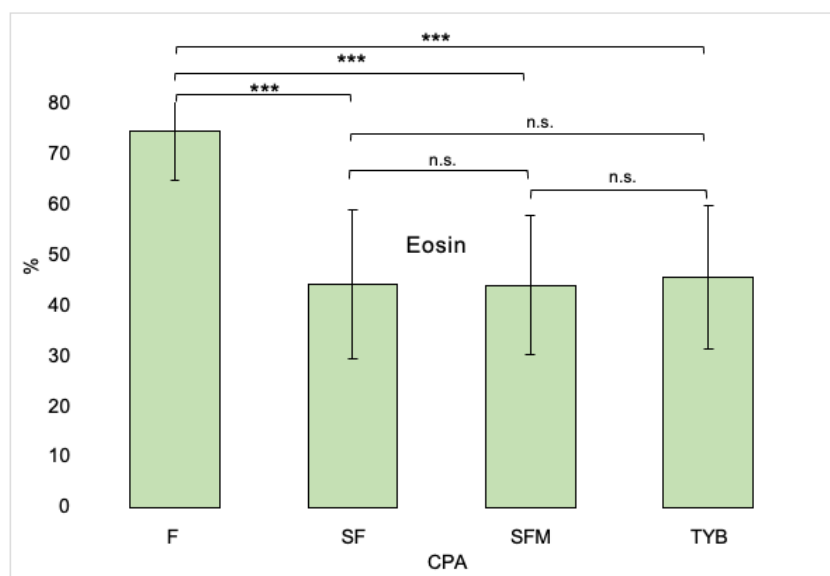


Abb. 33: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich des Eosin-Tests

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Vitalität zwischen den drei kryoprotektiven Medien SF, SFM und TYB.

TUNEL						
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,1141	0,5287	0,00328
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	**

AO						
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	0,01101	0,00043	0,0353	0,23269	0,46217	0,01222
Sig	*	***	*	n.s.	n.s.	*

Tab. 4: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich TUNEL und AO

Die Tabelle zeigt den Vergleich der drei kryoprotektiven Medien hinsichtlich der potenziell protektiven Kapazität auf die DNA-Fragmentation der Spermien. Die p-Werte sowie das Signifikanzniveau sind angegeben. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

		Motilität a				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,4593	0,0027	0,00906
Sig	***	***	***	n.s	**	**

		Motilität b				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,20349	0,41055	0,65762
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

		Motilität c				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	0,15603	0,71138	0,67612	0,0784	0,02182	0,6672
Sig	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

		Motilität d				
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,60778	0,74625	0,42798
Sig	***	***	***	n.s	n.s	n.s

		Eosin				
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,8921	0,25263	0,12228
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 5: Vergleich kryoprotektiver Medien bezüglich Motilität und Eosin

Die Tabelle zeigt den Vergleich der drei kryoprotektiven Medien hinsichtlich der potenziell protektiven Kapazität auf Beweglichkeit und Vitalität der Spermien. Die p-Werte sowie das Signifikanzniveau sind angegeben. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.7. Spearman-Korrelationsanalyse

Um mögliche Korrelationen innerhalb der Testergebnisse der frischen Proben sowie der Werteverhältnisse innerhalb desselben Tests zwischen frischen und kryokonservierten Proben und dem Alter der Patienten zu untersuchen, wurden eine Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt. Dieser nicht-parametrische Test misst die Stärke eines möglichen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Je näher der Korrelationskoeffizient, „rs“, an 1 oder -1 ist, desto stärker ist die Korrelation. (Eins und minus 1 zeigen eine perfekte Korrelation an, Null bedeutet keine Korrelation). Abhängig vom Vorzeichen handelt es sich um eine inverse, negative (-1) oder eine nicht inverse, positive (+1) Korrelation zwischen zwei Variablen (Akoglu, 2018). Abbildung 34 zeigt einen Überblick der signifikanten Abhängigkeiten der frischen Ejakulate zwischen den verschiedenen Tests und dem Patientenalter anhand von Streudiagrammen.

Die Analyse zeigte eine moderat negative Korrelation zwischen der Spermiovitalität und dem Alter der Patienten (Eosin/Alter: $r_s = -0,42$, $p = 0,00083$, A011). Hinsichtlich anderer potenzieller Abhängigkeiten der Werte aus den frischen Ejakulatproben konnten nur schwache Korrelationen ($r_s \leq \pm 0,4$) festgestellt werden. Hier zeigten sich beispielsweise schwach negative Korrelationen zwischen der Spermiovitalität und der TUNEL-Färbung (Eosin/TUNEL, $r_s = -0,36$), der Spermiovitalität und der Motilität c (Eosin/Mot. c, $r_s = -0,31$), sowie der Spermiovitalität und der Motilität d (Eosin/Mot. d; $r_s = -0,35$). Zwischen der TUNEL-Färbung und der Motilität d zeigte sich eine schwach positive Korrelation (TUNEL/Mot. d, $r_s = 0,39$; Abb. 34).

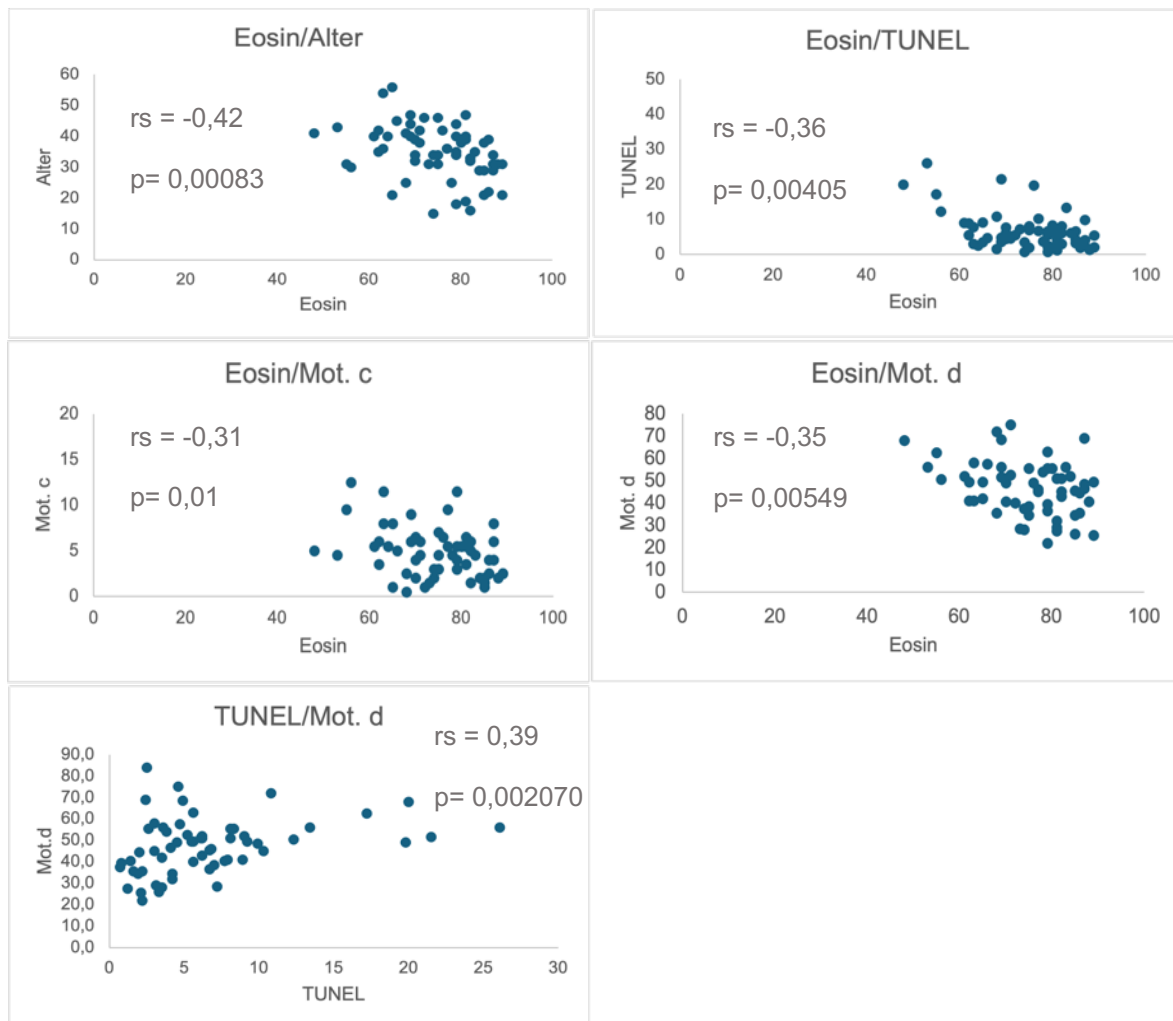


Abb. 34: Signifikante Ergebnisse der Spearman-Korrelationsanalyse: Daten aus der Analyse frischer Ejakulate: Spermogrammparameter und Patientenalter

Die Scatterplots weisen auf mögliche Korrelationen zwischen den verschiedenen Variablen hin. Eine moderat negative Korrelation ($rs \leq \pm 0,4$) zeigt sich zwischen dem Alter der Patienten und der Spermien-Vitalität. Weitere schwach negative Korrelationen sind im Vergleich zwischen Eosin/TUNEL, Eosin/Mot. c, Eosin/Mot. d, sowie eine schwach positive Abhängigkeit zwischen TUNEL/Mot. d zu verzeichnen.

Des Weiteren wurden die möglichen Korrelationen innerhalb jedes einzelnen Tests untersucht. Hierbei zeigten sich hohe Abhängigkeiten ($rs \geq \pm 0,7$) zwischen den frisch analysierten Proben und denen nach Kryokonservierung mit allen drei kryoprotektiven Medien in Bezug auf beide DNA-Analysen. Für TUNEL zeigten sich rs-Werte zwischen 0,73 bis 0,81 und für AO zwischen 0,77 und 0,83.

Mit Ausnahme einer weiteren starken Korrelation zwischen den frischen Ejakulatproben und denen mit SFM kryokonservierten Proben hinsichtlich der Motilität d, zeigten sich weitere starke Abhängigkeiten innerhalb desselben Tests ausschließlich beim Vergleich zwischen den drei verschiedenen Kryokonservierungsmedien (SF vs. SFM, SF vs. TYB und SFM vs. TYB).

Weitere moderate Korrelationen konnten zwischen F vs. TYB im Eosin-Test, zwischen F vs. allen anderen Medien in der Untersuchung der Motilität a und b, sowie zwischen F vs. SF und F vs. TYB in der Motilität d festgestellt werden. Alle anderen Untersuchungen zeigten ausschließlich schwache Korrelationen an (Tab. A010, Tab. A013-A015).

Im Rahmen der Arbeit wurden Zusammenhänge zwischen weiteren Parametern untersucht. Neben den Korrelationen zwischen den Spermienparametern sowie dem Alter der Patienten wurden des Weiteren die Körpergröße (59 Proben), das Körpergewicht (59 Proben), das Hodenvolumen (35 Proben), das Ejakulatvolumen (60 Proben), die Spermienkonzentration (59 Proben) sowie die Morphologie (59 Proben) der Ejakulate verglichen. Für die einzelnen Berechnungen konnte eine unterschiedliche Anzahl von Patienten abhängig vom Parameter inkludiert werden, da zum Zeitpunkt der Arbeit nicht für alle Patienten alle Daten erhoben werden konnten. Die Erfassung der Daten erfolgte nach WHO-Richtlinien.

Es zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern, insbesondere der Spermienkonzentration und der Morphologie zu der Spermienmotilität. Bei frischen Ejakulaten konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der Spermienkonzentration und den Motilitätsparametern a und b festgestellt werden ($r_s = 0,453$ bzw. $r_s = 0,354$, $p < 0,01$, Abb. 35). Das bedeutet, dass bei höherer Spermienkonzentration mehr Spermien in der Lage sind, sich vorwärtszubewegen - entweder schnell (a) oder zumindest progressiv (b).

Eine inverse Beziehung bestand jedoch zur Motilität c und d ($r_s = -0,431$ bzw. $r_s = -0,455$, $p < 0,01$). Dies deutet darauf hin, dass bei höherer Spermienkonzentration der Anteil an unbeweglichen (d) oder nur minimal beweglichen (c) Spermien abnimmt.

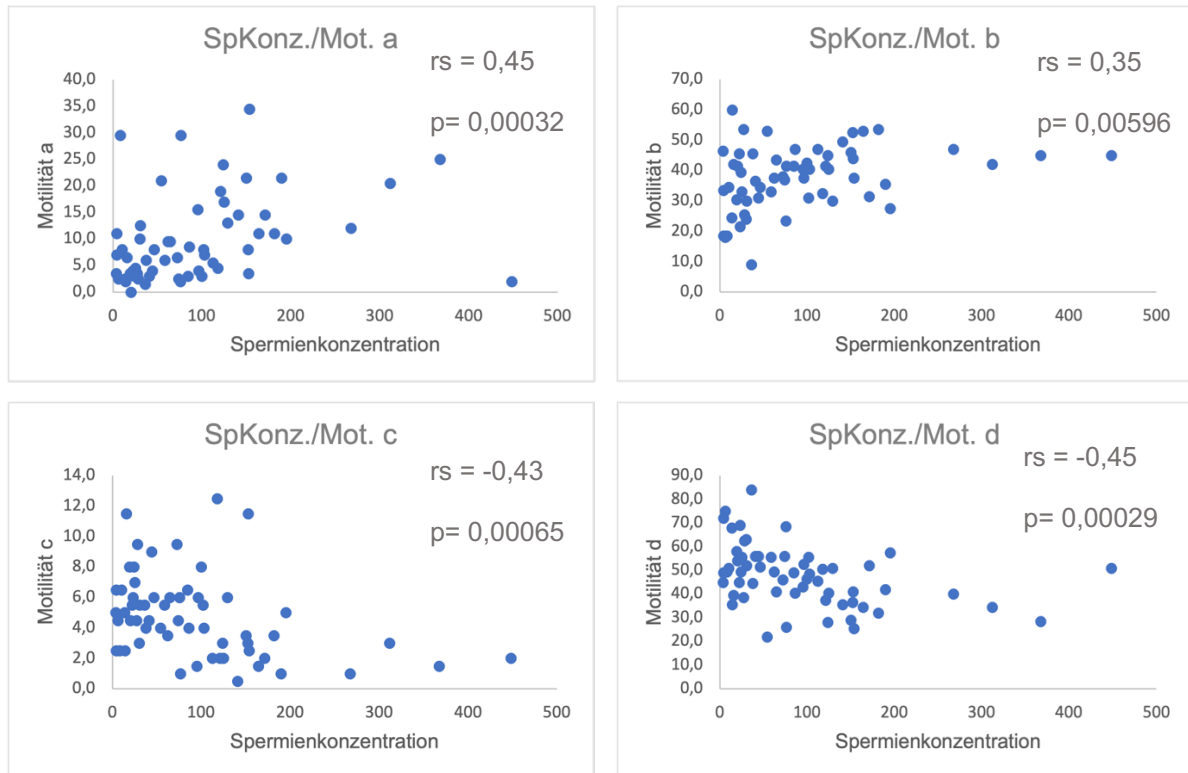


Abb. 35: Signifikante Zusammenhänge zwischen Spermienkonzentration und Spermienbeweglichkeit in frischen Ejakulaten

Die Streudiagramme zeigen potenzielle Korrelationen zwischen den einzelnen Variablen an. Signifikante positive Korrelationen bestanden zwischen der Spermienkonzentration und der progressiven Motilität (a: $rs = 0,453$; b: $rs = 0,354$), während eine inverse Beziehung zu unbeweglichen Spermien zu verzeichnen ist (c: $rs = -0,431$; d: $rs = -0,455$) vorlag ($p < 0,01$).

Für die Morphologie zeigten sich ebenfalls signifikante Korrelation, darunter eine moderate positive Beziehung zur Motilität b ($rs = 0,551$, $p < 0,001$) und eine starke negative Korrelation zur Motilität d ($rs = -0,631$, $p < 0,001$). Dies bedeutet, dass Spermien mit einer besseren Morphologie tendenziell häufiger progressiv beweglich sind, während Spermien mit schlechter Morphologie vermehrt immobil bleiben (Abb. 36).

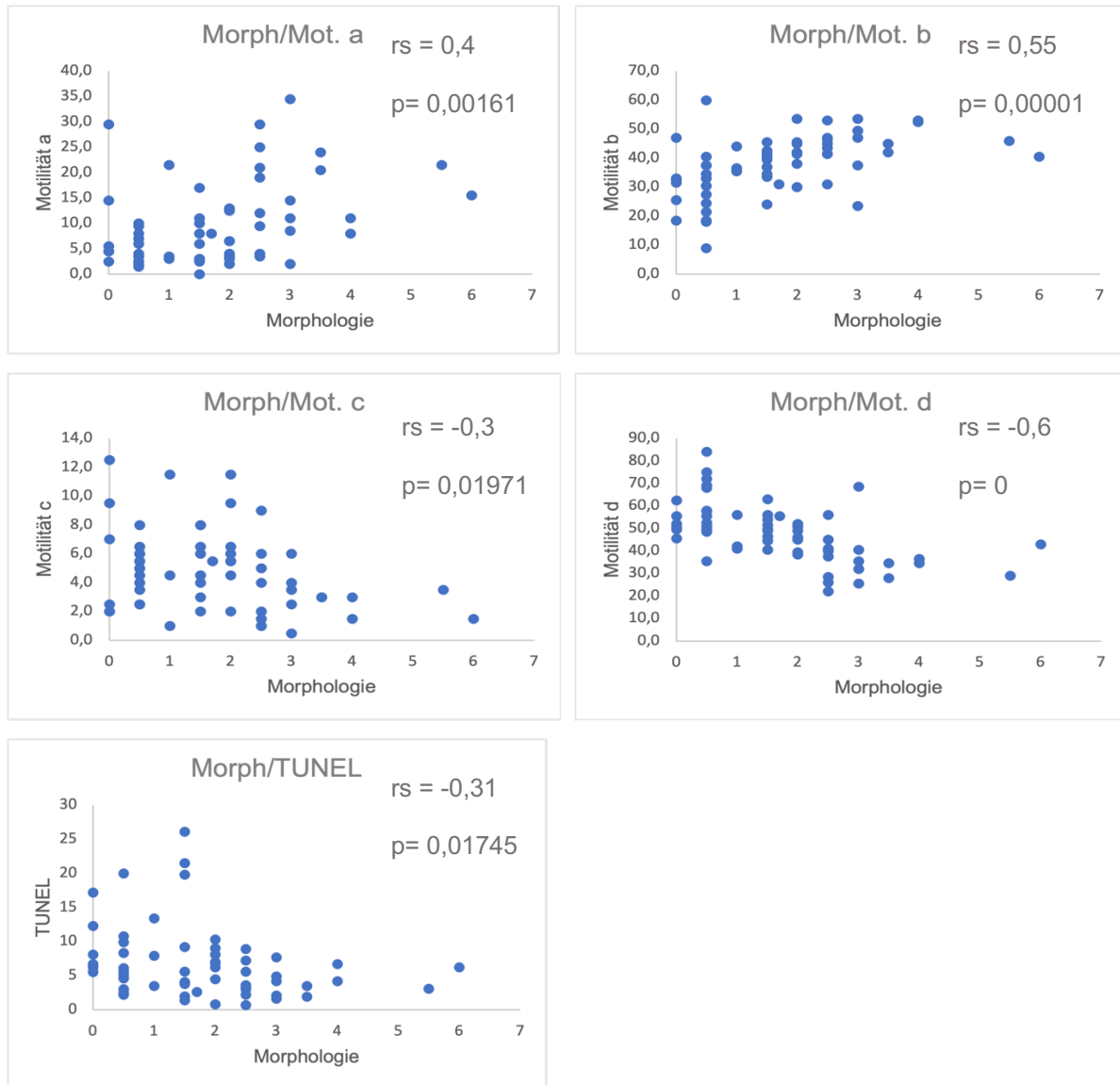


Abb. 36: Morphologie, Beweglichkeit und DNA-Fragmentation in frischen Ejakulaten

Die Morphologie steht in positivem Zusammenhang mit der nicht-progressiven Motilität b ($rs = 0,551$) und zeigt eine starke negative Beziehung zur Motilität d ($rs = -0,631$, $p < 0,001$).

In kryokonservierten, mit SF behandelten Proben zeigten sich vergleichbare Muster. Die Spermienkonzentration stand in signifikanter positiver Beziehung zur Motilität a und b ($rs = 0,512$ bzw. $rs = 0,396$, $p < 0,01$) sowie zu Eosin ($rs = 0,542$, $p < 0,001$). Hingegen zeigten sich inverse Zusammenhänge zur Motilität d ($rs = -0,473$, $p < 0,001$) und zu TUNEL ($rs = -0,382$, $p < 0,01$, Abb. 37).

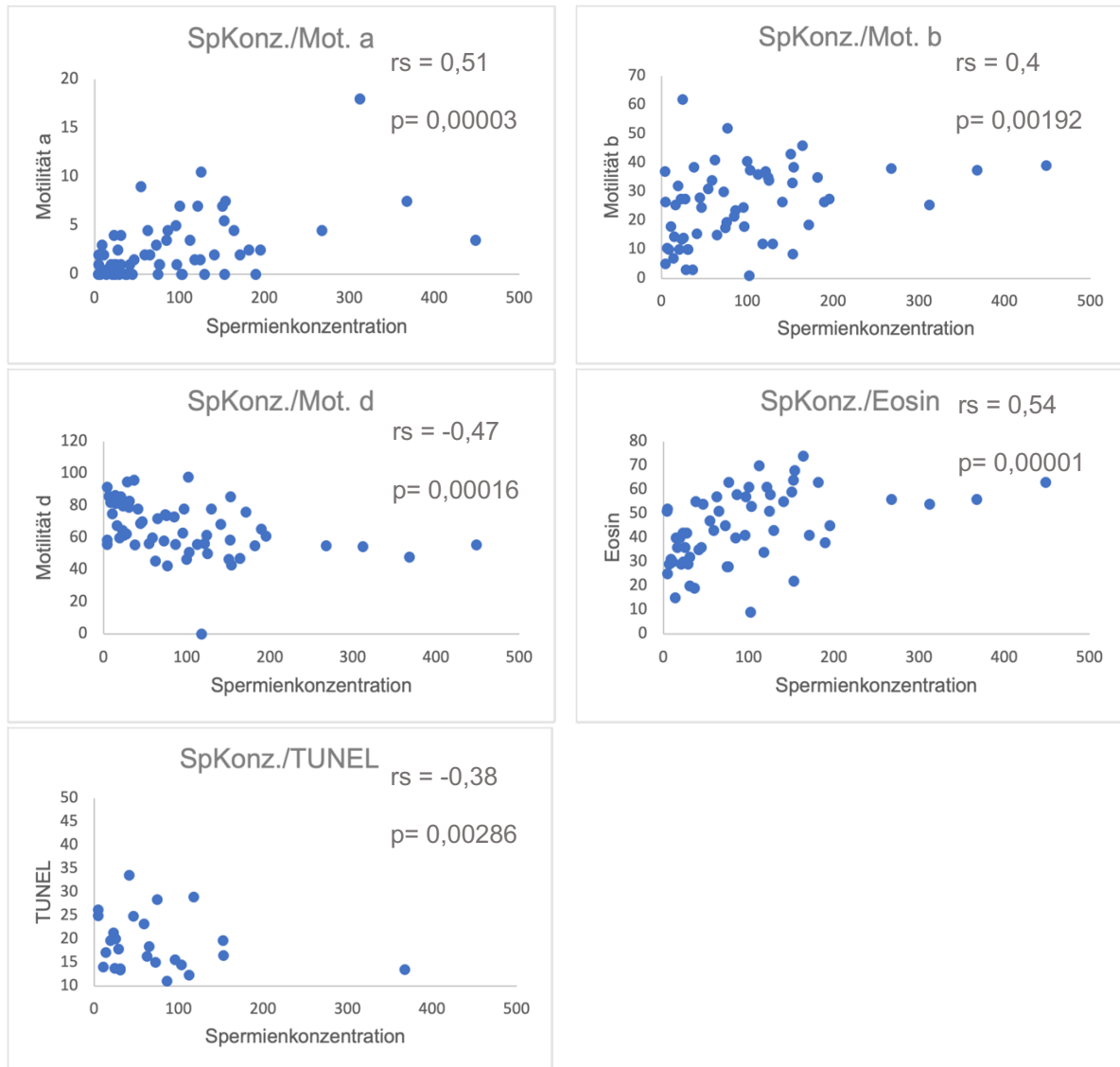


Abb. 37: Korrelationen in mit SF kryokonservierten Ejakulaten: Spermienkonzentration, Beweglichkeit, Eosin und TUNEL

Die Spermienkonzentration korreliert positiv mit der Motilität a ($rs = 0,512$), b ($rs = 0,396$) und Eosin ($rs = 0,542$), während eine negative Beziehung zur Motilität d ($rs = -0,473$) und TUNEL ($rs = -0,382$) besteht.

Bei den mit SF behandelten kryokonservierten Ejakulaten zeigte die Morphologie signifikante positive Korrelationen mit der progressiven Motilität a ($rs = 0,415$), der nicht-progressiven Motilität b ($rs = 0,430$) sowie mit Eosin ($rs = 0,451$, $p < 0,01$). Gleichzeitig wurden negative Korrelationen beobachtet, insbesondere mit der Motilität d ($rs = -0,499$, $p < 0,001$), und mit TUNEL ($rs = -0,356$, $p < 0,0$, Abb. 38).

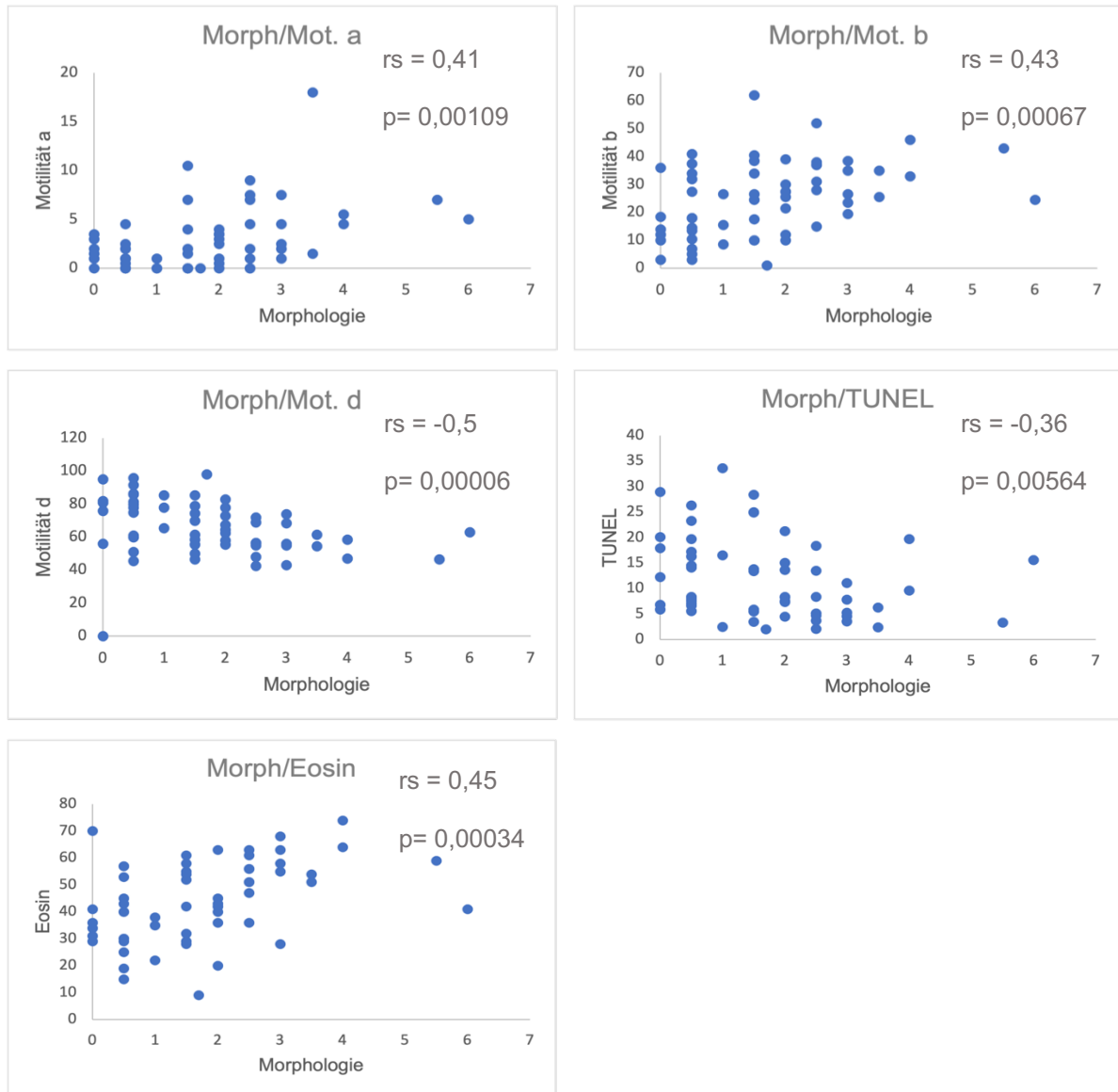


Abb. 38: Morphologie in kryokonservierten SF-Proben: Zusammenhänge zwischen Motilität und Vitalität

Die Morphologie zeigte ähnliche Muster mit positiven Korrelationen zu Motilität a ($rs = 0,415$), b ($rs = 0,430$) und Eosin ($rs = 0,451$) sowie negativen Korrelationen zu Motilität d ($rs = -0,499$) und TUNEL ($rs = -0,356$).

In den mit SFM behandelten Proben waren die Beziehungen noch stärker ausgeprägt. Hier war die Spermienkonzentration deutlich mit Motilität a, b und Eosin assoziiert ($rs = 0,638$, $rs = 0,567$ bzw. $rs = 0,673$, $p < 0,001$), während eine negative Verbindung zur Motilität d zu verzeichnen war ($rs = -0,622$, $p < 0,001$, Abb. 39).

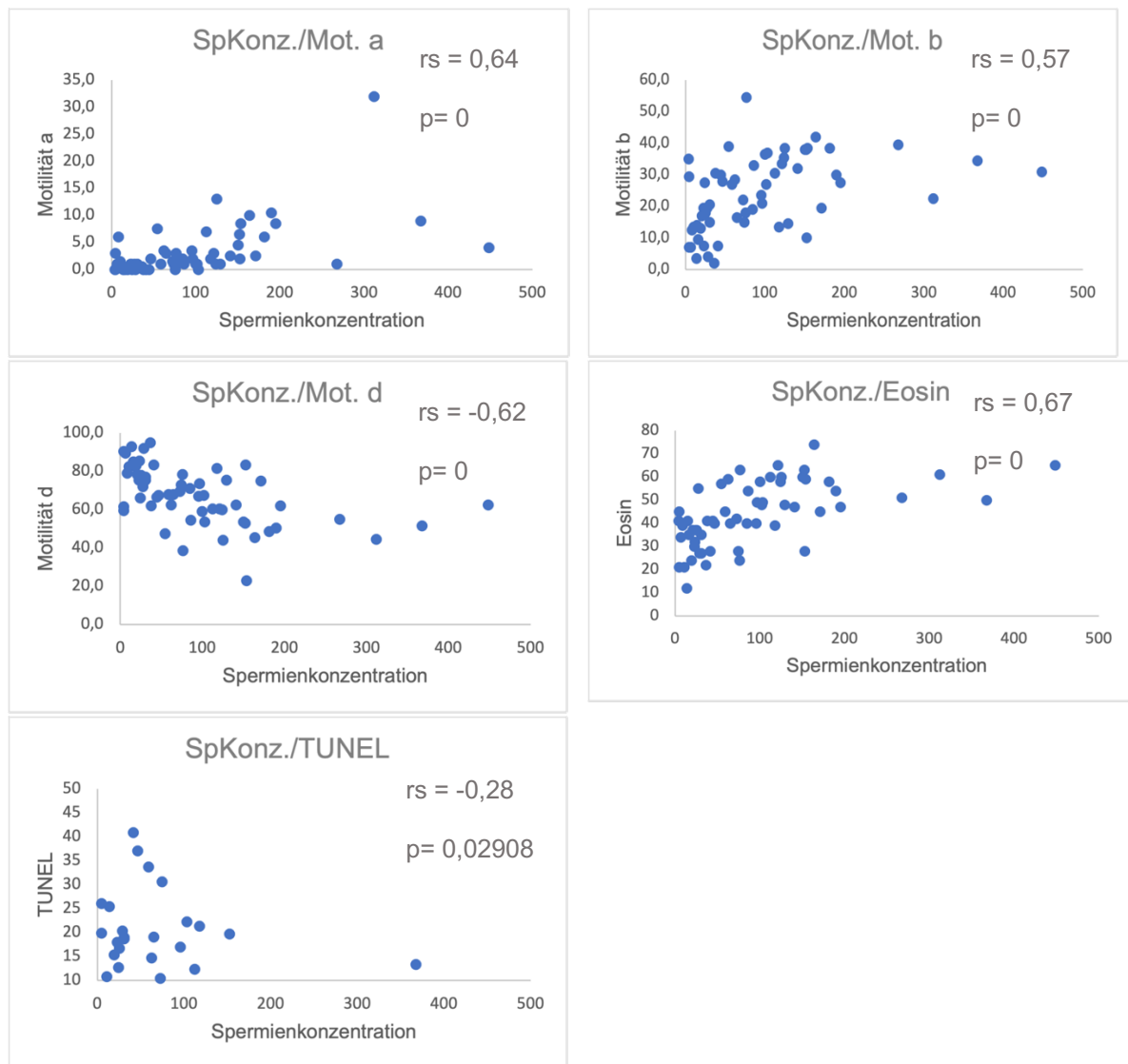


Abb. 39: Spermienkonzentration in SFM kryokonservierten Proben in Korrelation mit Motilität und Zell- bzw. DNA-Integrität

Die Spermienkonzentration steht in positiver Korrelation zur Motilität a ($rs = 0,638$), b ($rs = 0,567$) und Eosin ($rs = 0,673$, $p < 0,001$) sowie in negativer Korrelation zur Motilität d ($rs = -0,622$, $p < 0,001$).

Die Morphologie zeigt einen vergleichbaren Befund mit signifikant positiven Korrelationen zur Motilität b ($rs = 0,587$) und Eosin ($rs = 0,461$, $p < 0,01$). Gleichzeitig wurden negative Beziehungen zur Motilität d ($rs = -0,588$, $p < 0,001$) und zu TUNEL ($rs = -0,326$, $p < 0,01$) festgestellt (Abb. 40).

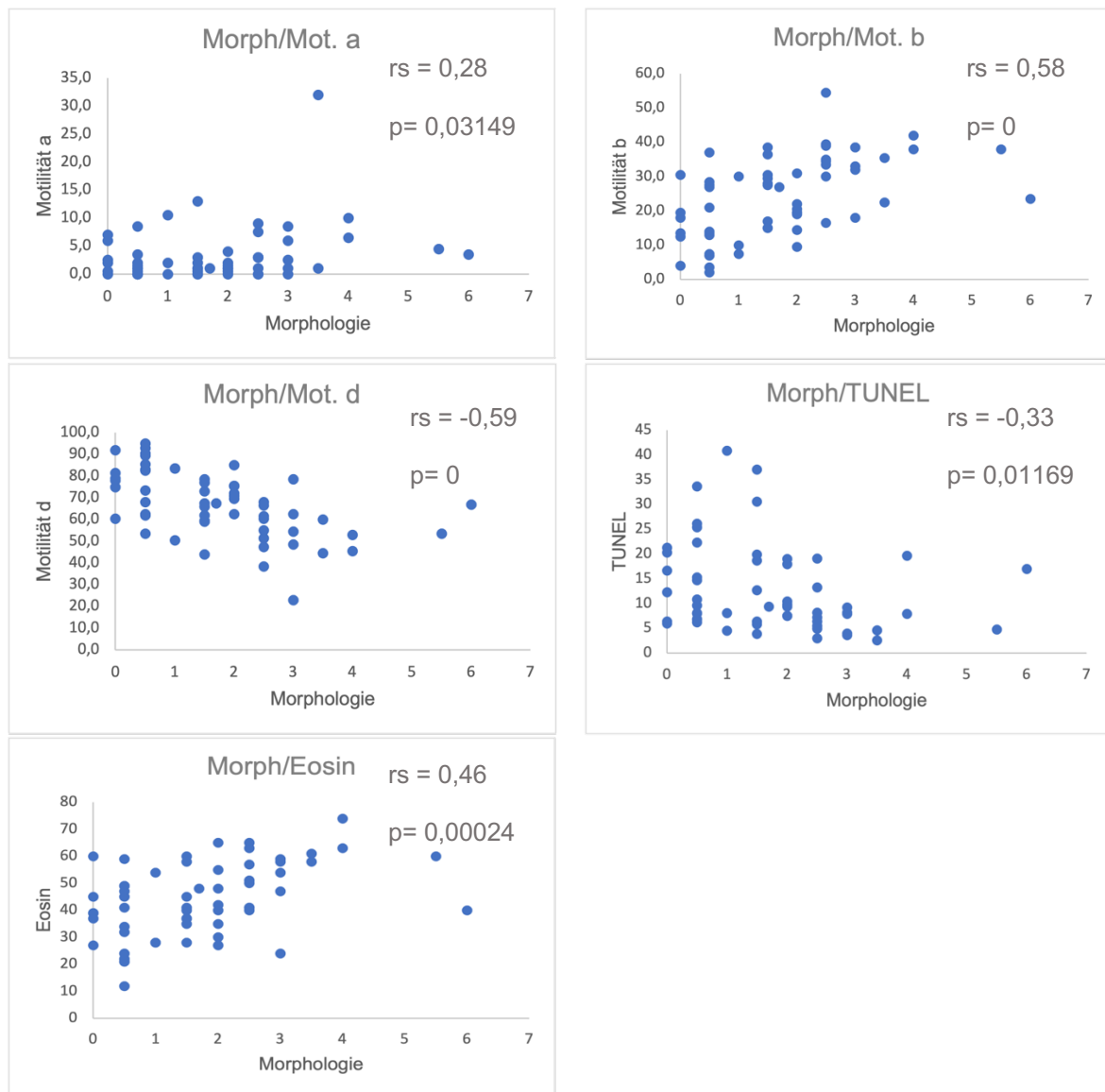


Abb. 40: Korrelationsanalyse von in SFM kryokonservierten Ejakulaten; Morphologie im Vergleich zur Motilität und der Zellintegrität

Die Morphologie korreliert positiv mit der Motilität b ($rs = 0,587$) sowie Eosin ($rs = 0,461$, $p < 0,01$) und negativ mit der Motilität d ($rs = -0,588$, $p < 0,001$) und TUNEL ($rs = -0,326$, $p < 0,01$).

Für die mit TYB behandelten Proben wurde ebenfalls eine signifikant positive Korrelation der Spermienkonzentration zur Motilität a ($rs = 0,538$, $p < 0,001$) und der Motilität b ($rs = 0,550$, $p < 0,001$) nachgewiesen.

Zusätzlich wurde ein starker positiver Zusammenhang zwischen der Spermienkonzentration und Eosin festgestellt ($rs = 0,592$, $p < 0,001$). Eine signifikant negative Beziehung wurde hingegen zur Motilität d beobachtet ($rs = -0,534$, $p < 0,001$, Abb. 41).

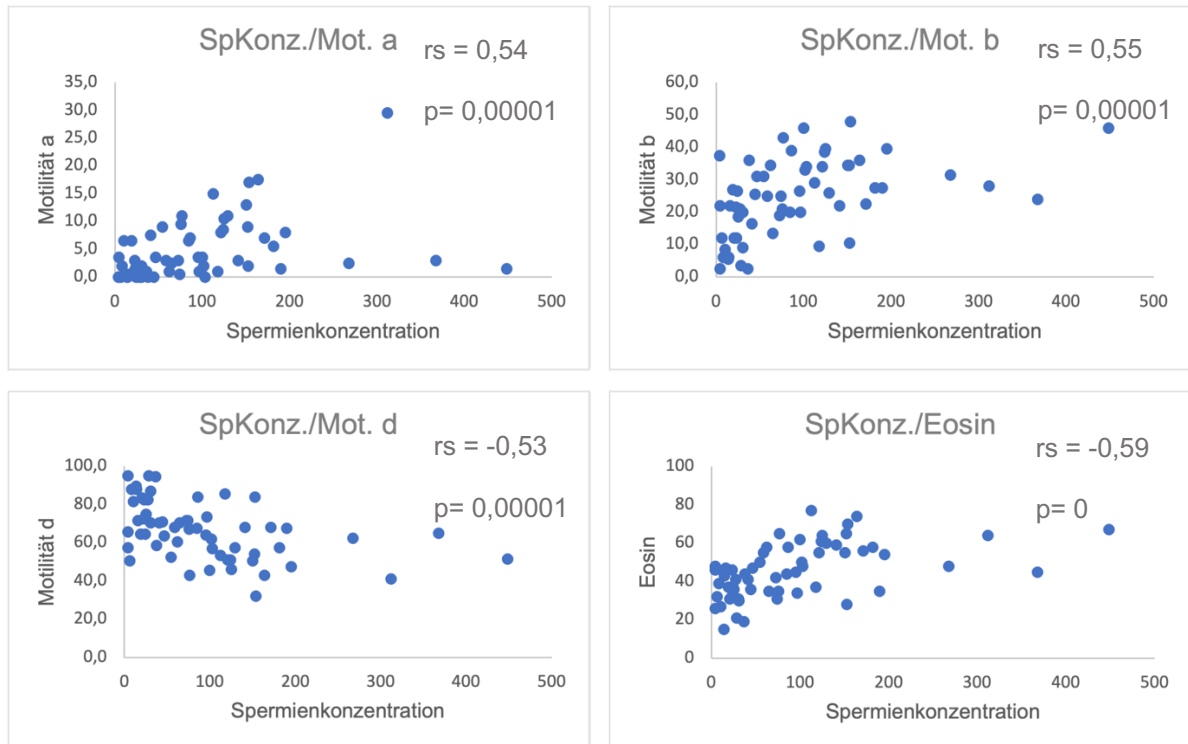


Abb. 41: Zusammenhänge zwischen Spermienkonzentration und Motilität sowie Eosin in TYB-kryokonservierten Proben

Die Spermienkonzentration weist eine positive Beziehung zu Motilität a ($r_s = 0,538$), b ($r_s = 0,550$) und Eosin ($r_s = 0,592$, $p < 0,001$) auf, während sie negativ mit Motilität d ($r_s = -0,534$, $p < 0,001$) assoziiert ist.

Weiterhin wurden positive Korrelationen zwischen der Spermienmorphologie und der progressiven Motilität a ($r_s = 0,441$, $p < 0,01$), der nicht-progressiven Motilität b ($r_s = 0,491$, $p < 0,01$) und Eosin ($r_s = 0,422$, $p < 0,01$) festgestellt. Gleichzeitig konnten signifikante negative Korrelationen mit Motilität d ($r_s = -0,467$, $p < 0,001$), sowie zu TUNEL ($r_s = -0,337$, $p < 0,01$, Abb. 42) gefunden werden.

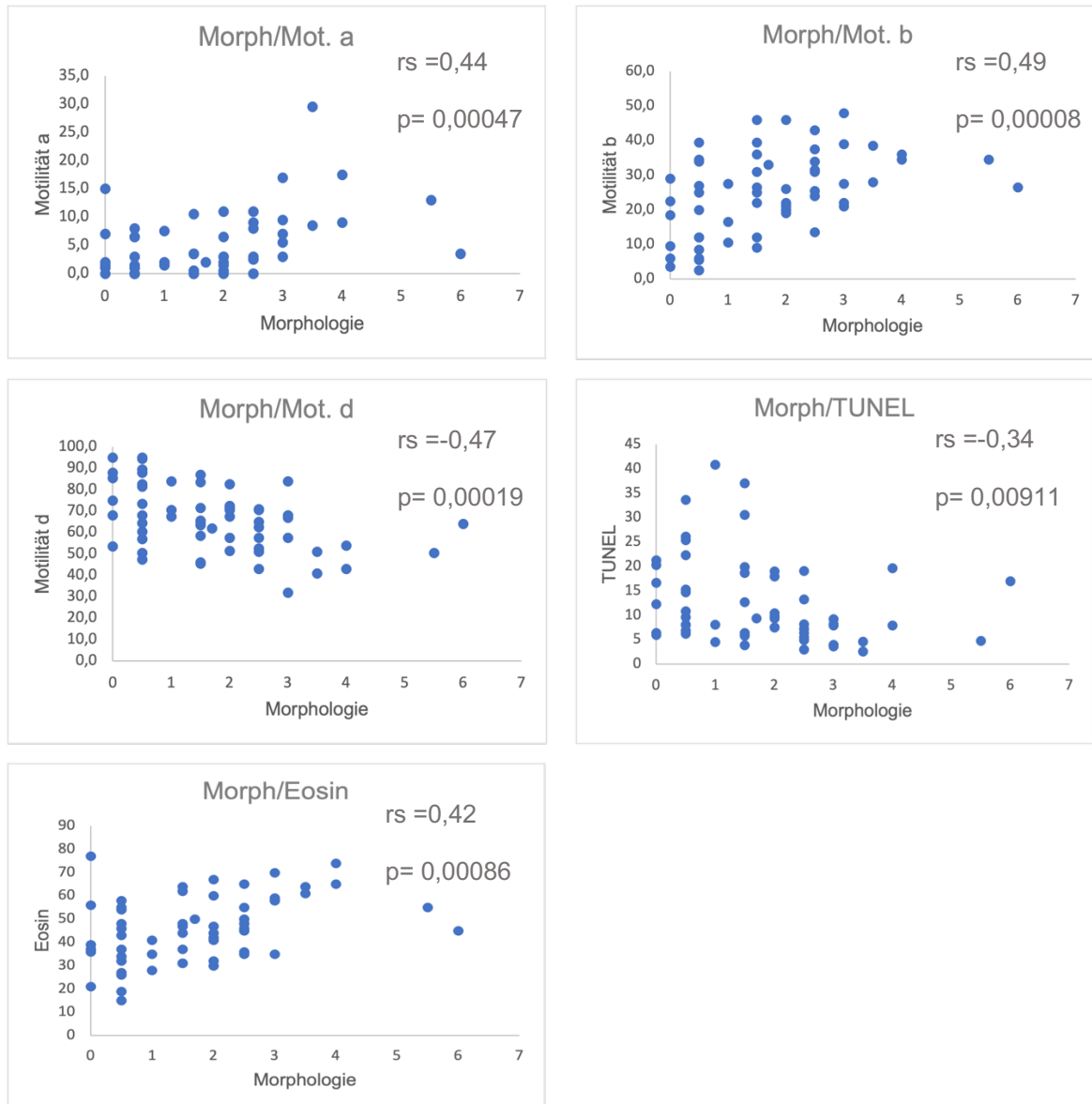


Abb. 42: Zusammenhänge zwischen der Morphologie und der Motilität, Eosin und TUNEL in TYB-kryokonservierten Ejakulaten

Die Morphologie ist positiv mit Motilität a ($rs = 0,441$), b ($rs = 0,491$) und Eosin ($rs = 0,422$, $p < 0,01$) verknüpft, während sie negativ mit Motilität d ($rs = -0,467$, $p < 0,001$) und TUNEL ($rs = -0,337$, $p < 0,01$) assoziiert ist.

Es zeigte sich bei den mit TYB kryokonservierten Ejakulaten zudem eine moderat signifikante Korrelation zwischen dem Hodenvolumen links und der Motilität a ($rs = 0,351$, $p = 0,038$). Diese Tendenz konnte für die rechte Seite nicht bestätigt werden ($rs = 0,254$, $p = 0,1396$). Die Ergebnisse könnten jedoch darauf hinweisen, dass ein größeres Hodenvolumen mit einer erhöhten progressiven Beweglichkeit der Spermien assoziiert ist (Abb. 43).

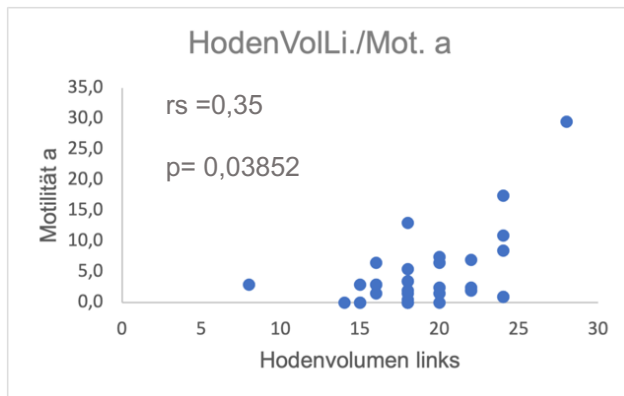


Abb. 43: Zusammenhang zwischen Hodenvolumen links und progressiver Motilität a in TYB kryokonservierten Ejakulaten

Das Hodenvolumen links zeigte eine moderat signifikante positive Assoziation mit der Motilität a ($r_s = 0,351$, $p = 0,038$). Dies deutet darauf hin, dass ein größeres Hodenvolumen mit einer erhöhten progressiven Beweglichkeit der Spermien verbunden sein könnte.

Die durchgeführten Analysen zeigen signifikante Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermienparametern, insbesondere hinsichtlich der Spermienkonzentration, Morphologie und Motilität. Dabei konnten sowohl in frischen als auch in kryokonservierten Ejakulaten konsistente Muster beobachtet werden.

3.8. Ergebnisse Assay Optimierung

Zur Optimierung der Assay-Settings wurden die ScanR-Messwerte mit den manuell ermittelten Laborwerten von 40 zufällig ausgewählten Stichproben verglichen, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zu erzielen. Hierzu wurden für die AO- und TUNEL-Färbung verschiedene Schwellenwerte getestet, bei denen die Fluoreszenz der positiven Objekte das Hintergrundsignal um den angegebenen Wert übersteigt.

Für die AO-Färbung wurden insgesamt 25 Schwellenwerte im Bereich von 15-40 % geprüft. Die höchste Übereinstimmung mit den manuell ermittelten Laborwerten wurde bei einem Schwellenwert von 30 % mit definiertem Gate zur Spermienerkennung erzielt. Dieser Wert wurde als optimaler Schwellenwert für den optimierten AO-Assay festgelegt.

Bei der TUNEL-Färbung wurden 15 verschiedene Schwellenwerte im Bereich von 1,5- bis 2,5-fach über dem Hintergrundsignal untersucht. Die höchste Übereinstimmung lag bei einem Schwellenwert im Bereich von 1,5 %, sowie individueller Anpassung des Gates zur Spermienerkennung, welcher als optimaler Wert für die weitere Analyse verwendet wurde.

Die optimierten Assay-Settings ermöglichen eine möglichst geringe Abweichung der ScanR-Messungen von den manuell ermittelten Laborwerten. Damit konnten präzisere und reproduzierbare Bedingungen für die automatische Auswertung der AO- und TUNEL-Färbungen etabliert werden.

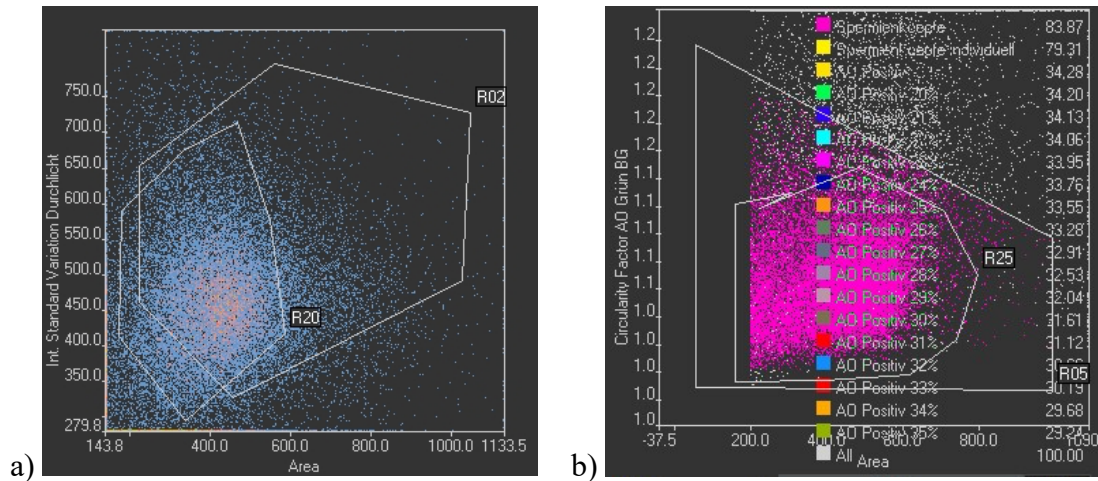


Abb. 44: Scan-R Analyse, Gates zur Spermienkopferkennung des optimierten Assays

Es zeigen sich die Gates (R2 und R20 bzw. R5 und R25) zur Spermiererkennung im ScanR bei der TUNEL-Färbung (a) und AO-Färbung (b). In der AO-Analyse (b) sind die einzelnen Schwellenwerte zu sehen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Aspekte der Spermienqualität, insbesondere im Zusammenhang mit Kryokonservierung, Spermien-DNA-Integrität und der Optimierung diagnostischer Analyseoptionen humaner Spermien untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern wertvolle Einblicke in die Auswirkungen der Kryokonservierung auf verschiedene Spermienparameter und zeigen, wie durch die Verwendung der automatisierten mikroskopbasierten Bildgebungsplattform ScanR die Analyse der DNA-Fragmentation optimiert werden konnte. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext eingeordnet, sowie Limitationen diskutiert und mögliche Verwendung für die klinische Praxis sowie zukünftige Forschungsansätze aufgezeigt.

4.1. Auswirkungen der Kryokonservierung auf Spermienparameter: Veränderungen und Implikationen

Die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit, Spermien langfristig zu lagern und sie für assistierte Reproduktionstechniken zu verwenden. Deshalb ist sie essenziell für Patienten, die sich beispielsweise einer gonadotoxischen Behandlung (beispielsweise Chemotherapie)

unterziehen müssen, eine künstliche Befruchtung durchführen möchten oder deren Fruchtbarkeit aus anderen Gründen gefährdet ist (Kliesch et al., 2023; Bier & Kliesch, 2024; Yang et al., 2024).

Ein besonderes Augenmerk gilt bei der Kryokonservierung dem Schutz der DNA-Integrität, da sie beispielsweise durch oxidative Schäden beeinträchtigt werden kann. Eine Studie von Tamburrino et al. (2024) zeigt zudem, dass längere Lagerungszeiten im flüssigem Stickstoff eine progressive Verschlechterung der Chromatinintegrität verursachen können. Dies wird durch eine verringerte Reparaturkapazität von Spermien nach dem Auftauen verstärkt (Brinkworth & Toppari, 2020).

Die vorliegenden Ergebnisse konnten ebenfalls eine deutliche Verschlechterung der Spermien-DNA-Integrität sowie der Motilitäts- und Vitalitätsparameter nach der Kryokonservierung zeigen.

In der TUNEL-Färbung war die DNA-Fragmentationsrate in den eingefrorenen Proben von gesunden Probanden (n=13) fast 2,7-fach höher als in frisch untersuchten Ejakulaten dieser gesunden Probanden. In der größeren Patientenpopulation (n=76) bestätigte sich diese Beobachtung mit einer doppelt so hohen Anzahl TUNEL-positiver, DNA-geschädigter Spermien nach Kryokonservierung. Die AO-Färbung zeigte bei den gesunden Probanden nur eine geringe Erhöhung (1,1-fach), während sie in der gesamten Patientengruppe (n=76) eine 1,4-fache Zunahme aufwies. Betrachtet man die Motilität der Spermien nach Kryokonservierung, zeigte sich die Anzahl der schnell progressiven Spermien um das 4-fache reduziert. Insgesamt halbierte sich außerdem die Gesamtmotilität nach der Kryokonservierung, während gleichzeitig der Anteil der nicht-progressiv beweglichen Spermien um das 1,6-fache und der der unbeweglichen Spermien um das 1,4-fache zunahm. Die Anzahl vitaler Spermien (gemessen im Eosin-Test) sank nach der Kryokonservierung etwa um die Hälfte im Vergleich zu frischen Ejakulaten. Diese Ergebnisse unterstreichen den angesprochenen negativen Einfluss der Kryokonservierung auf verschiedene funktionelle Parameter der Spermien. Die festgestellten Veränderungen der Spermienqualität nach der Kryokonservierung sind mit bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen konsistent. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Einfrier- und Auftauprozess erhebliche strukturelle und funktionelle Schäden durch osmotischen Stress, Eiskristallbildung und ROS an Spermien verursachen kann (Agarwal et al., 2021; Di Santo et al., 2022; Esteves et al., 2021).

Der signifikante Anstieg der DNA-Fragmentation (TUNEL-Ergebnisse) nach Kryokonservierung ist ebenfalls bekannt und wird primär auf oxidativen Stress und osmotische Veränderungen zurückgeführt. Während des Einfrierens kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die oxidative DNA-Schäden hervorrufen (Aitken et al., 2014; Agarwal et al., 2019). Interessant ist, dass die AO-Färbung, die für chromatinassoziierte

Schäden steht, in den gesunden Probanden keine signifikante Veränderung zeigte, während in der gesamten Patientenkohorte ein deutlicher Unterschied erkennbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Einfluss der Kryokonservierung auf die DNA-Struktur bei gesunden, fertilen Probanden geringer ist als bei Patienten mit möglicherweise bereits eingeschränkter Spermienqualität.

Die drastische Reduktion der schnell progressiven Spermien (4-facher Rückgang) sowie die Verdopplung der immotilen Spermien sind ebenfalls bekannte Folgen der Kryokonservierung. Der Grund hierfür liegt unter anderem in den Membranschäden, die durch den osmotischen Stress während des Einfrierens und Auftauens auftreten und die Funktion von Ionenkanälen und somit die Beweglichkeit der Spermien, beeinträchtigen (Pérez-Cerezales et al., 2018). Zudem kommt es, während der Kryokonservierung zu Veränderungen des Zytoskeletts, was ebenfalls die Bewegungsfähigkeit der Spermien reduzieren kann. Zuletzt kann der Energieverlust durch die Schädigung der Mitochondrien während des Einfrierprozesses erklärt werden. Hierdurch wird die ATP-Produktion verringert und somit die Motilität eingeschränkt (Hezavehei et al., 2018).

Neben der Motilität wird auch die Vitalität durch die Kryokonservierung signifikant negativ beeinflusst. So zeigen Studien eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Zellmembran nach der Kryokonservierung, was zu erhöhter Permeabilität und Zellsterblichkeit führt (Aliakbari et al., 2022; Sieme et al., 2016). Besonders empfindlich sind Spermienmembranen gegenüber Temperaturänderungen und der Bildung von intrazellulären Eiskristallen, die mechanische Schäden verursachen können (Sieme et al., 2016). Um die Spermiovitalität nach dem Einfrieren zu erhalten, werden deshalb zunehmend nicht-durchdringende Kryoprotektiva wie Trehalose oder Hyaluronsäure verwendet, die eine schützende Wirkung auf die Membran haben. Eine Studie von Figueroa und Kollegen (Figueroa et al., 2022) zeigt zudem, dass die Membranfluidität nach dem Auftauen stark verringert ist, was die Fusion mit der Eizelle erschwert. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die reduzierten Fertilisierungsraten nach Kryokonservierung sein. Morphologische Veränderungen, sowie strukturelle Veränderungen, insbesondere Defekte des Akrosoms und der Mittelstücke, sind ebenfalls dokumentiert und beeinträchtigen zusätzlich die Befruchtungsfähigkeit der Spermien (Björndahl et al., 2021; Campos et al., 2021).

Obwohl diese Ergebnisse wichtige Erkenntnisse liefern, bestehen einige Limitationen dieser Arbeit. Es muss beachtet werden, dass es eine unterschiedliche Ausgangsqualität der Spermien gab. Die Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten erfordern eine genauere Untersuchung der Ausgangsparameter. Dieses wird in einem späteren Abschnitt nochmals aufgegriffen (s. 4.4).

Kryokonservierung humaner Spermien hat, abhängig vom Patienten unterschiedliche Auswirkungen, weshalb personalisierte Kryoprotektionsstrategien weiter erforscht werden sollten und die individuelle Variabilität nicht zu vernachlässigen ist.

Zukünftige Studien könnten alternative Methoden zur DNA-Integritätsbewahrung untersuchen und so feststellen, ob die Supplementierung mit Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E oder N-Acetylcystein (NAC) während der Kryokonservierung oxidative Schäden reduzieren kann und so die DNA-Integrität erhalten kann (Mohammadi et al., 2024).

Diese Arbeit bestätigt, dass die Kryokonservierung signifikant negative Auswirkungen auf die DNA-Integrität, die Motilität und die Vitalität von Spermien hat. Insbesondere die Zunahme der DNA-Fragmentation und die starke Reduktion der progressiven Motilität sind klinisch relevante Befunde, die die Notwendigkeit weiterer Optimierungen in der Kryotechnologie unterstreichen.

4.2. Optimale Verflüssigungszeit von Ejakulaten: Einfluss auf DNA-Integrität und Kryokonservierung

Die Verflüssigungszeit des Ejakulats ist ein entscheidender Parameter in der andrologischen Diagnostik und beeinflusst somit maßgeblich die Beurteilung der Spermienqualität (Agarwal et al., 2020; Esteves et al., 2021). Unter normalen Bedingungen verflüssigt sich das Ejakulat innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach der Ejakulation. Eine verzögerte oder ausbleibende Verflüssigung kann die Analyse der Spermienparameter erschweren und die DNA-Integrität der Spermien beeinträchtigen (WHO, 2021). Die WHO empfiehlt eine Verflüssigungszeit zwischen 30 und 60 Minuten bei 37°C für die standardisierte Spermiendiagnostik (WHO, 2021).

Auch die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass eine verlängerte Verflüssigungszeit von 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Fragmentation führt. Eine Verflüssigungszeit von 30 Minuten, nach der standardisierten Spermiendiagnostik, führte zu einem signifikant besseren TUNEL-Wert als nach einer Lagerung über 24 Stunden ($p = 0,02$) oder nach der Kryokonservierung ($p = 0,00014$). Ähnliches wurde für die 60-minütige Verflüssigungszeit festgestellt, mit signifikant besseren Ergebnissen im Vergleich zu 24 Stunden ($p = 0,008$) und zur Kryokonservierung ($p = 0,0001$) und ohne signifikanten Unterschied zwischen 30 und 60 Minuten Verflüssigungszeit. Diese Ergebnisse konnten durch die AO-Färbung bestätigt werden. Hier waren die DNA-Integritätswerte ebenfalls bei 30 und 60 Minuten signifikant besser als nach 24 Stunden ($p = 0,03$; $p = 0,0018$). Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den 30- und 60-Minuten Proben festgestellt, sodass diese Arbeit ebenfalls zeigen konnte, dass die Ejakulate innerhalb von 30 bis 60 Minuten

analysiert werden sollten, um einen negativen Effekt auf die Spermienqualität und insbesondere die DNA-Integrität zu vermeiden.

Eine kontrollierte Verflüssigungszeit ermöglicht eine standardisierte Untersuchung der Spermienqualität, wodurch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Ouitrakul et al. (2018) konnten zeigen, dass eine längerfristige Lagerung von Spermien bei RT die Motilität bereits nach etwa 60 Minuten und die Vitalität nach ca. 120 Minuten signifikant reduziert. Ergänzend dazu fanden Muratori et al. (2015), dass eine verlängerte In-vitro-Lagerung die Expression von pro-apoptotischen Proteinen erhöht, was zu einer verstärkten DNA-Fragmentation führen kann.

Zudem erhöht sich die Anfälligkeit für oxidative DNA-Schäden mit der Zeit, was sich wiederum negativ auf den DNA-Fragmentationsindex auswirkt (Agarwal et al., 2016b).

Eine längere Verflüssigungszeit könnte negative Auswirkungen auf den Einfrierprozess haben, da oxidativer Stress und Membranveränderungen die Widerstandsfähigkeit der Spermien gegen kryogene Schäden verringern (Hezavehei et al., 2018; Thomson et al., 2009a). Die vorliegenden Ergebnisse sind insbesondere für die assistierte Reproduktion relevant. DNA-Schäden in Spermien können in direktem Zusammenhang mit einer reduzierten Embryoqualität, geringeren Schwangerschaftsraten und höheren Fehlgeburtsraten stehen (Simon et al., 2013). Daher ist eine optimale Prozessierung der Spermien essenziell, um die Schäden zu minimieren und die Fertilitätsergebnisse zu verbessern. Auch bei hohem Patientenaufkommen, Mangel an Personal oder anderen Gründen, welche die Analyse verzögern könnten, sollte eine geringe Variation in der Verflüssigungszeit und der Dauer bis zur Untersuchung des Ejakulates sichergestellt sein, um individuelle Veränderungen der Ejakulate zu vermeiden und eine einheitliche Analysemethodik zu garantieren.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen demnach die Empfehlung, Ejakulat möglichst schnell zu analysieren, sobald es die ideale Viskosität zur Analyse erreicht hat, um Schäden zu minimieren.

4.3. Der DNA-Fragmentationsindex als Marker der männlichen Fertilität: Validierung und klinische Relevanz

Die Untersuchung der DNA-Fragmentation bei gesunden, fertilen Probanden bestätigte, dass der DFI in dieser Gruppe signifikant niedriger ist als in der allgemeinen Population von Männern mit Fertilitätsproblemen (AO 16 %, TUNEL 7,3 %).

Die in der Literatur etablierten Grenzwerte (AO 25 %, TUNEL 20 %) konnten daher bestätigt werden (Evenson, 2022; Santi et al., 2018; Sergerie et al., 2005).

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die zeigen, dass Männer mit normalen Spermogrammen in der Regel einen geringen DFI aufweisen, während ein erhöhter DFI mit reduzierter Fertilität und verringerten Schwangerschaftsraten nach assistierter Reproduktion korreliert (Osman et al., 2015; Simon et al., 2013; Ribas-Maynou et al., 2013; Zheng et al., 2018).

Traditionelle und etablierte Spermogramm-Analysen (Konzentration, Motilität, Vitalität und Morphologie) liefern zwar wertvolle Informationen, sind aber nicht immer ausreichende Indikatoren für die männliche Fertilität. Es gibt zahlreiche Fälle, in denen Männer mit normalen Spermogrammen trotzdem eine eingeschränkte Fertilität aufweisen. Ein erhöhter DFI kann hier als zusätzlicher Marker zur Erkennung subklinischer DNA-Schäden dienen (Evenson & Wixon, 2006; Ribas-Maynou et al., 2013; Simon et al., 2017b; WHO, 2021) und hat daher eine signifikante Relevanz in der Fertilitätsdiagnostik. Bislang existiert kein einheitliches Verfahren zur Diagnostik der DNA-Fragmentation. Zu den verschiedenen Verfahren der DNA-Analyse gehören unter anderem das SCSA, welches weit verbreitet ist und auf der Durchflusszytometrie basiert, der TUNEL-Assay, der DNA-Brüche mittels Fluoreszenzmarkierung misst und so eine präzise Detektion fragmentierter DNA ermöglicht (Nordhoff, 2023; R. Sharma et al., 2021), sowie der COMET-Assay, bei dem es sich um eine elektrophoretische Methode handelt, die die DNA-Schädigung auf Einzelzellniveau sichtbar macht. Die hier durchgeführten Untersuchungen mittels TUNEL- und AO-Färbung zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den etablierten Referenzwerten und bestätigen deren klinische Relevanz.

Ein niedriger DFI ist ein positiver Indikator für eine intakte DNA-Struktur und korreliert mit höheren Schwangerschaftsraten (Sergeie et al., 2005; Osman et al., 2015). Studien zeigen, dass Männer mit einem DFI unter 15 % eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche natürliche Empfängnis oder IVF-ICSI haben, während Werte über 30 % mit reduzierter Fruchtbarkeit assoziiert sind (Bungum et al., 2007).

Zahlreiche Studien diskutieren eine direkte Korrelation zwischen erhöhtem DFI und verringerten Schwangerschaftsraten, insbesondere nach ART (Agarwal et al., 2023; Muriel et al., 2006; Nordhoff & Kliesch, 2019; Osman et al., 2015; Simon et al., 2013; Ribas-Maynou et al., 2013; Zheng et al., 2018), andere Studien widerlegen diese Beobachtung jedoch (Horta et al., 2020). Aufgrund der mangelnden Standardisierung des Verfahrens, sowie fehlender universeller Grenzwerte sind die Werte eingeschränkt in der Routinediagnostik zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestätigung der in der Literatur akzeptierten DFI-Werte eine Stichprobe von 13 gesunden Probanden herangezogen. Die Stichprobengröße könnte

die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränken. Zudem fehlt es an Langzeitstudien, die die Bedeutung des DFI für den natürlichen Fertilitätserfolg über mehrere Jahre hinweg untersuchen.

Diese Analyse bestätigt, dass die Spermien gesunder, fertiler Männer signifikant niedrigere DNA-Fragmentationswerte aufweisen, als diejenigen von Männern mit bekannten Fertilitätsproblemen.

Allerdings bleibt die klinische Bedeutung des DFI nach wie vor umstritten, da einige Studien keine eindeutige Korrelation mit dem Erfolg assistierter Reproduktionstechniken nachweisen konnten. Zukünftige Forschungen sind erforderlich, um die Standardisierung der DFI-Grenzwerte weiter zu verbessern und die besten Anwendungsgebiete dieses Markers zu definieren.

4.4. Einfluss der Kryokonservierung auf die DNA-Integrität: Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kryokonservierung signifikante Auswirkungen auf die DNA-Integrität von Spermien hat, wobei sich deutliche Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Fertilitätsstörungen zeigen. Fertile Probanden wiesen nach Kryokonservierung in der TUNEL-Färbung eine durchschnittliche Wertever schlechterung um den Faktor 2,7 auf, während dieser Wert bei Patienten der Andrologie nur 1,9 betrug. In der AO-Färbung hingegen zeigte sich das entgegengesetzte Muster: Die gesunden Probanden hatten mit einem Faktor von 1,1 eine geringere Wertever schlechterung als die Patienten, die eine 1,6-fache Zunahme der DNA-Schädigung verzeichneten. Auch bei der erweiterten Patientengruppe von 60 Männern bestätigten sich diese Ergebnisse mit einer durchschnittlichen Wertever schlechterung von 2,0 in der TUNEL-Färbung und 1,4 in der AO-Färbung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Patienten mit Fertilitätsstörungen möglicherweise anfälliger für chromatinassoziierte DNA-Schäden sind, während gesunde Probanden eine stärkere Zunahme direkter DNA-Strangbrüche durch Kryokonservierung zeigen.

Die Unterschiede in den gemessenen Parametern können sich durch verschiedene Mechanismen erklären lassen. Patienten mit Fertilitätsstörungen weisen häufig bereits vor der Kryokonservierung eine erhöhte DNA-Fragmentation auf, die durch Faktoren wie oxidativen Stress, entzündliche Prozesse oder Umweltbelastungen begünstigt wird (Agarwal et al., 2014; Esteves et al., 2021, Thomson et al., 2009b). Oxidativer Stress infolge eines Ungleichgewichts zwischen ROS und antioxidativen Schutzmechanismen ist ein zentraler Faktor für DNA-Schäden bei Männern mit eingeschränkter Fertilität (Agarwal et al., 2014). Die Kryokonservierung selbst verstärkt diese Prozesse, indem sie zusätzlichen oxidativen Stress

und osmotische Belastungen induziert, wie bereits diskutiert. Während gesunde Probanden in der Ausgangssituation eine geringere DNA-Fragmentation aufweisen, könnte ihre DNA durch den Einfrierprozess empfindlicher für neue Strangbrüche werden, was die stärkere TUNEL-Positivität nach Kryokonservierung erklären könnte (Henkel et al., 2003). Patienten hingegen haben möglicherweise bereits stabilisierte DNA-Schäden, die sich durch den Einfrierprozess weniger stark verschlechtern (Tamburrino et al., 2024). Während die Kryokonservierung eine essenzielle Technik zur langfristigen Lagerung von Ejakulaten sowie Erhaltung der Fertilität bleibt, zeigen diese Daten, dass besonders Patienten mit bereits erhöhter DNA-Fragmentation vor der Kryokonservierung eine noch stärkere Verschlechterung durch diese erfahren können.

Um die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die DNA-Integrität zu minimieren, könnten verschiedene präventive Maßnahmen ergriffen werden. Dazu könnte möglicherweise eine antioxidative Therapie vor der Kryokonservierung gehören, um oxidativen Stress zu reduzieren (Esteves et al., 2021; O'Neill et al., 2019).

Die Aussagekraft der Ergebnisse ist aufgrund der kleinen und unterschiedlich großen Vergleichsgruppen ($n = 13$ vs. $n = 16$) begrenzt und sollte durch Studien mit größeren Kohorten validiert werden.

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass Spermien von Probanden eine stärkere Zunahme direkter DNA-Schäden nach Kryokonservierung aufweisen, während Patienten anfälliger für chromatinassoziierte Schädigungen sind. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer personalisierten Herangehensweise an die Kryokonservierung, insbesondere bei Männern mit bereits erhöhter DNA-Fragmentation, um die Erfolgsraten der assistierten Reproduktion zu optimieren.

4.5. Auswirkungen unterschiedlicher Kryokonservierungsmethoden auf die Spermienqualität

Die Wahl der Kryokonservierungsmethode scheint eine entscheidende Rolle für die Erhaltung der Spermienqualität nach dem Auftauen zu spielen. In dieser Arbeit wurden drei etablierte Verfahren - Slow freezing, Rapid freezing und Vitrifikation - hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf DNA-Integrität, Motilität und Vitalität der Spermien untersucht. Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Methoden, die zum Teil auf die jeweiligen physikalischen und biologischen Prozesse während des Einfrierens zurückgeführt werden können.

Die Analyse der DNA-Integrität konnte zeigen, dass das frische, nicht kryokonservierte Ejakulat (F) in beiden DNA-Färbemethoden (TUNEL und AO) signifikant bessere Werte

aufwies als alle kryokonservierten Proben. Slow freezing wies dabei die beste DNA-Integrität, mit der geringsten DNA-Fragmentationsrate auf, während bei der Vitrifikation mit Kryoprotektivum (V+) interessanterweise eine signifikant schlechtere DNA-Integrität festgestellt wurde als bei der Vitrifikation ohne Kryoprotektivum (V-). Dies deutet darauf hin, dass die verwendeten Kryoprotektiva möglicherweise nicht in allen Fällen schützend wirken, sondern je nach Methode, Zellumgebung und Dosierung auch negative Effekte haben können (Aliakbari et al., 2022; Hezavehei et al., 2018; Hoffmann et al., 2011; Huang et al., 2022; Isachenko et al., 2004; Riva et al., 2018; Thomson et al., 2009b).

Hinsichtlich der Motilität schnitten die frischen Ejakulatproben ebenfalls am besten ab. Sie zeigten die höchste Anzahl an schnell progressiven Spermien (Motilität a). Unter den Kryokonservierungsmethoden zeigte erneut die Slow Freezing Methode die signifikant besten Ergebnisse im Vergleich zu den weiteren Methoden Rapid Freezing (R) und Vitrifikation mit (V+) sowie ohne Kryoprotektivum (V-). Die geringste Anzahl schnell progressiver Spermien wurde in der Vitrifikationsmethode ohne Kryoprotektivum (V-) festgestellt, was die Bedeutung eines geeigneten Schutzmediums jedoch wiederum unterstreicht. Ein ähnliches Muster wurde bei der progressiven Motilität (Motilität b) beobachtet, bei der Slow Freezing im Vergleich zu den anderen Kryokonservierungsmethoden gleichfalls überlegen war.

Die Untersuchung der Spermiovitalität zeigte ebenfalls die besten Ergebnisse für Slow Freezing, während die Vitrifikation ohne Kryoprotektivum (V-) auch hier die schlechtesten Werte lieferte. Diese Ergebnisse stimmen zum einen mit anderen Studien überein, die zeigen, dass ultraschnelle Einfrierverfahren wie die Vitrifikation in einigen Fällen die DNA-Fragmentation der Spermien erhöhen (Aliakbari et al., 2022; Hammadeh et al., 2001; Isachenko et al., 2004) und unterstreichen die Relevanz von kryoprotektiven Medien. Auch hinsichtlich der Spermiovitalität lieferte die Slow Freezing Methode mit Kryoprotektivum das signifikant beste Ergebnis, während die Proben ohne Kryoprotektivum erneut die schlechtesten Ergebnisse aufwiesen.

Es lässt sich festhalten, dass jede dieser Methoden spezifische Vor- und Nachteile bietet, die sich aus den physikalischen Prozessen der Zellkühlung und den verwendeten Kryoprotektiva ergeben. Auf die Auswahl der Kryoprotektiva wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Beleuchtet man die unterschiedlichen etablierten Kryokonservierungsmethoden wird deutlich, dass Slow Freezing, die am häufigsten angewandte Methode der Spermienkryokonservierung, ein bewährtes Standardverfahren mit guter Zellschutzwirkung darstellt und in jeder der untersuchten Qualitäten am besten abschneidet.

Die Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens scheint einen entscheidenden Faktor für die Überlebensrate der Spermien nach der Kryokonservierung zu spielen. In weiteren Studien wurden sowohl Slow Freezing Methoden als auch Rapid Freezing Methoden als vorteilhaft

bewertet (Isachenko et al., 2004; Nallella et al., 2004; O'Neill et al., 2019; Paras et al., 2008; Satirapod et al. 2012; Stanic et al., 2000).

Durch den langsamen Dehydrierungsprozess beim Slow Freezing mit schrittweisem, kontrolliertem Abkühlen wird das Zellvolumen reduziert, was den osmotischen Stress verringert und somit das Risiko der intrazellulären Eiskristall-Bildung minimieren kann (Hezavehei et al., 2018). Je nach Gerät und Protokoll zum Einfrieren variiert die Verfahrensdauer, jedoch nimmt das langsame Abkühlen generell signifikant mehr Zeit in Anspruch als andere Verfahren (mind. 1 Stunde). Auch wenn die Gefahr der Eiskristallbildung reduziert ist, bleibt sie bestehen und es können dennoch intra- und extrazelluläre Eiskristalle entstehen, die Zellschäden verursachen.

Das Rapid Freezing bietet eine deutlich schnellere Kühlung als die Slow Freezing Methode. Hierbei wurden die Kryovials mit dem Ejakulat und dem Kryokonservierungsmedium direkt in flüssigen Stickstoff getaucht, sodass das Verfahren weniger zeitaufwendig ist und schnell implementiert werden kann. Jedoch kommt es durch die rapide Abkühlung zu einer unvollständigen Zell-Dehydrierung, was das Risiko der intrazellulären Eiskristallbildung und von Membranschäden erhöht (Huang et al., 2022; Sieme et al., 2016).

Zuletzt wurde in dieser Arbeit die Methode der Vitrifikation untersucht. Hierbei handelt es sich um eine ultraschnelle Kühlung, bei der die Spermien in einen glasartigen Zustand überführt werden, wodurch die Bildung von Eiskristallen verhindert werden soll. Durch die extrem schnelle Abkühlung bleibt die Zellstruktur weitgehend erhalten, was das Überleben der Spermien verbessern kann (Isachenko et al., 2011). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Methode ist schneller als das Slow Freezing und einige Studien zeigen, dass auch die Motilität und Überlebensrate der Spermien nach der Vitrifikation mit der des Slow-Freezing vergleichbar (Satirapod et al., 2012) oder sogar besser sein kann (O'Neill et al., 2019).

Um die Zellen vor dem ultraschnellen Einfrieren zu schützen, müssen jedoch hohe Konzentrationen von Kryoprotektiva eingesetzt werden, die potenziell toxische Effekte haben können (Aliakbari et al., 2022; Hezavehei et al., 2018; Hoffmann et al., 2011; Huang et al., 2022; Isachenko et al., 2004). Zudem besteht bei der verwendeten Methode ein erhöhtes Risiko einer mikrobiellen Kontamination, da sie einen direkten Kontakt mit flüssigem Stickstoff erfordert. Wang et al. (2021) untersuchten daher ein Verfahren zur aseptischen kryoprotektivfreien Vitrifikation, was laut der Autoren nicht nur die Zellintegrität, sondern auch die Sterilität der Probe sichert, und dadurch einen entscheidenden Vorteil für klinische Anwendungen darstellen soll. Die Ergebnisse zeigen, dass nach dem Auftauen der Ejakulate die Motilität und DNA-Integrität der Spermien weitgehend erhalten bleibt, was das Potenzial der Vitrifikation ohne Kryoprotektiva zeigt (Wang et al., 2021).

Obwohl einige Studien vielversprechende Ergebnisse zeigten, existiert bislang kein etablierter Standard und die hier durchgeführte Versuchsreihe konnte diese Ansätze nicht bestätigen. Die Variabilität in den Studienergebnissen betont die Komplexität dieser Thematik und unterstreicht die Relevanz von einheitlichen Prozessen und Laborprotokollen.

4.6. Bewertung und Schutzwirkung verschiedener Kryokonservierungsmedien auf die Spermienqualität

Kryoprotektive Medien spielen eine essenzielle Rolle beim Schutz von Spermien während der Kryokonservierung. Seit der Entdeckung seiner kryoprotektiven Eigenschaften durch Polge, Smith und Parkes im Jahr 1949 ist Glycerin das bevorzugte Kryoprotektivum für Spermatozoen (Polge et al., 1949). Allerdings stellt der generelle Einsatz von Gefrierschutzmitteln, wie bereits angesprochen, eine herausfordernde Gratwanderung dar: Bei zu niedrigen Konzentrationen können die Spermienzellen nicht ausreichend vor den extremen Bedingungen, die während des Einfrierprozesses herrschen, geschützt werden, während zu hohe Konzentrationen aufgrund der toxischen Eigenschaften des verwendeten Kryoprotektivums oder einiger Bestandteile davon die Qualität der Spermien beeinträchtigen können (Aliakbari et al., 2022; Hezavehei et al., 2018; Hoffmann et al., 2011; Huang et al., 2022; Isachenko et al., 2004; Thomson et al., 2009b). Petrushko et al. (2021) untersuchten daher alternative Methoden ohne die Verwendung des herkömmlich eingesetzten Glycerols, wobei die Alternative mit 5 %-igem hochmolekularem Polyvinylpyrrolidon signifikant bessere Ergebnisse lieferte (Petrushko et al., 2021).

Die Wahl des geeigneten Mediums sowie die Dosis ist daher von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der Spermienqualität während der Kryokonservierung. Die Eigenschaften der Kryoprotektiva lassen sich in zwei Hauptkategorien unterteilen: durchdringende (z. B. Glycerol und Dimethylsulfoxid (DMSO)) und nicht-durchdringende (z. B. Saccharose, Trehalose, Albumin) Substanzen (Gao et al., 1995; Isachenko et al., 2011). In dieser Studie wurden drei verschiedene Kryokonservierungsmedien Sperm Freeze (SF), Sperm Freezing Medium (SFM) und Test Yolk Buffer (TYB) hinsichtlich ihrer protektiven Kapazität für die Spermienqualität untersucht und verglichen. Diese drei Medien unterscheiden sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihren mechanischen Ansätzen, die sich direkt auf die Spermienqualität nach der Kryokonservierung auswirken.

Sperm Freeze von Fertipro enthält durchlässige und nicht-durchlässige Kryoprotektiva wie Glycerol (15%) und Saccharose, HEPES-Puffer mit physiologischen Salzen, Glycin, Glukose, Laktat und humanes Serumalbumin ([3] Fertipro.com).

Das Sperm-Freezing-Medium von Cooper Surgical ähnelt dem o.g. Sperm Freeze. Es besteht ebenfalls aus Glycerol (20%) und Saccharose als Kryoprotektiva, und enthält Glycin, Glukose, Laktat, HEPES-Puffer und humanes Serumalbumin. Zusätzlich enthält es rekombinantes Insulin, das als "pro-survival" Element gilt, und den Spermien hilft, ihre Energieproduktion und Stoffwechselprozesse während der Kryokonservierung aufrechtzuerhalten, ebenso wie Gentamicin als Antibiotikum, um bakterielle Infektionen während der Kryokonservierung und dem Lagervorgang zu vermeiden ([4] surgical.com).

Das Test-Yolk-Buffer-Medium unterscheidet sich in verschiedener Hinsicht von den anderen verwendeten Medien. Es enthält einen anderen Puffer, eine Kombination aus TES (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure) und Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Glycerol (12%) fungiert auch hier als durchdringendes Kryoprotektivum. Das TYB-Medium enthält als weiteren wichtigen Bestandteil Hühner-Eigelb, welches als Schutzkomponente für die Spermienmembran während des Gefrierprozesses dient. Zudem beinhaltet das TYB-Medium Natriumcitrat als Antioxidans und Fruktose, sowie ebenfalls Gentamicin zur Vermeidung bakterieller Infektionen ([5] irvinesci.com).

Glycerol schützt Spermien durch seine hygroskopischen Eigenschaften vor osmotischem Stress während des Einfrierens (Aliakbari et al., 2022; Hezavehei et al., 2018).

Die in der Arbeit verwendeten Medien beinhalten alle Glycerol als Haupt-Kryoprotektivum, jedoch in unterschiedlicher Dosierung. In einer Vergleichsstudie von Thomson et al. (2009b) wurden sieben herkömmliche Kryoprotektiva verglichen. Das Medium mit dem höchsten Glycerolgehalt schnitt hinsichtlich der Spermien-DNA-Fragmentation mit Abstand am schlechtesten ab. Auch in der vorliegenden Studie zeigte das Medium mit dem geringsten Glycerolgehalt (TYB, 12%) die geringsten DNA-Schäden, was diese These unterstützt (Thomson et al., 2009b).

Das Eigelb im verwendeten Test-Yolk-Buffer ist reich an Phospholipiden, Cholesterin und Lipoproteinen, welche einen Lipidaustausch zwischen den Spermienmembranen und den Phospholipiden der Proteine mit niedriger Dichte im Eigelb ermöglichen. So wird die molekulare Zusammensetzung der Zellmembran verändert und ihre Fluidität kann erhalten werden (Jeyendran et al., 1995; Sieme et al., 2016, Tamburrino et al., 2023).

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich, dass TYB im Vergleich zu SFM eine signifikant bessere Schutzwirkung auf die DNA-Integrität der Spermien aufweist. Dies wurde sowohl durch die TUNEL-Färbung ($p = 0,003$), als auch die AO-Färbung ($p = 0,012$) bestätigt. Der enthaltene Eidotter in TYB scheint eine stabilisierende Wirkung auf die Zellmembran zu

haben, oxidative Schäden an der DNA zu reduzieren und somit die Integrität der Spermien-DNA am besten zu bewahren. Sperm Freeze (SF) und Sperm Freezing Medium (SFM) schnitten in Bezug auf Spermien-DNA-Fragmentation schlechter ab als TYB, was möglicherweise auf die alleinige Verwendung von Glycerol als durchdringendes Kryoprotektivum zurückgeführt werden kann.

Hinsichtlich der Motilität der Spermien zeigte sich ebenfalls eine Überlegenheit vom TYB-Medium: Proben, die mit diesem Medium eingefroren wurden, wiesen eine signifikant höhere Anzahl schnell progressiver Spermien auf als diejenigen, die mit SF oder SFM behandelt wurden ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,009$). Dies deutet darauf hin, dass die Kombination aus unter anderem Eidotter und Albumin im TYB-Medium dazu beiträgt, die Membranfluidität aufrechtzuerhalten und so die Beweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen zu erhalten (Hammadeh et al., 2001; Hallak et al., 2000). Zwischen SF und SFM konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Motilität festgestellt werden.

Bezüglich der Spermiovitalität wies keines der drei untersuchten Medien signifikant bessere Werte als die anderen auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass unabhängig von der spezifischen Zusammensetzung alle getesteten Kryoprotektiva eine ähnlich ausreichende Schutzfunktion für die Lebensfähigkeit der Spermien bieten.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die die Vorteile von Eidotter-haltigen Medien, wie TYB, für die Erhaltung der Spermienqualität nach Kryokonservierung hervorheben (Hallak et al., 2000; Hammadeh et al., 2001; Paras et al., 2008).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Wahl des Kryoprotektivums einen erheblichen Einfluss auf die Spermienqualität nach Kryokonservierung hat. TYB erwies sich als das effektivste Medium, insbesondere in Bezug auf Spermien-DNA-Integrität und -Motilität. Diese Überlegenheit ist wahrscheinlich auf die Kombination von Eidotterlipiden, Albumin und Glycerol zurückzuführen, die eine umfassende Schutzwirkung bieten.

4.7. Spearman-Korrelationsanalyse

Die durchgeführte Spearman-Korrelationsanalyse lieferte wertvolle Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermienparametern, dem Alter der Patienten sowie den Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Spermienqualität. Eine solche Analyse erlaubt es, mögliche Abhängigkeiten zwischen Variablen aufzudecken und ihre Relevanz für die männliche Fertilität zu bewerten.

Ein wichtiger Befund, der sich in dieser Analyse zeigte, war die moderate negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Spermiovitalität (Eosin/Alter: $r_s = -0,42$, $p = 0,00083$). Dies bedeutet, dass die Spermiovitalität mit zunehmendem Alter signifikant abnimmt. Frühere Studien haben bereits einen altersbedingten Rückgang der Spermienqualität dokumentiert, wobei insbesondere eine Abnahme der Spermienmotilität und eine erhöhte DNA-Fragmentation bei älteren Männern beobachtet wurden (Gonzalez et al., 2022; Kadoch et al., 2024). Diese Beobachtung könnte ein weiterer Anlass dafür sein, die DNA-Fragmentationsanalyse mit in die routinemäßige Diagnostik bei Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch aufzunehmen, insbesondere ab einem höheren paternalen Alter.

Die Analyse zeigte zudem mehrere signifikante Korrelationen zwischen Spermienkonzentration, Morphologie und Motilität: Eine positive Korrelation bestand zwischen der Spermienkonzentration und der progressiven Motilität (Motilität a: $r_s = 0,453$, $p=0,00032$; Motilität b: $r_s = 0,354$, $p=0,00596$). Des Weiteren wurde eine negative Korrelation zwischen der Spermienkonzentration und der Motilität d ($r_s = -0,455$, $p= 0,00029$) gefunden. Dies legt nahe, dass sich bei einer hohen Spermienkonzentration der Anteil beweglicher Spermien erhöht, sowie derjenige an unbeweglichen Spermien verringert ist.

Eine positive Korrelation zeigte sich auch zwischen der Spermienmorphologie und der progressiven Motilität a ($r_s= 0,402$, $p= 0,00161$) sowie der nicht-progressiven Motilität b ($r_s = 0,551$, $p= 0,00001$) und eine negative Korrelation mit der Motilität d ($r_s = -0,631$, $p= 0$). Dies bedeutet, dass Spermien mit einer besseren Morphologie tendenziell beweglicher sind, während Spermien mit abnormaler Morphologie häufiger immobil bleiben. Zudem wurde in Studien gezeigt, dass eine schlechtere Morphologie der Spermien mit einer höheren DNA-Fragmentation assoziiert ist (Henkel et al., 2003).

Unabhängig vom verwendeten Kryoprotektivum zeigte diese Arbeit eine signifikant positive Korrelation zwischen der Spermienkonzentration und der progressiven Motilität a und b. Dies unterstreicht die Bedeutung einer hohen Spermienkonzentration für die Erhaltung der Beweglichkeit nach dem Auftauen.

Die Spermienkonzentration korrelierte ebenfalls positiv mit der Spermien-Vitalität (Eosin-Test), was darauf hindeutet, dass eine höhere Anzahl von Spermien besser vor kryogenen Schäden geschützt ist. Eine negative Korrelation zeigte sich zwischen der Spermienkonzentration und der Spermien-DNA-Fragmentation (TUNEL-Analyse). Dieses könnte bedeuten, dass höhere Spermienkonzentrationen mit einer geringeren DNA-Schädigung assoziiert sind.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern wichtige Informationen für die andrologische Diagnostik und die Optimierung der Kryokonservierung.

Insbesondere die negativen Auswirkungen des Alters auf die Spermiovitalität sowie die stabilen Korrelationen zwischen Spermien-Konzentration, -Motilität und -Morphologie

unterstreichen die Relevanz, Patienten über altersbedingte Veränderungen aufzuklären und frühzeitig Optionen zur Fertilitätskonservierung in Betracht zu ziehen.

Künftige Studien sollten die langfristigen Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Spermienqualität weiter untersuchen und Strategien entwickeln, um die post-thaw-Ergebnisse weiter zu optimieren.

4.8. Optimierung der Automatisierten Spermienanalyse: Fortschritte durch Künstliche Intelligenz

Die TUNEL-Färbung und die AO-Färbung sind anerkannte Methoden zur Erkennung von DNA-Schäden und werden häufig zur Beurteilung der Spermien-DNA-Integrität eingesetzt. Im Andrologielabor des UKE wurden nach der Färbung ungefähr 2000 Samenzellen unter Fluoreszenzlicht visuell untersucht, um den Anteil an positiv getesteten AO oder TUNEL Samenzellen zu bestimmen. Dieses Verfahren ist nicht nur zeitaufwendig, sondern auch anfällig für subjektive Verzerrungen. Es könnte davon abhängig sein, welcher Untersucher das Spermium je nach der gewählten Farbgebung als rot, grün oder orange beurteilt hat. Indem Schwellwert und Gatingstrategien auf der automatisierten Bilderkennungsplattform ScanR systematisch angepasst wurden, konnte das manuelle Verfahren zur Bewertung der DNA-Integrität nach Kryokonservierung ersetzt werden.

Die Verwendung automatisierter Systeme zur Untersuchung von Samenzellen hat in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen, da sie eine objektivere und effizientere Methode zur Bewertung von Samenzellparametern darstellt. Die ScanR High Content Screening Station von Olympus wurde für die Identifikation fragmentierter DNA innerhalb menschlicher Samenzellköpfe genutzt. In der Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf hat sich diese Technologie als äußerst verlässlich erwiesen und wird routinemäßig für die Analyse von Patientenproben eingesetzt.

Bei der Anwendung der ScanR Technologie werden 100 Bilder mit einer 40-fachen Vergrößerung unter Verwendung der Acquisition-Software analysiert. Durch ein neuronales Netzwerk basierend auf Deep-Learning-Algorithmen erfolgt die Identifikation und Unterscheidung von Spermienköpfen im Vergleich zu Zellfragmenten und anderen Partikeln. Diese fortschrittliche, selbstlernende Software ermöglicht die Erkennung einer größeren Anzahl von Spermien in den aufgenommenen Bildern als im Rahmen der manuellen Zählung möglich wäre. Das zugrundeliegende neuronale Modell wurde mithilfe von fluoreszenzmarkierten Spermien als Referenzdaten trainiert, sodass die Software eine zuverlässige Detektion und Quantifizierung der Spermienköpfe gewährleisten kann. Ein zentraler Vorteil dieser Methode ist die Nutzung spezifischer Gating-Strategien, die anhand

optischer Eigenschaften und Objektgrößen eine präzise Abgrenzung der Spermien von Fremdpartikeln ermöglichen.

Die Analyse der DNA-Fragmentierung bei Spermien wurde mithilfe von zwei verschiedenen Färbetechniken (TUNEL und AO) durchgeführt. Dabei wurden bestimmte Fluoreszenzwerte als Schwellenwert festgelegt, um eine klare Unterscheidung zwischen den Spermienköpfchen und dem Hintergrund zu ermöglichen. Dieser Schritt ist entscheidend um eine präzise Auswertung der DNA-Fragmentierung sicherzustellen. In dieser Studie wurden die Schwellenwerte für die Fluoreszenzwerte bei TUNEL auf das 1,5-fache und bei AO auf 30 % angepasst; dies diente dazu, eine exaktere und reproduzierbare Erkennung fragmentierter Spermien-DNA zu ermöglichen. Die TUNEL-Analytik ergab die erfolgreichsten Resultate durch gezielte Anpassung des Schwellenwerts zum ausschließen von Zellclustern.

Die Automatisierung der Spermienanalyse bietet nicht nur eine höhere Effizienz, sondern reduziert auch insgesamt die subjektive Variabilität, die oft bei manuellen Auswertungen beobachtet wird. Auf diese Weise kann eine konsistente und zuverlässige Bestimmung der Spermien-DNA-Fragmentierung erreicht werden. Diese Verbesserung ist besonders bedeutend, da die Integrität der Spermien-DNA einen wichtigen Einfluss auf die Fruchtbarkeit hat und somit eine präzise Analyse der DNA-Fragmentierung eine solide Grundlage für die weitere klinische Diagnostik bildet.

Trotz der erzielten Fortschritte bestehen weiterhin Herausforderungen, die vor allem auf die Heterogenität der Spermienpopulation sowie auf Unterschiede in der Durchführung und Auswertung der Analysen zwischen verschiedenen Laboren zurückzuführen sind. Um diese zu überwinden sind standardisierte Protokolle, regelmäßige Validierungen und ein breites Spektrum an Trainingsdaten sowie automatisierte Erkennungsprogramme wie der ScanR unerlässlich. Nur so kann sichergestellt werden, dass die Ergebnisse unter verschiedenen Bedingungen und in diversen Laboren konsistent, reproduzierbar und vergleichbar sind.

Die Einbindung von künstlicher Intelligenz in die andrologische Diagnostik bietet vielversprechende Chancen denen diverse Herausforderungen gegenüberstehen. Dabei ist ein zentrales Anliegen die unzureichende Qualität, Reproduzierbarkeit und Vollständigkeit der verfügbaren Datenlage. Dies erschwert die Entwicklung genauerer Modelle und Protokolle. Es fehlen auch einheitliche Richtlinien für den Einsatz von künstlicher Intelligenz, was die Anwendung bisheriger Modelle einschränkt. Zusätzlich erweisen sich finanzielle und ethische Fragen als bedeutende Hindernisse. Die Entwicklung und Validierung von KI-Anwendungen in der Andrologie ist mit hohen Kosten verbunden, während die Finanzierungsmöglichkeiten begrenzt sind.

Trotz dieser Herausforderungen wächst das Interesse an KI in der Andrologie. Um das Potenzial dieser Technologie voll auszuschöpfen, sind jedoch Verbesserungen in der

Datenqualität, Standardisierung, Finanzierung sowie klare ethische Leitlinien erforderlich (Gül et al., 2024).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz der ScanR High Content Screening Station und das Feintuning der automatisierten Spermienanalyse mithilfe moderner KI-Technologien einen bedeutenden Fortschritt bei der Spermienanalyse im Bereich der Andrologie darstellen. Diese Entwicklungen ermöglichen eine präzisere, schnellere und objektivere Auswertung von Spermienparametern und bieten ein großes Potenzial für zukünftige klinische Anwendungen. Allerdings ist zur vollständigen Integration dieser Technologien in den klinischen Alltag eine kontinuierliche Verbesserung der Standardisierungsprozesse sowie eine Validierung der eingesetzten Systeme erforderlich. Im Laufe der Zeit könnten diese Fortschritte nicht nur die Genauigkeit der Untersuchung von Samenzellen erhöhen, sondern auch wesentlich zur Verbesserung der Diagnose von Fruchtbarkeitsproblemen beitragen.

4.9. Zusammenfassung

Die Kryokonservierung von Spermien spielt eine wichtige Rolle in der modernen Fortpflanzungsmedizin, insbesondere bei der Erhaltung der männlichen Fertilität im Vorfeld potenziell gonadotoxischer Behandlungen oder im Kontext assistierter Reproduktionsverfahren. Während des Prozesses der Kryokonservierung der Spermienzellen besteht jedoch das Risiko funktionaler und struktureller Schäden, vor allem an der Spermien-DNA. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, ein verbessertes Verfahren zur Kryokonservierung von Ejakulaten zu entwickeln und herkömmliche Kryokonservierungsmedien hinsichtlich ihres protektiven Effektes zu vergleichen. Dazu wurden Ejakulate sowohl von gesunden Spendern als auch von Patienten mit Fertilitätsproblemen analysiert. Die Untersuchung befasste sich mit verschiedenen Zeiten zur Ejakulatverflüssigung und unterschiedlichen Methoden der Kryokonservierung von Ejakulaten (Slow Freezing / Rapid Freezing/ Vitrifikation mit oder ohne Kryoprotektivum), einschließlich des Vergleiches dreier herkömmlicher kommerzieller kryoprotektiver Medien. Die Integrität der Spermien-DNA wurde anhand des TUNEL-Assays und der AO-Färbung bewertet und durch herkömmliche Spermiogrammparameter, wie Beweglichkeit und Vitalität, ergänzt. Zur Auswertung der Färbungen wurde ein automatisiertes High Content Screening System (ScanR) verbessert, etabliert und schließlich angewendet.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Qualität der Spermien nach dem Einfrierprozess abnimmt: Motilität und Vitalität verringerten sich, während der DNA-Fragmentationsindex (DFI) anstieg - ein deutlicher Effekt sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den Patienten. Besonders signifikant war der Unterschied im DNA-Schadensprofil zwischen den beiden Gruppen: Während bei den Probanden hauptsächlich direkte DNA-Doppelstrangbrüche (TUNEL-Methode) festgestellt wurden, zeigte sich bei den Patienten durch ein hohes AO-Testergebnis insbesondere eine erhöhte Anfälligkeit des Chromatins (AO-Assay). Beim Vergleich der Kryomethoden erzielte die Verwendung des kontrollierten Slow-Freezing zusammen mit dem Eidotter-basierten Medium Test Yolk Buffer (TYB) signifikant bessere Ergebnisse mit den minimalsten Spermien-DNA-Schäden, der besten Spermienmotilität und der höchsten erhaltenen Vitalität. Außerdem zeigte sich eine Lagerung des Ejakulates von über 24 Stunden vor dem Einfrierprozedere nachteilig auf die Qualität der Spermien-DNA. Aus den Erkenntnissen wurde ein Verfahren entwickelt, das eine Auftauzeit von 30 bis 60 Minuten vorsieht und die Verwendung von TYB als kryoprotektives Medium sowie das Slow Freezing als bevorzugte Kryokonservierungsmethode empfiehlt.

Des Weiteren betont diese Arbeit die Relevanz des DFI im Bereich der männlichen Fertilitätsdiagnostik und die potenzielle Anwendung von künstlicher Intelligenz zur automatisierten Beurteilung der Qualität von Spermienzellen. Die fortgeschrittene

Technologie des ScanR Systems ermöglicht eine präzisere und standardisierte Messung von Spermien-DNA-Schäden, was langfristig zu einer Verbesserung der herkömmlichen Analysemethoden führen könnte.

4.10. Abstract

Sperm cryopreservation plays an important role in modern reproductive medicine, particularly in the preservation of male fertility prior to potentially gonadotoxic treatments or as part of assisted reproduction procedures. However, during the process of ejaculate cryopreservation, there is a risk of functional and structural damage, particularly to the sperm DNA. This study focused on comparing three different cryoprotectant agents and developing a cryopreservation method to reduce the risk of sperm DNA damage during the process and uphold the integrity of sperm cells. We examined semen samples from both donors and infertile patients in scenarios with various liquefaction times (30 or 60 minutes versus 24 hours), different cryopreservation methods (slow freezing, rapid freezing or vitrification), with the latter including the comparison of three different cryoprotection media. Sperm characteristics like motility, viability and the degree of DNA fragmentation before and after the freezing were analyzed. An artificial intelligence (AI) powered high content screening system (ScanR) was first improved and then utilized to enhance the automated identification of the sperm cells.

Data revealed a negative impact of sperm cryopreservation on its quality as seen through reduced movement and viability. Furthermore, increased sperm DNA fragmentation levels were noted. Interestingly, healthy donor samples showed higher levels of DNA damage (TUNEL test) while those from patients displayed more chromatin associated damage (AO test).

After testing methods for sperm preservation, the best results were achieved with controlled slow freezing in combination with Test Yolk Buffer (TYB) as a cryoprotectant agent. Compared to the other techniques tested, this method yielded good thaw sperm quality and minimized DNA damage. In this work, it was also found that vitrification and delayed processing (24 hours later) did not effectively preserve DNA integrity. On the basis of these results, a revised cryopreservation method was developed that includes using TYB, liquefying for 30 to 60 minutes and employing controlled slow freezing.

In summary, these data show how freezing sperm can affect its DNA quality and emphasizes the importance of the choice of cryopreservation methods and cryomedia for the preservation of sperm and the integrity of its DNA. The outcomes support the use of DFI as a measured variable and demonstrate the advantages of the integration of AI-based systems in male reproductive health. Subsequent studies should confirm these results and investigate further

protective measures like adding antioxidants. Utilizing standardized techniques to assess DNA fragmentation and automated analysis could improve the efficacy of reproduction treatments.

5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, wie relevant eine sorgfältig abgestimmte und etablierte Methodik bei der Kryokonservierung humaner Spermien ist - insbesondere im Hinblick auf die Vermeidung von DNA-Schäden. Es wäre daher sinnvoll in zukünftigen Arbeiten den Einfluss verschiedener Kryoprotektiva systematisch zu untersuchen. Auch die Rolle standardisierter Einfrierprotokolle sollte weiter betrachtet werden, um reproduzierbare Ergebnisse im klinischen Alltag zu ermöglichen. Die Analysemethoden der Spermienzellen durch automatisierte Bildgebungssysteme wie dem ScanR sollten dabei verstärkt berücksichtigt werden, um die Bewertung der DNA-Integrität objektiver und effizienter zu gestalten. Langfristig stellt sich die Frage, inwiefern die hier beschriebenen Methoden nicht nur zur verbesserten Qualitätssicherung eingefrorener Proben beitragen, sondern auch einen Einfluss auf klinische Endpunkte wie die Befruchtungsrate oder Embryoentwicklung haben könnten. Ein weiterer Untersuchungsansatz könnte verschiedene Selektionsmethoden für humane Spermien mit intakter DNA sein, welche im Folgenden gezielt für die Kryokonservierung genutzt werden können. Die Kombination auf optimierter Kryokonservierungstechnik, automatisierter Analytik und präziser Spermien Selektion könnte langfristig zu einer verbesserten Reproduktionsmedizin beitragen, mit dem Ziel die Chance auf eine erfolgreiche Schwangerschaft bei kryokonserviertem Sperma weiter zu erhöhen.

6. Referenzliste

- Aboulmaouhib, S., Madkour, A., Kaarouch, I., Sefrioui, O., Saadani, B., Copin, H., Benkhalifa, M., Louanjli, N., & Cadi, R. (2018). Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage. *Andrologia*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/and.12926>
- Ackerman, D. R. (1968). The Effect of Cooling and Freezing on the Aerobic and Anaerobic Lactic Acid Production of Human Semen. *Fertility and Sterility*, 19(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)36552-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)36552-9)
- Agarwal, A., & Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(4), 331–345. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg027>

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1–17.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 37.
<https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016a). Measurement of DNA Fragmentation in Spermatozoa by TUNEL Assay Using Bench Top Flow Cytometer (S. 181–203).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_24
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016b). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational andrology and urology*, 5(6), 935–950.
<https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
- Agarwal, A., Henkel, R., Huang, C.-C., & Lee, M.-S. (2019). Automation of human semen analysis using a novel artificial intelligence optical microscopic technology. *Andrologia*, 51(11), e13440. <https://doi.org/10.1111/and.13440>
- Agarwal, A., Barbăroșie, C., Ambar, R., & Finelli, R. (2020). The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3882. <https://doi.org/10.3390/ijms21113882>
- Agarwal A, FarkouhAla'a, Saleh R, Abdel-Meguid Hamoda TA, Harraz AM, Kavoussi P, Arafa M, Salvio G, Rambhatla A, Toprak T, et al., (2023). Controversy and Consensus on Indications for Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations. *World J Mens Health*. 41(3):575-602.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.220282>
- Agarwal, A., Bocu, K., Karthikeyan, V. S., Franco, G., Solorzano, J. F., & Omran, H., et al. (2024). Technical aspects and clinical limitations of sperm DNA fragmentation testing in male infertility: A global survey, current guidelines, and expert recommendations. *World Journal of Men's Health*. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2024.xxx>
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84(10), 1039–1052.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22871>

- Aitken, R. J. (2020). The Male Is Significantly Implicated as the Cause of Unexplained Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 38(01), 003–020. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718941>
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., & Irvine, D. S. (1998). Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1037–1046. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1037>
- Akoglu H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 2018;18(3): 91-93. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
- Aliakbari, F., Taghizabet, N., Azizi, F., Rezaei-Tazangi, F., Samadee Gelehkolae, K., & Kharazinejad, E. (2022). A review of methods for preserving male fertility. *Zygote*, 30(3), 289–297. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000071>
- Alshahrani, S., Agarwal, A., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Durairajanayagam, D., Ayaz, A., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). Infertile men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 103. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-103>
- Barbăroșie, C., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Diagnostic value of advanced semen analysis in evaluation of male infertility. *Andrologia*, 53(2), e13625. <https://doi.org/10.1111/and.13625>
- Baskaran, S., Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., Finelli, R., Robert, K. A., Iovine, C., Pushparaj, P. N., Samanta, L., Harlev, A., & Henkel, R. (2019). Tracking research trends and hotspots in sperm DNA fragmentation testing for the evaluation of male infertility: A scientometric analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 17, 110. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0550-3>
- Benchai, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>
- Bier, S. & Kliesch, S. (2024). Kryokonservierung von Keimzellen aus Ejakulat oder Hodengewebe zur Fertilitätsprotektion. *Urologie (Heidelberg, Germany)*, 63(11), 1089–1096. <https://doi.org/10.1007/s00120-024-02456-7>
- Bijar, A., Benavent, A. P., Mikaeili, M., & Khayati, R. (2012). Fully automatic identification and discrimination of sperm's parts in microscopic images of stained human semen smear.

Journal of Biomedical Science and Engineering, 05(07), 384–395.

<https://doi.org/10.4236/jbise.2012.57049>

Björndahl, L., Wang, C., & Tomsu, M. (2021). Evolution of the WHO "Semen" processing manual from the first to the sixth edition. *Fertility and Sterility*, 117(2), 252-

257. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.11.037>

Brandt, J. S., Cruz Ithier, M. A., Rosen, T., & Ashkinadze, E. (2019). Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 39(2), 81–87.

<https://doi.org/10.1002/pd.5402>

Brinkworth, M., & Toppari, J. (2020). Umwelt- und arbeitsplatzbedingte Einflüsse auf die männliche Reproduktion. In E. Nieschlag, H. M. Behre, S. Kliesch, & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (S. 1–19). Springer.

https://doi.org/10.1007/978-3-662-61904-9_35-1

Bundesärztekammer (2022), Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiLiBÄK). *Deutsches Ärzteblatt*.

https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.rili_baek_QS_Labor20222511

Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., & Giwercman, A. (2007). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*, 22(1), 140–146.

<https://doi.org/10.1093/humrep/deh280>

Campos, L. G. A., Requejo, L. C., Miñano, C. A. R., Orrego, J. D., Loyaga, E. C., & Cornejo, L. G. (2021). Correlation between sperm DNA fragmentation index and semen parameters in 418 men seen at a fertility center. *JBRA Assisted Reproduction*, 25(3), 349–357.

<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200079>

Casanovas, A., Ribas-Maynou, J., Lara-Cerrillo, S., Jimenez-Macedo, A. R., Hortal, O., Benet, J., Carrera, J., & García-Peiró, A. (2019). Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and Sterility*,

111(4), 699-707.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>

Cassina, A., Silveira, P., Cantu, L., Montes, J. M., Radi, R., & Sapiro, R. (2015). Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production1.

Biology of Reproduction, 93(5), 119, 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130989>

- Cescon, M., Chianese, R., & Tavares, R. S. (2020). Environmental Impact on Male (In)Fertility via Epigenetic Route. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 2520.
<https://doi.org/10.3390/jcm9082520>
- Chang, V., Heutte, L., Petitjean, C., Härtel, S., & Hitschfeld, N. (2017). Automatic classification of human sperm head morphology. *Computers in Biology and Medicine*, 84, 205–216.
<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2017.03.029>
- Clarke, G. N., Liu, D. Y., & Baker, H. W. G. (2003). Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, Fertility, and Development*, 15(7–8), 377–381.
<https://doi.org/10.1071/RD03007>
- Clermont, Y. (1966). Spermatogenesis in Man. *Fertility and Sterility*, 17(6), 705–721.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)36120-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)36120-9)
- Clifton, D. K., & Bremner, W. J. (1983). The Effect of Testicular X-irradiation on Spermatogenesis in Man. *Journal of Andrology*, 4(6), 387–392. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1983.tb00765.x>
- Colasante, A., Minasi, M. G., Scarselli, F., Casciani, V., Zazzaro, V., Ruberti, A., Greco, P., Varricchio, M. T., & Greco, E. (2019). The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [Di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica*, 90(4), 254–259.
<https://doi.org/10.4081/aiua.2018.4.254>
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Fernández, J. L., Dávila-Rodríguez, M. I., López-Fernández, C., & Gosálvez, J. (2017). Two-Tailed Comet Assay (2T-Comet): Simultaneous Detection of DNA Single and Double Strand Breaks. In C. Pellicciari & M. Biggiogera (Hrsg.), *Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols* (S. 285–293). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9_22
- Cox CM, Thoma ME, Tchangalova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, & Kiarie J. (2022) Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open*, 12, 2022(4). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
- Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: Effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility*, 76(5), 892–900. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02834-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02834-5)

- Dutta, S., Henkel, R., & Agarwal, A. (2021). Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*, 53(2), e13718.
<https://doi.org/10.1111/and.13718>
- Duty, S. M., Singh, N. P., Silva, M. J., Barr, D. B., Brock, J. W., Ryan, L., Herrick, R. F., Christiani, D. C., & Hauser, R. (2003). The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environmental Health Perspectives*, 111(9), 1164–1169. <https://doi.org/10.1289/ehp.5756>
- Engel, K. M., Grunewald, S., Schiller, J., & Paasch, U. (2019). Automated semen analysis by SQA Vision® versus the manual approach-A prospective double-blind study. *Andrologia*, 51(1), e13149. <https://doi.org/10.1111/and.13149>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), e13874.
<https://doi.org/10.1111/and.13874>
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- Evenson, D. P. (2022). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment. *Current Protocols*, 2(8), e508. <https://doi.org/10.1002/cpz1.508>
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. (1980). Relation of Mammalian Sperm Chromatin Heterogeneity to Fertility. *Science*, 210(4474), 1131–1133.
<https://doi.org/10.1126/science.7444440>
- Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*, 23(1), 25–43. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5), 979–991.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.011>
- Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*, 44(2), 394–436.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90411-X)

- Figuerola, J. V., Bustos-Obregón, E., Zepeda, D. and Alvarado, S. (2022) Mitochondrial dysfunction and sperm motility impairment due to oxidative stress: causes and consequences, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), pp. 45–56.
- Fuentes-Mascorro, H.; Serrano, H., Rosada A. (2009). Sperm Chromatin. *Archives of Andrology*, 45(3), 215–225. <https://doi.org/10.1080/01485010050193995>
- Ganzer, L. M., Larcher, J. M. S., Avramovich, V. I., Tissera, A. D., & Estofan, G. M. (2017). Relationship between semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*, 108(3), e137–e138. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.415>
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- Gonzalez, D. C., Ory, J., Blachman-Braun, R., Nackeeran, S., Best, J. C., & Ramasamy, R. (2022). Advanced Paternal Age and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review. *The World Journal of Men's Health*, 40(1), 104–115. <https://doi.org/10.5534/wjmh.200195>
- Grunewald, S., Paasch, U., Wuendrich, K., & Glander, H. J. (2005). Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Archives of Andrology*, 51(6), 449–460. <https://doi.org/10.1080/014850190947813>
- Gunes, S., Al-Sadaan, M., & Agarwal, A. (2015). Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.010>
- Gül, M., Russo, G. I., Kandil, H., Boitrelle, F., Saleh, R., Chung, E., Kavoussi, P., Mostafa, T., Shah, R. & Agarwal, A., (2024). Male Infertility: New Developments, Current Challenges, and Future Directions. *The World Journal of Men's Health*, 42(3), pp.502–517. <https://doi.org/10.5534/wjmh.230232>
- Hallak, J., Sharma, R.K., Wellstead, C. & Agarwal, A., (2000). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 45(1), pp.38–42. <https://doi.org/10.1080/014850100426688>.
- Hallam, J., Burton, P., & Sanders, K. (2024). Poor sperm chromatin condensation is associated with cryopreservation-induced DNA fragmentation and cell death in human spermatozoa. *Journal of Clinical Medicine*, 13(14), 4156. <https://doi.org/10.3390/jcm13144156>

- Hammadeh, M.E., 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. *Journal of Andrology*, 22(6), pp.1012–1018. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03442.x>.
- Harlev, A., Agarwal, A., Gunes, S. O., Shetty, A., & du Plessis, S. S. (2015). Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *The World Journal of Men's Health*, 33(3), 143–160. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2015.33.3.143>
- Heller, C. G., & Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in man: An estimate of its duration. *Science (New York, N.Y.)*, 140(3563), 184–186. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.184>
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W.-B., & Kruger, T. F. (2003). DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(4), 477–484. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61893-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61893-7)
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0804615>
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., Sieme, H., (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.001>.
- Höhn, H., Holinski-Feder, E., Meitinger, T., Poeggel, G., Zerres, K (2017). Grundlagen der Genetik. In: Murken J., Grimm T., Holinski-Feder E., Zerres K., ed. Taschenlehrbuch Humangenetik. 9. teilaktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.
- Holstein, A. F., & Roosen-Runge, E. C. (1981). *Atlas of human spermatogenesis*. Grosse Berlin.
- Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., Vollenhoven, B., & Temple-Smith, P. (2020). Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm

DNA damage in mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 35(3), 529–544.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dez308>

Huang, C., Tang, Y. L., Hu, J. L., Zhou, W. J., Huang, Z. H., Luo, X. F., Li, Z., & Zhu, W. B. (2022). Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 24(6), 563–569. <https://doi.org/10.4103/aja20229>

Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., Coulson, C., Lambert, P. A., Watt, E. M., & Desai, K. M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 291(6510), 1693–1697. <https://doi.org/10.1136/bmj.291.6510.1693>

Isachenko, E., Rahimi, G., Mallmann, P., Sanchez, R., & Isachenko, V. (2011). Novel Approaches to the Cryopreservation of Human Spermatozoa: History and Development of the Spermatozoa Vitrification Technology. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2(2), 128–145. <https://doi.org/10.1177/205891581100200207>

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S. & Nawroth, F., 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), pp.191–200. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)

Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I. I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F., & van der Ven, H. (2004). Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1167–1173. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028811>

Ito, C., & Toshimori, K. (2016). Acrosome markers of human sperm. *Anatomical Science International*, 91(2), 128–142. <https://doi.org/10.1007/s12565-015-0323-9>

Jeyendran, R.S., Gunawardana, V.K., Barisic, D. & Wentz, A.C., (1995). TEST-yolk media and sperm quality. *Human Reproduction Update*, 1(1), pp.73–79. <https://doi.org/10.1093/humupd/1.1.73>

Kadoch, E., Benguigui, J., Chow-Shi-Yée, M., Tadevosyan, A., Bissonnette, F., Phillips, S., Zini, A. & Kadoch, I. J. (2024). The paternal clock: Uncovering the consequences of advanced paternal age on sperm DNA fragmentation. *Reproductive Biology*, 24 (4) <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2024.100931>

- Karimian, M., & Babaei, F. (2020). Large-scale mtDNA deletions as genetic biomarkers for susceptibility to male infertility: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.216>
- Kesari, K. K., Agarwal, A., & Henkel, R. (2018). Radiations and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0431-1>
- Kliesch, S; Neuhaus, N., Stefan, S. (2023) In: Kryokonservierung menschlicher Spermien und von Keimzellgewebe des Hodens zur Zeugungsreserve. *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61901-8>
- Kliesch, S. (2021). „Praktisches Spermogramm“ – Ejakulatdiagnostik gemäß WHO. *Der Urologe*, 60(5), 647–656. <https://doi.org/10.1007/s00120-021-01537-1>
- Krause, W.; Diemer, T.; Sperling, H.; Weidner, W. (2011). *Andrologie* (4. Auflage). Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-41866>
- Kuchakulla, M., Narasimman, M., Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., & Ramasamy, R. (2021). How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia*, 53(1), e13615. <https://doi.org/10.1111/and.13615>
- Kumar, R. S., Sharma, S., Halder, A., & Gupta, V. (2023). Deep Learning-Based Robust Automated System for Predicting Human Sperm DNA Fragmentation Index. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 16(1), 16–21. https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_4_23
- Le, M. T., Nguyen, T. A. T., Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, V. T., Le, D. D., Nguyen, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reproductive Medicine and Biology*, 18(4), 390–396. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12297>
- Leaver, R. B. (2016). Male infertility: An overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)*, 25(18), S35–S40. <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.18.S35>
- Leslie, S. W., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. A. (2023). Male Infertility. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., & Swan, S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: A systematic review and

meta-regression analysis. *Human Reproduction Update*, 23(6), 646–659.

<https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>

Majzoub, A., Arafa, M., Mahdi, M., Agarwal, A., Al Said, S., Al-Emadi, I., El Ansari, W., Alattar, A., Al Rumaihi, K., & Elbardisi, H. (2018). Oxidation–reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 87–95.

<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.014>

Marchiani, S., Tamburrino, L., Muratori, M., & Baldi, E. (2020). Spermatozoal Chromatin Structure: Role in Sperm Functions and Fertilization. In: Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., Agarwal, A. (eds) *Genetics of Male Infertility*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37972-8_3

Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47, 347–369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>

McCallum, C., Riordon, J., Wang, Y., Kong, T., You, J. B., Sanner, S., Lagunov, A., Hannam, T. G., Jarvi, K., & Sinton, D. (2019). Deep learning-based selection of human sperm with high DNA integrity. *Communications Biology*, 2(1), 250. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0491-6>

McPherson, S., & Longo, F. J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 37(2) 109–128. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7688597/>

Minhas, S., Bettocchi, C., Boeri, L., Capogrosso, P., Carvalho, J., Cilesiz, N. C., Cocci, A., Corona, G., Dimitropoulos, K., Gül, M., Hatzichristodoulou, G., Jones, T. H., Kadioglu, A., Martínez Salamanca, J. I., Milenkovic, U., Modgil, V., Russo, G. I., Serefoglu, E. C., Tharakan, T., ... Salonia, A. (2021). European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *European Urology*, 80(5), 603–620. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.014>

Mohammadi, A., Jafarpour, F., Tanhaei Vash, N., Hajian, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2024). Supplementation of sperm cryopreservation media with H₂S donors enhances sperm quality, reduces oxidative stress, and improves in vitro fertilization outcomes. *Scientific Reports*, 14, 62485. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62485-2>

- Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., Cambi, M., Lotti, F., Natali, I., Filimberti, E., Noci, I., Forti, G., Maggi, M., & Baldi, E. (2015). DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertility and Sterility*, 104(3), 582-590.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.005>
- Muriel, L., Garrido, N., Fernández, J. L., Remohí, J., Pellicer, A., de los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2006). Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 85(2), 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1327>
- Nallella, K.P., Sharma, R.K., Allamaneni, S.S.R., Aziz, N. & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, 82(4), 913-918. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.126>
- Nallella, K. P., Sharma, R. K., Aziz, N., & Agarwal, A. (2006). Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*, 85(3), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.024>
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>
- Newman, H., Catt, S., Vining, B., Vollenhoven, B., & Horta, F. (2022). DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: A systematic review. *Molecular Human Reproduction*, 28(1), gaab071. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab071>
- Ni, K., Spiess, A.-N., Schuppe, H.-C., & Steger, K. (2016). The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 4(5), 789–799. <https://doi.org/10.1111/andr.12216>
- Nieschlag, E., Behre, H. M., Wieacker, P., Meschede, D., Kamischke, A., & Kliesch, S. (2009). Störungen im Bereich der Testes. In E. Nieschlag, H. M. Behre, & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (S. 199–244). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92963-5_13
- Nieschlag, E., Tüttelmann, F., Kliesch, S., & Behre, H. M. (2023). Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In E. Nieschlag, H. M. Behre, S. Kliesch, & S. Nieschlag (Hrsg.),

Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes (S. 87–92). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61901-8_4

Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Janssen, M., Vanheusden, E., Castro-Sanchez, Y., Thijs, H., & Ombelet, W. (2009). Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), 202–206. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60073-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60073-9)

Nordhoff, V., (2023). In: *Spermienqualität und Spermienfunktionstests. Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61901-8>

Nordhoff, V., Baldi, E., Hellenkemper, B., Nieschlag, E. (2023). In: *Untersuchung des Ejakulates. Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61901-8>

Nordhoff, V., & Kliesch, S. (2019). Das eine unter vielen – Spermienqualität und Möglichkeiten der Selektion. *Gynäkologische Endokrinologie*, 17(4), 250–256. <https://doi.org/10.1007/s10304-019-00274-1>

Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., Escobedo, C., Jarvi, K., & Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature Reviews. Urology*, 14(12), 707–730. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.175>

O'Neill, H. C., Nikoloska, M., Ho, H. T., Doshi, A., & Maalouf, W. (2019). Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: Comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36, 1713–1720. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01505-x>

Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-Toukhy, T., & Khalaf, Y. (2015). The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.10.018>

Ouitrakul, S., Sukprasert, M., Treetampinich, C., Choktanasiri, W., Vallibhakara, S., & Satirapod, C. (2018). The effect of different timing after ejaculation on sperm motility and viability in semen analysis at room temperature. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 101, 26–32. http://www.jmatonline.com/PDF/26-32_N230.pdf

- Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2018). A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 65–76.
<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.001>
- Panner Selvam, M. K., Ambar, R. F., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia*, 53(1), e13706.
<https://doi.org/10.1111/and.13706>
- Panner Selvam, M. K., Sengupta, P., Agarwal, A. (2020). Sperm DNA fragmentation and male infertility. In: Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., Agarwal, A. (eds) *Genetics of Male Infertility*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37972-8_9
- Paras, L., Freisinger, J., Esterbauer, B., Schmeller, N., Szlauer, R., Jungwirth, A. (2008). Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. *Andrologia*, 40(1), 18–22.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18211297>
- Passet-Wittig J., Schneider NF., Letzel S., Schuhrke B., Seufert R., Zier U., Münster E. (2016). Prävalenz von Infertilität und Nutzung der Reproduktionsmedizin in Deutschland.
- Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., Chacón de Castro, A., Sánchez-Calabuig, M.J., Cano-Oliva, E., de Castro-Pita, F.J., Montoro-Buils, L., Pericuesta, E., Fernández-González, R. and Gutiérrez-Adán, A. (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8, Article 2902. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-21335-8>
- Petrushko, M., Yurchuk, T., Todorov, P., Hristova, E., Piniayev, V., Isachenko, E., Rahimi, G., Mallmann, P. & Isachenko, V. (2021). New method for cryoprotectant-free freezing of human oligoasthenoteratozoospermic spermatozoa with high-molecular polymer. *Cryobiology*, 103, pp.39–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.09.013>
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- Pollister, A. W., & Mirsky, A. E. (1946). The nucleoprotamine of trout sperm. *Journal of General Physiology*, 30(2), 101–120. <https://doi.org/10.1085/jgp.30.2.101>
- Potts, R. J., Newbury, C. J., Smith, G., Notarianni, L. J., & Jefferies, T. M. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 423(1–2), 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00242-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00242-5)

- Pozzi, E., Fallara, G., Belladelli, F., Corsini, C., Raffo, M., Candela, L., Schifano, N., d'Arma, A., Capogrosso, P., Boeri, L., Cilio, S., Montorsi, F., & Salonia, A. (2023). Clinical parameters associated with altered sperm DNA fragmentation index among primary infertile men: Findings from a real-life cross-sectional study. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13380>
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 90(5), S60. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.065>
- Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2014). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>
- Rex, A. S., Aagaard, J., & Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: A historical review. *Andrology*, 5(4), 622–630. <https://doi.org/10.1111/andr.12381>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., & Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>
- Ribas-Maynou, J., Yeste, M., Becerra-Tomás, N., Aston, K. I., James, E. R., & Salas-Huetos, A. (2021). Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biological Reviews*, 96(4), 1284–1300. <https://doi.org/10.1111/brv.12700>
- Ribeiro, S., Sharma, R., Gupta, S., Cakar, Z., De Geyter, C., & Agarwal, A. (2017). Inter- and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Andrology*, 5(3), 477–485. <https://doi.org/10.1111/andr.12334>
- Ringertz, N. R., Gledhill, B. L., & Darzynkiewicz, Z. (1970). Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. Sensitivity of DNA to heat denaturation. *Experimental Cell Research*, 62(1), 204–218. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90521-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90521-4)
- Riva, N. S., Ruhlmann, C., Iazzo, R. S., López, C. A. M., & Martínez, A. G. (2018). Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(3), 219–227. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180060>
- Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Kirkman-Brown, J., & Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A

systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), 2908–2917.

<https://doi.org/10.1093/humrep/des261>

Rousseaux, S., Boussouar, F., Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Curtet, S., Vitte, A.-L., & Khochbin, S. (2011). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming.

Systems Biology in Reproductive Medicine, 57(1–2), 50–53.

<https://doi.org/10.3109/19396368.2010.498076>

Rowe, P. J., Comhaire, F. H., Hargreave, T. B., & Mahmoud, A. M. A. (2000). *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Male*. Cambridge University Press.

Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 14(4), 231–240.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918773/>

Sakkas, D., Manicardi, G. C., & Bizzaro, D. (2003). Sperm nuclear DNA damage in the human. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 518, 73.-

84. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9190-4_7

Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., & Sharma, R. K. (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertility and Sterility*, 78(2), 313–318.

[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03219-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03219-3)

Santi, D., Spaggiari, G., & Simoni, M. (2018). Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management –meta-analyses.

Reproductive BioMedicine Online, 37(3), 315-326.

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.023>

Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S., & Choktanasiri, W. (2012). Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity.

Andrologia, 44 Suppl 1, 786–790. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01267.x>

Schünke. (2009). *Prometheus. Innere Organe: 118 Tabellen* (2., überarb. und erw. Aufl.). Thieme.

Schuppe, H.-C., Köhn, F.-M., Pilatz, A., Diemer, T., Bergmann, M., & Weidner, W. (2015).

Andrologische Diagnostik bei Fertilitätsstörungen. In M. S. Michel, J. W. Thüroff, G.

Janetschek, & M. Wirth (Hrsg.), *Die Urologie* (S. 1–14). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-41168-7_154-1

Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., & Bleau, G. (2005). Sperm DNA fragmentation: Threshold value in male fertility. *Human Reproduction*, 20(12), 3446–3451.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dei231>

Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M., & Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: Taking control of your fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 11, 66. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-66>

Sharma, R., Ahmad, G., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016a). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: Protocol, reference values, and quality control. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(2), 291–300.
<https://doi.org/10.1007/s10815-015-0635-7>

Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. (2016b). Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *European Urology*, 70(4), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.010>

Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*, 53(2), e13738.
<https://doi.org/10.1111/and.13738>

Sharma, S., Wistuba, J., Pock, T., Schlatt, S., & Neuhaus, N. (2019). Spermatogonial stem cells: Updates from specification to clinical relevance. *Human Reproduction Update*, 25(3), 275–297. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz006>

Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2–5.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive Biomedicine Online*, 23(6), 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.08.010>

- Simon, L., Emery, B. R., & Carrell, D. T. (2017a). Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 44, 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.07.003>
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J., & Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, 29(11), 2402–2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>
- Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D., & Lewis, S. E. M. (2013). Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reproductive Biomedicine Online*, 26(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.09.019>
- Simon, L., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A., & Carrell, D. T. (2017b). A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 80–90. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.182822>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Slabbert, M., du Plessis, S. S., & Huyser, C. (2015). Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, 47(5), 594–599. <https://doi.org/10.1111/and.12307>
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Seminars in cell & developmental biology*, 0, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.012>
- Song, W.-H., Ballard, J. W. O., Yi, Y.-J., & Sutovsky, P. (2014). Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility. *BioMed Research International*, 2014, 981867. <https://doi.org/10.1155/2014/981867>
- Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2023). Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4656. <https://doi.org/10.3390/ijms24054656>

- Tamburrino, L., Traini, G., Ragosta, M. E., Dabizzi, S., Vezzani, S., Scarpa, F., Vignozzi, L., Baldi, E., & Marchiani, S. (2024). Semen cryopreservation and storage in liquid nitrogen: Impact on chromatin compaction. *Andrology*, 10.1111/andr.13806.
<https://doi.org/10.1111/andr.13806>
- Tharakan, T., Bettocchi, C., Carvalho, J., Corona, G., Jones, T. H., Kadioglu, A., Salamanca, J. I. M., Serefoglu, E. C., Verze, P., Salonia, A., & Minhas, S. (2022). European Association of Urology Guidelines Panel on Male Sexual and Reproductive Health: A Clinical Consultation Guide on the Indications for Performing Sperm DNA Fragmentation Testing in Men with Infertility and Testicular Sperm Extraction in Nonazoospermic Men. *European Urology Focus*, 8(1), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.12.017>
- Thomson, L.K., Fleming, S.D., Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A. and Clark, A.M. (2009a). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis, *Human Reproduction*, 24(9), pp. 2061–2070.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>.
- Thomson, L.K., Fleming, S.D., Schulke, L., Barone, K., Zieschang, J.A. and Clark, A.M. (2009b) The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation, *Fertility and Sterility*, 92(3), pp. 991–1001.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1726>.
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.-L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.-M., & Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989). *Human Reproduction*, 6(6), 811–816.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433>
- Trottmann, M., & Weidner, W. (2023). Ursachen der männlichen Infertilität. In *Die Urologie* (S. 2263–2266). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-63400-4_48
- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*, 13(6), 1429–1436.
<https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1429>

- Wagner, H., Cheng, J. W., & Ko, E. Y. (2018). Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*, 16(1), 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001>
- Wang, M., Isachenko, E., Rahimi, G., Mallmann, P. & Isachenko, V., 2021. Aseptic Cryoprotectant-Free Vitrification of Human Spermatozoa by Direct Dropping into a Cooling Agent. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2180, pp.427–436. Available at:
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_19
- Ward, WS. (2011). Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod*, 84(5):841-843. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.090951>
- Watson P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, fertility, and development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/rd9950871>
- WHO (2021), WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. World Health Organization, Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The Epidemiology of Male Infertility. *Urologic Clinics of North America*, 41(1), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.006>
- Wistuba, J., Neuhaus, N., & Nieschlag, E. (2020). Physiologie der Hodenfunktion. In E. Nieschlag, H. M. Behre, S. Kliesch, & S. Nieschlag (Hrsg.), *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (S. 1–44). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-61904-9_2-1
- World Health Organization, (2018). International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva: WHO 2018, <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
- Yang EH, Strohl HB, Su HI. Fertility preservation before and after cancer treatment in children, adolescents, and young adults. *Cancer*. 2024 Feb 1;130(3):344-355.
<https://doi.org/10.1002/cncr.35108>
- Zheng, W.-W., Song, G., Wang, Q.-L., Liu, S.-W., Zhu, X.-L., Deng, S.-M., Zhong, A., Tan, Y.-M., & Tan, Y. (2018). Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian Journal of Andrology*, 20(1), 75–79.
https://doi.org/10.4103/aja.aja_19_17

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75(4), 674–677. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01796-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01796-9)

Internet-Quellen:

[1] WHO (2024), Infertility, abgerufen am 21.05.2025

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>

[2] Diagnostic and therapy before assisted reproductive treatments. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2K-Level, AWMF Registry No. 015/085, 02/2019); abgerufen am 22. August 2023, <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-085.html>

[3] <https://fertipro.com/2019/12/18/spermfreeze/> (abgerufen am 05.03.2025)

[4] <https://www.coopersurgical.com/product/sperm-freezing-medium/> (abgerufen am 05.03.2025)

[5] <https://www.irvinesci.com/freezing-medium-tyb-with-glycerol-gentamicin.html> (abgerufen am 05.03.2025)

7. Anhang

Tabelle A01: Optische Parameter für AO-Assay, ScanR Analysis Programme, Olympus

Regionen	Parameter
R1	Circularity Factor AO Grün / Circularity Factor AO Grün
R2	AO Ratio (Fluoreszenz 25 % höher als BG-Signal)
R3	Mean intensity AO Orange BG / Mean intensity AO Orange BG
R4	Orange Max/Mean / Orange Max/Mean
R5	Area / Circularity Factor AO Grün BG
R6	Elongation Factor AO Grün BG / Circularity Factor AO Grün BG
R7	Intensity Standard Variation Durchlicht / Intensity Standard Variation Durchlicht
R8	AO Ratio (Fluoreszenz 33 % höher als BG-Signal)
R9	AO Ratio (gesamtes AO-Intervall)
R10	Orange Ratio/ Orange Ratio
R11-R24	AO Ratio (Fluoreszenz 15-40 % höher als BG-Signal)
R20	AO Ratio (Fluoreszenz 30 % höher als BG-Signal)
R25	Area / Circularity Factor AO Grün BG (individuell an Population angepasst)

Tabelle A02: Optische Parameter für TUNEL-Assay, ScanR Analysis Programme, Olympus

Regionen	Parameter
R1	Circularity (Intervall/Range)
R2	Area/ Intensity Standard Variation Durchlicht
R3	Mean Intensity Grün (Intervall/Range)
R4	Max Intensity Grün / Mean Intensity Grün (Intervall / Range) Frag
R5	Fragmentations Ratio, >1,5 x grüner als die Umgebung
R6	Fragmentations Ratio, >2 x grüner als die Umgebung
R20	Area / Intensity Standard Variation Durchlicht (individuell an Population angepasst)

Tabelle A03: Gates im AO Assay

Gates	Definition
Spermienköpfe	R1 und R2 und R5 und nicht R6 und R9
Spermienpopulation individuell	R1 und R2 und R25 und nicht R6 und R9
AO Positiv 30 %	R1 und R7 und R5 und nicht R6 und R3 und R10 und R20

Tabelle A04: Gates im TUNEL Assay

Gates	Definition
Spermienköpfe	R1 und R2 und R5 und nicht R6 und R9
Keine Köpfe	Nicht R2
TUNEL >2	R1 und R2 und R3 und R4 und R6
TUNEL > 1,5	R1 und R2 und R3 und R4 und R5

Tabelle A05: Verflüssigungszeiten von Ejakulaten, Auswirkung auf die DNA-Integrität, a) TUNEL, b) AO

a)		TUNEL				
Zeit	30 vs. 60	30 vs. 24h	30 vs. Kryo	60 vs. 24	60 vs. Kryo	24 vs. Kryo
p	0,68641	0,02296	0,00014	0,00865	0,00011	0,03266
Sig	n.s.	*	***	**	***	*

b)		AO				
Zeit	30 vs. 60	30 vs. 24h	30 vs. Kryo	60 vs. 24	60 vs. Kryo	24 vs. Kryo
p	0,83414	0,03236	0,42537	0,0018	0,36096	0,02674
Sig	n.s.	*	n.s.	**	n.s.	*

Tabelle A06: Vergleich Kryokonservierungsmethoden, DNA-Integrität, a)TUNEL, b) AO

a)				AO						
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	0,00619	0,00026	0,00366	0,00327	0,34727	0,56159	0,8779	0,87837	0,54618	0,66837
Sig	**	***	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

b)				TUNEL						
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	<0.00001	0,00003	<0,00001	0,00011	0,68073	0,51373	0,15431	0,18297	0,19907	0,01503
Sig	***	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

Tabelle A07: Vergleich Kryokonservierungsmethoden, a) Motilität , und b) Vitalität

a)			Motilität a							
Methode	aF vs. aS	aF vs. aR	aF vs. aV+	aF vs. aV-	aS vs. aR	aS vs. aV+	aS vs. aV-	aR vs. aV+	aR vs. aV-	aV+ vs. aV-
p	0,00039	0,00017	0,00007	0,0004	0,002	0,00017	0,00064	0,78012	0,00148	0,00338
Sig	***	***	***	***	**	***	***	n.s.	**	**

			Motilität b							
Methode	bF vs. bS	bF vs. bR	bF vs. bV+	bF vs. bV-	bS vs. bR	bS vs. bV+	bS vs. bV-	bR vs. bV+	bR vs. bV-	bV+ vs. bV-
p	0,01982	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00008	0,00089	<0,00001	0,32584	<0,00001	<0,00001
Sig	*	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***

			Motilität c							
Methode	cF vs. cS	cF vs. cR	cF vs. cV+	cF vs. cV-	cS vs. cR	cS vs. cV+	cS vs. cV-	cR vs. cV+	cR vs. cV-	cV+ vs. cV-
p	0,54891	0,62467	0,61505	0,00019	0,21985	1	<0,00001	0,09198	0,00314	0,00002
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	**	***

			Motilität d							
Methode	dF vs. dS	dF vs. dR	dF vs. dV+	dF vs. dV-	dS vs. dR	dS vs. dV+	dS vs. dV-	dR vs. dV+	dR vs. dV-	dV+ vs. dV-
p	0,00124	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,00014	<0,00001	0,21995	<0,00001	<0,00001
Sig	**	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***

b)			Eosin							
Methode	F vs. S	F vs. R	F vs. V+	F vs. V-	S vs. R	S vs. V+	S vs. V-	R vs. V+	R vs. V-	V+ vs. V-
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00001	<0,00018	<0,00001	0,31566	<0,00001	<0,00001
Sig	***	***	***	***	***	***	***	n.s.	***	***

Tabelle A08: Vergleich kryoprotektive Medien, DNA-Integrität, a) TUNEL, b) AO

a)		TUNEL				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,1141	0,5287	0,00328
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	**

b)		AO				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	0,01101	0,00043	0,0353	0,23269	0,46217	0,01222
Sig	*	***	*	n.s.	n.s.	*

Tabelle A09: Vergleich kryoprotektiver Medien, a) Motilität und b) Vitalität

a)

		Motilität a				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,4593	0,0027	0,00906
Sig	***	***	***	n.s.	**	**

		Motilität b				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,20349	0,41055	0,65762
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

		Motilität c				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	0,15603	0,71138	0,67612	0,0784	0,02182	0,6672
Sig	ns	ns	ns	ns	*	ns

		Motilität d				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,60778	0,74625	0,42798
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

b)

		Eosin				
CPA	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
p	<0,00001	<0,00001	<0,00001	0,8921	0,25263	0,12228
Sig	***	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabelle A010: Spearman Korrelationsanalyse, frischen vs. kryokonservierte Ejakulate,
a) TUNEL, b) AO, c) Eosin d) Motilität**

a) TUNEL						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,80965	0,83102	0,76923	0,87696	0,8174	0,88423
p	0	0	0	0	0	0
Sig	***	***	***	***	***	***

b) AO						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,73229	0,80947	0,80182	0,8373	0,85586	0,90364
p	0	0	0	0	0	0
Sig	***	***	***	***	***	***

c) Eosin						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,3762	0,38409	0,50345	0,85701	0,80531	0,84661
p	0,00305	0,00245	0,00004	0	0	0
Sig	**	**	***	***	***	***

d) Motilität a						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,57398	0,65495	0,52452	0,76784	0,63516	0,59922
p	0	0	0,00002	0	0	0
Sig	***	***	***	***	***	***

Motilität b						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,58368	0,6267	0,46049	0,82024	0,7856	0,84763
p	0	0	0,00021	0	0	0
Sig	***	***	***	***	***	***

Motilität c						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,19428	0,12323	0,08991	0,58402	0,44544	0,45624
p	0,1369	0,34824	0,49449	0	0,00036	0,00025
Sig	n.s	n.s.	n.s.	***	***	***

Motilität d						
	F vs. SF	F vs. SFM	F vs. TYB	SF vs. SFM	SF vs. TYB	SFM vs. TYB
rs	0,67358	0,72837	0,4723	0,85611	0,7331	0,75798
p	0	0	0,00014	0	0	0
Sig	***	***	***	***	***	***

Tabelle A011: Spearman Korrelationsanalyse, frischen Ejakulate Spermienparameter und Patientenalter

	Eosin/Alter	Eosin/TUNEL	Eosin/AO	Eosin/Mot a	Eosin/Mot b	Eosin/Mot c	Eosin/Mot d
rs	-0,42034	-0,36578	0,26167	0,29356	0,26929	-0,31163	-0,35426
p	0,00083	0,00405	0,04342	0,02282	0,03747	0,01536	0,00549
Sig	***	**	*	*	*	*	**

	TUNEL/Alter	TUNEL/AO	TUNEL/Eosin	TUNEL/Mot a	TUNEL/Mot b	TUNEL/Mot c	TUNEL/Mot d
rs	0,13853	0,17487	-0,36578	-0,27247	-0,24759	0,26982	0,38991
p	0,29117	0,18143	0,00405	0,03519	0,05648	0,03708	0,00207
Sig	n.s.	n.s.	**	*	*	*	**

	AO/Alter	AO/TUNEL	AO/Eosin	AO/Mot a	AO/Mot b	AO/Mot c	AO/Mot d
rs	-0,15303	0,17487	0,26167	0,08057	-0,01265	-0,0335	0,0282
p	0,2408	0,18143	0,04342	0,54058	0,92358	0,79939	0,83064
Sig	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

	Alter/Eosin	Alter/TUNEL	Alter/AO	Alter/Mot a	Alter/Mot b	Alter/Mot c	Alter/Mot d
rs	-0,42034	0,13853	-0,15303	-0,10119	-0,06374	0,11218	0,12961
p	0,00083	0,29117	0,2408	0,44172	0,62849	0,39345	0,32363
Sig	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle A012: Spearman Korrelationsanalyse von frischen Ejakulaten (F).

Spermienparameter, Körpergröße, Körpergewicht (KG), Hodenvolumen, Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration und Morphologie

Körpergröße in cm (59 Pat)

	Körpergröße/ Mot. a	Körpergröße/ Mot. b	Körpergröße/ Mot. c	Körpergröße/ Mot. d	Körpergröße/ Eosin	Körpergröße/ TUNEL	Körpergröße/ AO
rs	-0,0075	0,02256	0,14479	-0,04915	0,09859	0,05041	-0,07924
p	0,95501	0,86532	0,2739	0,71164	0,45753	0,70454	0,5508
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Körpergewicht (59 Pat.)

	KG/Mot. a	KG/Mot. c	KG/Mot. c	KG/Mot. d	KG/Eosin	KG/TUNEL	KG/AO
rs	0,16999	-0,13721	-0,11613	0,09702	-0,003	0,01054	-0,00291
p	0,19804	0,30006	0,38107	0,46477	0,982	0,93688	0,98254
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Links (35 Pat.)

	HodenVolLi/ Mot. a	HodenVolLi/ Mot.b	HodenVolLi/ Mot.c	HodenVolLi/ Mot. d	HodenVolLi/ Eosin	HodenVolLi/ TUNEL	HodenVolLi/ AO
rs	0,28122	-0,16551	-0,03284	-0,06922	0,00394	-0,11102	-0,07176
p	0,10173	0,34202	0,85145	0,69278	0,9821	0,52547	0,68208
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Rechts (35 Pat.)

	HodenVolRe/ Mot. a	HodenVolRe/ Mot.b	HodenVolRe/ Mot.c	HodenVolRe/ Mot. d	HodenVolRe/ Eosin	HodenVolRe/ TUNEL	HodenVolRe/ AO
rs	0,31464	-0,10266	-0,15539	-0,11079	0,01825	-0,05407	-0,00968
p	0,06564	0,55733	0,37274	0,52633	0,91713	0,75722	0,95597
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Ejakulatvolumen (60 Pat.)

	EjVol/Mot. a	EjVol/Mot.b	EjVol/Mot.c	EjVol/Mot. d	EjVol/Eosin	EjVol/TUNEL	EjVol/AO
rs	0,16362	0,10222	0,04943	-0,23713	0,1738	-0,03803	-0,04087
p	0,21563	0,44105	0,71003	0,07055	0,18803	0,77491	0,75856
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Spermienkonzentration (59 Pat.)

	SpKonz/Mot. a	SpKonz/Mot.b	SpKonz/Mot.c	SpKonz/Mot. d	SpKonz/ Eosin	SpKonz/ TUNEL	SpKonz/AO
rs	0,45295	0,35392	-0,43132	-0,45502	0,04323	-0,16786	-0,13145
p	0,00032	0,00596	0,00065	0,00029	0,74512	0,20379	0,32101
Sig	***	**	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

Morphologie (59 Pat.)

	Morph/Mot. a	Morph/Mot.b	Morph/Mot.c	Morph/Mot. d	Morph/ Eosin	Morph/ TUNEL	Morph/AO
rs	0,40171	0,55123	-0,3029	-0,63122	0,10475	-0,30847	-0,13043
p	0,00161	0,00001	0,01971	0	0,42979	0,01745	0,32479
Sig	**	***	*	***	n.s.	*	n.s.

Tabelle A013: Spearman Korrelationsanalyse von mit SF kryokonservierten Ejakulaten.
Spermienparameter, Körpergröße, Körpergewicht (KG), Hodenvolumen (HodenVolLi/HodenVolRe),
Ejakulatvolumen (EjVol), Spermienkonzentration (SpKonz) und Morphologie (Morph)

Körpergröße in cm (59 Pat.)

	Körpergröße/ Mot. a	Körpergröße/ Mot. b	Körpergröße/ Mot. c	Körpergröße/ Mot. d	Körpergröße/ Eosin	Körpergröße/ TUNEL	Körpergröße/ AO
rs	-0,08193	0,10445	0,22698	-0,04972	0,06709	0,03406	0,05505
p	0,53731	0,4311	0,08385	0,70846	0,61365	0,79785	0,67881
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Körpergewicht (59 Pat.)

	KG/Mot. a	KG/Mot. b	KG/Mot. c	KG/Mot. d	KG/ Eosin	KG/ TUNEL	KG/AO
rs	-0,01211	0,04051	0,13303	-0,0459	0,06968	-0,01242	-0,05536
p	0,92748	0,76066	0,31517	0,72992	0,59997	0,92561	0,6771
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Links (35 Pat.)

	HodenVolLi/ Mot. a	HodenVolLi/ Mot.b	HodenVolLi/ Mot.c	HodenVolLi/ Mot. d	HodenvolLi/ Eosin	HodenVolLi/ TUNEL	HodenVolLi/ AO
rs	0,10304	-0,10242	-0,30184	0,01409	0,10085	-0,30632	0,13065
p	0,55586	0,55823	0,07803	0,93597	0,56432	0,07351	0,45443
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Rechts (35 Pat.)

	HodenVolRe/ Mot. a	HodenVolRe/ Mot.b	HodenVolRe/ Mot.c	HodenVolRe/ Mot. d	HodenVolRe/ Eosin	HodenVolRe/ TUNEL	HodenVolRe/ AO
rs	0,14283	-0,1538	-0,20328	0,05103	0,09086	-0,25723	0,16771
p	0,41308	0,37772	0,24152	0,77096	0,60369	0,13577	0,33555
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Ejakulatvolumen (60 Pat.)

	EjVol/Mot. a	EjVol/Mot.b	EjVol/Mot.c	EjVol/Mot. D	EjVol/Eosin	EjVol/TUNEL	EjVol/AO
rs	-0,08567	-0,05607	0,02989	0,11484	-0,0955	-0,04618	-0,03501
p	0,51514	0,67047	0,82066	0,38228	0,46753	0,72606	0,79057
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Spermienkonzentration (59 Pat.)

	SpKonz/Mot.a	SpKonz/Mot.b	SpKonz/Mot.c	SpKonz/Mot.d	SpKonz/Eosin	SpKonz/TUNEL	SpKonz/AO
rs	0,51206	0,39566	-0,18145	-0,47267	0,54218	-0,38158	-0,13177
p	0,00003	0,00192	0,16903	0,00016	0,00001	0,00286	0,31981
Sig	***	**	n.s.	***	***	**	n.s.

Morphologie (59 Pat.)

	Morph/Mot. a	Morph/Mot.b	Morph/Mot.c	Morph/Mot. d	Morph/Eosin	Morph/TUNEL	Morph/AO
rs	0,41483	0,43041	-0,05385	-0,49894	0,45102	-0,35608	-0,12726
p	0,00109	0,00067	0,68544	0,00006	0,00034	0,00564	0,33681
Sig	**	***	n.s.	***	***	**	n.s.

Tabelle A014: Spearman Korrelationsanalyse von mit SFM kryokonservierten Ejakulaten.
Spermienparameter, Körpergröße, Körpergewicht (KG), Hodenvolumen(HodenVolLi/HodenVolRe),
Ejakulatvolumen (EjVol), Spermienkonzentration (SpKonz) und Morphologie (Morph)

Körpergröße in cm (59.Pat)

	Körpergröße/ Mot. a	Körpergröße/ Mot. b	Körpergröße/ Mot. c	Körpergröße/ Mot. d	Körpergröße/ Eosin	Körpergröße/ TUNEL	Körpergröße/ AO
rs	-0,12703	0,11158	0,17344	-0,09534	0,11818	-0,04865	-0,07974
p	0,33768	0,40014	0,18894	0,47259	0,37267	0,71443	0,54829
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Körpergewicht (59 Pat.)

	KG/Mot. a	KG/Mot. b	KG/Mot. c	KG/Mot. d	KG/Eosin	KG/TUNEL	KG/AO
rs	0,02523	0,14407	0,00406	-0,1246	0,09051	-0,02686	-0,07026
p	0,84958	0,27632	0,97567	0,34706	0,49541	0,83996	0,59694
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Links (35 Pat.)

	HodenVolLi/ Mot. a	HodenVolLi/ Mot.b	HodenVolLi/ Mot.c	HodenVolLi/ Mot. d	HodenVolLi/ Eosin	HodenVolLi/ TUNEL	HodenVolLi/ AO
rs	0,23483	0,02292	0,14223	-0,15021	0,18641	-0,22298	-0,07248
p	0,1618	0,89288	0,40104	0,37487	0,2693	0,18466	0,6699
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Rechts (35 Pat.)

	HodenVolRe/ Mot. a	HodenVolRe/ Mot.b	HodenVolRe/ Mot.c	HodenVolRe/ Mot. d	HodenVolRe/ Eosin	HodenVolRe/ TUNEL	HodenVolRe/ AO
rs	0,23483	0,02292	0,14223	-0,15021	0,18641	-0,22298	-0,07248
p	0,1618	0,89288	0,40104	0,37487	0,2693	0,18466	0,6699
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Ejakulatvolumen (60 Pat.)

	EjVol/Mot. a	EjVol/Mot.b	EjVol/Mot.c	EjVol/Mot. d	EjVol/Eosin	EjVol/TUNEL	EjVol/AO
rs	-0,16092	0,00808	0,02262	0,0135	-0,01726	-0,04001	-0,02796
p	0,21933	0,95114	0,86379	0,91843	0,89589	0,76152	0,83205
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Spermienkonzentration (59 Pat.)

	SpKonz/Mot. a	SpKonz/Mot.b	SpKonz/Mot.c	SpKonz/Mot.d	SpKonz/Eosin	SpKonz/TUNEL	SpKonz/AO
rs	0,63805	0,56707	-0,00314	-0,62186	0,67252	-0,28432	-0,06277
p	0	0	0,98115	0	0	0,02908	0,6367
Sig	***	***	n.s.	***	***	*	n.s.

Morphologie (59 Pat.)

	Morph/Mot. a	Morph/Mot.b	Morph/Mot.c	Morph/Mot. d	Morph/Eosin	Morph/TUNEL	Morph/AO
rs	0,28037	0,58703	0,1976	-0,58805	0,46117	-0,32621	-0,10158
p	0,03149	0	0,13358	0	0,00024	0,01169	0,44395
Sig	*	***	n.s.	***	***	**	n.s.

Tabelle A015: Spearman Korrelationsanalyse von mit TYB kryokonservierten Ejakulaten.
Spermienparameter, Körpergröße, Körpergewicht, Hodenvolumen, Ejakulatvolumen,
Spermienkonzentration und Morphologie

Körpergröße in cm (59.Pat)

	Körpergröße/ Mot. a	Körpergröße/ Mot. b	Körpergröße/ Mot. c	Körpergröße/ Mot. d	Körpergröße/ Eosin	Körpergröße/ TUNEL	Körpergröße/ AO
rs	0,058	0,19933	0,31919	-0,15743	0,12975	-0,03465	-0,01882
p	0,66259	0,13015	0,01373	0,23372	0,32737	0,79444	0,8875
Sig	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Körpergewicht (59 Pat.)

	KG/Mot. a	KG/Mot. b	KG/Mot. c	KG/Mot. d	KG/ Eosin	KG/ TUNEL	KG/AO
rs	-0,05403	0,17029	0,2087	-0,25968	0,11042	0,01012	-0,13535
p	0,68445	0,19723	0,11268	0,22702	0,40507	0,93934	0,30672
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Links (35 Pat.)

	HodenVolLi/ Mot. a	HodenVolLi/ Mot.b	HodenVolLi/ Mot.c	HodenVolLi/ Mot. d	HodenVolLi/ Eosin	HodenVolLi/ TUNEL	HodenVolLi/ AO
rs	0,35129	0,14658	-0,30706	-0,24731	0,12796	-0,17305	-0,05168
p	0,03852	0,4007	0,07278	0,15205	0,46382	0,32016	0,76812
Sig	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Hodenvolumen Rechts (35 Pat.)

	HodenVolRe/ Mot. a	HodenVolRe/ Mot.b	HodenVolRe/ Mot.c	HodenVolRe/ Mot. d	HodenVolRe/ Eosin	HodenVolRe/ TUNEL	HodenVolRe/ AO
rs	0,25482	0,09569	-0,27526	0,16338	0,06008	-0,07194	-0,00285
p	0,1396	0,58452	0,1095	0,34834	0,7317	0,68132	0,98704
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Ejakulatvolumen (60. Pat.)

	EjVol/Mot. a	EjVol/Mot.b	EjVol/Mot.c	EjVol/Mot. d	EjVol/Eosin	EjVol/TUNEL	EjVol/AO
rs	0,05204	-0,03084	0,03634	0,03391	-0,00213	-0,11275	-0,00738
p	0,69295	0,81507	0,78283	0,79701	0,98713	0,39105	0,95535
Sig	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Spermienkonzentration (59 Pat.)

	SpKonz/Mot.a	SpKonz/Mot.b	SpKonz/Mot.c	SpKonz/Mot. d	SpKonz/Eosin	SpKonz/TUNEL	SpKonz/AO
rs	0,53751	0,54981	-0,15332	-0,53415	0,59159	-0,21488	-0,11322
p	0,00001	0,00001	0,24632	0,00001	0	0,10219	0,39323
Sig	***	***	n.s.	***	***	n.s.	n.s.

Morphologie (59 Pat.)

	Morph/Mot. a	Morph/Mot.b	Morph/Mot.c	Morph/Mot. d	Morph/Eosin	Morph/TUNEL	Morph/AO
rs	0,44084	0,49113	0,04726	-0,46716	0,4224	-0,33674	-0,15149
p	0,00047	0,00008	0,72223	0,00019	0,00086	0,00911	0,25205
Sig	***	***	n.s.	***	***	**	n.s.

Tabelle A016: TUNEL-Optimierung der Assay-Methode am Scan-R

a) Definierte Referenzbereiche

mit R2 (definierter Reference gate= Spermienköpfe																	Akzeptiertes Range
SpzGesamt																	
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	Labor T gefärbt	
1	8381	15,4	14,6	14	13,5	12,9	12	11	10	8,9	7,6	6,8	5,8	5	4,5	4	10-16
2	12084	3,4	3,4	3,3	3,3	3,2	3,2	3,1	3	3	2,9	2,8	2,7	2,5	2,4	4,1	2,1-6,1
3	15144	14,5	13,5	12,6	11,7	10,6	9,7	8,8	7,6	6,5	5,6	4,7	4,1	3,3	2,8	2,3	6,3-10,3
4	40126	34,1	27,1	22,3	18,8	15,6	12,8	10,5	8,3	6,5	5,1	3,9	2,9	2,2	1,7	1,3	17,6-27,6
5	9329	22,5	20,8	19,4	18,1	16,6	14,9	13,7	12,3	11	9,8	8,8	7,7	6,8	6	5,3	10,6-16,6
6	25119	11,3	10,1	9,1	8,2	7,1	6,1	5,1	4,3	3,5	2,9	2,4	2,1	1,8	1,6	1,4	2,9-6,9
7	3287	45,9	44,3	42,9	41,3	39,7	38,5	37,4	36	34,6	32,9	31,6	30	28,4	26,3	24,8	10,1-16,1
8	28264	18,3	16,2	14,1	12	10,1	8,2	6,5	5,2	4,2	3,2	2,5	1,8	1,4	1	0,8	9,4-15,4
9	8448	41,2	39,3	37,3	35,3	32,8	30	26,9	24,2	21,7	19,4	17,1	15	13,2	11,6	10,1	19-29
10	7893	28,2	25,3	22,9	20,6	18,3	15,9	12	12,1	10,5	8,8	7,6	6,6	5,7	4,9	4,3	15,4-23,4
11	9218	10,8	10,3	9,8	9,3	8,8	8,3	7,6	7	6,5	6	5,6	5,1	4,6	4,1	3,8	1,4-5,4
12	40213	17,4	16,3	15,1	14	12,9	11,5	10,1	8,8	7,4	6,1	5,1	4,2	3,5	2,9	2,3	6,6-11,6
13	11636	37	35,6	33,4	31	28,1	25	22,2	19,4	16,9	14,4	12,4	10,4	9,1	7,9	6,7	12,1-20,1
14	32030	14,2	12,9	11,6	10,2	8,8	7,4	6,2	5,1	4,1	3,3	2,6	2	1,6	1,3	1	5,2-10,2
15	27432	25,1	23,6	21,7	19,5	17	14,7	12,3	10,1	8,1	6,6	5,3	4,3	3,4	2,7	2,2	16,9-26,9
16	7289	15,5	13,1	11	9,5	7,9	6,6	5,4	4,6	3,9	3,2	2,6	2,1	1,8	1,5	1,2	7,1-13,1
17	14926	17,7	15,9	14,4	13,1	11,7	10,2	8,8	7,6	6,4	5,5	4,7	4	3,4	3	2,5	2,9-6,9
18	14298	21	17,9	15,4	13,3	11,5	9,9	8,6	7,1	6	5,1	4,4	3,6	3,1	2,6	2,3	4,9-9,9
19	15069	26	24,7	23,3	21,9	20	18,1	16,3	14,3	12,5	10,7	9,2	7,7	6,6	5,6	4,8	11,7-19,7
20	15132	5,4	5,2	4,9	4,6	4,1	3,6	3,1	2,7	2,2	1,8	1,5	1,2	0,9	0,8	0,6	1,9-5,9
21	10287	17,9	14,4	12,4	10,9	9,5	8,2	7	6	5,1	4,4	3,8	3,2	2,7	2,2	1,8	9-15
22	20462	13	10,5	9,3	8,1	7,1	6,1	5,4	4,7	4,1	3,5	2,9	2,5	2,1	1,9	1,6	3,5-8,5
23	7873	25,1	23,1	20,9	19,4	16,6	15,9	14,1	12,5	11,1	9,7	8,5	7,3	6,3	5,5	4,7	10,6-16,6
24	17700	30,7	27,7	25	22,4	20,1	17,9	15,9	14	12,3	11	9,8	8,7	7,7	6,8	6	15,2-23,2
25	20897	23,2	21,3	19,3	17,5	15,7	14,1	12,3	10,9	9,5	8,3	7,1	6,1	5,2	4,3	3,6	19,9-29,9
26	31010	30,1	28,3	26,5	14,6	22,6	20,6	18,7	16,7	15	13,2	11,7	10,2	8,8	7,6	6,1	3,6-8,6
27	5475	17,8	16,9	16,1	15,2	14,4	13,4	12,4	11,1	9,9	8,7	7,5	6,3	5,3	4,4	3,8	9,7-15,7
28	40361	14,8	13,4	12,4	11,2	10	8,7	7,5	6,3	5,2	4,2	3,4	2,7	2,2	1,7	1,3	6,5-11,5
29	23710	23,7	23,2	22,7	22	21,1	20	18,8	17,6	16,2	14,7	13,1	11,7	10,4	9,3	8,2	9,4-15,4
30	44053	8,9	8,2	7,6	6,8	5,9	5	4,2	3,4	2,8	2,3	1,9	1,5	1,2	0,9	0,8	5,1-10,1
31	8381	15,4	14,6	14	13,5	12,9	12	11	10	8,9	7,6	6,8	5,8	5	4,5	4	10-16
32	64701	10,1	7,9	6,3	5	4	3,1	2,4	1,9	1,5	1,1	0,9	0,7	0,5	0,4	0,3	3,5-8,5
33	19864	31	26,3	22,2	19,2	16,5	14,2	12,5	10,9	9,5	8,2	7,2	6,3	5,5	4,7	4	5,9-10,9
34	3882	25,5	24,2	22,1	20,5	19,3	17,9	16,2	15,1	13,8	12,4	11,1	9,9	8,5	7,5	6,5	18-28
35	7804	37,6	35,8	33,8	31,3	28,6	25,3	21,6	18,7	15,5	13,2	11,2	9,6	8,3	6,9	5,8	13,2-21,2
36	10790	53,2	49,7	42,3	32,2	24,4	19,4	16,4	14,2	12,5	10,9	9,2	8,1	6,9	5,9	5,1	11,4-17,4
37	12959	12,5	10,7	9,4	8	6,8	5,9	5,1	4,3	3,6	3,1	2,7	2,2	1,9	1,7	1,4	4,4-9,4
38	9246	30,3	28,6	26,4	24,2	21,8	19,5	17,3	15,3	13,3	11,8	10,6	9,6	8,6	7,5	6,6	11,3-17,3
39	15207	21,1	18,7	16,8	14,9	13	11,4	10,1	8,9	7,9	6,8	6	5,3	4,7	4	3,4	8,9-14,9
40	11465	11	10,1	9,2	8,4	7,6	6,8	6	5,3	4,6	4,1	3,6	3	2,6	2,3	1,9	1,2-5,2
SUM	8	12	15	19	20	19	21	21	19	12	6	6	5	5	5	4	

b) Individuelle Referenzbereiche

mit R20 Individu. Reference Gate = Spermiennpop. Individuell		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	Labor T gefärbt	Akzeptiertes Range
Patienten	Spz Gesamt	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	Labor T gefärbt	Akzeptiertes Range
1	7672	13,5	12,8	12,3	11,9	11,3	10,6	9,7	8,8	7,8	6,7	5,9	5,1	4,4	3,9	3,5	13	10-16
2	10897	2,6	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,4	2,4	2,3	2,3	2,2	2,2	2,1	2	1,8	4,1	2,1-6,1
3	12486	12,5	11,6	10,8	10	9,1	8,3	7,5	6,6	5,7	4,9	4,1	3,6	3	2,5	2,1	8,3	6,3-10,3
4	41370	27,3	21,5	17,8	15,1	12,6	10,4	8,5	6,7	5,3	4,1	3,1	2,4	1,8	1,3	1	22,6	17,6-27,6
5	7121	19,3	17,6	16,5	15,4	14,3	12,9	11,9	10,7	9,6	8,8	7,9	7,1	6,3	5,7	5,1	13,6	10,6-16,6
6	21244	10,8	9,7	8,8	7,9	6,8	5,8	4,8	4,1	3,3	2,7	2,3	2	1,7	1,5	1,4	4,9	2,9-6,9
7	2494	40,3	38,7	37,6	36,4	35,1	34	33	31,6	30,2	28,5	27,2	25,6	24,3	22,3	21	13,1	10,1-16,1
8	25041	17	15	13,1	11,2	9,4	7,7	6,1	4,9	3,9	3	2,4	1,8	1,4	1	0,8	12,4	9,4-15,4
9	6529	38,5	36,7	34,8	33,1	30,7	28,2	25,3	22,8	20,5	18,4	16,2	14,4	12,8	11,2	9,8	24	19-29
10	6187	26,5	23,9	21,8	19,8	17,5	15,2	13,5	11,6	9,9	8,4	7,2	6,3	5,5	4,6	4,1	19,5	15,4-23,4
11	6749	9,4	8,9	8,4	7,9	7,4	6,9	6,4	5,8	5,4	5	4,6	4,3	3,8	3,5	3,2	3,4	1,4-5,4
12	35816	15	14	13,1	12,1	11,2	10	8,8	7,7	6,5	5,4	4,5	3,8	3,1	2,6	2,1	9,1	6,6-11,6
13	9096	35	33,7	31,5	29,2	26,5	23,5	20,8	18,2	16,1	13,7	11,8	9,8	8,6	7,4	6,3	16,1	12,1-20,1
14	21197	13,5	12,3	11,1	9,8	8,5	7,2	6,1	5,1	4,1	3,4	2,7	2,1	1,8	1,4	1,1	7,7	5,2-10,2
15	17793	22,7	21,3	19,7	17,8	15,5	13,3	11,2	9,4	7,5	6,2	5	4,1	3,3	2,6	2,1	21,9	16,9-26,9
16	5189	13,6	11	9,2	7,9	6,5	5,4	4,3	3,6	3	2,5	2	1,6	1,2	1	0,8	10,1	7,1-13,1
17	10581	16,7	14,9	13,5	12,3	11	9,6	8,2	7,2	6,1	5,3	4,5	3,8	3,3	2,9	2,4	4,9	2,9-6,9
18	9095	18,9	15,8	13,5	11,4	9,9	8,6	7,4	6	5	4,2	3,6	2,9	2,5	2,1	1,9	7,4	4,9-9,9
19	8217	23,1	21,9	21	19,8	18,5	16,9	15,4	13,5	11,8	10,2	8,8	7,4	6,3	5,4	4,5	15,7	11,7-19,7
20	7235	4,4	4,2	4	3,7	3,3	2,9	2,5	2,2	1,8	1,5	1,3	1	0,9	0,7	0,6	3,9	1,9-5,9
21	7981	16,5	13	11,4	10,2	9	7,8	6,7	5,9	4,9	4,3	3,6	3,1	2,6	2,1	1,7	12	9, - 15
22	25117	15,3	12,5	11	9,7	8,5	7,3	6,4	5,6	4,9	4,1	3,5	3	2,5	2,2	1,8	6	3,5- 8,5
23	4759	22,5	20,4	18,5	17,3	15,6	14,1	12,7	11,4	9,9	8,7	7,6	6,5	5,8	5,1	4,4	13,6	10,6-16,6
24	11898	27,6	25	22,6	20,3	18,1	16,1	14,4	12,8	11,1	10	8,9	8	7,2	6,5	5,8	19,2	15,2-23,2
25	13867	22,3	20,4	18,5	16,9	15,1	13,5	11,8	10,6	9,2	8,1	6,8	5,8	4,9	4,2	3,5	24,9	19,9-29,9
26	16119	24,7	23,1	21,7	20,1	18,4	16,6	15	13,3	11,8	10,4	9,2	7,9	6,9	5,9	5,1	6,1	3,6-8,6
27	4228	15,1	14,3	13,6	12,9	12,3	11,3	10,5	9,5	8,7	7,6	6,8	5,7	4,8	4,1	3,5	12,7	9,7-15,7
28	33244	13,1	11,8	10,9	10	8,9	7,9	6,8	5,7	4,8	3,9	3,2	2,5	2,1	1,6	1,3	9	6,5-11,5
29	19503	21,9	21,5	21	20,4	19,6	18,6	17,5	16,3	15,1	13,7	12,3	11	9,8	8,8	7,7	12,4	9,4-15,4
30	38037	7,5	7	6,4	5,8	5,1	4,3	3,6	2,9	2,4	1,9	1,6	1,3	1,1	0,8	0,7	7,6	5,1-10,1
31	7006	12,3	11,7	11,2	10,8	10	9,6	8,7	7,9	6,9	5,9	5,2	4,4	3,8	3,4	2,9	13	10-16
32	54784	9,2	7,2	5,9	4,7	3,8	3	2,4	1,9	1,4	1,1	0,8	0,7	0,5	0,4	0,3	6	3,5-8,5
33	16680	28,4	23,9	20,2	17,4	14,9	12,9	11,2	9,8	8,5	7,3	6,5	5,7	5	4,3	3,6	8,4	5,9-10,9
34	2870	23,3	22,1	20,4	19,1	18	16,7	15,3	14,3	13,2	12,1	11	10,1	8,7	7,8	6,9	23	18-28
35	6394	35,2	33,4	31,6	29,5	27	23,6	20,3	17,6	14,7	12,6	10,7	9,2	7,9	6,7	5,6	17,2	13,2-21,2
36	9242	45,6	42,4	35,9	26,6	19,5	15,1	12,6	11	9,7	8,4	7,1	6,3	5,5	4,7	4,1	14,4	11,4-17,4
37	10521	9,6	8,1	7,1	6,2	5,3	4,6	3,9	3,3	2,7	2,3	2	1,7	1,5	1,3	1,2	6,9	4,4-9,4
38	8471	26,4	25	23,4	21,5	19,4	17,5	15,5	13,5	11,7	10,4	9,3	8,4	7,6	6,6	5,8	14,3	11,3-17,3
39	11168	16,8	14,8	13,4	12	10,8	9,4	8,5	7,5	6,7	6	5,3	4,8	4,3	3,8	3,3	11,9	8,9-14,9
40	10396	9	8,1	7,4	6,8	6,1	5,4	4,7	4,1	3,5	3	2,6	2,1	1,8	1,5	1,2	3,2	1,2-5,2
SUM		10	16	20	21	25	19	19	17	13	8	7	6	6	4	3		

Tabelle A017: AO- Optimierung der Assay-Methode am Scan-R

a) Definierte Referenzbereiche

mit RS (definierte Referenzbereiche-Spermienköpfe)		Labor AO gel																				Akzeptanz								
Patienten	Spa Gesamt	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	Labor AO gel	Akzeptanz	
1	19859	29.2	26.6	23.9	21.4	19.2	17	15.3	13.8	12.3	11.2	10.2	9.3	8.4	7.7	7.1	6.7	6.2	5.8	5.4	5	4.7	4.3	4	3.7	3.4	3.2	3.2	6.4-16.4	
2	1259	43.9	43.9	43.8	43.1	42.3	41.7	40.8	39.9	38.5	37.5	35.9	34.9	33.4	32.2	31.3	30.8	29.7	28.7	28	27	26.3	25.5	25.1	24.3	23.8	23.6	23.6	23.4-53.3	
3	18656	58.4	58.3	58	57.5	56.4	54.8	52.8	50.4	47.6	45.1	42.7	40.2	38	35.8	33.9	32	30.3	28.5	27	25.7	24.5	23.3	22	21	19.8	18.9	39	29.49	
4	52825	53.2	53.2	53.1	52.8	52.4	51.7	51	50.1	49.1	48	47	46.1	45	44	43	41.9	40.9	39.9	38.9	37.9	37	36	35	34.1	33.2	32.4	36.6	26.6-66.6	
5	6158	36.1	35.7	35	34.3	33.5	32.7	31.7	30.5	29.3	28	27.1	25.6	24.6	23.7	22.8	21.8	20.8	19.9	18.9	18	17.2	16.5	15.8	15.1	14.3	13.7	41.2	31.2-51.2	
6	28023	18.2	16.3	14.5	13.1	11.9	10	9.9	9.2	8.4	7.9	7.3	6.9	6.5	6.1	5.7	5.4	5.2	4.9	4.7	4.5	4.3	4.1	3.9	3.7	3.6	3.4	8.2	3.2-13.2	
7	2496	34.7	34.4	33.9	32.9	31.7	30	27.8	26.1	24	22.4	21.3	19.8	18.6	17.2	15.7	15.2	14.3	14.1	13.7	13.1	12.3	11.9	11.3	10.8	10.5	10.4	20.2	12.7-17.7	
8	29461	59	58.3	57.5	56.2	54.7	53.1	51.2	49.3	47.5	45.7	44	42.5	40.6	39	37.5	36.2	34.9	33.8	32.6	31.4	30.4	29.3	28.3	27.3	26.3	25.3	22.3	14.8-9.8	
9	5961	45.7	45.3	45	44.3	43.5	42.4	41.1	39.4	37.9	36.3	34.8	33.6	31.9	30.5	29.3	28.3	27.2	26	25	23.9	23	22.1	21.1	20.2	19.5	19	21.3	13.8-8.8	
10	8540	34.4	34.3	34.1	33.9	33.6	33	32.4	31.6	30.6	29.6	28.5	27.5	26.4	25.1	23.9	23	21.8	20.7	19.7	18.9	18	17.2	16.3	15.7	15	14.4	12.8	7.8-17.8	
11	8817	23.1	22.9	22.5	21.9	21.3	20.4	19.4	18.2	17.2	16.1	14.9	14.1	13.2	12.5	11.6	10.9	10.4	9.8	9.2	8.7	8.2	7.7	7.2	6.6	6.2	5.8	12.3	7.3-17.3	
12	54939	27	26.8	26.6	26.2	25.7	25	24.2	23.4	22.5	21.6	20.7	19.8	19	18.2	17.4	16.7	16.1	15.5	15	14.4	14	13.5	13.1	12.7	12.2	11.7	6.1	1.1-11.1	
13	10242	20	19.5	18.5	17	15.4	13.6	12.3	11	9.7	8.8	8.2	7.6	7	6.5	6.1	5.7	5.4	5	4.7	4.5	4.2	4	3.8	3.6	3.5	3.3	8.6	3.6-13.6	
14	88159	39	37.3	34.5	31	27.1	23.4	20.2	17.6	15.3	13.4	11.8	10.6	9.5	8.6	7.8	7.1	6.4	5.9	5.4	4.9	4.5	4.1	3.7	3.4	3.1	2.9	4.2	0.8-9.2	
15	34762	19.9	19.4	18.6	17.7	16.5	15.4	14.3	13.2	12.2	11.3	10.5	9.7	9	8.2	7.7	7.2	6.7	6.2	5.7	5.3	4.9	4.6	4.2	3.9	3.6	3.3	18.5	13.5-23.5	
16	8217	18.4	17.8	16.7	15.2	13.6	11.7	9.8	8.3	6.9	5.7	4.8	4.1	3.7	3.2	3	2.7	2.6	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6	1.4	1.2	1.1	1.1	5.3	0.3-10.3	
17	20336	51.2	49.5	47.2	44.4	41.4	38.7	36	33.6	31.2	29.3	27.4	25.9	24.4	23	21.7	20.5	19.5	18.5	17.4	16.5	15.7	15.1	14.3	13.6	12.9	12.2	22	14.5-29.5	
18	14331	24.6	23.9	22.8	21.9	20.5	19	17.7	16.3	15.1	14	12.9	11.9	11	10.2	9.5	8.8	8.3	7.8	7.3	6.8	6.3	5.9	5.5	5.2	4.7	4.5	8.3	3.3-13.3	
19	11921	15.5	15	14.1	13.2	12.1	11	9.8	8.9	8.1	7.4	6.6	6.2	5.7	5.3	4.8	4.4	4.1	3.9	3.6	3.3	3.1	2.9	2.7	2.5	2.3	2.1	7	2-12	
20	14405	24.5	24.4	24.1	23.8	23.2	22.4	21.6	20.7	19.8	19	18.2	17.4	16.7	16.1	15.5	15	14.4	14	13.5	13.1	12.8	12.3	11.9	11.5	11.1	10.8	18.7	13.7-23.5	
21	63909	45.6	45.3	44.8	43.9	42.7	41.3	39.6	37.8	36.2	34.8	32.2	31	29.9	28.8	27.8	26.9	26.1	25.4	24.6	23.9	23.2	22.6	22	21.5	21	21	10.1	5.1-15.1	
22	22801	61.4	61	59.9	58	55.2	52	48.6	45.2	42	38.8	35.9	33.2	30.8	28.6	26.6	24.5	22.7	21.2	19.8	18.4	17.2	16.1	15.1	14.2	13.3	12.5	16.6	11.6-16.6	
23	5796	33.1	32.8	32.3	31.4	30.4	29.1	27.4	25.7	23.7	22.2	20.7	19.4	18.5	17.2	16.1	15	14.2	13.1	12	11.3	10.5	9.9	9.3	8.7	8.1	7.5	10.2	5.2-15.2	
24	18718	15.1	15	14.8	14.5	14	13.4	12.6	11.8	11	10	9.2	8.4	7.6	6.9	6.3	5.6	5.1	4.6	4.1	3.7	3.4	3.1	2.8	2.6	2.4	2.2	6.7	1.7-11.7	
25	19995	47.7	47.6	47.3	47	46.5	45.9	44.9	43.9	42.8	41.7	40.6	39.7	38.7	37.6	36.6	35.6	34.6	33.8	33	32.1	31.4	30.7	29.9	29.1	28.3	27.6	28.17	20.67-36.67	
26	31608	49.9	49.4	48.7	47.8	46.6	45.2	43.6	41.9	40.2	38.2	36.2	34.4	32.4	30.7	29.1	27.6	26.1	24.6	23.3	22.1	20.9	19.8	18.8	17.7	16.7	15.8	19.73	14.73-24.73	
27	4263	49.7	48.4	46.8	44.7	42.1	39.6	37.4	35.7	33.8	32.1	30.2	28.7	27.6	26.3	25	23.9	22.9	22.1	21.4	20.3	19.6	18.9	17.9	17.3	16.5	15.6	17.5	12.5-22.5	
28	32091	28.3	27.4	26.4	24.8	22.9	21	18.9	17	15.2	13.6	12.1	10.8	9.7	8.6	7.7	6.9	6.2	5.5	5	4.4	4	3.5	3.1	2.8	2.5	2.3	4.9	1.01-9.9	
29	11663	31.2	30	28.4	26.6	24.7	22.6	20.7	18.7	17.1	15.8	14.4	13.3	12.1	11.2	10.3	9.5	8.9	8.4	7.9	7.3	6.8	6.3	6	5.5	5.2	5	20.5	13-28	
30	48065	21	19.5	17.8	16	14.3	12.8	11.5	10.4	9.5	8.7	7.9	7.3	6.7	6.2	5.8	5.4	5.1	4.9	4.5	4.1	3.9	3.7	3.4	3.2	3	2.8	9.8	4.8-14.8	
31	19859	29.2	26.6	23.9	21.4	19.2	17	15.3	13.8	12.3	11.2	10.2	9.3	8.4	7.7	7.1	6.7	6.2	5.8	5.4	5	4.7	4.3	4	3.7	3.4	3.2	11.4	6.4-16.4	
32	48234	49.7	44.3	39.2	34.9	31	27.7	24.9	22.2	19.9	17.9	16.2	14.7	13.3	12.1	10.9	9.9	9	8.2	7.5	6.9	6.3	5.8	5.4	4.9	4.5	4.2	13.9	8.9-18.9	
33	14959	27.4	26.7	25.8	24.6	23.3	22	20.5	19.2	18.1	17	15.7	14.9	14.1	13.3	12.5	11.9	11.2	10.5	10	9.5	9	8.5	7.9	7.6	7.2	6.8	16.45	11.45-21.45	
34	4798	68.7	67	65.2	63.2	61.2	59.5	57.9	56.2	55	53.6	52.3	51.3	50.1	49	48.2	47.2	46.2	45.5	44.6	43.8	42.9	41.8	41	40.3	39.5	38.8	53.1	43.1-63.1	
35	5443	44	43.4	42.8	41.7	39.8	37.7	35.6	33.2	31.1	29.2	27.6	26.1	24.8	23.5	22.4	21.4	20.2	19.1	17.8	16.8	16.1	15	14.3	13.5	12.8	12	20.9	15.9-25.9	
36	11802	51.8	51.5	50.9	49.9	48.3	46.1	44	41.9	39.8	38	36	34	32.5	31.2	30	28.7	27.5	26.2	25.1	24.4	23.5	22.4	21.7	20.9	20.2	19.4	32.4	24.9-39.9	
37	7166	43.7	43.6	43.1	42.5	41.7	40.5	39.1	37.6	36	34.6	33	31.5	30.3	29.2	28.2	27.3	26.4	25.4	24.5	23.8	22.9	22.2	21.6	21.1	20.4	19.7	30.4	22.9-37.9	
38	9500	23	22.8	22.4	21.9	21.2	20.4	19.5	18.5	17.7	16.8	15.9	15.3	14.5	13.7	13.2	12.5	11.9	11.5	10.9	10.5	10.1	9.8	9.4	9	8.5	8.1	14.7	9.7-19.7	
39	13119	51.6	51.6	51.5	51.4	51.2	51	50.8	50.6	50.2	49.8	49.5	49.2	48.8	48.4	48.1	47.7	47.3	47	46.6	46.2	45.8	45.4	44.9	44.3	43.9	43.4	52.1	42.1-62.1	
40	9070	24.8	24.5	24.1	23.4	22.3	21.2	20	19	18	17	16	15	14.1	13.5	12.8	12.2	11.6	11.2	10.7	10.1	9.6	9.2	8.8	8.5	8.2	7.9	12.9	7.9-17.9	
SUM		4	4	4	6	9	11	16	16	20	23	24	25	26	27	27	30	27	28	26	25	23	23	23	19	19	18	18		

b) Individuelle Referenzbereiche

mit R25 (ind Reference Gate = Spermiogramm, individuell)																																							
Patienten	Spt Gesamt	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	Labor AO gel	Akzeptieren										
1	17088	31	28,1	25,1	22,4	20	17,6	15,8	14,1	12,6	11,4	10,3	9,4	8,4	7,7	7	6,6	6,1	5,6	5,2	4,8	4,5	4,2	3,8	3,6	3,3	3	11,4	6,4-16,4										
2	1212	44,1	44,1	44	43,2	42,6	41,9	41	40	38,6	37,5	35,9	34,8	33,3	32,2	31,2	30,7	29,6	28,7	28	27	26,3	25,6	25,2	24,3	23,9	23,7	35,3	25,3-45,3										
3	17299	57,6	57,5	57,2	56,7	55,7	54,1	52,1	49,7	46,9	44,5	42,1	39,6	37,5	35,3	33,4	31,6	29,9	28,1	26,7	25,4	24,3	23,1	21,9	20,9	19,7	18,8	39	29-49										
4	44194	54,6	54,5	54,4	54,1	53,6	52,9	52,1	51,1	50,1	48,9	47,9	46,9	45,7	44,6	43,5	42,4	41,4	40,3	39,2	38,2	37,2	36,1	35,1	34,1	33,2	32,4	36,6	26,6-46,6										
5	5381	38,7	38,2	37,5	36,7	35,9	35	33,9	32,6	31,3	29,9	28,9	27,4	26,2	25,2	24,2	23	21,9	21	19,9	19	18	17,2	16,6	15,8	14,9	14,3	41,2	31,2-51,2										
6	26949	17,9	16	14,3	12,9	11,7	10,7	9,8	9	8,3	7,8	7,2	6,8	6,4	6	5,7	5,3	5,1	4,8	4,6	4,4	4,2	4	3,9	3,7	3,5	3,4	8,2	3,2-13,2										
7	2269	36	35,7	35,2	34,1	32,8	31	28,7	26,8	24,6	22,9	21,8	20,2	19	17,5	16	15,4	14,5	14,2	13,9	13,3	12,4	12,1	11,6	11,1	10,8	10,7	20,2	12,7-27,7										
8	22885	62,9	62,2	61,4	60,2	58,6	56,9	54,9	52,9	50,9	48,9	47,1	45,2	43,4	41,7	40	38,6	37,3	36,1	34,8	33,6	32,5	31,4	30,3	29,2	28,2	27,1	22,3	14,8-29,8										
9	2352	45,2	44,9	44,5	43,9	43	41,8	40,5	38,7	37,3	35,6	34,1	32,8	31,1	29,6	28,5	27,4	26,4	25,3	24,2	23,1	22,2	21,3	20,3	19,4	18,6	18,1	21,3	13,8-28,8										
10	7194	33,7	33,5	33,4	33,2	32,9	32,4	31,8	31,1	30,1	29	27,9	26,9	25,6	24,3	23,2	22,3	21	19,9	18,9	18,1	17,4	16,5	15,8	15,2	14,5	13,9	12,8	7,8-17,8										
11	7507	22,7	22,5	22,2	21,6	20,9	20	18,9	17,8	16,8	15,7	14,6	13,7	12,7	12	11,3	10,6	10,1	9,5	8,9	8,4	7,9	7,4	6,9	6,3	5,9	5,5	12,3	7,3-17,3										
12	43564	24,5	24,3	24,1	23,6	23,1	22,5	21,7	20,9	20,1	19,2	18,4	17,6	16,9	16,2	15,6	15	14,4	13,9	13,4	12,9	12,3	11,9	11,5	11,1	10,6	10,1	6,1	1,1-11,1										
13	8973	20,6	19,7	18,6	17	15,3	13,4	12	10,8	9,5	8,5	7,9	7,4	6,7	6,2	5,8	5,4	5,1	4,7	4,4	4,2	4	3,8	3,5	3,3	3,2	3	8,6	3,6-13,6										
14	77010	39,1	37,5	34,9	31,6	27,7	24	20,8	18,1	15,7	13,8	12,3	11	9,9	9	8,2	7,4	6,8	6,2	5,7	5,2	4,7	4,3	4	3,6	3,3	3	4,2	-0,8 bis 9,2										
15	32142	20,5	19,9	19,1	18,1	16,9	15,7	14,6	13,5	12,5	11,6	10,7	9,9	9,1	8,4	7,8	7,3	6,8	6,3	5,8	5,4	5	4,7	4,3	4	3,6	3,3	18,5	13,5-29,5										
16	7632	18,3	17,6	16,5	15,1	13,4	11,5	9,6	8,1	6,7	5,5	4,6	3,9	3,5	3	2,8	2,5	2,3	2,1	1,8	1,6	1,5	1,4	1,2	1,1	1	5,3	0,3-10,3											
17	17122	50,2	48,5	46,1	43,2	40,2	37,5	34,8	32,4	30	28,2	26,4	24,8	23,4	22,1	20,8	19,6	18,7	17,7	16,6	15,8	15,1	14,4	13,7	13	12,4	11,7	22	14,5-29,5										
18	10869	24,7	24	23,1	22,1	20,7	19,1	17,9	16,5	15,2	14,1	12,9	11,9	11	10,2	9,4	8,7	8,1	7,6	7,2	6,6	6,1	5,6	5,2	4,9	4,5	4,2	8,3	3,3-13,3										
19	8909	15	14,5	13,8	12,9	11,9	10,9	9,7	8,7	7,9	7,2	6,5	6,1	5,6	5,1	4,7	4,3	4	3,7	3,4	3,1	2,9	2,7	2,5	2,3	2,1	2	7	2-12										
20	9731	22,3	22,2	21,9	21,6	21	20,2	19,4	18,6	17,7	16,9	16,2	15,3	14,6	14	13,6	13,1	12,5	12,1	11,6	11,3	11	10,6	10,2	9,9	9,5	9,2	18,7	13,7-23,5										
21	53816	47,1	46,9	46,4	45,4	44,1	42,6	40,8	38,9	37,3	35,7	34,3	33	31,7	30,5	29,4	28,3	27,4	26,6	25,8	25,1	24,3	23,6	23	22,4	21,8	21,3	10,1	5,1-15,1										
22	21161	61,5	61,1	60	58,1	55,2	51,9	48,4	44,9	41,6	38,4	35,5	32,9	30,3	28,1	26,1	24,1	22,2	20,8	19,4	18	16,7	15,7	14,7	13,8	12,9	12,2	16,6	11,6-21,6										
23	2416	35,2	34,9	34,3	33,5	32,4	31,1	29,1	27,3	25,2	23,5	21,8	20,4	19,3	17,8	16,6	15,2	14,4	13,2	11,9	11,3	10,5	9,7	9,1	8,4	7,9	7,1	10,2	5,2-15,2										
24	15993	14,9	14,8	14,6	14,3	13,8	13,1	12,4	11,5	10,6	9,7	8,8	8	7,2	6,5	5,8	5,2	4,7	4,2	3,7	3,2	2,9	2,7	2,4	2,2	2	1,9	6,7	1,7-11,7										
25	13444	53,4	53,3	53	52,6	52,1	51,3	50,2	49	47,7	46,4	45,1	44	43	41,6	40,4	39,4	38,2	37,3	36,3	35,3	34,4	33,6	32,7	31,9	31	30,2	28,17	20,97-35,67										
26	26148	50,3	49,8	49,1	48,2	47,1	45,7	44,1	42,4	40,7	38,7	36,7	34,8	32,8	31,1	29,4	27,9	26,4	24,9	23,6	22,4	21,1	20	17,9	17,9	16,8	16	19,73	14,73-24,73										
27	3441	50,7	49,4	47,8	45,6	42,8	40	37,9	36	33,9	32,1	30,1	28,5	27,2	25,8	24,5	23,4	22,3	21,5	20,7	19,5	18,9	18,2	17,3	16,8	16,2	15,3	17,5	12,5-24,5										
28	29762	28,2	27,4	26,4	24,8	23	21,1	19	17,1	15,3	13,6	12,1	10,8	9,6	8,6	7,7	6,8	6,2	5,5	4,9	4,4	3,9	3,5	3,1	2,8	2,5	2,2	4	-1,01-9,9										
29	10934	30,6	29,5	28	26,2	24,3	22,2	20,4	18,5	16,9	15,5	14,2	13,1	12	11	10,1	9,4	8,8	8,2	7,7	7,1	6,6	6,2	5,8	5,4	5,1	4,8	20,5	13-28										
30	41713	19,9	18,5	17	15,2	13,6	12,2	10,9	9,8	9	8,2	7,5	6,9	6,4	5,9	5,5	5,1	4,8	4,6	4,3	4	3,7	3,5	3,3	3,1	2,9	2,7	9,8	4,8-14,8										
31	17909	29,4	26,6	23,9	21,4	19,1	16,9	15,1	13,6	12,2	11,1	10	9,2	8,3	7,6	7	6,5	6	5,7	5,2	4,8	4,5	4,2	3,9	3,6	3,4	3,1	11,4	6,4-16,4										
32	38119	48,7	48,7	48,3	38,2	34	30,1	26,9	24,1	21,5	19,3	17,4	15,8	14,3	13	11,8	10,7	9,7	8,8	8,1	7,4	6,8	6,3	5,8	5,4	5	4,6	4,2	13,9	8,9-18,9									
33	13004	26,6	26	25,2	24,1	22,9	21,7	20,2	18,9	17,9	16,7	15,4	14,6	13,8	13,1	12,3	11,7	11,1	10,4	9,9	9,4	8,8	8,3	7,8	7,4	7,1	6,6	16,45	11,45-21,45										
34	3465	77,5	75,9	73,9	71,7	69,6	67,7	65,7	63,7	62,3	60,7	59,2	57,9	56,5	55,2	54,2	53	51,8	50,9	49,8	49,1	48	46,7	45,8	44,9	44,1	43,1	53,1	43,1-63,1										
35	4143	44,9	44,4	43,8	42,7	40,5	38,2	35,9	33,1	31	28,9	27,4	25,7	24,3	22,9	21,7	20,6	19,3	18	16,8	15,8	15,2	14,1	13,3	12,5	11,8	11	20,9	15,9-25,9										
36	8725	52,9	52,5	52	51	49,4	47	44,6	42,2	40	38,1	36	33,8	32,3	31	29,8	28,5	27,3	26	24,8	24,1	23,1	22	21,3	20,5	19,7	18,9	32,4	24,9-39,9										
37	4646	47,8	47,7	47,4	46,6	45,8	44,6	42,8	41	39	37,3	35,6	34	32,5	31,2	30,1	29,1	28	27	25,9	25,2	24,4	23,7	23	22,4	21,7	20,9	30,4	22,9-37,9										
38	6004	22,5	22,4	22	21,6	21	20,3	19,3	18,3	17,6	16,6	15,7	15	14,2	13,3	12,9	12,2	11,5	11,1	10,6	10,2	9,9	9,6	9,3	8,9	8,4	8	14,7	9,7-19,7										
39	7775	58,4	58,3	58,2	58	57,8	57,5	57,2	56,8	56,4	56	55,6	55,2	54,7	54,3	53,8	53,3	53	52,6	52	51,5	51	50,4	49,7	49,3	48,7	52,1	42,1-62,1											
40	8697	24,4	24,1	23,8	23,1	22	20,9	19,8	18,7	17,7	16,7	15,8	14,8	13,9	13,3	12,6	12,1	11,5	11	10,5	10	9,4	9	8,6	8,4	8,1	7,7	12,9	7,9-17,9										
SUM		5	5	6	7	9	10	15	17	20	23	24	25	26	27	27	28	25	24	24	24	24	24	22	19	20	20	19											

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schneider für die wohlwollende Begleitung dieser Dissertation bedanken. Sein wissenschaftliches Interesse, die konstruktive Kritik und die stets offene Tür haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Kathrein von Kopylow die mich mit großem Engagement, fachlicher Expertise und viel Geduld durch alle Phasen der Arbeit begleitet hat. Ihre Unterstützung war für den Fortschritt und die Qualität dieser Dissertation von großem Wert.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Armin Soave für die Begutachtung der Arbeit.

Für die hervorragende Zusammenarbeit danke ich den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Andrologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Insbesondere Frau Dr. Andrea Salzbrunn, Frau Katrin Laubis, Frau Gaby Hahn, Frau Nala Blenck, Frau Marta Agnieszka Godlewska, Herrn Peter Kohlmannslehner und Frau Stefanie Steinert deren technische Unterstützung im Labor maßgeblich zum Erfolg der experimentellen Arbeiten beigetragen hat.

Ich danke zudem allen Probanden und Patienten, die durch ihre Teilnahme an der Studie einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

9. Erklärung des Eigenanteils

Hiermit erkläre ich, Emilia Lula Kruschel, folgenden Eigenanteil an der Promotionsarbeit: Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Entwicklung eines optimierten Protokolls zur Kryokonservierung humaner Spermien zur Vermeidung verfahrensbedingter DNA-Schäden der Spermien“ entstand während meiner wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung für Andrologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf mit Herrn Prof. Dr. Schneider als Doktorvater und Frau Dr. rer. nat. Kathrein als Betreuerin. Ich war maßgeblich an der Konzeption und Methodenentwicklung für die Untersuchungen beteiligt. Dies umfasste sowohl die Formulierung der Forschungsfrage als auch die Auswahl der methodischen Herangehensweise. Die Rekrutierung der gesunden Probanden wurde eigenständig von mir durchgeführt. Ebenso erfolgte die Organisation und Dokumentation der Einwilligungserklärungen in Eigenverantwortung. Die experimentelle Durchführung der DNA-Untersuchungen, einschließlich der Färbungen (TUNEL und AO) sowie die Aufnahme und Auswertung am automatisierten High-Content Imaging-System ScanR, wurde von mir durchgeführt. Auch die Optimierung des verwendeten Assays (inkl. Gating Strategie) erfolgte in enger Abstimmung mit Frau Stefanie Steinert, wurde jedoch von mir selbstständig umgesetzt.

Die Durchführung der verschiedenen Methoden der Kryokonservierung sowie das Auftauen der Ejakulatproben erfolgt ebenfalls eigenständig. Die Analyse der Spermioogramm-Parameter (Vitalität, und Motilität) wurde durch das Team der Andrologie (Frau Laubis, Frau Hahn und Frau Blenck) nach WHO-Standard durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden von mir übernommen, statistisch ausgewertet und in die Arbeit integriert.

Die Datenaufbereitung, statistische Analyse und Interpretation der Ergebnisse erfolgten eigenständig unter Anwendung geeigneter wissenschaftlicher Methoden.

Vor Verfassen des Manuskriptes wurde eine umfassende Literaturrecherche zu Spermien-DNA-Schäden, Kryokonservierungstechniken und deren Einfluss auf die Spermienqualität durchgeführt. Die Erstellung der Tabellen und Abbildungen erfolgte eigenständig. Das Manuskript wurde nach vollständiger Auswertung der Daten von mir selbstständig verfasst. Der gesamte Prozess - von Datenerhebung über die Analyse bis hin zur Verschriftlichung - wurde durch Frau Dr. rer. nat. von Kopylow begleitet und supervidiert. Fachliche Rückmeldungen und kritische Anmerkungen zur Konzeption und Interpretation wurden von ihr und Frau Dr. Salzbrunn eingebracht. Die Einschätzung meines Eigenanteils wurde mit meiner Betreuerin abgestimmt.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den 20.07.2025

Unterschrift

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a cursive 'el'.