

# Masterarbeit

Auswirkungen der Vitrifikation von humanen  
Samenzellen auf den DNA-Fragmentationsindex,  
Motilität und Vitalität  
Methodenetablierung in einem IVF-Labor

eingereicht von  
**Sophie Wanderer, BSc.**

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc) an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des  
Universitätslehrgangs Master of Science Medizinische Genetik

unter der Anleitung von Univ. -Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner

Wien, 19. Juni 2022

## **Abstract**

This thesis deals with the comparison of the effects on sperm cells in terms of motility, viability and DNA fragmentation index (DFI), which occur through the process of vitrification, a special process of cryopreservation. Sperm cryopreservation is a widely used method in assisted reproductive technology (ART) to obtain sperm cells from men and represents a therapeutic solution for patients suffering from cancer or undergoing hormonal therapy. Precautionary cryopreservation of sperm is currently the only clinically available technique for preserving male gametes and allowing later fertility treatment. In this thesis, the ejaculate of sperm donors was analyzed before and after vitrification, in order to compare the effects of cryopreservation. Motility was determined using the Makler counting chamber, which enables determination of concentration and motility at the same time. The viability of the sperm cells was determined using an eosin-negrosine test. A Halosperm® was then carried out to determine the DFI.

The results of the motility and viability determination as well as the DFI showed a significant difference before and after vitrification, with a decrease in motility and viability and an increase in DNA fragmentation of the sperm cells. From the results it can be concluded that the vitrification and the subsequent thawing leads to cellular damage, which is associated with reduced motility, viability and DNA integrity.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass die vorliegende Masterarbeit von mir selbst ohne fremde Hilfe verfasst wurde, ich keine anderen als die angeführten Behelfe verwendet bzw. mich auch sonst keiner unerlaubter Hilfe bedient habe und die den benutzen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Bachelorarbeit bisher weder im In- noch im Ausland (einer Beurteilerin/einem Beurteiler zur Begutachtung) in irgendeiner Form als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Weiters versichere ich, dass die von mir eingereichten Exemplare (ausgedruckt und elektronisch) identisch sind.

Datum: 19. Juni 2022

Unterschrift: e.h. Sophie Wanderer

## **Vorwort**

Zur Erlangung des akademischen Grades „Master of Science“ übte ich meine empirische Forschungsarbeit im Bereich der Reproduktionsmedizin im Kinderwunschzentrum an der Wien aus.

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung während meines Studiums und dem Verfassen dieser Arbeit begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner, welcher mich von Beginn an bei der Verfassung dieser Arbeit begleitet und unterstützt hat. Ein herzliches Dankeschön auch an die Firma IVF-Express, welche mir die in dieser Arbeit verwendeten Vitrifikationsstraws kostenlos zur Verfügung gestellt hat.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Oma Brigitte, welche mir dieses Studium ermöglichte, sowie meiner Mutter Karin und meiner Schwester Mielle, welche mich während des gesamten Studiums stets unterstützten.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Humanes Spermium .....	2
1.2. Samenanalyse .....	4
1.2.1. Basisuntersuchung.....	4
1.2.2. Referenzwerte und Nomenklatur .....	6
1.2.3. Erweiterte Analysen .....	8
1.2.4. Weiterführende Untersuchungen .....	9
1.3. Kryokonservierung.....	10
1.3.1. Slow-Freezing .....	10
1.3.2. Vitrifikation.....	11
1.4. DNA-Fragmentation.....	12
1.5. Problemstellung .....	13
1.6. Fragestellung .....	14
1.7. Ziel .....	14
1.8. Statistik .....	15
1.8.1. Hypothesen .....	15
1.8.2. Datenauswertung.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Samenanalyse und -aufbereitung.....	16
2.1.1. Makroskopische Analyse .....	16
2.1.2. Mikroskopische Analyse.....	16
2.1.3. Vitalitätsbestimmung mittels Eosin-Nigrosin-Färbung.....	18
2.1.4. Samenaufbereitung .....	19
2.2. Vitrifikation .....	20
2.2.1. CBS™ High Security Straws .....	20
2.2.2. Vitrifikationsmedium .....	21

2.2.3. Durchführung .....	21
2.3. Auftauen .....	21
2.4. Halosperm®.....	22
3. Ergebnisse .....	26
3.1. Ergebnisse der Motilitätsbestimmung.....	28
3.2. Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung .....	30
3.3. Ergebnisse des DNA-Fragmentationsindex.....	33
4. Zusammenfassung.....	35
5. Diskussion .....	37
Literaturverzeichnis .....	41
Anhang .....	44

## Abkürzungsverzeichnis

ART	assistierte Reproduktionstechnologie
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CPA	kryoprotektive Additive
DFI	DNA-Fragmentationsindex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IB	Immunobead
MAR	Mixed Antiglobulin Reaction
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDF	Spermien-DNA-Fragmentierung
TEST	TES-Puffer und Trizma-Base
TYB	TEST-Yolk Buffer
WHO	World Health Organisation

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spermatogenese adaptiert nach Thomas Weyerstahl: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, Thieme, 4. Auflage, 2013 .....	3
Abbildung 2: Aufbau einer humanen Samenzelle adaptiert nach Mariana Ruiz Villarreal: Human Spermatozoa. 2006 .....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Samenzellen zur Beurteilung des Halosperm® .....	25
Abbildung 4: Darstellung von Samenzellen mittels Halosperm® .....	25
Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichung der Motilität vor und nach Vitrifikation .....	28
Abbildung 6: Gesamtmotilität vor und nach der Vitrifikation .....	29
Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichung der Vitalität vor und nach Vitrifikation .....	30
Abbildung 8: Vitalität und Motilität vor der Vitrifikation .....	31
Abbildung 9: Vitalität und Motilität nach der Vitrifikation .....	32
Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichung des DFI's vor und nach Vitrifikation .....	33

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Referenzwerte Normozoospermie (WHO 2021).....	6
Tabelle 2: Nomenklatur der Ejakulatparameter .....	7
Tabelle 3: Dichtegradient 90% .....	19
Tabelle 4: Dichtegradient 45% .....	19
Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung der Motilität vor und nach Vitrifikation.....	28
Tabelle 6: p-Werte der Ergebnisse der Motilität vor und nach Vitrifikation.....	29
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung der Vitalität vor und nach Vitrifikation.....	30
Tabelle 8: p-Werte der Ergebnisse der Vitalität vor und nach Vitrifikation .....	31
Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung des DFI's vor und nach Vitrifikation .....	33
Tabelle 10: p-Werte der Ergebnisse des DFI's vor und nach Vitrifikation .....	34

## **Kurzfassung**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich der Effekte auf Samenzellen hinsichtlich der Motilität, Vitalität und DNA-Fragmentationsindex (DFI), welche durch das Verfahren der Vitrifikation, einem speziellen Verfahren der Kryokonservierung, auftreten. Die Kryokonservierung von Spermien ist in der assistierten Reproduktionstechnologie (ART) eine weitverbreitete Methode, um Samenzellen von Männern zu erhalten und stellt eine therapeutische Lösung für Patienten dar, welche an einer Krebserkrankung leiden oder sich einer Hormontherapie unterziehen. Die vorsorgliche Kryokonservierung von Spermien ist derzeit die einzige klinisch verfügbare Technik zum Erhalt männlicher Gameten und ermöglicht eine Kinderwunschbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt. Um den Vergleich der Effekte der Vitrifikation zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das Ejakulat von Samenspendern jeweils vor und nach der Vitrifikation analysiert. Die Motilitätsbestimmung erfolgte mithilfe der Maklerkammer, welche eine gleichzeitige Konzentrations- und Beweglichkeitsbestimmung ermöglicht. Die Vitalität der Samenzellen wurde mittels einem Eosin-Negrosin-Test bestimmt. Um den DFI zu bestimmen, wurde anschließend ein Halosperm<sup>®</sup> durchgeführt.

Sowohl die Ergebnisse der Motilitäts- und Vitalitätsbestimmung, als auch des DFI's zeigten einen signifikanten Unterschied jeweils vor und nach der Vitrifikation, wobei es zu einer Abnahme der Beweglichkeit und Vitalität kam und zu einer Zunahme der DNA-Fragmentationen der Samenzellen. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass es durch die Vitrifikation und dem anschließenden Auftauen zu zellulären Schädigungen kommt, welche mit einer verminderten Motilität, Vitalität und DNA-Intaktheit einhergehen.

## **Abstract**

This thesis deals with the comparison of the effects on sperm cells in terms of motility, viability and DNA fragmentation index (DFI), which occur through the process of vitrification, a special process of cryopreservation. Sperm cryopreservation is a widely used method in assisted reproductive technology (ART) to obtain sperm cells from men and represents a therapeutic solution for patients suffering from cancer or undergoing hormonal therapy. Precautionary cryopreservation of sperm is currently the only clinically available technique for preserving male gametes and allowing later fertility treatment. In this thesis, the ejaculate of sperm donors was analyzed before and after vitrification, in order to compare the effects of cryopreservation. Motility was determined using the Makler counting chamber, which enables determination of concentration and motility at the same time. The viability of the sperm cells was determined using an eosin-negrosine test. A Halosperm® was then carried out to determine the DFI.

The results of the motility and viability determination as well as the DFI showed a significant difference before and after vitrification, with a decrease in motility and viability and an increase in DNA fragmentation of the sperm cells. From the results it can be concluded that the vitrification and the subsequent thawing leads to cellular damage, which is associated with reduced motility, viability and DNA integrity.

## 1. Einleitung

Die Kryokonservierung von Spermien ist in der assistierten Reproduktionstechnologie (ART) eine weitverbreitete Methode, um Samenzellen von Männern zu erhalten, welche beispielsweise von einer hochgradigen Oligozoospermie oder Ejakulationsstörungen betroffen sind und stellt unter anderem eine therapeutische Lösung für Patienten dar, welche an einer Krebserkrankung leiden oder sich einer Hormontherapie unterziehen. Die vorsorgliche Kryokonservierung von Spermien ist derzeit die einzige klinisch verfügbare Technik zum Erhalt männlicher Gameten und ermöglicht eine Kinderwunschbehandlung zu einem späteren Zeitpunkt. Durch die reprotoxische Wirkung dieser Behandlungen können diese in einer therapiebedingten Infertilität resultieren. R. G. Bunge und J. K. Sherman versuchten erstmals 1953 durch kryokonservierte Samenzellen eine Lebendgeburt bei Menschen zu erzielen. Hierbei verwendeten sie eine Methode, bei welcher Trockeneis eingesetzt und als Kryoprotektivum Glycerol verwendet wurde<sup>1</sup>. Bei dieser Methode handelte es sich um das sogenannte Slow-Freezing, bei welchem die Zellen durch langsames und schrittweises Abkühlen der Umgebungstemperatur eingefroren werden. Ein weiteres Verfahren der Kryokonservierung ist die Vitrifikation. Hierbei werden die Proben durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff rapide auf  $-196^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Da bei der Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen die Vitrifikation den Goldstandard darstellt<sup>2</sup> soll nun auch versucht werden, eine geeignete Vorgehensweise dieser Methode für Spermien zu entwickeln.

Trotz des Vorteils der Kryokonservierung ist bekannt, dass das Einfrieren und anschließende Auftauen, für die Spermien schädlich ist. So verursacht dieses Verfahren eine signifikante Abnahme der Motilität, Vitalität, Chromatinstabilität und Membranintegrität und verursacht morphologische Veränderungen der Samenzellen<sup>3</sup>. Dieser Verlust der Spermienqualität ist besonders bei Patienten, deren Spermienparameter von vornherein eingeschränkt sind, signifikant<sup>4</sup>. Des Weiteren kann eine Kryokonservierung von Samenzellen auch Schäden der Desoxyribonukleinsäure (DNA) induzieren. Durch Schäden an der mitochondrialen Membran wird der Prozess der Energieproduktion unterbrochen, was zu einer verringerten Adenosintriphosphat (ATP)-Verfügbarkeit in den Spermien führt<sup>3</sup>. Aus ATP entsteht durch Adenylyl Cyclase das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)<sup>5</sup>. cAMP ist für Ereignisse, die während der Kapazitation auftreten, einschließlich der

Aktivierung der Motilität, Änderungen im Motilitätsmuster, die als Hyperaktivierung bekannt sind, und für die Entwicklung der Fähigkeit, die Akrosomreaktion einzugehen, wesentlich<sup>5</sup>. Somit kann eine reduzierte ATP-Verfügbarkeit mit einer Verringerung der Beweglichkeit der Samenzellen einhergehen. Die Unversehrtheit der Spermien scheint der entscheidende Faktor für den Erfolg der Befruchtung sowohl bei natürlichen als auch bei assistierten Reproduktionsmethoden zu sein<sup>6</sup>.

## **1.1. Humanes Spermium**

Bei männlichen menschlichen Individuen kommt es gleichzeitig mit Eintreten der Pubertät zur Spermienproduktion und -reifung, der sogenannten Spermatogenese. Die Keimstränge im kindlichen Hoden entwickeln beim Eintreten der Pubertät ein Lumen und entwickeln sich zu Samenkanälchen, den sogenannten Tubuli seminiferi corti, in dessen Basalmembran sich die Spermatogonie, welche die lokale männliche Stammzelle darstellt, befindet. Im Laufe der Spermatogenese reifen die Spermatogonien heran und wandern immer weiter Richtung Lumen. Dabei werden unterschiedliche Entwicklungsstadien durchlaufen, welche sich in die Mitose, Meiose und Spermiohistogenese unterteilen lassen. Unter der Mitose der Spermatogenese versteht man die Vermehrungsphase. Im Zuge dieser Phase kommt es einerseits zur mitotischen Teilung der Spermatogonien, welche eine anschließende Reifung zum Spermium durchlaufen, andererseits kommt es bei einem Teil der Spermatogonien zu einer homonymen mitotischen Teilung, wodurch die Aufrechterhaltung der Stammzellenpopulation gesichert wird. Diejenigen Spermatogonien, welche zur weiteren Reifung bestimmt sind, teilen sich heteronym, wobei die so entstehenden Tochterzellen durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden bleiben und teilen sich anschließend noch einmal mitotisch. In der Phase der Spermiohistogenese reifen die Spermatiden in den Hodenkanälchen zu befruchtungsfähigen Spermatozyten heran.

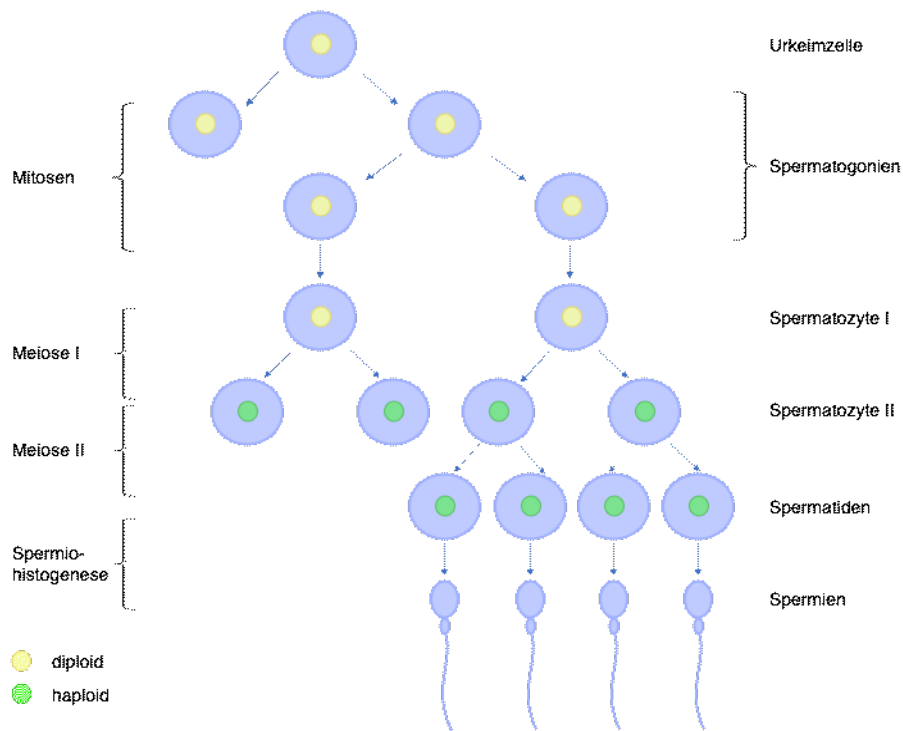


Abbildung 1: Spermatogenese *adaptiert nach Thomas Weyerstahl: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, Thieme, 4. Auflage, 2013*

Im Zuge dessen werden die Spermatoziden elongiert, der Zellkern kondensiert und es kommt zur Bildung des Akrosoms aus dem Golgi-Apparat. Des Weiteren kommt es zur Einlagerung der Mitochondrien in das Mittelstück und zur Bildung einer Geißel, dem Kinozilium, wodurch sich das Spermium schlussendlich selbstständig fortbewegen kann.

Über die Samenkanälchen wandern die Spermien in den Ductus epididymidis, den Nebenhodengang, in welchem die Ausreifung abgeschlossen wird. Hier wird das ausgereifte, unbewegliche Spermatozoon bis zur Ejakulation gespeichert. Erst durch den Kontakt der Spermien mit der Samenflüssigkeit des Ejakulats werden die Spermien durch den alkalischen pH-Wert aktiviert und beweglich. Durch die in der Samenflüssigkeit enthaltenen Fructose werden die Samenzellen mit Energie versorgt. Die Spermatogenese umfasst die Bildung der Spermato gonie, welche die lokale männliche Stammzelle darstellt, im Keimepithel der Tubuli seminiferi des Hodens.

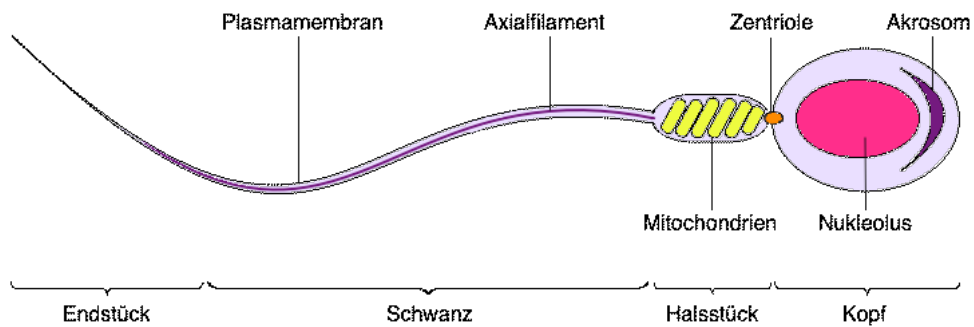


Abbildung 2: Aufbau einer humanen Samenzelle *adaptiert nach Mariana Ruiz Villarreal: Human Spermatozoa. 2006*

## 1.2. Samenanalyse

Das Laborhandbuch der World Health Organisation (WHO) zur Untersuchung von menschlichem Samen und der Sperma-Zervixschleim-Interaktion wurde erstmals 1980, als Antwort auf einen wachsenden Bedarf der Standardisierung von Verfahren zur Untersuchung menschlichen Ejakulats, veröffentlicht. Das Handbuch wurde seitdem viermal überarbeitet (2-5) und in mehrere Sprachen übersetzt. Im Jahr 2021 wurde das Handbuch abermals überarbeitet, wodurch Version 6 nun die aktuelle Ausgabe ist.

Der Teil der Samenanalyse ist in drei Kapitel geteilt: Basisuntersuchungen, welche Routineverfahren für die Bestimmung von Samenparametern sind und von jedem Labor durchgeführt werden können, welche Samenanalysen anbieten; erweiterte Analysen, welche in ausgewählten Laboratorien angeboten werden; und weiterführende Untersuchungen, die derzeit nicht routinemäßig Anwendung bei der Erstbeurteilung der männlichen Fertilität finden.

### 1.2.1. Basisuntersuchung

Bei der Basisuntersuchung wird neben der Anzahl, der Beweglichkeit und der Morphologie der Samenzellen auch das Volumen, die Farbe, die Verflüssigungszeit, die Viskosität und der pH-Wert des Ejakulats bestimmt.

Die Anzahl der Spermien spiegelt die Spermienproduktion in den Hoden wider, die Durchgängigkeit des posttestikulären Gangsystems, die Wirksamkeit der

Muskelkontraktionen der Nebenhoden und Vasa deferentia, und die Erektions- und Ejakulationseffizienz, um ein spermienreiches Ejakulat auszustoßen.

Nach der makroskopischen Analyse der Farbe, Verflüssigungszeit und Viskosität, sowie der pH-Wert-Messung und Volumenbestimmung, findet die mikroskopische Analyse statt. Durch die Anfertigung eines feuchten Präparates lässt sich die Anzahl, die Beweglichkeit und der Verdünnungsfaktors bestimmen, welcher für die Beurteilung der Konzentration benötigt wird. Außerdem lässt sich das Vorhandensein von Rundzellen, Agglutinationen und Aggregaten bestimmen, welche durch die erweiterte Analyse untersucht werden können.

Bei Agglutinationen handelt es sich um bewegliche Spermien, die aneinanderhaften. Dabei können sie Kopf an Kopf, Schwanz an Schwanz oder Kopf an Schwanz zusammenhaften<sup>7</sup>. Die Samenzellen zeigen oft eine kräftige und hektische Schüttelbewegung, können jedoch manchmal auch so agglutiniert sein, dass ihre Bewegung eingeschränkt ist. Bewegliche Spermien, die an Zellen oder Trümmern haften, oder unbewegliche Spermien, die aneinanderhaften werden als Aggregate bezeichnet und sollten nicht als Agglutination gewertet werden<sup>7</sup>.

Nach der Konzentrationsbestimmung lässt sich anhand der ermittelten Zahl und des Ejakulatvolumens die Gesamtzahl der Spermien pro Ejakulat bestimmen. Da die Gesamtzahl an Spermien mehr Aussagekraft als die Konzentration selbst hat, ist es wichtig, dass das Volumen genau gemessen wird<sup>7</sup>.

In der neuesten Ausgabe des Laborhandbuchs der WHO wird wieder empfohlen, die Motilität der Samenzellen genauer zu beurteilen, da die Abwesenheit bzw. Anwesenheit von schnell progressiven Samenzellen von klinischer Bedeutung ist. So wird diese wieder kategorisiert in schnell progressiv beweglich (Grad A), langsam progressiv beweglich (Grad B), nicht progressiv beweglich (Grad C) und unbeweglich (Grad D)<sup>7</sup>.

Auch die Morphologie der Samenzellen soll genauer beurteilt werden, da die Spermienmorphologie nicht nur ein prognostischer Wert in Bezug auf spontane Schwangerschaften oder den Ausgang einer assistierten Reproduktionstherapie ist, sondern auch diagnostische Informationen über den Funktionszustand der männlichen Fortpflanzungsorgane, hauptsächlich der Hoden und Nebenhoden gibt<sup>7</sup>. Für die Beurteilung der männlichen Geschlechtsorgane reicht es nicht aus, nur den Anteil

normalgeformter Spermien zu bestimmen. Es ist wichtig, die spezifische Morphologie von Kopf, Hals/Mittelstück und Schwanz sowie das mögliche Vorhandensein abnormaler zytoplasmatischer Rückstände zu bewerten<sup>7</sup>.

### 1.2.2. Referenzwerte und Nomenklatur

Die Samenqualität wird als Maß für die männliche Fruchtbarkeit in der klinischen Andrologie, der Reproduktionstoxikologie, der Epidemiologie und der Bewertung des Schwangerschaftsrisikos herangezogen<sup>8</sup>. Um Entscheidungen in der Patientenbehandlung treffen zu können, ist es notwendig die erhobenen Parameter der Samenanalyse mit definierten Referenzwerten zu vergleichen<sup>9</sup>. Die Referenzwerte, welche im WHO Laborhandbuch (2021) angegeben werden, wurden bereits in Version 5 (2010) erwähnt und wurden in prospektiven Studien bezüglich der Beurteilung der Samenqualität und Fertilität ermittelt<sup>9</sup>. Dabei wurde die Fertilität als Erzielung einer Schwangerschaft der Partnerin innerhalb von 12 Monaten nach Beendigung einer Kontrazeption definiert<sup>8</sup>. Für die Ermittlung der Referenzwerte wurden Daten einer fruchtbaren Population verwendet, aus denen eine Fertilitätsprognose oder eine Unfruchtbarkeitsdiagnose extrapoliert werden kann<sup>8</sup>. Als Grenzwert der Referenzwerte wurde die untere 5%-Perzentile der ermittelten Werte fertiler Probanden festgelegt.

Tabelle 1: Referenzwerte Normozoospermie (WHO 2021)

Parameter	Referenzwert
Karenztage	2-7 Tage
Ejakulatvolumen	≥ 1,5ml
Konzentration	≥ 1,6Mio/ml
Gesamtzahl	≥ 16Mio/ml
Spermiengesamtmotilität (a+b+c)	≥ 42%
Progressive Spermienmotilität (a+b)	≥ 30%
Morphologie: Normalformen	≥ 4%
Vitalität	≥ 54%
Leukozyten	≤ 1Mio/ml

Anhand der erhobenen Parameter lässt sich, abhängig vom jeweiligen eingeschränkten Wert, folgende Nomenklatur anwenden:

Tabelle 2: Nomenklatur der Ejakulatparameter

<b>Nomenklatur</b>	<b>Definition</b>
Aspermie	kein Ejakulat (keine oder retrograde Ejakulation)
Asthenozoospermie	Prozentsatz der progressiv beweglichen Samenzellen unterhalb des Referenzwertes
Asthenoteratozoospermie	Kombination aus Prozentanteile von sowohl progressiv-motilen Spermien (PR) und morphologisch normalen Spermatozoen unterhalb der unteren Referenzwerte
Azoospermie	Keine Samenzellen im Ejakulat
Globozoospermie	Fehlendes Akrosom des Spermienkopfes
Hämatospermie	Vorhandensein von Erythrozyten im Ejakulat
Kryptozoospermie	Samenzellen erst nach Zentrifugation nachweisbar
Leukospermie	≥1Mio/ml Leukozyten im Ejakulat
Nekrozoospermie	Ausschließlich immotile Samenzellen im Ejakulat nachweisbar
Normozoospermie	Konzentration/ Gesamtzahl, Prozentsatz an progressiv beweglichen als auch morphologisch normalgeformten Samenzellen ist gleich oder über dem jeweiligen Referenzbereich
Oligoasthenoteratozoospermie	Konzentration/ Gesamtzahl, Prozentsatz an progressiv beweglichen als auch morphologisch normalgeformten Samenzellen ist unterhalb dem jeweiligen Referenzbereiches

Oligoasthenozoospermie	Konzentration/ Gesamtzahl, Prozentsatz an progressiv beweglichen ist unterhalb dem jeweiligen Referenzbereiche
Oligoteratozoospermie	Konzentration/ Gesamtzahl, Prozentsatz an morphologisch normalgeformten Samenzellen ist unterhalb dem jeweiligen Referenzbereiches
Oligozoospermie	Konzentration/ Gesamtzahl ist unterhalb dem jeweiligen Referenzbereiche
Teratozoospermie	Prozentsatz an morphologisch normalgeformten Samenzellen ist unterhalb des Referenzbereiches

### 1.2.3. Erweiterte Analysen

Erweiterte Analysen sind bei routinemäßigen Spermienanalysen nicht erforderlich, können aber für diagnostische oder Forschungszwecke nützlich sein. So sollte bei Vorhandensein von Agglutinationen ein sogenannter Mixed Antiglobulin Reaction (MAR)-Test oder ein Immunobead (IB)-Test durchgeführt werden, um die Präsenz von Antikörper gegen Permatozoen zu testen. Auch die Beurteilung unreifer Keimzellen, wie runde Spermatiden und Spermatozyten, im Ejakulat sollte durchgeführt werden. Sie können in gefärbten Samenabstrichen nachgewiesen werden.

Als weiterführende Analyse wird auch die Bestimmung von DNA-Schäden der Samenzellen beschrieben. Unter diesen Veränderungen ist die Spermien-DNA-Fragmentierung (SDF) eine der häufigsten Störungen, die das Erbgut in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen schädigen. Diese kann durch verschiedene Prozesse ausgelöst werden, wie die fehlerhafte Verpackung der DNA während der Spermatogenese und apoptotische Prozesse und oxidativen Stresses, die mit mehreren pathologischen Vorkommnissen und Umweltbedingungen in Verbindung gebracht werden können<sup>7</sup>.

In den letzten 15 Jahren wurde immer deutlicher, dass ein erheblicher Prozentsatz männlicher Unfruchtbarkeit eine genetische oder genomische Grundlage, wie Chromosomenanomalien und Genmutationen, hat. Da die Methodik der meisten genetischen Analysen nicht spezifisch für Samendefekte ist, werden genetische Analysen grundsätzlich in einem genetischen Labor durchgeführt. Eine Ausnahme

stellt jedoch der Test auf Spermienaneuploidien dar, welcher mithilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt werden kann. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine zytogenetische Methode, die die Häufigkeit von Chromosomenanomalien bewertet. Die Chromosomen X, Y, 13, 18 und 21 werden im Spermien-Aneuploidie-Test gemessen, da Aneuploidien in diesen Chromosomen mit einem lebensfähigen, aber betroffenen Nachwuchs assoziiert sind (Klinefelter-Syndrom [XXY-XXXXY], Turner-Syndrom [XO], Patau-Syndrom [Trisomie 13], Edwards [Trisomie 18] und Down-Syndrom [Trisomie 21])<sup>7</sup>.

#### **1.2.4. Weiterführende Untersuchungen**

Oft ist die Ursache der männlichen Unfruchtbarkeit auf eine unzureichende Spermienproduktion, eine eingeschränkte Spermienmotilität oder Spermienmorphologie, oder Kombinationen davon zurückzuführen. Diese Parameter werden bei der Basisuntersuchung der Samenanalyse bereits aufgedeckt. Die Unfruchtbarkeit liegt jedoch häufig einer Funktionsstörung der Samenzelle zugrunde. So können alle erhobenen Parameter einer Normozoospermie entsprechen und der Grund für die Dysfunktion der Samenzellen verborgen bleiben. Spermien erwerben die meisten Fähigkeiten, welche zu einer funktionstüchtigen Samenzelle führen, erst im weiblichen Genitaltrakt während eines Reifungsprozesses, der Kapazitation. Diese Spermienfunktionen sind zwar für die Befruchtung unerlässlich, werden aber bei einer Basisanalyse des Ejakulats nicht beurteilt.

Um Anomalien der Spermienfunktion zu untersuchen, können weiterführende Analysen angestellt werden. So kann beispielsweise der oxidative Stress in Samenzellen oder Seminalplasma gemessen werden, welcher unter anderem zu DNA-Fragmentationen führen kann. Auch können die Akrosomreaktion, das Spermienchromatin oder der transmembrane Ionenfluss und -transport in Spermien beurteilt werden und Aufschluss über die zugrundeliegende Ursache der Unfruchtbarkeit geben<sup>7</sup>.

### **1.3. Kryokonservierung**

Der Begriff der Kryokonservierung beschreibt ein Verfahren, welches es ermöglicht, Zellen oder auch Gewebestücke durch Einfrieren zu konservieren und die Vitalität zu bewahren. Die Kryokonservierung von Spermien ist deshalb ein wesentlicher Bestandteil der assistierten Reproduktionstechnik und der Erhaltung der männlichen Fertilität<sup>10</sup>. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Methoden der Kryokonservierung: das Slow-Freezing und die Vitrifikation. Bei beiden Verfahren wird durch die Zugabe von kryoprotektiven Substanzen (CPAs) die Eiskristallbildung in den Zellen unterbunden. Diese Chemikalien optimieren den osmotischen Druck und den pH-Wert, versorgen die Spermien mit extrazellulärer Energie und beugen zudem auch bakterielle Kontaminationen vor<sup>11</sup>. Wesentliche Unterschiede der Vitrifikation vom Slow-Freezing finden sich bei den Einfrierraten ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), der Zusammensetzung der Kryoprotektiva und den Auftauprotokollen<sup>10</sup>.

Beim konventionellen Verfahren, dem Slow-Freezing, wird das verwendete Material durch langsames und stufenweises Abkühlen auf Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts gebracht. Im Gegensatz dazu steht die Vitrifikation. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei welcher die Proben durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff abgekühlt werden. Anschließend werden die Proben sowohl beim Slow-Freezing und bei der Vitrifikation bei einer Temperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bis heute ist die Methode des Slow-Freezings die am weitesten verbreitete und am häufigsten angewandte Methode um humane Samenzellen im Zuge der assistierten Reproduktionsmedizin einzufrieren, jedoch ist in den letzten Jahrzehnten die Vitrifikation immer effektiver geworden<sup>12</sup>.

#### **1.3.1. Slow-Freezing**

Bei der Methode des Slow-Freezings werden Gewebeproben oder Zellen durch langsames und stufenweises Abkühlen allmählich von Raumtemperatur auf Temperaturen um den Gefrierpunkt gebracht und schlussendlich bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Gegenwärtig werden weitverbreitet Techniken des Slow-Freezings für die Kryokonservierung von Spermien verwendet und stellen somit aktuell den Goldstandard dar. Das Einfrieren der Samenzellen mit dem Verfahren des Slow-Freezings ist zeitaufwendig und dauert in etwa zwei bis vier Stunden<sup>3</sup>. Ein wesentlicher

Nachteil dieser Technik besteht in der interzellulären Eiskristallbildung, wenn die Abkühlgeschwindigkeit zu schnell ist. Während dem Prozess des Einfrierens kommt es aufgrund der Eiskristallbildung im wässrigen Medium, in welchem sich die Samenzellen befinden, zu einer erhöhten Konzentration an gelösten Stoffen in der extrazellulären Umgebung, was wiederum zu einer Dehydration der Zelle führt<sup>13</sup>. Dieser Prozess ist notwendig, um die Samenzellen vor einer möglichen intrazellulären Eiskristallbildung zu schützen. Jedoch kann es bei einer zu starken Dehydrierung und daraus resultierender Verringerung des Zellvolumens um etwa 40% zu irreversiblen Schäden des Spermiums kommen<sup>13</sup>. Außerdem können Zellen aufgrund von Osmose schrumpfen, wenn die Abkühlrate zu langsam ist<sup>3</sup>. Aufgrund dessen wird seit Kurzem versucht, die Vitrifikation von Spermien als Alternative zum langsamen Einfrieren anzuwenden<sup>14</sup>.

### **1.3.2. Vitrifikation**

Bei der Vitrifikation handelt es sich um eine Methode, bei welcher die Proben, nach Zusatz von kryoprotektiven Additiven, durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff abgekühlt werden. Mit ihrer hohen Effizienz und Konsistenz entwickelt sich die Vitrifikation zum Hauptansatz für die Kryokonservierung menschlicher Oozyten und Embryonen und ersetzt das traditionelle langsame Einfrieren in der ART<sup>15</sup>. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Verfahren der Vitrifikation zu besseren Ergebnissen hinsichtlich der Qualität der Oozyten, Embryonen und Blastozysten führt<sup>16</sup>. Deshalb wird dieses Verfahren von der American Society for Reproductive Medicine empfohlen und in Reproduktionszentren weltweit als häufigste Methode der Kryokonservierung angewandt<sup>17</sup>. Verglichen mit der traditionellen Methode des langsamen Einfrierens ist die Vitrifikation von Embryonen eine kürzlich eingeführte ultraschnelle Kryokonservierungsmethode, die die Eisbildung innerhalb der Suspension verhindert, und diese in einen glasähnlichen Feststoff umwandelt, wodurch Schäden an den Zellen oder Geweben vermieden werden<sup>18</sup>. Bei der Vitrifikation lassen sich zwei Methoden voneinander unterscheiden, nämlich das „geschlossene“ und das „offene“ System<sup>19</sup>. Der Unterschied beider Systeme liegt darin, dass beim offenen System durch Eintauchen der Probe in den flüssigen Stickstoff direkter Kontakt beider Komponenten entsteht. Für eine Vitrifikation mit dem offenen System werden beispielsweise Kryoröhrchen verwendet, welche nicht

verschlossen werden, oder mithilfe einer Pipette Tröpfchen der Probe direkt in den flüssigen Stickstoff pipettiert. Durch den direkten Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kann eine noch höhere Abkühlrate erzielt werden, jedoch bringt dies auch Nachteile mit sich<sup>19</sup>. Bei gleichzeitiger Lagerung verschiedener Proben unterschiedlicher Patienten in einem flüssigen Medium, beispielsweise flüssigem Stickstoff, kann es trotz Temperaturen von  $-196^{\circ}\text{C}$  bei einer Langzeitlagerung dieses Materials zu einer Kontamination einer Probe mit einem Krankheitserreger aus einer betroffenen Probe kommen<sup>20,21</sup>. Somit kann der flüssige Stickstoff eine potentielle Kontaminationsquelle darstellen<sup>21</sup>.

Durch die Verwendung von geschlossenen Vitrifikationssystemen, wie beispielweise Straws, kann eine Kontamination mit potenziell krankheitsverursachenden Erregern verhindert werden. Diese stellen eine geeignete Alternative zu offenen Vitrifikationssystemen dar, da bereits gezeigt werden konnte, dass mittels Vitrifikation vergleichbare Ergebnisse wie beim Slow-Freezing von humanen Eizellen und Embryonen erzielt werden konnten<sup>16</sup>.

#### **1.4. DNA-Fragmentation**

Die Integrität der Spermien-DNA ist eine der wichtigen Determinanten einer normalen Befruchtung und Embryoentwicklung<sup>22</sup> und ist für die Geburt gesunder Nachkommen unerlässlich<sup>21</sup>. Zunehmende Beweise deuten darauf hin, dass die SDF, welcher ein Marker für beschädigtes Chromatin ist, eine unabhängige und bemerkenswerte Rolle bei der männlichen Unfruchtbarkeit und dem Fortpflanzungserfolg spielt<sup>23</sup>. So kann die Spermien-DNA-Fragmentierung das Befruchtungspotenzial der Spermien beeinträchtigen, insbesondere wenn die Anzahl der DNA-Schäden hoch ist<sup>24,25</sup>. DNA-Fragmentationsschäden können beispielsweise durch oxidativen Stress verursacht werden. Im Falle eines erhöhten Levels an oxidativem Stress, welcher jedoch noch zu niedrig ist, um den Zelltod durch Apoptose zu induzieren, können alle Aspekte der Spermienfunktion, einschließlich Motilität, Spermien-Zona-Erkennung, akrosomale Exozytose und Spermien-Oozyten-Fusion beeinträchtigt werden<sup>26</sup>. Trotz der Beeinträchtigung der Spermienfunktion können Spermien mit beschädigtem Chromatin ihre Befruchtungsfähigkeit behalten<sup>23</sup>.

Spermien-DNA-Schäden gelten als prädiktiver Faktor für die klinischen Ergebnisse von Patienten, die sich einer ART unterziehen. Laborbefunde deuten darauf hin, dass Zygoten und sich entwickelnde Embryonen spezifische Reaktions- und Reparaturmechanismen angenommen haben, um DNA-Schäden väterlichen Ursprungs zu reparieren<sup>27</sup>.

Bei DNA-Schäden unterscheidet man zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Erstere haben die Durchtrennung der Nukleotidkette eines einzelnen DNA-Stranges der Doppelhelix zur Folge. Ursachen hierfür wären beispielsweise exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung, Mutagene oder aber auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Einzelstrangbrüche können aber auch als gewolltes Zwischenprodukt entstehen, wie bei der Strangentwindung der doppelsträngigen DNA durch das Enzym Topoisomerase I. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem Doppelstrangbruch der DNA zur Durchtrennung beider Nukleotidketten. Ursachen hierfür können UV-Strahlung oder mechanische Prozesse sein. Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendsten Schäden der DNA dar. Falls diese durch DNA-Reparaturmechanismen nicht repariert werden können, geht dies mit Apoptose einher.

## **1.5. Problemstellung**

Das Verfahren des Slow-Freezings stellt bis heute den Goldstandard bei der Kryokonservierung von Samenzellen dar. Da die Vitrifikation bis heute aber bereits bei Eizellen und Embryonen erfolgreich durchführbar ist, stellt die Vitrifikation von Samenzellen aufgrund der möglichen Eiskristallbildung noch ein Problem dar. Ein weiteres Problem stellt die durch die Vitrifikation hervorgerufene Minderung der Motilität, Vitalität und DNA-Integrität dar.

## 1.6. Fragestellung

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist bei der Kryokonservierung von Samenzellen das Slow-Freezing die Methode der Wahl. Da aber in den letzten Jahrzehnten die Vitrifikation zunehmend effektiver geworden ist und hier unklar ist, ob diese Methode der Kryokonservierung in einem IVF Labor eine signifikante Verbesserung bringt, ergaben sich daraus die nachstehenden Fragestellungen dieser Forschungsarbeit:

- Wie verhalten sich humane Samenzellen beim Prozess der Vitrifikation hinsichtlich der Motilität?
- Welchen prozentuellen Verlust an vitalen humanen Samenzellen hat man nach der Vitrifikation zu erwarten?
- Inwiefern ändert sich der DNA-Fragmentierungsindex (DFI) von humanen Samenzellen durch die Vitrifikation?

## 1.7. Ziel

In dieser Studie soll die Auswirkung der Vitrifikation von humanen Samenzellen untersucht werden. Dabei soll aufgezeigt werden, inwiefern sich die Motilität und Vitalität nach dem Prozess der Kryokonservierung ändert. Des Weiteren soll die Auswirkung der Vitrifikation auf die DNA-Fragmentation analysiert werden. Um den Vergleich anzustellen, sollen jeweils unmittelbar nach der Ejakulatgewinnung und nach der Vitrifikation die Parameter zur Beurteilung der Beweglichkeit, Vitalität und DNA-Fragmentation erhoben werden.

## **1.8. Statistik**

### **1.8.1. Hypothesen**

Hinsichtlich der Fragestellungen dieser Masterarbeit ergaben sich folgende Hypothesen:

Erste Hypothese:

- Nullhypothese: Es gibt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Motilität vor und nach dem Prozess der Vitrifikation.
- Alternativhypothese: Es gibt einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Motilität vor und nach dem Prozess der Vitrifikation.

Zweite Hypothese:

- Nullhypothese: Es gibt keinen signifikanten Verlust an vitalen humanen Samenzellen durch die Vitrifikation.
- Alternativhypothese: Es gibt einen signifikanten Verlust an vitalen humanen Samenzellen durch die Vitrifikation.

Dritte Hypothese:

- Nullhypothese: Es gibt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des DNA-Fragmentationsindex vor und nach dem Prozess der Vitrifikation.
- Alternativhypothese: Es gibt einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des DNA-Fragmentationsindex vor und nach dem Prozess der Vitrifikation.

### **1.8.2. Datenauswertung**

Um eine übersichtliche Darstellung der ermittelten statistischen Werte zu ermöglichen, werden mithilfe der deskriptiven Statistik zusammenfassende Tabellen und Grafiken erstellt. Aus den gewonnenen Werten der Analysen vor und nach der Vitrifikation werden jeweils Mittelwerte der Motilität, Vitalität und DNA-Fragmentation berechnet und die dazugehörigen Standardabweichungen ermittelt. Um einen Vergleich der jeweiligen Ergebnisse der unterschiedlichen Parameter vor und nach dem Prozess der Kryokonservierung anstellen zu können, wird ein gepaarter t-Test als statistischer Hypothesentest angewandt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Samenanalyse und -aufbereitung**

Um die Auswirkungen der Vitrifikation von humanen Spermienzellen auf den DFI, die Motilität und der Vitalität zu bestimmen, wurden Samenproben von 30 unterschiedlichen Samenspendern zwischen 18 und 36 Jahren, welchen den Kriterien der WHO von 2021 eine Normozoospermie entsprechen, verwendet.

#### **2.1.1. Makroskopische Analyse**

Nach der Gewinnung der Samenprobe, wurden diese auf einer Wärmeplatte, welche auf 37°C aufgeheizt wurde, solange inkubiert, bis die Proben vollständig verflüssigt waren. Sobald die Verflüssigung der Samenprobe eingetreten ist, wurde mithilfe eines pH-Papiers der pH-Wert des Ejakulats gemessen. Hierfür wurden 10µl des Ejakulats auf dem pH-Papier aufgetragen und der Farbumschlag sofort abgelesen. Da der Farbumschlag sehr schnell dunkler wird, ist es wichtig, dass dieser unmittelbar nach dem Auftragen beurteilt wird, da ansonsten falsche Ergebnisse ausgegeben werden.

Um die Anzahl an Spermienzellen pro Ejakulat berechnen zu können, wurde das Volumen der Samenprobe mithilfe einer Pipette exakt gemessen. Im Zuge dessen wurde auch die Viskosität der Probe bestimmt, indem das Ejakulat langsam aus der Pipette getropft wurde. Haben sich kleine Tropfen gebildet, so wurde die Viskosität als normal bewertet. Bildete das Ejakulat 2cm lange Fäden, so wurde die Probe als schleimig bezeichnet. Im Falle von Fäden >2cm wurde die Viskosität als viskös beschrieben. Auch die Beurteilung des makroskopischen Aussehens wurde bei diesem Schritt durchgeführt. Je nach Erscheinung des Ejakulats wurde das Aussehen als homogen oder opaleszent beschrieben.

#### **2.1.2. Mikroskopische Analyse**

Durch Verwendung des Lichtmikroskops BX41 der Firma Olympus wurde die Konzentration, die Motilität, das Vorhandensein von anderen zellulären Elementen, Aggregaten und Agglutinationen beurteilt. Auch die Analyse der Morphologie wurde

anschließend mit demselben Mikroskop unter Verwendung von Immersionsöl durchgeführt.

### **Bestimmung der Konzentration und Beweglichkeit**

Für die gleichzeitige Beurteilung der Konzentration und Beweglichkeit der Samenzellen, wurde eine Maklerkammer verwendet. Hierfür wurden 10µl des unverdünnten, nativen Ejakulats auf die Maklerkammer pipettiert und das Deckglas aufgesetzt. Dadurch entsteht ein Raum von exakt 0,01mm<sup>3</sup>. Auf der Unterseite des Deckglases ist ein Netz graviert, welches in 100 kleine Quadrate unterteilt ist. Bei Verwendung der 200-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops wurden für die Konzentrationsbestimmung alle Samenzellen gezählt, welche sich in 10 Quadrate befanden. Die Konzentration gibt die Anzahl an Samenzellen in Mio/ml an. Um die Gesamtzahl an Samenzellen pro Ejakulat zu bestimmen, wurde die Konzentration mit dem zuvor bestimmten Volumen multipliziert.

Um die Beweglichkeit der Samenzellen zu beurteilen, wurden pro Probanden mindestens 200 Samenzellen beurteilt. Hierfür wurden die Richtlinien der sechsten Ausgabe des WHO Laborhandbuchs angewandt und die Zellen in schnell progressiv (Grad A), langsam progressiv (Grad B), ortsbeweglich (Grad C) und unbeweglich (Grad D) kategorisiert. Um die Plausibilität des ermittelten Wertes zu prüfen, wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### **Beurteilung der Morphologie**

Zur Beurteilung der Morphologie der Samenzellen wurde ein Ausstrich angefertigt. Hierfür wurden 10µl der nativen Samenprobe auf einem Objektträger aufgetragen und mithilfe eines Deckglases ausgestrichen. Der Ausstrich wurde nach Lufttrocknung mittels Diff-Quick-Färbung gefärbt. Der Objektträger wurde 15 Sekunden lang in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend folgte eine 10sekündige Inkubationsszeit in der eosinophilen Färbelösung, gefolgt von einer 5sekündigen Inkubationszeit in der basophilen Färbelösung. Die überschüssige Färbelösung wurde durch Spülen mit Aqua dest entfernt und der Ausstrich luftgetrocknet.

Unter Verwendung von Immersionsöl und einer 1000-fachen Vergrößerung wurde das Aussehen der Samenzellen beurteilt. Hierfür erfolgte die Differenzierung in „normalgeformte“ Samenzellen und „pathologisch geformte“ Samenzellen. Auch hier wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, bei welcher je 200 Samenzellen ausgezählt wurden.

### **2.1.3. Vitalitätsbestimmung mittels Eosin-Nigrosin-Färbung**

Die Vitalitätsbestimmung unmittelbar vor und nach der Vitrifikation wurde unter Verwendung des „VitalScreen“ durchgeführt. Das Kit besteht aus zwei verschiedenen Reagenzien. Reagenz 1 besteht aus dem Farbstoff Eosin (1%iges Eosin Y in Kochsalzlösung), Reagenz 2 aus dem Farbstoff Nigrosin (5%iges Nigrosin in Kochsalzlösung). Die Farbstoffe wurden in einem Kühlschrank bei 7°C aufbewahrt. Da sich ein Sediment in den Fläschchen absetzt, wurden diese gut durchgemischt um das Sediment aufzumischen. Vor Verwendung der Farbstoffe müssen diese erst auf Raumtemperatur gebracht werden. Hierfür wurden je 2 Tropfen Reagenz 1 und Reagenz 2 in separierten Eppendorf Tubes getropft. Sobald die Farbstoffe Raumtemperatur erreicht haben, wurden 50µl Ejakulat mit 2 Tropfen Reagenz 1 für 30 Sekunden durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Anschließend wurden 2 Tropfen Reagenz 2 dazugeben und 30 Sekunden durch Pipettieren vermengt. Für die mikroskopische Beurteilung wurde ein Tropfen der Eosin-Nigrosin-Lösung auf einen Objektträger pipettiert und mithilfe eines Deckglases ein Ausstrich angefertigt. Dieser Ausstrich wurde luftgetrocknet und unter Verwendung von Immersionsöl und dem 100er Objektiv des Lichtmikroskops beurteilt.

### **Beurteilung**

Vitale Samenzellen weisen eine intakte Zellmembran auf, weshalb die Farbstoffe nicht in die Zelle eindringen können. Aufgrund dessen erscheinen vitale Samenzellen im Ausstrich farblos. Samenzellen, welche keine Vitalität besitzen, zeigen durch die Schädigung der Zellmembran eine rote Färbung und sind somit gut von vitalen Samenzellen zu differenzieren. Für die Beurteilung des Prozentsatzes an vitalen und nicht vitalen Samenzellen wurden 200 Samenzellen ausgezählt und eine Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 2.1.4. Samenaufbereitung

Durch die Aufbereitung des Ejakulats mittels Dichtegradientenzentrifugation werden Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Dichte in einem Konzentrationsgradienten getrennt und befruchtungsfähige Samenzellen aus dem Ejakulat isoliert. Samenzellen mit dicht gepackter DNA haben eine höhere Dichte als der 90% Gradient, sedimentieren durch die Lösungen und setzen sich am Boden des Röhrchens ab. Andere Zellen des Ejakulats (z.B. Rundzellen, unreife Samenzellen) haben eine Dichte, die zwischen dem 45% und 90% Gradienten liegt und befinden sich nach der Zentrifugation in der Schicht zwischen den beiden Lösungen.

#### Vorbereitung

Am Vortag wurde für jede Präparation 5 ml SpermActive der Firma Gynemed, welches ein Waschmedium ist, in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> im Inkubator Labotect C16 äquilibriert. Dabei durfte der Deckel der Flasche nicht ganz geschlossen werden, damit das CO<sub>2</sub> in das Medium diffundieren konnte. Am Tag der Präparation wurden die für die Aufbereitung benötigten Dichtegradienten von 45% und 90% hergestellt. Zur Herstellung des Gradienten wurde SpermGrad der Firma Vitrolife verwendet. Hierfür wurden Zellkulturflaschen verwendet.

Tabelle 3: Dichtegradient 90%

SpermActive	4ml
SpermGrad	36ml

Tabelle 4: Dichtegradient 45%

SpermActive	22ml
SpermGrad	18ml

Die Dichtegradienten können nach Herstellung 4 Tage lang bei Lagerung im Kühlschrank verwendet werden. Vor Verwendung ist darauf zu achten, dass diese auf Raumtemperatur gebracht werden.

## **Durchführung**

Für die Samenaufbereitung wurden je 1,5ml des 90% Gradienten in das Zentrifugenröhrchen vorlegt und anschließend vorsichtig mit 1,5ml 45% Gradienten überschichtet. Es musste darauf geachtet werden, dass sich die beiden Lösungen nicht durchmischten.

Anschließend wurde der Samenbecher kurz geschwenkt, 2ml Ejakulat vorsichtig auf den Gradienten überschichtet und bei 500xg für 20 Minuten zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation entstandene Pellet wurde mithilfe einer Pipette entnommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Waschen des Pellets wurden 5ml des Waschmediums Sperm Active hinzugefügt und anschließend bei 300xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation durch eine schnelle Kippbewegung in das erste Zentrifugenröhrchen abgegossen und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der Probe für die Vitrifikation mittels Maklerkammer und 200-facher Vergrößerung bestimmt.

## **2.2. Vitrifikation**

### **2.2.1. CBS™ High Security Straws**

Für diese Masterarbeit wurden CBS™ High Security Vitrification Straws der Firma Cryo Bio System verwendet. Das geschlossene Vitrifikationssystem besteht aus einem ultradünnen äußerem Straw, welcher über ein vorversiegeltes, beschwertes Ende und einer Öffnung verfügt. Die äußere Hülle wird mit einem Kapillarrohr mit vorgeformter, vollständig durchsichtiger Rinne bestückt, auf welcher sich die zu vitrifizierende Probe befindet. Um das Kapillarrohr in den äußeres Straw einbringen zu können, ist ein Einführungsgerät beigelegt. Da die verwendeten Straws für die Vitrifikation von Embryonen konzipiert wurden und das Volumen des Tropfens mit der biologischen Probe 0,5 µl nicht überschreiten darf, wurden die Straws adaptiert. Das vorversiegelte Ende wurde aufgeschnitten, sodass die Proben mithilfe einer Pipettierhilfe direkt in den äußeren Straw aufgezogen werden konnten.

### **2.2.2. Vitrifikationsmedium**

Für die Vitrifikation wurde das Einfriermedium „TEST-Yolk Buffer (TYB) mit Glycerol und Gentamicin“ der Firma FUJIFILM Irvine Scientific verwendet. TYB ist ein TES-Puffer und eine Trizma-Base (TEST) und enthält hitzeinaktiviertes Eigelb aus spezifisch pathogenfreien Legehennen<sup>1</sup>, wodurch nach dem Auftauen mehr bewegliche Spermien zu vorhanden sind, als bei Verwendung von reinem Glycerinmedium<sup>28</sup>. Durch die Kombination des Puffers mit Glycerol, kann eine hohe Beweglichkeit und Lebensfähigkeit der Spermien erzielt werden. Das Einfriermedium TYB ist das einzige Medium zur Kryokonservierung von Spermien mit CE-Kennzeichnung und FDA-Zulassung, das TYB und Glycerin enthält<sup>1</sup>.

### **2.2.3. Durchführung**

Für die Patientenidentifikation wurden im Vorfeld Etiketten gedruckt, welche auf dem Straw angebracht wurden. Damit die Proben so schnell wie möglich in Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kommen konnten, wurde zuvor ein Styroporgefäß vorgefüllt.

Nachdem das Ejakulat für die Vitrifikation vorbereitet war, wurde mithilfe einer Pipettierhilfe die Probe in den Straw aufgezogen. Sobald die Probe das gestopfte Ende des Straws erreicht hatte, wurde die Pipettierhilfe abgenommen und der Straw an beiden Enden mit einem Sealer verschweißt. Der verschlossene Straw wurde mithilfe einer Pinzette in das Styroporgefäß, welches mit flüssigem Stickstoff befüllt war, solange getaucht, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Anschließend wurde der Straw zügig in einen Kryotank überführt, in welchem der Straw bis zum Auftauen bei -196°C in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert wurde.

## **2.3. Auftauen**

Die in Stickstoff gelagerten Proben wurden mithilfe einer Pinzette aus der entsprechenden Position aus dem Tank entnommen und die Probenidentifikation geprüft. Die Straws wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt der Straws in ein Zentrifugenröhrchen überführt, indem mit einer Schere das untere Ende des Straws aufgeschnitten wurde, der Straw ins

---

<sup>1</sup> Anhang: Freezing Medium - TEST Yolk Buffer (TYB) with Glycerol and Gentamicin

Zentrifugenröhrchen gehalten wurde und dann das gestopfte Ende abgeschnitten wurde, damit der Inhalt entleert wurde. Nach Überführung der Probe wurde langsam und tropfenweise 5ml Sperm Active mithilfe einer Spritze zur aufgetauten Samenpräparation pipettiert und das Röhrchen nach 5 Tropfen Medium aufgeschüttelt, sodass sich beide Flüssigkeiten miteinander vermischen konnten. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgehoben und das Zellpellet resuspendiert. Danach wurden von dieser Probe die Konzentration, die Beweglichkeit, die Vitalität und der DNA-Fragmentationsindex bestimmt.

## **2.4. Halosperm®**

Um den DNA-Fragmentationsindex zu bestimmen, wurde das Kit Halosperm G2 der Firma Halotech verwendet und laut deren Gebrauchsanweisung durchgeführt. Das Kit enthält Agarose, Denaturierungslösung, Lyselösung sowie Eosinfärbelösung und Thiazinfärbelösung. Destilliertes Wasser sowie 70%igen und 100%igen Alkohol sind nicht Bestandteile des Kits und müssen selbständig besorgt werden.

### **Vorbereitung**

Die Lösungen müssen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur gebracht werden und die Agarose aliquotiert werden, indem sie bei 95-100°C in einem Wasserbad inkubiert wird, bis diese flüssig ist. Um eine erneute Verfestigung der Agarose zu verhindern, kann diese in einem Wasserbad bei 37°C warmgehalten werden, bis man diese benötigt. Das native Ejakulat muss zuvor mit PBS auf eine Konzentration von maximal 20 Millionen Samenzellen pro Milliliter verdünnt werden, damit es bei der anschließenden mikroskopischen Beurteilung zu keiner Überlagerung der Samenzellen kommt. Nach Herstellung der Verdünnung wurde 50µl davon in das Agarose Eppendorf tube überführt und vorsichtig vermischt, sodass es zu keiner Blasenformation kam. Zur Bildung des Microgels und Verfestigung der Agarose wurden anschließend 8µl der hergestellten Mischung aus Agarose und verdünnter Samenprobe auf den mitgelieferten Objektträger in das entsprechende Feld pipettiert, mit einem Deckglas versehen und 5 Minuten auf einer gekühlten Fläche (beispielsweise Metall oder Glas) im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach Verfestigung

des Gels, wurde der Objektträger aus dem Kühlschrank genommen und das Deckglas vorsichtig entfernt. Die weiteren Bearbeitungsschritte mussten bei Raumtemperatur erfolgen.

### **Durchführung**

Der Objektträger wurde horizontal in eine Petrischale gelegt, mit der Denaturierungslösung (Lösung 1) vollkommen bedeckt und für 7 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationsszeit wurde die Lösung durch vorsichtiges Abkippen entfernt und der Objektträger wieder in die horizontale Position gebracht. Anschließend wurde die Lyselösung (Lösung 2) aufgetragen und für 20 Minuten inkubiert. Auch hier wurde nach der Inkubationsszeit das Reagenz durch vorsichtiges Kippen des Objektträgers entfernt. Nach der Lyse musste der Objektträger gewaschen und anschließend dehydriert werden. Hierfür wurde dieser zuerst mit Aqua dest vollkommen benetzt und für 5 Minuten inkubiert. Für die Dehydrierung wurde anschließend 70%iger Alkohol und 96%iger Alkohol für je 2 Minuten inkubiert. Die unterschiedlichen verwendeten Lösungen wurden nach jedem Schritt durch vorsichtiges Abkippen entfernt. Der Objektträger wurde nun zur Lufttrocknung auf einem Filterpapier platziert.

### **Färbung**

Nach vollständiger Trocknung des Objektträgers konnte die Färbung durchgeführt werden. Hierfür wurde der Objektträger wieder in horizontaler Position in eine Petrischale gelegt und mit der Färbelösung SSA (Lösung 3) vollkommen bedeckt und für 7 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung durch vorsichtiges Abkippen entfernt und die Färbelösung SSB (Lösung 4) aufgetragen. Diese wurde auch für 7 Minuten inkubiert und anschließend durch vorsichtiges Abkippen entfernt. Der Objektträger musste vor der mikroskopischen Beurteilung wieder luftgetrocknet werden.

## Mikroskopische Beurteilung

Zur Beurteilung des Halosperm® wurde das Lichtmikroskop Olympus BX41 verwendet. Der Objektträger wurde mithilfe des 100er-Objektivs und unter Verwendung des Breitlichts mikroskopiert. Falls die Färbung zu intensiv ist, kann der Objektträger mit Leitungswasser gewaschen werden. Im Falle einer zu schwachen Färbung kann der Objektträger nochmals in 100%igen Alkohol getaucht werden. Anschließend kann dieser nach vollständiger Lufttrocknung gefärbt werden.

Um den Prozentsatz an Samenzellen mit fragmentierter DNA zu bestimmen, kann folgende Formel angewandt werden:

$$SDF (\%) = \frac{\text{fragmentierte} + \text{degradierte SZ}}{\text{Gesamtzahl SZ}} \times 100$$

Es wurden mindestens 300 Samenzellen anhand dieser Kriterien beurteilt:

- Spermien ohne DNA-Fragmentation

Samenzellen ohne DNA-Fragmentation zeigen einen großen oder mittleren „Heiligenschein“ (Halo), welcher ähnlich breit oder größer als der Durchmesser des Samenzellkerns ist, beziehungsweise dessen Größe zwischen jenen liegt, die einen großen und sehr kleinen Halo zeigen.

- Spermien mit DNA-Fragmentation

Samenzellen mit DNA-Fragmentationen zeigen keinen oder nur einen kleinen Halo, welcher kleiner oder gleichgroß wie 1/3 des Durchmessers des Kerns ist. Zu Samenzellen mit Fragmentation werden auch jene gezählt, welche keinen Halo zeigen und einen unregelmäßig oder schwach gefärbten Kern aufweisen.

- Andere Zellbestandteile

Zellkerne, die nicht Spermatozoa entsprechen. Eines der morphologischen Merkmale, die sie auszeichnen, ist das Fehlen eines Schwanzes. Diese Zellen dürfen nicht in die Schätzung der Häufigkeit von Spermien mit fragmentierter DNA einbezogen werden.

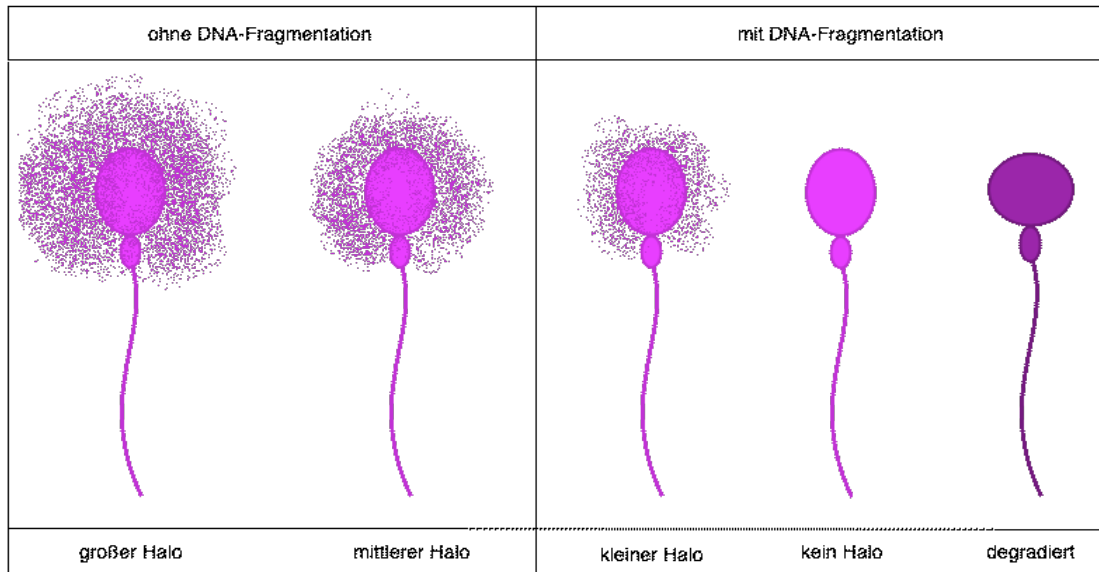


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Samenzellen zur Beurteilung des Halosperm®

In Abbildung 4 sind Samenzellen zu sehen, welche nach Durchführung des Halosperm® unter Verwendung von Immersionsöl und 1000-facher Vergrößerung mikroskopisch analysiert wurden. Dabei zeigen jene Samenzellen, welche mit „1“ beschriftet wurden, einen großen Halo und zeigen somit keine DNA-Fragmentation. Samenzellen, welche mit „2“ beschriftet wurden, weisen DNA-Fragmentationen auf, weshalb diese nur einen kleinen Halo zeigen. Auch können degradierte Samenzellen nachgewiesen werden, welche der mit „3“ beschrifteten Samenzelle entsprechen. Diese Samenzellen werden zu Samenzellen mit DNA-Fragmentation gezählt.

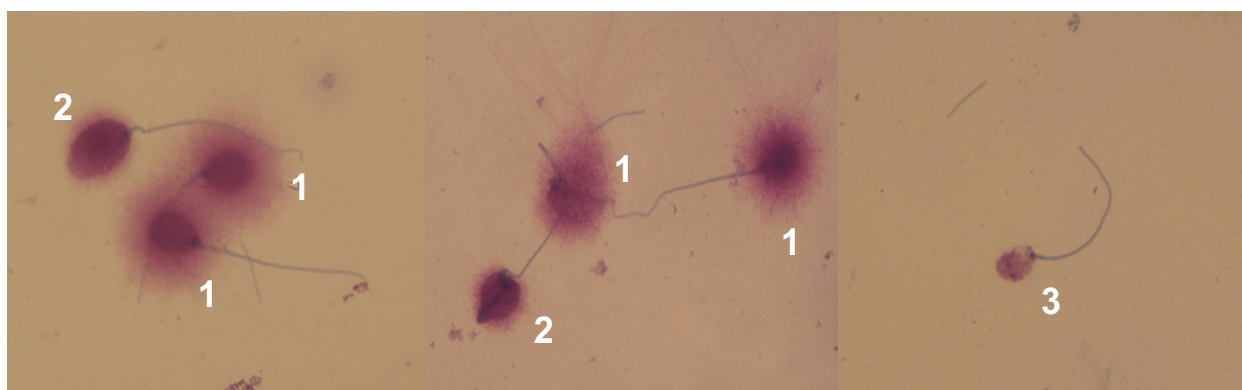


Abbildung 4: Darstellung von Samenzellen mittels Halosperm®

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mithilfe von Excel und dem statistischen Programm „R“ graphisch dargestellt. Die Prüfung der Hypothesen erfolgte ausschließlich mit dem Programm „R“. Um die ermittelten deskriptiven statistischen Daten zu veranschaulichen, wurden zusammenfassende Tabellen erstellt. Durch die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Daten auf ihre Normalverteilung überprüft. Als statistisches Testverfahren zur Hypothesenprüfung wurde der t-Test angewandt, um eine Tendenz der Ergebnisse darstellen zu können. Mithilfe des t-Tests lässt sich prüfen, ob sich die Mittelwerte der Daten von abhängigen Stichproben unterscheiden. Aus den ermittelten Daten der Untersuchung der Motilität, der Vitalität und des DFI's vor und nach der Vitrifikation wurden jeweils Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet.

Die Stichproben wurden bei den Ergebnissen der Motilitätsbestimmung vor und nach der Durchführung der Vitrifikation wie folgt definiert:

- Ergebnisse welche mit „vor Vitrifikation“ gekennzeichnet wurden, wurden vor der Vitrifikation aus dem Nativejakulat erhoben. Ergebnisse der Ermittlung der Motilität der gefrorenen Proben nach der Vitrifikation wurden mit „nach Vitrifikation“ betitelt.
- Jene Stichproben, welche mit „Mot A“ und „Mot B“ gekennzeichnet wurden, stellen die schnell und langsam progressiv beweglichen Samenzellen vor bzw. nach der Vitrifikation dar.
- Stichproben, welche mit „Mot C“ gekennzeichnet wurden, stellen jene Samenzellen dar, welche vor bzw. nach der Vitrifikation ortsbeweglich waren.
- Der Anteil an unbeweglichen Samenzellen welcher vor bzw. nach der Vitrifikation ermittelt wurde, wurde „Mot D“ genannt.

Die Proben der Vitalitätsbestimmung wurden bei den Ergebnissen vor und nach der Vitrifikation folgendermaßen definiert:

- Ergebnisse welche mit „vor Vitrifikation“ gekennzeichnet wurden, wurden vor der Vitrifikation aus dem Nativejakulat erhoben. Ergebnisse der Ermittlung der Vitalität der kryokonservierten Proben wurden mit „nach Vitrifikation“ bezeichnet.
- Jener Prozentsatz an Samenzellen, welche Vitalitätszeichen zeigten, wurden mit „vital“ gekennzeichnet. Samenzellen, welche keine Vitalitätszeichen aufwiesen, wurden „nicht vital“ genannt.

Bei der Ermittlung der Ergebnisse der Bestimmung des DFI's vor und nach Vitrifikation wurden die verwendeten Stichproben wie folgt definiert:

- Ergebnisse welche mit „vor Vitrifikation“ gekennzeichnet wurden, wurden vor der Vitrifikation aus dem Nativejakulat erhoben. Ergebnisse der Ermittlung des DFI's der gefrorenen Proben nach der Vitrifikation wurden mit „nach Vitrifikation“ betitelt.
- Der Prozentsatz an Samenzellen, welche eine intakte DNA aufwiesen und einen Halo zeigten, wurden mit „with halo“ gekennzeichnet. Jener Prozentsatz an Samenzellen, welche eine fragmentierte DNA aufwiesen, wurden „without halo“ genannt.

### 3.1. Ergebnisse der Motilitätsbestimmung

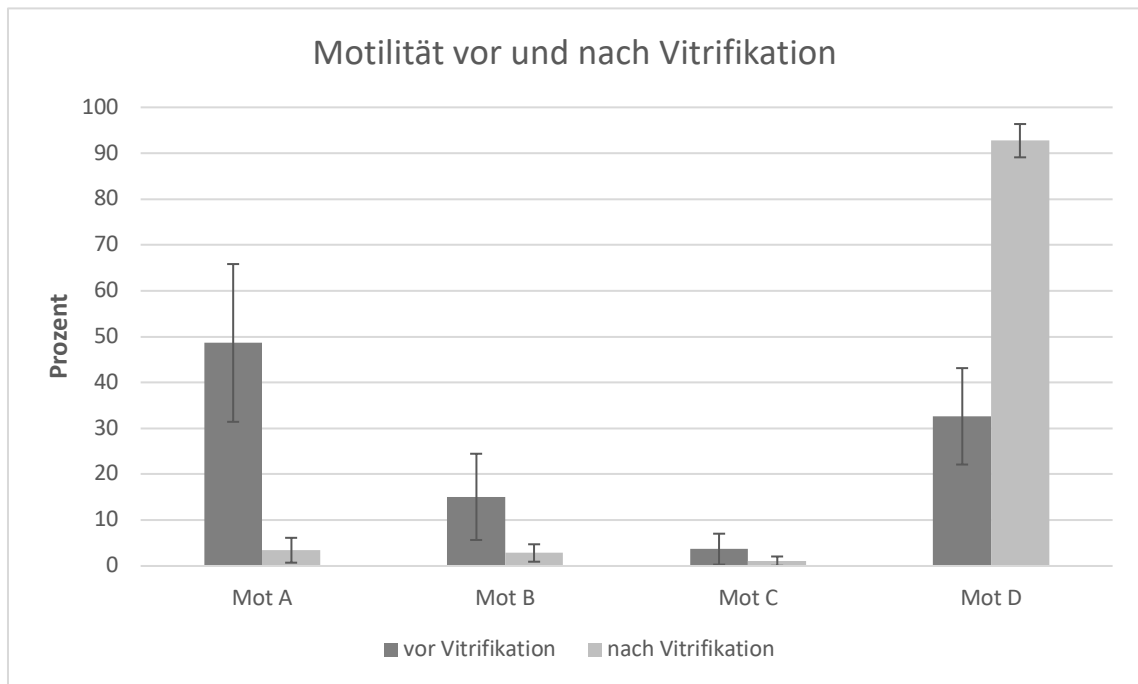


Abbildung 5: Mittelwerte und Standardabweichung der Motilität vor und nach Vitrifikation

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung der Motilität vor und nach Vitrifikation

	vor Vitrifikation	nach Vitrifikation
n	30	30
Mittelwert Mot A (%)	48,63	3,43
Mittelwert Mot B (%)	15,07	2,83
Mittelwert Mot C (%)	3,67	1,06
Mittelwert Mot D (%)	32,63	92,68
Mittelwert Mot A, B, C (%)	67,37	7,32
STABW Mot A (%)	17,2	2,71
STABW Mot B (%)	9,4	1,9
STABW Mot C (%)	3,37	1,01
STABW Mot D (%)	10,51	3,63

Anhand der in Abbildung 5 und Tabelle 5 dargestellten Ergebnisse der Motilitätsbestimmung vor und nach der Vitrifikation lässt sich eine starke Motilitätsabnahme und eine daraus folgende Zunahme an unbeweglichen Samenzellen nach der Vitrifikation im Vergleich zu Samenzellen aus den Nativejakulat beobachten. Um die Motilität vor und nach Vitrifikation im Generellen zu vergleichen, wurden die Motilität A, B und C vor, sowie die Motilität A, B und C nach Vitrifikation zusammengenommen. Dadurch lässt sich mittels dem berechneten p-Wert von  $<0,01$  ein signifikanter Unterschied der Gesamtmotilität (A, B und C) feststellen.

Tabelle 6: p-Werte der Ergebnisse der Motilität vor und nach Vitrifikation

	p-Werte
Mot A vor Vitrifikation – Mot A nach Vitrifikation	$<0,01$
Mot B vor Vitrifikation – Mot B nach Vitrifikation	$<0,01$
Mot C vor Vitrifikation – Mot C nach Vitrifikation	$<0,01$
Mot D vor Vitrifikation – Mot D nach Vitrifikation	$<0,01$
Mot A, B,C vor Vitrifikation – Mot A,B,C nach Vitrifikation	$<0,01$

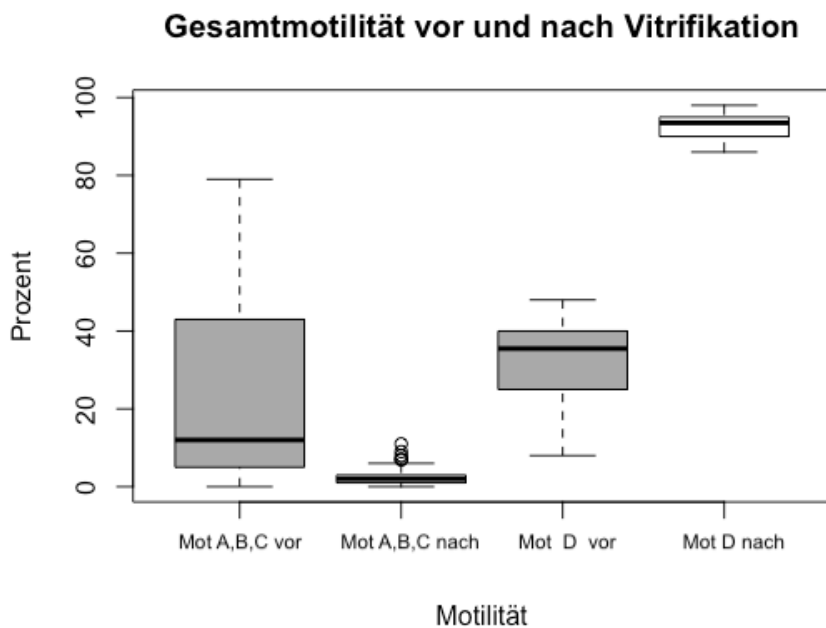


Abbildung 6: Gesamtmotilität vor und nach der Vitrifikation

Durch die Veranschaulichung der Daten der Gesamtmotilität in Abbildung 6, welche alle beweglichen Samenzellen (Mot A, Mot B, und Mot C) zusammenfasst, wird noch einmal verdeutlicht, dass die Beweglichkeit „Mot D“, welche der Kategorie der unbeweglichen Samenzellen entspricht, bedeutend höher nach der Vitrifikation ist.

### 3.2. Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung der Vitalität vor und nach Vitrifikation

	vor Vitrifikation	nach Vitrifikation
n	30	30
Mittelwert vital (%)	94,73	7,77
Mittelwert nicht vital (%)	5,2	92,43
STABW vital (%)	2,68	2,74
STABW nicht vital (%)	2,67	2,74

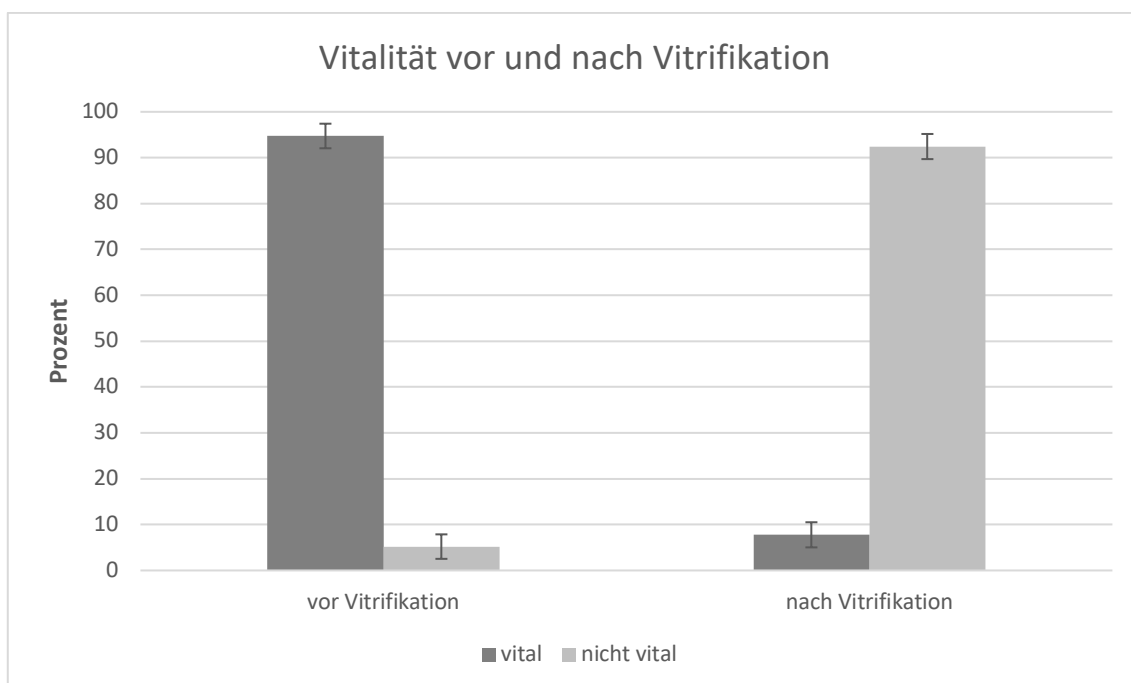


Abbildung 7: Mittelwerte und Standardabweichung der Vitalität vor und nach Vitrifikation

Wie den Werten der Tabelle 7 und deren Veranschaulichung in Abbildung 7 zu entnehmen ist, gibt es einen bedeutenden Unterschied zwischen der Vitalität der Samenzellen im nativen Ejakulat und der Vitalität der Samenzellen nach der Vitrifikation. Auffallend ist, dass beim Vergleich der Vitalität nach der Vitrifikation bei dem Großteil der Samenzellen keine Vitalitätszeichen mehr nachgewiesen werden konnten. Durch die Ermittlung des p-Wertes von  $<0,01$  lässt sich somit ein signifikanter Unterschied der Vitalität der Samenzellen jeweils vor und nach der Vitrifikation bestätigen.

Tabelle 8: p-Werte der Ergebnisse der Vitalität vor und nach Vitrifikation

	p-Wert
vital vor Vitrifikation – vital nach Vitrifikation	$<0,01$
Nicht vital vor Vitrifikation – nicht vital nach Vitrifikation	$<0,01$

Anhand der Ergebnisse der Vitalität und der Motilität, welche in der untenstehenden Abbildung 8 und 9 grafisch dargestellt wurden, lässt sich eine Korrelation beider Parameter jeweils vor und nach der Vitrifikation beobachten. So konnte bei einer geringeren Beweglichkeit der Samenzellen eine niedrigere Vitalität und ebenso bei Vorhandensein einer höheren Motilität eine höhere Vitalität nachgewiesen werden.

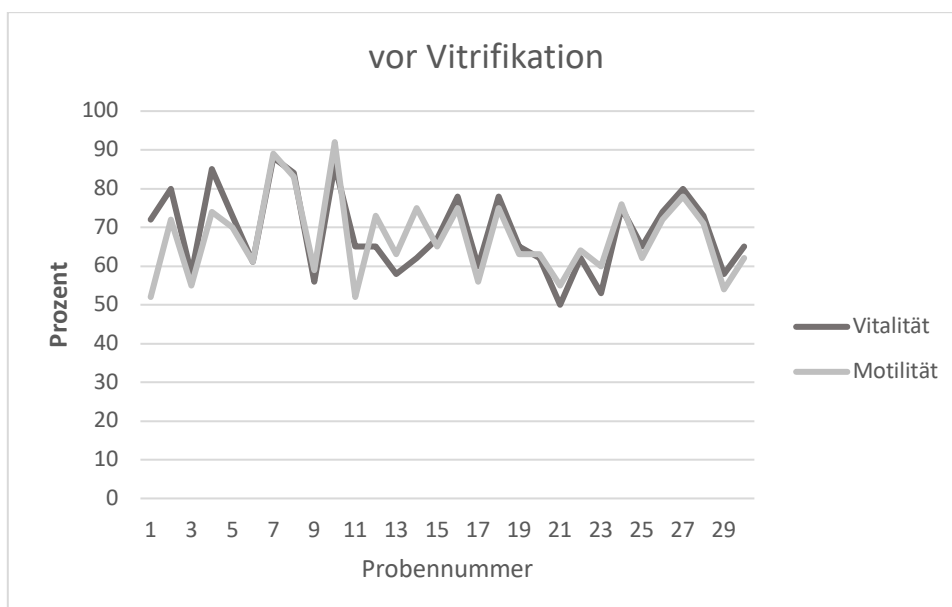


Abbildung 8: Vitalität und Motilität vor der Vitrifikation

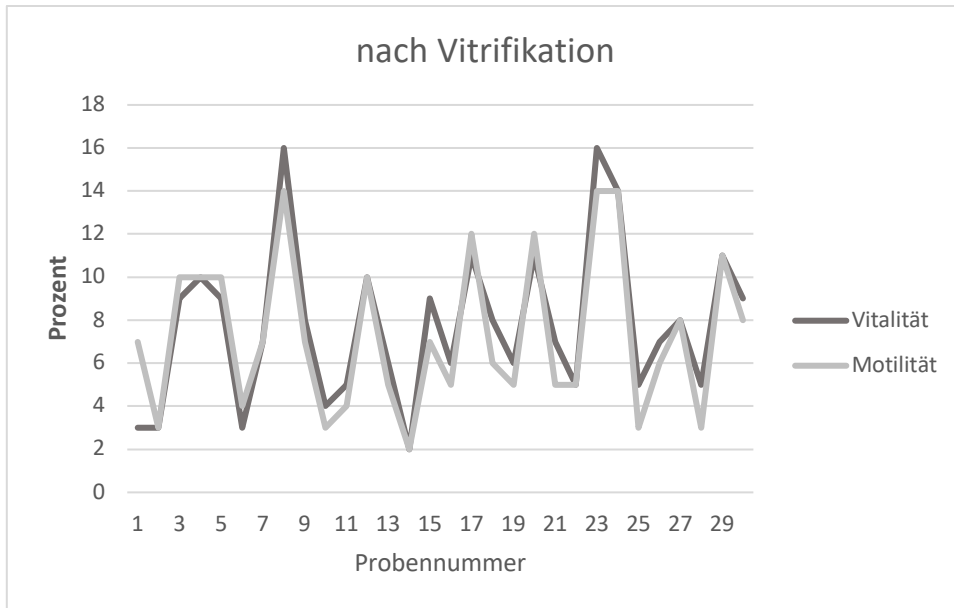


Abbildung 9: Vitalität und Motilität nach der Vitrifikation

### 3.3. Ergebnisse des DNA-Fragmentationsindex

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung des DFI's vor und nach Vitrifikation

	vor Vitrifikation	nach Vitrifikation
n	30	30
Mittelwert halo (%)	94,73	92,27
Mittelwert without halo (%)	5,2	7,73
STABW halo (%)	2,68	2,74
STABW without halo (%)	2,67	2,74

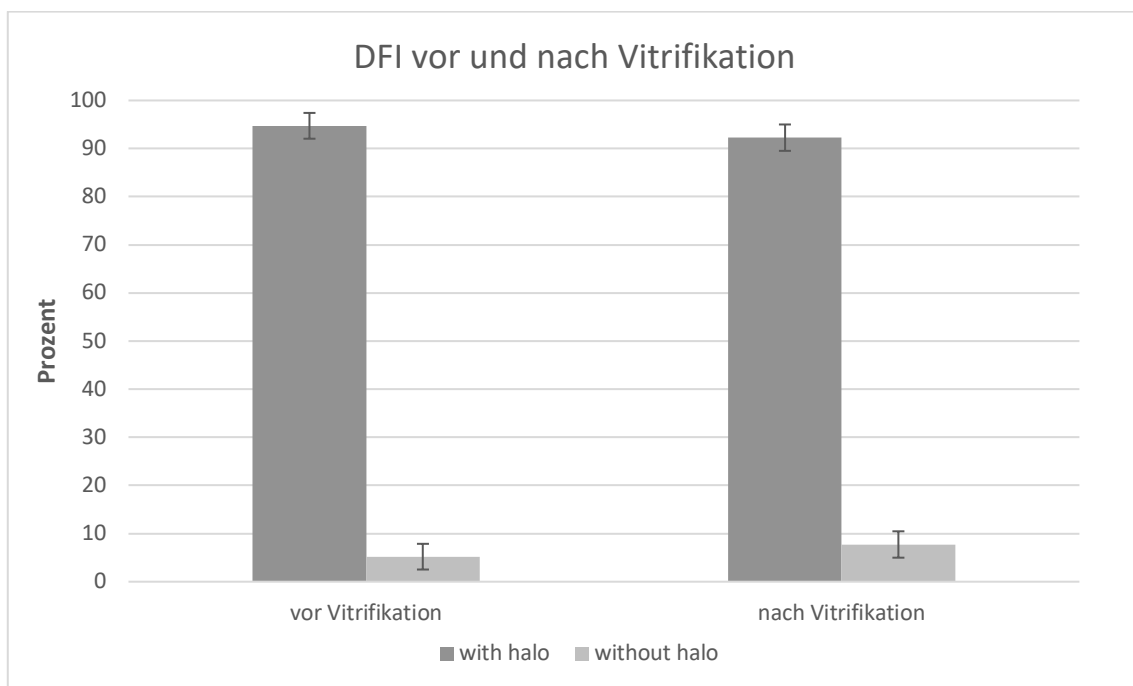


Abbildung 10: Mittelwerte und Standardabweichung des DFI's vor und nach Vitrifikation

Wie anhand der Werte, welche in Tabelle 9 ersichtlich sind und in Abbildung 10 veranschaulicht werden, weisen sowohl die Proben, bei welchen der DFI aus dem Nativejakulat bestimmt wurde, als auch jene Proben, bei welchen der DFI nach der Vitrifikation bestimmt wurde, zwischen 92-95% Samenzellen auf, bei welchen keine Fragmentation der DNA vorliegt. Dies bedeutet, dass sowohl die Proben vor als auch nach der Vitrifikation einen normalen DFI aufweisen, da erst bei einem Prozentsatz von 15 – 30 ein grenzwertiges bzw. ab über 30 ein abnormales Ergebnis der DNA-

Fragmentationen vorliegt. Betrachtet man die Ergebnisse des DFI's vor und nach der Vitrifikation genauer, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen vor und nach der Kryokonservierung. So erzielten die Samenproben vor der Vitrifikation einen signifikant höheren Prozentsatz ( $p < 0,01$ ) an Samenzellen mit intakter DNA.

Tabelle 10: p-Werte der Ergebnisse des DFI's vor und nach Vitrifikation

	p-Wert
with halo vor Vitrifikation – with halo nach Vitrifikation	<0,01
without halo vor Vitrifikation – without halo nach Vitrifikation	<0,01

## 4. Zusammenfassung

Der Begriff der Kryokonservierung beschreibt ein Verfahren, welches es ermöglicht, Zellen oder auch Gewebestücke durch Einfrieren zu konservieren und die Vitalität zu bewahren. Die Kryokonservierung von Spermien ist deshalb ein wesentlicher Bestandteil der assistierten Reproduktionstechnik und der Erhaltung der männlichen Fertilität<sup>10</sup>. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Methoden der Kryokonservierung: das Slow-Freezing und die Vitrifikation. Bei beiden Verfahren wird durch die Zugabe von CPAs die Eiskristallbildung in den Zellen unterbunden. Diese Chemikalien optimieren den osmotischen Druck und den pH-Wert, versorgen die Spermien mit extrazellulärer Energie und beugen zudem auch bakterielle Kontaminationen vor<sup>11</sup>. Wesentliche Unterschiede der Vitrifikation vom Slow-Freezing finden sich bei den Einfrierraten, der Zusammensetzung der Kryoprotektiva und den Auftauprotokollen<sup>10</sup>. Bis heute ist die Methode des Slow-Freezings die am weitesten verbreitete und am häufigsten angewandte Methode um humane Samenzellen im Zuge der assistierten Reproduktionsmedizin einzufrieren, jedoch ist in den letzten Jahrzehnten die Vitrifikation immer effektiver geworden<sup>12</sup>.

Trotz des Vorteils der Kryokonservierung ist bekannt, dass das Einfrieren und anschließende Auftauen für die Spermien, schädlich ist. So verursacht dieses Verfahren eine signifikante Abnahme der Motilität, Vitalität, Chromatinstabilität und Membranintegrität und verursacht morphologische Veränderungen der Samenzellen<sup>3</sup>. Des Weiteren kann eine Kryokonservierung von Samenzellen auch Schäden der DNA induzieren. Durch Schäden an mitochondrialen Membranen wird der Prozess der Energieproduktion unterbrochen, was zu einer verringerten ATP-Verfügbarkeit in den Spermien führt<sup>3</sup>. Die Unversehrtheit der Spermien scheint der entscheidende Faktor für den Erfolg der Befruchtung sowohl bei natürlichen als auch bei assistierten Reproduktionsmethoden zu sein<sup>6</sup>.

In dieser Arbeit wird die Motilität, die Vitalität sowie der DFI der Samenzellen jeweils vor und nach der Vitrifikation untersucht und miteinander verglichen. Hierfür wurde unmittelbar nach der Ejakulation die Samenprobe makro- und mikroskopisch beurteilt, um unter anderem mittels Maklerkammer die Beweglichkeit zu bestimmen. Mittels Eosin-Negrosin-Test wurde anschließend die Vitalität und mittels Halosperm<sup>®</sup> der DFI der Samenzellen erhoben.

Die Ergebnisse der Motilitätsbestimmung ergaben einen signifikanten Unterschied sowohl der Gesamtmotilität (A, B und C) als auch der einzelnen Motilität A, B oder C vor und nach der Vitrifikation. Vor der Kryokonservierung wiesen die Samenzellen der jeweiligen Proben eine bedeutend höhere Beweglichkeit als nach der Vitrifikation auf. Da die Beweglichkeit von Samenzellen unter anderem ein Zeichen der Vitalität ist, ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung eine signifikante Abnahme der Vitalität nach Vitrifikation ergaben.

Bezüglich der Änderung des DFI's konnte auch hier ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Nativejakulat und der gefrorenen Probe nachgewiesen werden. Wie auch bei der Motilität und der Vitalität, zeigten Samenzellen nach der Vitrifikation einen signifikant höheren Prozentsatz an DNA-Fragmentationen.

## 5. Diskussion

Die Kryokonservierung von Spermien mittels Slow-Freezing ist in der ART eine weitverbreitete Methode, um Samenzellen von Patienten zu erhalten, welche beispielsweise an einer Krebserkrankung leiden oder sich einer Hormontherapie unterziehen. Da bei der Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen die Vitrifikation den Goldstandard darstellt<sup>2</sup> soll nun auch versucht werden, eine geeignete Vorgehensweise dieser Methode für Spermien zu entwickeln. Beiden Verfahren ist gemeinsam, dass durch Zugabe von kryoprotektiven Additiven die Eiskristallbildung innerhalb der Zelle verhindert werden soll.

Die Resultate der Untersuchung der Auswirkung der Vitrifikation auf die Motilität von humanen Samenzellen zeigten, dass es einen signifikanten Unterschied des Prozentsatzes der Beweglichkeit der Zellen aus dem Nativejakulat und denen der Kryokonservierung gab. So konnte eine Reduzierung der Gesamtbeweglichkeit von 67,37% auf 7,32% beobachtet werden. Nijs et al. berichteten in ihrer Studie, welche sich mit der Hyaluronbindung von Samenzellen nach Einfrieren und Auftauen befasst, dass der Prozentsatz der beweglichen Spermien nach der Kryokonservierung deutlich sank und erzielten somit ähnliche Resultate<sup>29</sup>.

Die Abnahme der Beweglichkeit der Samenzellen kann auf die nicht gänzlich ausgeschlossene Eiskristallbildung, trotz Zugabe von kryoprotektiven Additiven, zurückzuführen sein. So kommt es bei der Kryokonservierung zu Schäden der Spermien verschiedenster Arten, unter anderem konnte die Schädigung des Akrosoms und die teilweise Entfernung der äußeren akrosomalen Membran mit Abnahme des akrosomalen Inhalts als häufige Veränderung, der physikalischen Gefrierereignissen zugeschrieben werden<sup>30</sup>. Alternativ können osmotische Veränderungen Schäden an der Lipidmembranstruktur verursacht haben, welche zu Spannungsänderungen in den Wasserkanalproteinen und somit zu morphologischen Veränderungen führten<sup>31</sup>. Da die Vitrifikation zwar mit dem Kryokonservierungsmedium TYB mit Glycerol und Gentamicin durchgeführt wurde und dieses prinzipiell für das Verfahren des Slow-Freezings verwendet wird, kann auch dies Grund für die starke Motilitätsabnahme nach Vitrifikation sein. Jedoch konnten Studien bereits zeigen, dass Glycerol als Schutzmittel dem Dimethylsulfoxid (DMSO) vorzuziehen ist, da die Spermienstruktur so besser geschützt wird<sup>32,33</sup>. Der Mechanismus, durch den die Motilität abnimmt, ist jedoch bis heute nicht gänzlich geklärt. Es besteht aber eine starke Korrelation

zwischen dem Anteil unbeweglicher Spermien und mitochondrialen Defekten nach dem Auftauen<sup>34</sup>.

Neben der Motilität wurde auch der Unterschied der Vitalität der Samenzellen vor und nach der Vitrifikation untersucht. Hierfür wurde der Eosin-Negrosin-Test angewandt. Die Ergebnisse zeigten, dass es auch hinsichtlich der Vitalität einen signifikanten Unterschied zwischen der Analyse aus dem Nativejakulat und der aufgetauten Probe nach der Kryokonservierung gab. Dieses Ergebnis war bereits nach der Motilitätsbestimmung zu erwarten, da die Beweglichkeit der Samenzellen unter anderem ein Indikator für die Vitalität der Zellen ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die Vitalität im direkten Zusammenhang mit der Motilität der Samenzellen steht. Auch hier kann der Unterschied vor und nach der Vitrifikation auf die Eiskristallbildung innerhalb der Zelle und der damit verbundenen Schädigung der Membran zurückzuführen sein.

Um die Forschungsfrage bezüglich der Änderung des DFI's nach Vitrifikation zu untersuchen, wurde ein Halosperm<sup>®</sup> der unbehandelten und der vitrifizierten Proben durchgeführt. Bei der Analyse der Ergebnisse konnte eine signifikante Abnahme von 94,73% auf 92,27% der Samenzellen ohne DNA-Fragmentation nachgewiesen werden. Die Abnahme des DFI's kann auf die Veränderung der Eigenschaften der Mitochondrienmembran und erhöhte Produktion von ROS in der Samenzelle zurückzuführen sein, welche durch die Kryokonservierung hervorgerufen werden<sup>35</sup>. Durch die Produktion von ROS und eine geringere antioxidative Enzymaktivität in den Samenzellen, kann die Lebensfähigkeit der Spermien reduziert und apoptotische Wege induziert werden<sup>36</sup>. Durch die Erhöhung von ROS kann es anschließend zu einer höheren Häufigkeit von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA kommen<sup>35</sup>. In der 2006 veröffentlichten Studie von Wyrobek et al. konnte gezeigt werden, dass die Spermienmotilität unter anderem sehr stark mit DNA-Strangbrüchen und dem DFI korreliert<sup>37</sup>. Diese Korrelation konnte anhand der Ergebnisse, welche im Zuge dieser Arbeit generiert wurden, nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Durchführung der Analyse mittels Halosperm<sup>®</sup> und nicht mittels eines TUNEL-Assays sein, welcher möglicherweise exaktere Ergebnisse geliefert hätte. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass gezeigt werden konnte, dass der SCD-Test, welcher dem Halosperm<sup>®</sup> entspricht, eine signifikante Korrelation mit anderen Tests wie beispielweise dem TUNEL oder SCSA hatte<sup>38</sup>.

Darüber hinaus wurde in der Studie von Bogle et al. über Defekte in DNA-Reparaturenzymen als weiterer Grund für DNA-Schäden nach dem Einfrieren berichtet<sup>39</sup>. Des Weiteren wurde postuliert, dass DNA-Veränderungen in Spermien während der Kryokonservierung durch oxidativen Stress und Apoptose-induzierende Faktoren verursacht werden können und zur Zerstörung der Nukleoproteinstruktur, Disulfidbindungen und des DNA-Protamin-Komplexes führen<sup>40,41</sup>.

Durch die Untersuchung der Forschungsfragen hinsichtlich der Veränderung der Motilität, der Vitalität und des DFI's der Samenzellen nach Vitrifikation konnte gezeigt werden, dass das Verfahren der Kryokonservierung zu einer signifikanten Abnahme der Beweglichkeit, einhergehend mit der Vitalität führt und der DFI erhöht wird. Auch Ozkavukcu et al. stellte fest, dass die Beweglichkeit, Plasmamembranfunktionalität, Akrosomintegrität und Gesamtlebensfähigkeit der Spermien nach dem Auftauen typischerweise im Vergleich zum Zustand vor dem Einfrieren abnimmt<sup>34</sup>. Dadurch kann belegt werden, dass nach dem Einfrieren eine insgesamt schlechtere Samenqualität zu erwarten ist.

Da es sich bei den verwendeten Samenproben um jene von Samenspendern mit Normozoospermie handelt, wäre durch die starke Motilitätsabnahme mit diesem Protokoll der Vitrifikation, eine Kryokonservierung von Ejakulat mit eingeschränkter Samenqualität nicht sinnvoll. Mit der Slow-Freezing Methode, welche im IVF-Labor des Kinderwunschzentrums an der Wien angewandt wird, werden deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Beweglichkeit der Samenzellen nach dem Tauen erzielt. Dadurch kann belegt werden, dass die Vitrifikation unter Verwendung des Freezingmediums TYB mit Glycerol und Gentamicin und der umfunktionierten CBS™ High Security Vitrefication Straws nicht die gewünschten Ergebnisse, nämlich eine vergleichbare oder sogar verbesserte Motilität nach Kryokonservierung mittels Slow-Freezing, hervorbrachte.

Um weiterführende Untersuchungen bezüglich der Findung einer geeigneten Methode der Vitrefikation von Samenzellen anzuschließen, kann ein anderes Einfriermedium verwendet werden, welches eigens für das Verfahren der Vitrefikation entwickelt wurde. Des Weiteren wäre die Verwendung von Straws, welche für die Kryokonservierung von Samenzellen konzipiert wurden, sinnvoll, da diese zweckgemäß angewandt werden können und nicht umfunktioniert werden müssen.

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Samenzellen mit einer Abnahme der Beweglichkeit, Vitalität und des DFI's auf das Verfahren der Vitrifikation reagieren. Aufgrund dessen, dass dieses Verfahren des Einfrierens den Goldstandard bei der Kryokonservierung von Eizellen und Embryonen darstellt und eine wesentliche Zeitersparnis mit sich bringt, sind weiterführende Untersuchungen für die Vitrifikation von Samenzellen von Bedeutung.

## Literaturverzeichnis

1. Bunge, R., Sherman J. © 1953 Nature Publishing Group. *Nature*. **172**, 767-768 (1953)
2. Pietrowski, D. *et al.* Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression. *Cryobiology* **85**, 73-78 (2018).
3. Sharma, R. *et al.* Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. **61**, 1-12 (2015).
4. Hammadeh, M. E. *et al.* Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl*. **22**, 155-162 (1999).
5. Manuscript A. *NIH Public Access*. **1842**, 2610-2620 (2015).
6. Gandini, L., Sgrò, P., Lombardo, F., *et al.* Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod*. **21**, 2882-2889 (2006).
7. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen Sixth Edition*. Vol Edition, **VI**, (2021).
8. Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. **16**, 231-245 (2009).
9. Luis, F., Moncayo, G., World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, **5**, (2010).
10. Li Y, Zhou L, Lv M, Ge P, Liu Y, Zhou D. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation : A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **233**, 84-92 (2019).
11. Anger, J.T., Gilbert, B. R., Goldstein, M. Cryopreservation of sperm: Indications, methods and results. *J Urol*. **170**, 1079-1084 (2003).
12. Tao, Y., Sanger, E., Saewu, A., Leveille, M. Human sperm vitrification : the state of the art. *Reprod Biol Endocrinol*. **5**, 1-10 (2020).
13. Lusignan, M. F., Li, X., Herrero, B., Delbes, G., Chan, P. T. K. Effects of different cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *Andrology* **6**, 829-835 (2018).
14. Riva, N.S., Ruhlmann, C., Iaizzo, R.S., López, C.A.M., Martínez, A.G. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. *J Bras Reprod Assist*. **22**, 331-337 (2018).
15. Vajta, G., Rienzi, L., Ubaldi, F.M. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. **30**, 325-333 (2015).

16. Cai, H., Niringiyumukiza, J.D., Li, Y., *et al.* Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: A systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reprod Biol Endocrinol.* **16**,1-11 (2018).
17. Practice, T., Medicine R, Technology R. Mature oocyte cryopreservation: A guideline. *Fertil Steril.* **99**, 37-43 (2013).
18. Li, Z., Wang, Y. A., Ledger, W., Edgar, D. H. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod.* **0**, 1-8 (2014).
19. Su, P., Li, Y., Niringiyumukiza, J.D., *et al.* Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reprod Biol Endocrinol.* **16**, 1-11 (2018).
20. Pomeroy, K.O., Harris, S., *et al.* Storage of cryopreserved reproductive tissues : evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril.* **94**, 181-1188 (2010).
21. Pemán, J., Molina, I., Mari, M., Pellicer, N., Martínez, J. V., Novella-Maestre, E. Bacterial and fungal contamination risks in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertil Steril.* **106**, 127-132 (2016).
22. Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., *et al.* The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* **27**, 2908-2917 (2012).
23. Agarwal, A., Gupta, S., Du Plessis, S., *et al.* Abstinence Time and Its Impact on Basic and Advanced Semen Parameters. *Urology.* **94**, 102-110 (2016).
24. González-Marín, C., Gosálvez, J., Roy, R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci.* **13**, 14026-14052 (2012).
25. Simon, L., Lutton, D., McManus, J., Lewis, S. E. M. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril.* **95**, 652-657 (2011).
26. Atiken, R. J. Implications for fertility. *Reproduction.* **159**, R189-R201(2020).
27. Newman, H., Catt, S., Vining, B., Vollenhoven, B., Horta, F. DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: a systematic review. *Mol Hum Reprod.* **28**, 71 (2022).
28. Hallak, J., Sharma, R. K., Wellstead, C., Agarwal, A. Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med.* **45**, 38-42 (2000).
29. Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., *et al.* Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* **19**, 202-206 (2009).

30. Barthelemy, C., Royere, D., Hammah, S., Lebos, C., Tharanne, M. J., Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Syst Biol Reprod Med.* **25**, 29-40 (1990).
31. Sa-Ardrit, M., Saikhun, J., Thongtip, N., *et al.* Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int J Androl.* **29**, 346-352 (2006).
32. Oettle, E. E. Changes in Acrosome Morphology During Cooling and. *Anim Reprod Sci.* **12**, 145-150 (1986).
33. Serafini, P.C., Hauser, D., Moyer, D., Marrs, R.P. Cryopreservation of human spermatozoa correlations of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova. *Fertil Steril.* **46**, 691-695 (1986).
34. Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A. Oztuna, D., Karahuseyinoglu, S., Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* **25**, 403-411 (2008).
35. Said, T. M., Gaglani, A., Agarwal, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online.* **21**, 456-462 (2010).
36. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol.* (2012).
37. Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S., *et al.* Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**, 9601-9606 (2006).
38. Le, M. T., Nguyen, T., Nguyen, H., *et al.* Does sperm DNA fragmentation correlate with semen parameters? *Reprod Med Biol.* **18**, 390-396 (2019).
39. Bogle, O. A., Kumar, K., Attardo-Parrinello, C., *et al.* Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology.* **5**, 10-22 (2017).
40. Yeste, M., Estrada, E., Casas, I., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology.* **79**, 929-939 (2013).
41. Johnston, S. D., Satake, N., Zee, Y., López-Fernández, C., Holt, W. V., Gosálvez J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: An integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. *Reproduction.* **143**, 787-797 (2012).

# Anhang

## a. Freezing Medium - TEST Yolk Buffer (TYB) with Glycerol and Gentamicin

### DEUTSCH

**EU-Vorsichtshinweis:** Nur für den professionellen Einsatz.

#### INDIKATIONEN

Freezing Medium ist für Kryokonservierung von menschlichem Samen für den Einsatz in assistierten Reproduktionsverfahren vorgesehen.

#### PRODUKTBESCHREIBUNG

**Komponente** **Spezifikation**  
Formulierung: (siehe Referenzen 3 und 4)  
Hauptkomponenten:

TES, Trizma-Basis, Natriumcitrat und Fruktose  
Gentamicinsulfat..... 10 µg/ml  
Glycerol..... 12 % (w/v)  
Hitzeinaktiviertes Eigelb aus spezifisch  
pathogenfreien (SPF) Legehennen ..... 20 % (w/v)

#### ZUSAMMENSETZUNG:

<u>Antibiotika</u>	<u>Protein</u>
Natriumcitrat	Eigelb vom Hahn
<u>Puffer</u>	<u>Energiesubstrate</u>
TES-Puffer	Fruktose
Trizma-Basis	<u>Antibiotika</u>
<u>Kryoprotektoren</u>	Gentamicinsulfat
Glycerol	<u>Wasser</u>
	Wasser für Injektionszwecke (WFI)

#### QUALITÄTSSICHERUNG

Die aseptische Verarbeitung des membranfiltrierten Freezing Mediums erfolgt in Übereinstimmung mit Fertigungsverfahren, die nachweislich einen Sterilitätsicherheitswert (SAL) von  $10^{-6}$  aufweisen.

Jede Charge Freezing Medium wird auf Folgendes getestet:

- Endotoxine durch Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)-Nachweis
- Spermien-Kryo-Überlebensassay
- Sterilität durch aktuellen USP-Sterilitätstest <71>

Alle Ergebnisse sind einer chargenspezifischen Analysebescheinigung zu entnehmen, die auf Anfrage erhältlich ist.

#### GEBRAUCHSANWEISUNG

- Samen wird nach zwei oder drei Tagen Abstinenz gesammelt.
- Die Probe 30 Minuten lang bei 37 °C verflüssigen lassen.
- Ein Fläschchen des Mediums wird aufgetaut und auf 37 °C gebracht.
- Die verflüssigte Probe in ein steriles, konisches 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführen. Das Volume wird bestimmt und das Medium wird tröpfchenweise hinzugegeben, bis ein Verhältnis von der Probe zum Medium von 1:1 erreicht wird.  
Hinweis: Proben mit einer hohen Viskosität erfordern möglicherweise einen zusätzlichen Schritt mit wiederholtem Pipettieren oder eines Passierens durch eine 18-G-Nadel, um ein gründliches Mischen sicherzustellen.
- Die Proben-Medium-Mischung wird in einen Becher oder einen anderen geeigneten Behälter mit 37 °C warmem Wasser gestellt.
- Der Behälter wird bei 2 °C bis 5 °C gekühlt gelagert, um eine langsame Kühlung der Mischung zu ermöglichen (0,5 °C/min.). Nach 90 Minuten kann die Probe mithilfe von herkömmlichen Vorgehensweisen in Halmen, Fläschchen oder Pellets eingefroren werden.

Hinweis: Die Schritte 1-5 können bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Weitere Einzelheiten zum Gebrauch dieser Produkte sind den Verfahren und Vorschriften des jeweiligen Labors zu entnehmen, die eigens für das jeweilige medizinische Programm entwickelt und optimiert wurden.

#### LAGERUNGSANWEISUNGEN UND STABILITÄT

Die ungeöffneten Flaschen bei mindestens -10 °C lagern. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist das Freezing Medium bis zu dem auf der Kennzeichnung der Flasche oder des Fläschchens angegebenen Verfallsdatum stabil.

Das Medium keinen wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen aussetzen. Werden kleinere Aliquoten gewünscht, das Produkt auftauen, in sterile etikettierte Behälter aliquotieren und bis zum Gebrauch einfrieren.

#### VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

Dieses Produkt ist für den Gebrauch durch Personal vorgesehen, das in assistierten Reproduktionsverfahren geschult ist. Zu diesen Verfahren zählt der Anwendungsbereich, für den dieses Produkt vorgesehen ist.

Die Einrichtung des Anwenders ist für die Rückverfolgbarkeit des Produkts verantwortlich und muss alle einschlägigen geltenden Bestimmungen zur Rückverfolgbarkeit einhalten.

Freezing Medium erscheint opak. Flaschen mit Medium, das sichtbare Partikel enthält oder nicht gelb ist, nicht verwenden.

Um Kontaminationsprobleme zu vermeiden, stets aseptische Kautelen einhalten und überschüssiges Medium, das nach Abschluss des Verfahrens in der Flasche oder im Fläschchen verbleibt, entsorgen.

Angaben zu bekannten Merkmalen und technischen Faktoren, die bei einer Wiederverwendung des Produkts ein Risiko darstellen könnten, wurden nicht identifiziert. Daher darf das Produkt nach dem ersten Gebrauch des Behälters nicht mehr verwendet werden.

#### KONTRAINDIKATIONEN

Das Produkt enthält Gentamicinsulfat und Eigelbprotein. Es ist anhand angemessener Vorsichtsmaßnahmen sicherzustellen, dass der Patient keine Sensitivität gegenüber diesem Antibiotikum oder Eigelbprotein aufweist.

## b. VitalScreen

# VitalScreen

Dokumentenreferenz: FP09 I14 R01 D.1  
Aktualisierungsdatum: 20/04/2022

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik  
Reagenzien nur für den professionellen  
Gebrauch

### ALLGEMEINE INFORMATIONEN

VitalScreen verwendet die Eosin-Nigrosin-Färbung, um den Prozentsatz der lebenden Spermien zu bestimmen. Das Verfahren basiert auf dem Grundsatz, dass tote Zellen Eosin über ihre Zellmembran aufnehmen und sich dadurch rot färben. Das Nigrosin sorgt für einen dunklen Hintergrund, der die Auswertung der Objektträger erleichtert.

Die Vitalität der Spermien sollte bestimmt werden, wenn weniger als 40 % der Spermien beweglich sind. Bei Proben mit schlechter Beweglichkeit ist es wichtig, zwischen unbeweglichen toten Spermien und unbeweglichen lebenden Spermien zu unterscheiden (1).

### BESTIMMUNGSGEMÄßE VERWENDUNG

VitalScreen ist ein semi-quantitativer, nicht-automatisierter diagnostischer Test zur Beurteilung der Vitalität von Spermien in einer Samenprobe mittels einer Eosin-Nigrosin-Färbung.

VitalScreen kann unter Umständen bei der Beurteilung der Diagnose und Behandlung männlicher Unfruchtbarkeit helfen.

VitalScreen ist so konzipiert, dass mit einem Kit 200 Tests durchgeführt werden können.

### IM KIT ENTHALTENE MATERIALIEN

VitalScreen (Produktcode: VITAL):

- Reagenz 1: 20 ml 1%iges Eosin Y in Kochsalzlösung
- Reagenz 2: 30 ml 5%iges Nigrosin in Kochsalzlösung

Ein Analysezertifikat und ein Sicherheitsdatenblatt sind auf Anfrage erhältlich oder können von unserer Website ([www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)) heruntergeladen werden.

### ERFORDERLICHES MATERIAL, DAS NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN IST

- Lichtmikroskop (400 - 600fache Vergrößerung)
- Mikroskop-Objektträger

- Deckgläser
- Pipetten und frische Pipettenspitzen
- Kleine Reagenzröhrchen oder Eppendorf-Röhrchen

### METHODE

Scannen Sie den Barcode (oder folgen Sie dem Link auf [www.fertipro.com](http://www.fertipro.com)), um das Demonstrationsvideo anzusehen:



### PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

VitalScreen sollte an frischen, menschlichen Samenproben durchgeführt werden, vorzugsweise innerhalb einer Stunde nach der Ejakulation.

### VORBEREITUNG VON REAGENZIEN

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Mischen Sie Reagenz 2 vor dem Gebrauch.

### VITALSCREEN-VERFAHREN

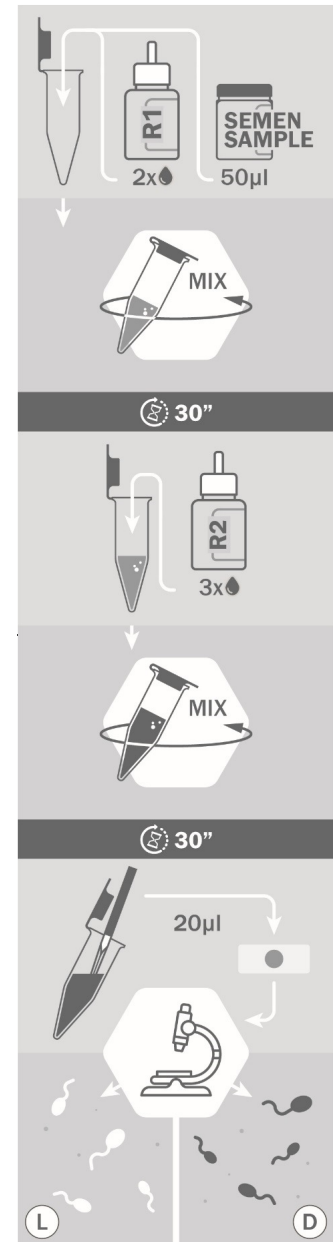
1. Geben Sie 50 µl Sperma und 2 Tropfen Reagenz 1 in ein Eppendorf-Röhrchen. Vorsichtig mischen. Vermeiden Sie den Kontakt zwischen der Reagenzflasche und dem Röhrchen mit dem Sperma.
2. Innerhalb von 30 Sekunden 3 Tropfen von Reagenz 2 hinzufügen. Vorsichtig mischen. Vermeiden Sie den Kontakt zwischen der Reagenzflasche und dem Röhrchen mit dem Sperma.
3. Innerhalb von 30 Sekunden nach dem Hinzufügen von Reagenz 2 20 µl der Sperma-Färbemittel-Mischung auf einen Objektträger geben und sofort das Deckglas darauf legen.
4. Sofort unter dem Mikroskop auswerten.

**Hinweis 1:** Nicht warten, bis der Tropfen getrocknet ist, da sich sonst Nigrosin-Kristalle bilden, die die Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen können.

**Hinweis 2:** Falls sich das Nigrosin in der Samenprobe abscheidet (was bei zähflüssigen Proben selten vorkommen kann) oder bei der Analyse von Proben mit geringer Spermienkonzentration, wird empfohlen, nur mit Eosin (Reagenz 1) zu arbeiten und kein Nigrosin (Reagenz 2) zu verwenden. In diesem Fall fahren Sie nach Schritt 1 mit Schritt 3 fort.

### INTERPRETATION

- Farblose Spermien: lebende Spermien
- Rot gefärbte Spermien: tote Spermien



**Hinweis:** Spermien mit einer schwachen rosa Kopfverfärbung sollten als tot bewertet werden (1).

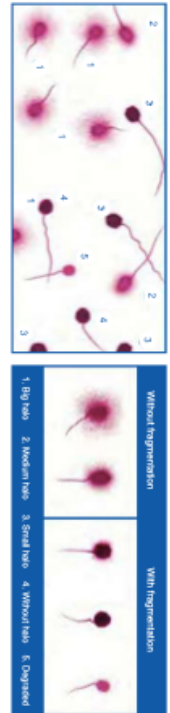
Den kompletten Objektträger absuchen und zwischen 100 und 200 Zellen zählen. Die lebenden von den toten Spermien unterscheiden.

Die Ergebnisse sofort ablesen. Bei einer zu langen Wartezeit sinkt der Prozentsatz der Vitalität.

Die Vitalitätsergebnisse sollten in Verbindung mit den Motilitätsergebnissen derselben Samenprobe bewertet werden.

## c. Halosperm® G2 – Instruction for use

Version 08.1 / 2018



### Sperm classification

Count a minimum of 300 sperm per sample following this criteria:

- Spermatozoa without DNA fragmentation:
  - Spermatozoa with big halo: those whose halo width is similar or higher than the diameter of the core (Fig. 1).
  - Spermatozoa with medium-sized halo: their halo size is between those with large and with very small halo (Figure 2).
  - "others": cell nucleus which do not correspond to spermatozoa. One of the morphological characteristics which distinguish them is the absence of tail. These cells must not be included in the estimation of the frequency of sperm with fragmented DNA.
- Spermatozoa with fragmented DNA:
  - Spermatozoa with small halo: the halo width is similar or smaller than 1/3 of the diameter of the core (Fig. 3).
  - Spermatozoa without halo: (Fig. 4).
  - Spermatozoa without halo and degraded: those that show no halo and present a core irregularly or weakly stained (Fig. 5).

### Positive and negative controls

**Positive control:** all the sperm cells are shown with halo. Follow the instruction for use, skipping step 7.  
**Negative control:** all the sperm cells are shown without halo. Follow the instruction for use, skipping step 8.

### Safety and the environment

- Care should be taken to avoid contact with skin or eyes, and to prevent inhalation. The acid solution (DA) contains Hydrochloric acid, and the lysis solution (LS) contains Dithiothreitol and Triton X-100. Work under air removal environment and follow the manufacturer's Material Safety Data regarding safe handling.  
 - Do not release the products used into the environment. Please follow the specific safety regulation of your laboratory facility with respect to chemicals storage and toxic products disposal as well as the exposure to them.

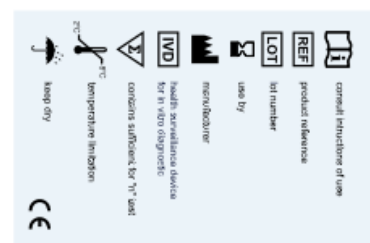
### Precautions

- All patient samples and reagents should be treated as potentially infectious and the user must wear protective gloves, eye protection and laboratory coats when performing the test.
- The test should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Do not use beyond the expiration date, which appears on the package label.
- The use of gloves and face mask is recommended.
- Material Safety Data Sheet is available on request.

### Store conditions

After receiving the kit, store it between 2° and 8°C.  
 After opening the kit is stable for 9 months

CI-Faraday, 7 Párrafo Científico de Madrid / Edificio CLAUD / Campus de Cantoblanco / 28049 Madrid  
 Tel. + 34 91 279 69 50 / www.halotech.com / info@halotech.com



halosperm® G2 has been developed by Halotech DNA in response to the needs of users of the SCD test (Sperm Chromatin Dispersion test) for assessing sperm DNA fragmentation in human.

### Principle of the method

Intact unfixed sperm (fresh, frozen/unthawed, diluted samples) are immersed in an inert agarose microgel on a pretreated slide. An initial acid treatment denatures DNA in those sperm cells with fragmented DNA. Following this, the lysis solution removes most of the nuclear proteins. When absence of massive DNA breakage is present, nucleoids from sperm with fragmented DNA either, do not show a dispersion halo or the halo is minimal. The diagnostic sensitivity and specificity is 93%. This test is an aid in the diagnosis. Interpretation of the results will be under medical criteria.

### Description of kit reagents

Every kit contains the necessary to perform 10 assays. The components are:

- Agarose Cell Support (ACS): 1 screw tube
- Super-Coated Slides (SCS): 10 units
- Eppendorf Tubes (ETP): 10 units
- Solution 1 (DA) Denaturant Agent, one 10 ml drop bottle
- Solution 2 (LS) Lysis Solution, one 10 ml drop bottle
- Solution 3 (SSA) eosine Staining Solution A, one 10 ml drop bottle
- Solution 4 (SSB) thiazine Staining Solution B, one 10 ml drop bottle
- Floret

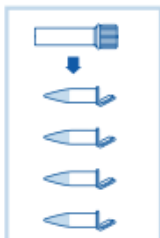
### Material and equipment required, not provided with the kit

Bright field or fluorescence microscope, fridge at 4° C, incubation bath (s) at 37° C and 95-100° C, plastic gloves, glass coverslips (24 x 24 mm), Micropipettes, Petri dishes or similar tray, disposable pipettes, distilled water, ethanol at 70% and 100%, Microwave oven and fume hood (it is recommended the use of fume hood but it is not mandatory because of low reactive concentration). Be ware that all equipment is calibrated

### Sperm sample

Fresh semen samples should be collected in a sterile recipient. The sperm DNA fragmentation assay should be performed immediately once the sperm sample has been obtained or thawed after cryopreservation.

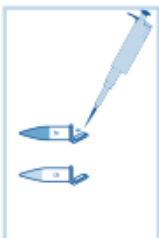
## Instructions for use



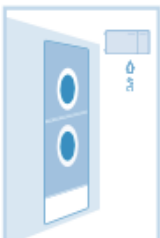
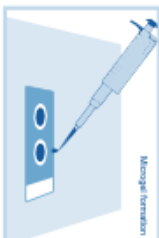
- Place the agarose screw tube (ACS) into the float and melt using a water bath (or a beaker with water on a hot plate) at 95-100°C for 5 minutes or until it is completely melted. Otherwise, if you prefer melting the agarose using a microwave oven, fill 100 ml of water in a beaker. Then, place the ACS slightly opened with the float inside the beaker and heat it at maximum power for 1.5 minutes. Watch constantly and stop the process as soon as the water starts boiling. Please do not keep the ACS boiling inside the microwave! Add 10 Eppendorf tubes (ET) with 100 microliters of the agarose melted. Immediately after, keep the Eppendorf tubes which are not going to be used at that moment will be stored in the fridge along with the kit.
- Set Solutions 1 and 2 at room temperature (22°C) during the whole process.
- Prepare and select the Super-Coated Slides (SCS) which are going to be used.



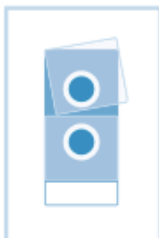
2. Dilute the sperm sample in an appropriate human sperm extender or PBS to a maximum of 20 million sperm per milliliter.
3. Immediately after, transfer 50 µl of the sperm sample to the Eppendorf tube and mix gently with a micropipette. The formation of bubbles shall be prevented.



4. Following, place a drop of 8 µl of the coil suspension onto the centre of sample well (S<sup>1</sup>). Cover with a coverslip. Press gently, avoiding air bubbles formation. Slides must be held in a horizontal position throughout the entire process. Use the 'C' well to process a control sample.



5. Place the slide on a cold surface (for example, a metal or glass plate pre cooled at 4°C) and transfer into the fridge at 4°C, for 5 minutes to solidify the agarose.
6. Take the slide out of the fridge and remove the coverslip by sliding it off gently. All the processing must be performed at room temperature (22°C).



7. Place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure into a Petri dish or similar tray.  
Apply Solution 1 (DA) on the well making sure it is fully covered by the reactive during the whole process. Incubate for 7 minutes. Then, remove the reactive by tilting until completing the drying and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. It is very important to remove the reactive by tilting and letting it slide.



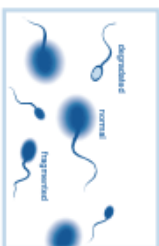
8. Apply Solution 2 (LS) on the well making sure it is fully immersed. Incubate for 20 minutes. Then, remove the reactive by tilting until completing the drying and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. It is very important to remove the reactive without shaking. We will perform the removal by tilting and letting it slide.



9. Wash the slide for 5 min covering with abundant distilled water and using a disposable pipette. Then, remove the reactive by tilting until completing the drying and place the slide horizontally in an elevated position as suggested in the figure. Dehydrate by flooding with 70% ethanol, using a disposable pipette and incubate for 2 minutes. Drain and allow to dry horizontally on filter paper or similar. After drying, processed slides may be kept in slide boxes at room temperature in a dry and dark place for several months.



10. Place the slide horizontally in an elevated position into a Petri dish or similar tray. Apply Solution 3 (SSA) on the wells making sure these are fully immersed. Incubate for 7 minutes. Then, remove the stain by tilting until completing the drying and place the slide horizontally in an elevated position.



11. Apply Solution 4 (SSB) on the wells making sure these are fully immersed. Incubate for 7 minutes. Then, remove the stain by tilting. Remove the excess of stain and allow to dry at room temperature.



12. Visualize under bright field microscopy. If the staining is too intense, the slide might be washed in tap water. If the staining is too weak, immerse the slide in 100% ethanol, allow to dry and repeat since step 10. For fluorescence microscopy staining, please contact the authorized dealer.

13. Calculate the percentage of sperm with fragmented DNA. The results should be evaluated taking into account all clinical and laboratory findings related to the sperm sample. Thresholds for frequency of Sperm DNA Fragmentation (SDF) have been suggested by Dr. Eversen et al. (Evensen and Nixon, Reprod Biomed Online 12:466-472, 2006).



$$\text{SDF (\%)} = \frac{\text{Fragmented + Degraded}}{\text{Total number of covered cells}} \times 100$$

### For future assays

Place as many eppendorf tubes as semen samples are going to be evaluated and start the protocol at the point 1.2. Previously, place the agarose screw tube (ACS) into the float and melt using a water bath (or a beaker with water on a hot plate) at 95-100°C for 5 minutes or until it is completely melted. Otherwise, if you prefer melting the agarose using a microwave oven, fill 100 ml of water in a beaker. Then, place the ACS slightly opened with the float inside the beaker and heat it at maximum power for 1.5 minutes. Watch constantly and stop the process as soon as the water starts boiling.

**Please do not keep the ACS boiling inside the microwave!**