

Masterarbeit

Gegenüberstellung zweier verschiedener
Samenaufbereitungsmethoden hinsichtlich Qualität,
Chromatinkondensation und Expression der Hyaluronsäure-
Rezeptoren

Dichtegradient vs. Mikrofluidik

eingereicht von
Anja Zimmer, BSc.

Zu Erlangung des akademischen Grades
MSc. in Medizinischer Genetik
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des
Universitätslehrganges Master Medizinische Genetik

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

Graz, 17. August 2022

Abstract

Sperm preparation plays a crucial role in medical-assisted reproduction (MAR). In the present work, two different processing techniques (density gradient and microfluidics (ZyMot chamber)) were compared.

The aim of this study was to find a processing technique that isolates high-quality sperm cells with the highest potential to achieve pregnancy.

Thereeto, the sperm concentration, motility, hyaluronan-binding ability and chromatin condensation were measured after processing with the respective separation technique to have a direct comparison.

These techniques were compared in 20 male patients, including twelve patients with normozoospermia (normal sperm count), seven patients with teratozoospermia (impaired sperm appearance) and one patient with oligoteratozoospermia (reduced sperm count and appearance).

This demonstrated that both the concentration and the percentage of motile spermatozoa were statistically significantly increased after the microfluidic processing technique compared to density gradient centrifugation. The total sperm concentration, hyaluronan-binding ability, and chromatin condensation showed no significant differences when comparing the two methods.

The increased motility after microfluidic processing technique may be due to the fact that spermatozoa must independently find their way to reach the surface through the narrow pore membrane. This serves as a surrogate for the natural process that usually occurs in the cervix in the female organism. In contrast, in density gradient centrifugation, sperm cells are separated by their different densities using a centrifugation step in a tube.

This pilot study provides promising results using the ZyMot chamber as a semen processing technique. A further study with a larger number of subjects would be required to make a statistically sound statement regarding the most appropriate semen processing technique.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass die vorliegende Masterarbeit von mir selbst verfasst wurde und ich keine unerlaubten Hilfsmittel verwendet oder andere angegebene Quellen benutzt habe.

Ich versichere, dass ich die Masterarbeit bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form im In- und Ausland vorgelegt oder veröffentlicht habe.

Weiters versichere ich, dass die vorliegende Arbeit der elektronisch eingereichten Version entspricht.

Datum: 17.08.2022

Unterschrift: _____

Vorwort

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Masterlehrganges „Medizinische Genetik“ an der Medizinischen Universität Graz zum Erlangen des akademischen Titels Master of Science (MSc.) verfasst.

Ich möchte mich bei all jenen Personen bedanken, die sowohl durch ihre fachliche, als auch persönliche Unterstützung einen Beitrag zur Verfassung meiner Masterarbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Ebner für die Betreuung und die Begutachtung meiner Masterarbeit danken.

Ein großes Dankeschön geht an die ärztlichen Leiter des Kinderwunschzentrums an der Wien Herrn Univ. Prof. Dr. Andreas Obruca und Herrn Univ. Prof. Dr. Heinz Strohmer für die Ermöglichung dieser Masterarbeit.

Ich möchte mich bei der Laborleitung Martina Wöber für die Weitergabe ihres fachlichen Wissens und das Vertrauen und Unterstützung zur Umsetzung dieser Masterarbeit bedanken.

Weiters danke ich dem gesamten Laborteam (Alexandra Urbanitsch, Cindy Simon, Hans-Peter Satzer, Lars Fökel, Linda Rieschl, Maria Wohlmacher, Nicole Burdis, Nina Dietrich, Sophie Wanderer und Vesna Krajina) für deren Mithilfe.

Für die Unterstützung, Hilfestellung und Geduld möchte ich besonders meinem Freund Benjamin danken. Danke, dass du immer für mich da bist.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich in all meinen Zielen unterstützen und immer hinter mir stehen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund.....	2
2.1	Männliche Geschlechtsorgane	2
2.1.1	Hoden	2
2.1.2	Nebenhoden	3
2.1.3	Samenleiter	3
2.1.4	Akzessorische Geschlechtsdrüsen	4
2.1.5	Harnröhre	4
2.1.6	Penis	4
2.2	Spermatogenese	6
2.2.1	Vermehrung.....	7
2.2.2	Reifung	7
2.2.3	Differenzierung (Spermiogenese)	7
2.3	Aufbau eines Spermiums	8
2.3.1	Kopf	8
2.3.2	Halsstück.....	8
2.3.3	Mittelteil	9
2.3.4	Schwanz	9
2.3.5	Endstück	9
2.4	Befruchtung.....	9
2.5	Ursachen für eine Infertilität des Mannes	11
2.5.1	Genetische und chromosomale Ursachen des Mannes.....	11
2.5.2	Weitere mögliche Ursachen.....	14
2.6	Samenanalyse	17
2.6.1	Spermiogramm	17
2.6.2	Spermium-Hyaluronan-Bindungstest (HBA)	20
2.6.3	Anilinblau-Färbung.....	20

2.7	Methoden der Samenaufbereitung	22
2.7.1	Dichtegradient	22
2.7.2	Mikrofluidik	23
2.8	Material und Methoden	24
2.8.1	Studiendesign	24
2.8.2	Aufbereitung Samenprobe	27
2.8.3	Analyse der Samenqualität	27
2.8.4	Geräte und Reagenzien	29
3	Ergebnisse	32
3.1	Konzentrationsbestimmung	32
3.1.1	Konzentrationsbestimmung gesamt	32
3.1.2	Konzentrationsbestimmung: motile Samenzellen	33
3.2	Motilitätsbestimmung	34
3.2.1	Motilitätsbestimmung: progressiv bewegliche Samenzellen	34
3.2.2	Motilitätsbestimmung: progressiv und ortsbewegliche Samenzellen	35
3.2.3	Motilitätsbestimmung: unbewegliche Samenzellen	36
3.3	HBA	37
3.4	Anilinblau – Färbung	38
4	Diskussion	39
5	Literaturverzeichnis	43
6	Anhang (Rohdaten)	47

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Androgen-Insensitivitäts-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
AZF	Azoospermie-Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DG	Dichtegradient
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HBA	Spermium-Hyaluronan-Bindungstest
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-Vitro-Fertilisation
KAIS	komplettes Androgen-Insensitivitäts-Syndrom
LH	Luteinisierendes Hormon
MAIS	mildes Androgen-Insensitivitäts-Syndrom
MAR	medizinisch-assistierte Reproduktion
MAR-Test	Mixed-Antiglobulin-Reaction-Test
ml	Milliliter
PAIS	partiell Androgen-Insensitivitäts-Syndrom
µl	Mikroliter
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCOS	Sertoli-Cell-Only-Syndrom
SRY	Sex determining region of Y
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Männliche Geschlechtsorgane	2
Abbildung 2: Spermatogenese	6
Abbildung 3: Aufbau einer Samenzelle	8
Abbildung 4: Zählkammer – Maklerkammer	18
Abbildung 5: Beurteilung der Morphologie mittels Diff-Quick Färbung	19
Abbildung 6: Anilinblau-Färbung	21
Abbildung 7: Samenaufbereitung mittels Dichtegradienten	23
Abbildung 8: ZyMot Multi 850 µl	24
Abbildung 9: Flussdiagramm der experimentellen Durchführung der Masterarbeit	26
Abbildung 10: Konzentrationsbestimmung gesamt im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	32
Abbildung 11: Konzentrationsbestimmung motil im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	33
Abbildung 12: Motilitätsbestimmung progressiv im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	34
Abbildung 13: Motilitätsbestimmung gesamt im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	35
Abbildung 14: Motilitätsbestimmung unbeweglich im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	36
Abbildung 15: HBA im Vergleich beider Aufbereitungstechniken	37
Abbildung 16: Anilinblau-Färbung im Vergleich beider Aufbereitungstechniken ..	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientenkollektiv.....	25
Tabelle 2: verwendete Geräte mit dazugehöriger Firma und Seriennummer	29
Tabelle 3: verwendete Reagenzien mit dazugehöriger Firma und Lot-Nummer ..	30

Zusammenfassung

Die Spermienaufbereitung spielt eine entscheidende Rolle in der medizinisch-assistierten Reproduktion (MAR). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Aufbereitungstechniken (Dichtegradient und Mikrofluidik (ZyMot-Kammer)) miteinander verglichen.

Ziel dieser Arbeit war es eine Aufbereitungstechnik zu finden, die hoch-qualitative Spermien mit dem höchstmöglichen Potential zum Erzielen einer Schwangerschaft isoliert.

Getestet wurde die Konzentration, Motilität, Hyaluronan-Bindungsfähigkeit und die Chromatinkondensation nach Aufbereitung der Samenprobe im Vergleich der beiden Techniken. Verglichen wurden diese Aufbereitungstechniken an 20 männlichen Patienten, wobei zwölf Patienten mit einer Normozoospermie (normaler Spermiogrammbefund), sieben Patienten mit einer Teratozoospermie (Einschränkung im Aussehen der Samenzellen) und ein Patient mit einer Oligoteratozoospermie (Einschränkung in der Anzahl und Aussehen der Samenzellen) in dieser Studie inkludiert waren.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an motilen Samenzellen und der prozentuelle Anteil an motilen Samenzellen nach der mikrofluidischen Aufbereitungstechnik im Vergleich zu der Dichtegradientenzentrifugation statistisch signifikant erhöht wurde. Die Gesamtkonzentration, Hyaluronan-Bindungsfähigkeit und Chromatinkondensation zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Methoden.

Die gesteigerte Motilität nach mikrofluidischer Aufbereitungstechnik kann darauf zurückzuführen sein, dass die Samenzellen eigenständig ihren Weg finden müssen, um durch die engporige Membran an die Oberfläche gelangen zu können. Dies soll den natürlichen Prozess, der üblich im Gebärmutterhals im weiblichen Organismus abläuft, nachahmen. Im Gegensatz dazu werden die Samenzellen bei der Dichtegradientenzentrifugation durch deren unterschiedliche Dichte mittels eines Zentrifugationsschrittes in einem Röhrchen aufgetrennt.

Diese Pilotstudie liefert vielversprechende Ergebnisse bei Verwendung der ZyMot-Kammer als Samen-Aufbereitungstechnik. Eine weitere Studie mit einer größeren Probandenzahl wäre erforderlich, um eine statistisch fundierte Aussage bezüglich der geeignetsten Samen-Aufbereitungstechnik zu treffen.

Abstract

Sperm preparation plays a crucial role in medical-assisted reproduction (MAR). In the present work, two different processing techniques (density gradient and microfluidics (ZyMot chamber)) were compared.

The aim of this study was to find a processing technique that isolates high-quality sperm cells with the highest potential to achieve pregnancy.

There to, the sperm concentration, motility, hyaluronan-binding ability and chromatin condensation were measured after processing with the respective separation technique to have a direct comparison.

These techniques were compared in 20 male patients, including twelve patients with normozoospermia (normal sperm count), seven patients with teratozoospermia (impaired sperm appearance) and one patient with oligoteratozoospermia (reduced sperm count and appearance).

This demonstrated that both the concentration and the percentage of motile spermatozoa were statistically significantly increased after the microfluidic processing technique compared to density gradient centrifugation. The total sperm concentration, hyaluronan-binding ability, and chromatin condensation showed no significant differences when comparing the two methods.

The increased motility after microfluidic processing technique may be due to the fact that spermatozoa must independently find their way to reach the surface through the narrow pore membrane. This serves as a surrogate for the natural process that usually occurs in the cervix in the female organism. In contrast, in density gradient centrifugation, sperm cells are separated by their different densities using a centrifugation step in a tube.

This pilot study provides promising results using the ZyMot chamber as a semen processing technique. A further study with a larger number of subjects would be required to make a statistically sound statement regarding the most appropriate semen processing technique.

1 Einleitung

Von Infertilität spricht man, wenn ein Paar trotz regelmäßigen, ungeschützten Geschlechtsverkehrs keine Schwangerschaft erzielt. Dieser unerfüllte Kinderwunsch wird in unserer Gesellschaft zu einem immer größeren Thema und stellt für viele Paare eine große psychische Belastung dar. Wobei die Gründe der Unfruchtbarkeit historisch eher bei der Frau gesucht wurden, fokussiert sich die Analyse heutzutage auf beide Partner.

Die Andrologie befasst sich mit der Fortpflanzungsfunktion des Mannes und den damit verbundenen Störungen. Dabei spielt die Analyse des Samens, die auch Spermogramm genannt wird, eine entscheidende Rolle um den Grund für eine Infertilität aufzudecken.

Die medizinisch-assistierte Reproduktion (MAR) ist für viele Paare mit einem unerfüllten Kinderwunsch eine Möglichkeit trotz Fruchtbarkeitsstörung eine Schwangerschaft zu erzielen. Dabei werden die Paare von Medizinern begleitet und die Behandlung auf deren jeweilige Situation abgestimmt. Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Techniken: Insemination, In-Vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Die Insemination stellt die natürlichste Art der MAR dar, da die Samenzellen direkt in die Gebärmutter eingebracht werden und die Eizelle im Eileiter befruchten. Die IVF Behandlung ist die älteste Form der künstlichen Befruchtung. Bei dieser Methode werden Samenzellen und Eizellen gemeinsam außerhalb des Körpers in ein Gefäß gegeben und die Samenzelle muss eigenständig ihren Weg in die Eizelle finden, um eine Befruchtung zu erzielen. Die ICSI ist die am meisten durchgeführte Methode in der MAR und findet ebenfalls außerhalb des Körpers statt. Dabei wird eine einzelne Samenzelle, die auf Motilität und Morphologie geprüft wurde, direkt mit einer feinen Glaspipette in das Zytoplasma der entnommenen Eizelle injiziert.

Die Samenaufbereitung ist ein wichtiger Schritt in der Durchführung der künstlichen Befruchtung, um die bestmöglichen Samenzellen mit dem höchsten Potential zum Erzielen einer Schwangerschaft zu gewinnen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Männliche Geschlechtsorgane

Die männlichen Geschlechtsorgane dienen der Bildung und dem Transport der Samenzellen, die für die Befruchtung und somit der Erfüllung eines Kinderwunsches eine entscheidende Rolle spielen.

Dabei werden diese in äußere und innere Geschlechtsorgane eingeteilt. Zu den äußeren Geschlechtsorganen zählen der Penis und der Hodensack. Die inneren Geschlechtsorgane sind die paarigen Hoden, die Nebenhoden, die Samenwege und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Bläschendrüse, Prostata). (1,2,3)

In der Abbildung 1 sind diese bildlich dargestellt.

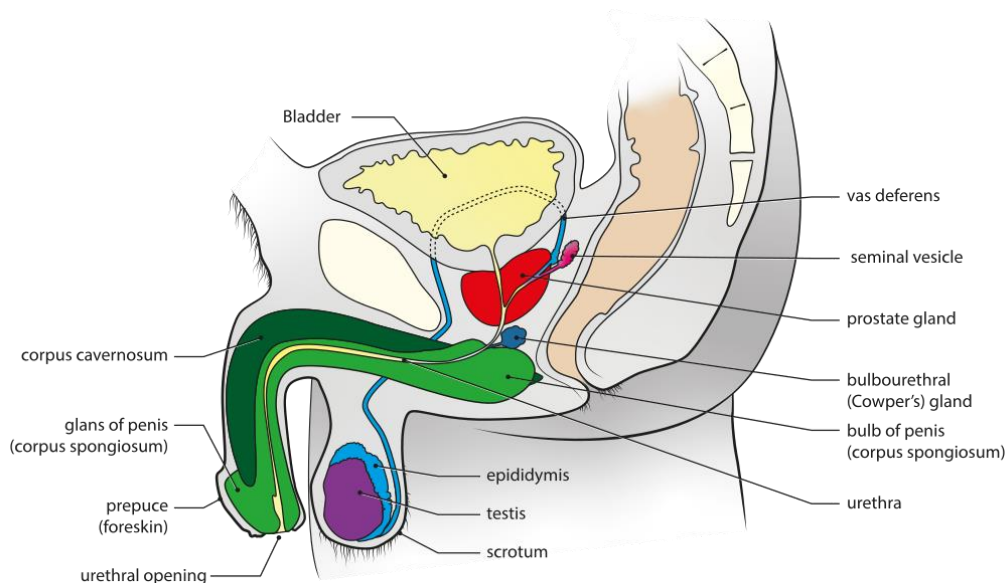


Abbildung 1: Männliche Geschlechtsorgane

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/Male_genital_system_-_Sagittal_view.svg. R. Dewaele (Bioscope, Unige), J. Abdulcadir (HUG), C. Brockmann (Bioscope, Unige), O. Fillod, S. Valera-Kummer (DIP), www.unige.ch/ssi, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons (abgerufen am 12.07.2022)

2.1.1 Hoden

In den Hoden, die als Keimdrüsen des Mannes bezeichnet werden, findet die Produktion der Samenzellen ab der Pubertät statt.

Da die Spermatogenese (Bildung von Spermien) eine Temperatur von 2-3°C unter der intraabdominalen Kerntemperatur voraussetzt, wandert der Hoden während der

Fetalentwicklung von der Bauchhöhle durch den Leistenkanal in den Hodensack (Skrotum). (1,2,3)

Der Hoden ist von einer Bindegewebsschicht (Tunica albuginea) umgeben und wird durch zarte Bindegewebssepten in keilförmige Läppchen gegliedert. Diese Hodenläppchen enthalten stark gewundene Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), in denen die Spermatogenese stattfindet. Die Samenkanälchen münden in das Rete testis, einem verzweigten Ausführungssystem. Über das Rete testis erfolgt die Weiterleitung in die Ductuli efferentes bis zum Nebenhoden. Zwischen den Hodenkanälchen liegen sogenannte Leydig Zellen, die männliche Geschlechtshormone, wie Testosteron produzieren. Diese Hormone sind wichtige Bestandteile in der Differenzierung zum männlichen Geschlecht. Das Epithel der Hodenkanälchen wird durch Sertoli-Zellen gebildet, die das notwendige Milieu schaffen damit die Spermatogenese stattfinden kann. Sie besitzen zahlreiche Zellfortsätze und bilden mit den benachbarten Sertoli-Zellen eine Blut-Hoden-Schranke aus. (1,2,3)

2.1.2 Nebenhoden

Der Nebenhoden liegt dorsal auf dem Hoden und dient der funktionellen Ausreifung und Lagerung der Samenzellen. Er besteht aus einem einzelnen, stark gewundenen Gang, dem Ductus epididymidis, und wird in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda) unterteilt. Er ist von einem Zylinderepithel ausgekleidet und besitzt eine Wand aus glatten Muskelzellen, an der sich Stereozilien befinden. Da die Samenzellen aufgrund des sauren pH-Wertes von 6,5 noch unbeweglich sind, werden diese durch das Zusammenziehen des Nebenhodenganges mithilfe von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen weitertransportiert. (1,2,3)

Die Samenzellen werden durch die Ductuli efferentes aufgenommen und nach erfolgreicher Ausreifung bei einer Ejakulation über den Nebenhodengang (Ductus epididymidis) weitergeleitet. (1,2,3)

2.1.3 Samenleiter

Der Samenleiter, der als Ductus deferens bezeichnet wird, verbindet den Nebenhoden mit der Harnröhre und dient als Transportorgan.

Die Wand besteht aus einer glatten Muskulatur, wodurch die Weiterleitung der Samenzellen ermöglicht wird. (1,2,3)

2.1.4 Akzessorische Geschlechtsdrüsen

Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, zu denen die Bläschendrüsen, Prostata und die Cowper-Drüse gehören, dienen der Produktion des Ejakulats. (1,2,3)

Die Bläschendrüse, die als Glandula vesiculosa bezeichnet wird, liegt oberhalb der Prostata und produziert ein fruktosereiches, alkalisches Sekret, welches für die Mobilisierung und Energiebereitstellung der Samenzellen dient. Das Sekret der Bläschendrüse macht ca. 70% des Ejakulatvolumens aus. (1,2,3)

Die Prostata, die auch als Vorsteherdrüse bezeichnet wird, ist für die Produktion des sauren Prostatasekrets verantwortlich und regt die Beweglichkeit der Spermien an. Es enthält das Eiweiß Spermin, welches die DNA des Spermiums schützt, und PSA (Prostata-spezifisches Antigen), welches der Verflüssigung des Ejakulates dient. Das Prostatasekret macht ca. 30% des Ejakulatvolumens aus.

Die Cowper-Drüse, die auch Bulbourethraldrüse genannt wird, produziert bei einer sexuellen Erektion eine klare, visköse Flüssigkeit (Lusttropfen), die als Gleitmittel für das Ejakulat dient. (1,2,3)

2.1.5 Harnröhre

Die Harnröhre, die auch Urethra genannt wird, ist ein 20-25mm großes schlauchförmiges Organ, das nicht nur zur Ausscheidung des Harns, sondern auch zum Transport der Samenzellen dient.

Die Littre Drüsen, die auch als Glandulae urethrales bezeichnet werden, sitzen in der Schleimhaut im vorderen Teil der Harnröhre. Sie produzieren ein alkalisches glykoproteinreiches Sekret, welches die Harnröhre vor dem sauren Urin schützt und diese befeuchtet. (1,2,3)

2.1.6 Penis

Der Penis besteht aus zwei paarigen Schwellkörpern und einem unpaarigen Schwellkörper.

Während einer Erektion erweitern sich die Blutgefäße und die Schwellkörper füllen sich mit Blut. Somit kann die Größe, Form und Konsistenz des Gliedes verändert werden.

Die paarigen Schwellkörper, die auch als Corpora cavernosa penis bezeichnet werden, verlaufen seitlich an der Oberfläche des Gliedes und spielen eine wichtige Rolle während einer Erektion. Der unpaarige Schwellkörper, der auch Corpus spongiosum penis genannt wird, befindet sich an der Unterseite des Gliedes und umgibt die Harnröhre. Auch dieser schwillt während einer Erektion an, jedoch ist dieser von einer kaum dehnbaren Bindegewebshaut umgeben, da er die Durchgängigkeit der Harnröhre sicherstellen muss. (1,2,3)

Die Spermien, die im Hoden gebildet und im Nebenhoden gereift wurden, werden durch den Penis weitertransportiert und können somit zu einer Befruchtung einer Eizelle im weiblichen Geschlecht führen. (1,2,3)

2.2 Spermatogenese

Unter Spermatogenese versteht man die Bildung von Samenzellen aus Keimzellen. Diese umfasst alle Schritte von der Spermatogonie bis zum Spermatozoon (reifes Spermium) und wird in drei Teilschritte eingeteilt: Vermehrung, Reifung und Differenzierung (Abbildung 2).

Nach Einwanderung der männlichen Keimzellen in die Keimstränge der männlichen Gonadenanlage des Embryos treten diese in eine Ruhephase ein, die bis zur Pubertät andauert. Im Gegensatz zur Oogenese (Entwicklung und Differenzierung der Eizelle), die bereits im Uterus im dritten Monat beginnt, setzt die Differenzierung zum reifen Spermium erst nach der Pubertät in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) des Hodens ein. Die Entwicklung bis zu einem reifen Spermium dauert ca. 74 Tage und die Fähigkeit der Produktion von Samenzellen bleibt bis ins hohe Alter bestehen. (4,5)

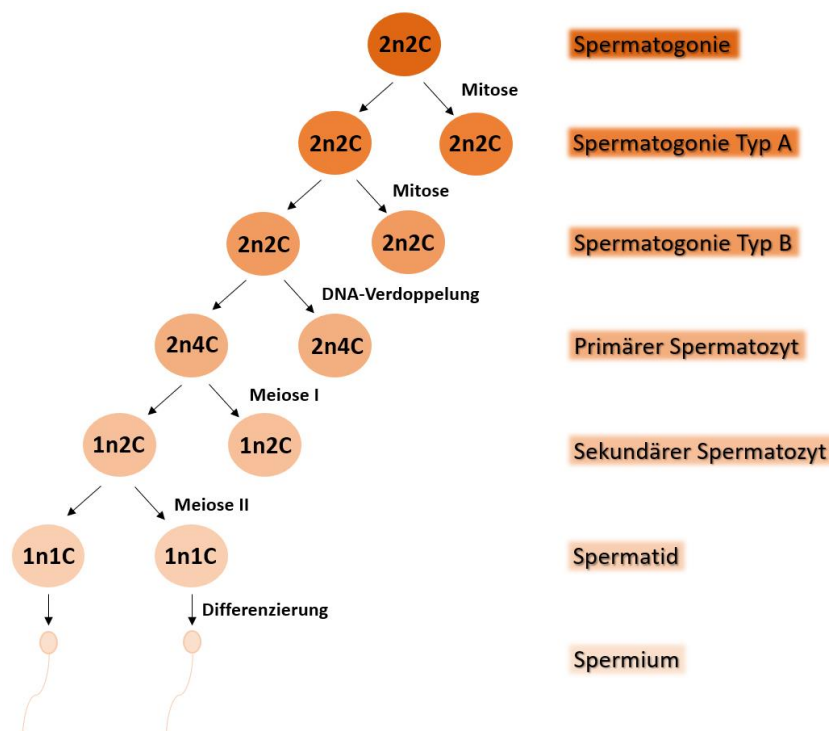


Abbildung 2: Spermatogenese

2.2.1 Vermehrung

Der Ausgangspunkt der Spermatogenese sind die Spermatogonien (Urkeimzellen), die in Typ A und Typ B eingeteilt werden. (4,5)

Durch mitotische Teilung entstehen aus der Urkeimzelle die Spermatogonien Typ A, die als Stammzellen und somit der Vermehrung dienen. Durch eine weitere mitotische Teilung entwickelt sich aus den Spermatogonien Typ A die Spermatogonien Typ B, die die mitotische Teilung verlassen und sich in die Reifeteilung begeben.

Die Spermatogonien Typ A und B besitzen einen diploiden Chromosomensatz mit zwei DNA-Kopien ($2n2C$). (4,5)

2.2.2 Reifung

Die Spermatogonien Typ B wandern durch die Blut-Hoden-Schranke ins adluminal Kompartiment. Nach der DNA-Verdoppelung entstehen primäre Spermatozyten, die einen diploiden Chromosomensatz mit vier DNA-Kopien ($2n4C$) besitzen.

Anschließend erfolgt der erste Schritt der Reifeteilung bzw. meiotischen Teilung, aus der zwei sekundäre Spermatozyten mit einem haploiden Chromosomensatz und zwei DNA-Kopien ($1n2C$) entstehen. Nach einem zweiten Reifeteilungsschritt entstehen im Anschluss vier Spermatisden mit einem haploiden Chromosomensatz und einer DNA-Kopie ($1n1C$). (4,5)

2.2.3 Differenzierung (Spermiogenese)

Die Differenzierung der Spermatisden zu reifen Spermien wird Spermiogenese genannt und umfasst die Kondensation des Zellkerns, Bildung eines Akrosoms und Entwicklung einer Geißel. (4,5)

Durch die Kondensation des Zellkerns kann das Kernvolumen um etwa 90% verringert und der Energiebedarf herabgesetzt werden. Dies geschieht durch den Austausch von Histonen zu Protaminen und dem dadurch dichter verpackten Chromatin. Somit kann die Bewegungsgeschwindigkeit des Spermiums gesteigert werden. (4,5)

Das Akrosom spielt eine entscheidende Rolle in der Befruchtung einer Eizelle, da durch die darin enthaltenen Enzyme das Durchdringen der Zona pellucida

ermöglicht wird. Das Akrosom, das einem Lysosom entspricht, wird vom Golgi-Apparat gebildet und legt sich kappenartig um den Kern des Spermiums. (4,5)
Die Geißel, die auch als Schwanz bezeichnet wird, ist aus Mikrotubuli aufgebaut und dient der Fortbewegung im Eileiter. (4,5)

2.3 Aufbau eines Spermiums

Das Spermium besitzt eine Länge von 50-60µm und wird in Kopf, Halsstück, Mittelteil, Schwanz und Endstück unterteilt. (6)

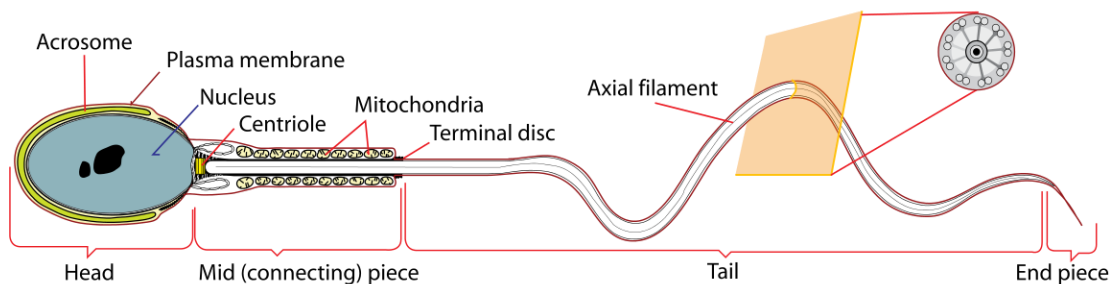


Abbildung 3: Aufbau einer Samenzelle

LadyofHats, Public domain, via Wikimedia Commons.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/13/Simplified_spermatozoon_diagram.svg (abgerufen am 12.07.2022)

2.3.1 Kopf

Der Kopf des Spermiums ist oval und hat eine Größe von 5-8µm. Im Kopfbereich liegt das Akrosom und der Kern, die von einer Plasmamembran umgeben sind. Das Akrosom besitzt proteolytische Enzyme, die zur Auflösung der Zona pellucida führen und somit den Durchtritt des Spermiums in die Eizelle ermöglichen. Der Kern besitzt einen haploiden Chromosomensatz und dient der Weitergabe des genetischen Materials. (6)

2.3.2 Halsstück

Im Halsstück befindet sich die nach der Mitose teilung übrig gebliebenen Zentriolen. Weiters ist im Halsstück das Axonem, das für die Bewegung der Geißel zuständig ist, verankert. (6)

2.3.3 Mittelteil

Im Mittelteil, welches verdickt ist, sitzen mehrere Mitochondrien, die durch die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) Energie für die Fortbewegung erzeugen. (6)

2.3.4 Schwanz

Der Schwanz, der auch als Geißel oder Flagellum bezeichnet wird, besteht aus dem Axonem, welches ein aus Mitochondrien aufgebautes Zytoskelett ist und der Fortbewegung dient.

Das Axonem besteht aus einer ringförmigen Anordnung von neun Mikrotubulipaaren, die durch das Eiweiß Nexin verbunden sind. In der Mitte befinden sich zwei einzelne Mikrotubuli, die durch Radialspeichen mit den äußeren Dupletten verbunden sind. Weiters enthält das Axonem Dyneinarme, die als Motorproteine bezeichnet werden. (6)

2.3.5 Endstück

Im Endstück befinden sich Mikrotubuli in nicht geordneter Form. (6)

2.4 Befruchtung

Während des Geschlechtsverkehrs gelangen Millionen von Samenzellen in die Vagina, von denen nur ein sehr geringer Teil in die Zervix und anschließend in den Pars ampullaris des Eileiters wandert. (7)

Damit die Samenzellen eine Befruchtung durchführen können, müssen diese einen weiteren Reifungsprozess im weiblichen Genitaltrakt durchlaufen. Dieser Reifungsprozess wird als Kapazitation bezeichnet und dauert etwa sieben Stunden. Durch die Interaktion zwischen Eileiterschleimhaut und Spermium wird die Glykoproteinschicht auf der Zellmembran des Spermiums abgebaut. Darüber hinaus wird im Laufe der Kapazitation Cholesterin vom Kopf des Spermiums entfernt und dadurch eine höhere Durchlässigkeit von Kalzium-Ionen ermöglicht, welche zu einer Steigerung der Motilität führt. Nur nach erfolgreicher Kapazitation können die Spermien die Corona radiata durchdringen und die Akrosomreaktion an der Zona pellucida durchlaufen. (7)

Die Akrosomreaktion wird induziert, wenn das Spermium auf die Zona pellucida, die die Glykoproteinhülle der Eizelle ist, trifft. Das Spermium haftet dabei am primären spezifischen Spermienrezeptor der Zona pellucida (ZP3) und weitere Schritte für eine Befruchtung werden eingeleitet. Der Inhalt des Akrosoms, das unter anderem Hyaluronidase und Proteasen (Akrosin) enthält, wird ausgeschüttet und sorgt für die Auflösung der Zona pellucida. Dadurch entsteht in der Zona pellucida ein „Kanal“ wodurch das Spermium in den Raum zwischen Zona pellucida und Eizellmembran (perivitelliner Raum) gelangt. (7)

Als Imprägnation wird das Eindringen des Zellkernes in die Eizelle durch die Verschmelzung der Eizellmembran mit der Akrosom-Membran des Spermiums, bezeichnet. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die beiden Rezeptoren Juno, welcher sich auf der Eizellmembran befindet, und Izumo-1, welcher auf der Spermienmembran lokalisiert ist. Beide interagieren nach einem Schlüssel-Schloss Prinzip. Nur nach erfolgreicher Bindung der beiden Rezeptoren kommt es zur Verschmelzung der Vorkerne. (8)

Um das Eindringen weiterer Samenzellen zu verhindern, wird eine Polyspermieblockade ausgelöst, welche in eine schnelle und langsame Phase unterteilt werden kann. Die schnelle Polyspermieblockade findet zuerst statt und zeichnet sich, nach Eintritt des Akrosoms, durch einen Einstrom von Natrium-Ionen und eine daraus entstehende Änderung der elektrischen Ladung in der Eizelle aus. Diese Phase setzt innerhalb von drei Sekunden ein und kann das Eindringen von weiteren Samenzellen kurzfristig bis zum Aufbau der langsamen Polyspermieblockade verhindern. Die darauffolgende langsame Polyspermieblockade führt zu einer Ausschüttung von Kalzium-Ionen, welche die kortikalen Granula freisetzt, die Proteoglykane ausschüttet. Dieses führt zu einer Verhärtung der Zona pellucida und das Eindringen weiterer Spermien wird gestoppt. (9)

Nach Eintritt eines Spermiums wird die Meiose 2 der Eizelle weitergeführt und es entsteht ein zweites Polkörperchen.

Der Spermienkopf entwickelt sich durch Dekondensation zum Vorkern und nach erfolgreicher DNA Reduplikation des männlichen und weiblichen Vorkernes kommt es zu deren Verschmelzung (Syngamie). Die daraus entstehende Zygote besitzt einen diploiden Chromosomensatz ($2n4C$) und setzt deren Zellteilung fort. (7)

2.5 Ursachen für eine Infertilität des Mannes

Kommt es nach über 12 Monaten bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr zu keiner Schwangerschaft, geht man von einer Infertilität aus. Diese Infertilität kann sowohl die Frau, als auch den Mann betreffen und unterschiedliche Ursachen haben. (10)

2.5.1 Genetische und chromosomale Ursachen des Mannes

Ungefähr 15% der männlichen Unfruchtbarkeit gehen auf einen genetischen Defekt zurück, der unterschiedlichste Auswirkungen haben kann. Bei dem Befund einer Azoospermie, also einem Fehlen der Spermien im Ejakulat, liegt das Risiko Träger einer genetischen Anomalie zu sein bei 25%. (10)

2.5.1.1 Klinefelter Syndrom

Bei einem Klinefelter-Syndrom handelt es sich um eine genetisch bedingte Krankheit, die nur bei Jungen und Männern auftritt. Es handelt sich um eine chromosomale Aberration und wird durch das Vorhandensein eines zusätzlichen X-Chromosoms gekennzeichnet (Karyotyp: 47, XXY). Auch Sonderformen, sogenannte Mosaik-Formen, können auftreten. Dabei sind nicht alle Körperzellen von der Veränderung betroffen und die restlichen tragen den normalen Chromosomensatz (Karyotyp 46, XY/47, XXY). (10)

Betroffene besitzen oft kleine Hoden, verminderte Körperbehaarung, geringe Muskelmasse und einen Androgenmangel. Weiters liegt eine Störung in der Spermatogenese vor, die zu 90% zu einer Azoospermie (Fehlen von Samenzellen) führt. Bei Mosaik-Formen kann es zu einer Kryptozoospermie (erst nach Zentrifugation sind vereinzelt Samenzellen zu finden) oder einer hochgradigen Oligozoospermie (geringe Zahl an Samenzellen) kommen. (10,11,12)

2.5.1.2 46, XX Mann

Dieses Syndrom wird als De la Chapelle-Syndrom bezeichnet und ist eine seltene Form der Geschlechtsentwicklung. Obwohl es sich um einen XX-Karyotypen handelt, kommt es trotzdem zur Ausbildung eines männlichen Erscheinungsbildes. Als Grund wird eine Translokation des Sex determining region of Y (SRY)-Gens vom kurzen Arm des Y-Chromosoms auf den kurzen Arm des X-Chromosoms

während der Meiose vermutet. Dieses SRY-Gen ist verantwortlich für das männliche Erscheinungsbild. Die Betroffenen haben oft eine kleinere Statur, ein höheres Risiko eines Hodenhochstandes und einer Gynäkomastie (Vergrößerung der Brustdrüsen beim Mann). Alle Männer sind zeugungsunfähig und leiden unter einer Azoospermie. (10,13)

Bei einem Mann mit der Diagnose 46,XX macht eine testikuläre Spermienextraktion (TESE) im Gegensatz zu einem Patienten mit Klinefelter Syndrom keinen Sinn, da durch das Fehlen der Azoospermie-Faktor (AZF)-Region, welches auf dem Y-Chromosom liegt, die Spermienproduktion im Hoden nicht möglich ist. (10,14)

2.5.1.3 Chromosomale balancierte Translokationen

Bei einer chromosomalen balancierten Translokation bzw. balancierten Robertson'schen Translokation werden Teile eines Chromosoms auf ein anderes Chromosom übertragen ohne dass Genmaterial verloren geht. Meist sind Träger dieser Translokation gesundheitlich nicht beeinträchtigt und bleiben daher oft unbemerkt. Deren Nachkommen haben jedoch ein erhöhtes Risiko einer chromosomalen unbalancierten Translokation, die zu Fehlbildungen oder Aborten führt. (10)

Diese Aberration kommt bei Männern mit einer diagnostizierten Oligozoospermie zehnmal häufiger vor (4-8%) als bei Männern mit einem Befund im Normbereich. (10,15)

2.5.1.4 Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCOS)

Bei dem Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCOS) handelt es sich um eine angeborene genetische Erkrankung, die zu einer Azoospermie, also zu einem vollständigen Fehlen der Samenzellen, führt. Oft verläuft dieses Syndrom unbemerkt und wird erst bei einer Untersuchung auf Unfruchtbarkeit aufgedeckt. (10)

In der Yq11 Region am Y-Chromosom liegt der AZF, der in vier unterschiedliche Bereiche eingeteilt wird (AZFa, AZFb, AZFc und AZFd). Liegt eine Mikrodeletion in einem dieser Bereiche vor, können die Spermien nicht richtig reifen und es liegt eine gestörte Spermatogenese vor. Deletionen im Bereich AZFa und AZFb, führen zu einer Azoospermie und werden klinisch als SCOS bezeichnet. Liegt eine Deletion im Bereich des AZFc vor kommt es zu einer gestörten Spermatogenese mit einer

starken Oligozoospermie (sehr geringerer Spermienbildung) bis hin zu einer Azoospermie. (10,16)

Im Gegensatz zu einer Deletion im Bereich von AZFa und AZFb können bei einer Deletion im Bereich des AZFc in 50% der Fälle Spermien bei einer Hodenbiopsie (TESE) gefunden werden. (10,16)

Die Ausprägungen bei Patienten mit einer AZFd Mikrodeletion sind sehr variabel und können von einer leichten Oligozoospermie zu einer normalen Spermienanzahl mit auffälliger Morphologie reichen. (17,18)

2.5.1.5 Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (AIS)

Bei dem Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (AIS) handelt es sich um eine Störung der Geschlechtsentwicklung durch einen Androgenrezeptordefekt und dadurch resultierender Androgenresistenz.

Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Gruppen, die zu einem unterschiedlichen Phänotyp führen: minimales bzw. mildes Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (MAIS), partielles Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (PAIS) und komplettes Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (KAIS). Patienten mit MAIS sind phänotypisch männlich mit minimalen Auffälligkeiten (z.B. reduzierte männliche Behaarung) und mit bzw. auch ohne Einschränkung der Fertilität. Bei einem PAIS ist der Phänotyp sehr variabel und kann sich phänotypisch als männlich, weiblich oder einer Mischform ausprägen. Patienten mit KAIS besitzen ein weibliches äußeres Genital mit einem männlichen Karyotyp. Oft werden diese Patienten als Mädchen gehalten und die Auffälligkeiten werden erst ab Eintritt der Pubertät bemerkt. (10,19,20)

2.5.1.6 Hodentumor

Keimzelltumore, wie auch Stromazelltumore können die Ursache einer Infertilität sein. Es kann eine Schädigung des Keimepithels oder auch eine Änderung der Hormonproduktion, die zu einer Einschränkung der Fertilität führen, resultieren. (21)

2.5.2 Weitere mögliche Ursachen

2.5.2.1 Varikozele

Unter einer Varikozele versteht man eine Krampfaderbildung am Hodensack, die sowohl angeboren sein kann als auch im späteren Alter auftreten kann.

Durch eine Venenklappenschwäche kommt zu einer Störung des Abflusses und somit zu einer Erweiterung der Venen. Durch die gesteigerte Durchblutung und die damit verbundene Erhöhung der Temperatur im Hoden kann es zur geringen Samenbildung kommen. (22)

Die Auswirkungen der Varikozele auf die Spermienqualität sind jedoch vielfältig und können zu einem unauffälligen Befund, Einschränkung der Motilität oder verändertem Aussehen der Samenzelle führen. (22)

2.5.2.2 Retrograde Ejakulation

Als retrograde Ejakulation wird eine fehlerhafte Ausscheidung des Ejakulates bezeichnet. Das Ejakulat wird nicht wie üblich über den Penis ausgeschieden, sondern verläuft rückwärts in die Harnblase. Je nach Schweregrad der Erkrankung wird wenig Ejakulat bis gar kein sichtbares Ejakulat ausgeschieden. Die Samenzellen befinden sich bei einer retrograden Ejakulation in der Harnblase und können aus dem Urin isoliert werden. (23)

2.5.2.3 Spermienfunktionsstörung

Ein fehlerhafter Aufbau der Spermiumgeißel kann ebenfalls die Fruchtbarkeit einschränken. Gründe hierfür können zum Beispiel das Vorhandensein von defektem Dynein, das Vorliegen eines Kartagener-Syndroms oder eines Usher-Syndroms sein. Darüber hinaus können auch Reifungsdefekte, die zum Beispiel durch eine Erkrankung des Nebenhodens ausgelöst werden, zu einer Infertilität führen. (24)

2.5.2.4 Infektionen

- Mumps-Orchitis: Es handelt sich um eine Entzündung des Hodens, die durch Mumps-Viren, die über die Blutbahn in den Hoden gelangen, ausgelöst wird. (25)
- Infektionen bei bakterieller Epididymitis: Ist eine akute oder chronische Entzündung des Nebenhodens, die durch eine Harnwegsinfektion, sexuell übertragbare Krankheiten (z.B.: Chlamydien, Gonokokken) oder Tuberkulose ausgelöst wird. (26)

2.5.2.5 Hormonstörung

Hormonstörungen können je nach Ausprägung zu einer eingeschränkten Fertilität oder einer vollständigen Infertilität führen. (27)

Hypogonadismus ist eine endokrine Funktionsstörung der Gonadenanlage, die in den hypergonadotropen und hypogonadotropen Hypogonadismus eingeteilt werden kann. Bei dem hypergonadotropen Hypogonadismus liegt eine Störung in der Gonadenanlage selbst vor. Es wird genügend Gonadotropin (Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH)) produziert, jedoch ist die weitere Produktion von Hormonen und Gameten durch die Hoden gestört. Die häufigste Ursache bei Männern ist das Klinefelter-Syndrom, da bei dieser Erkrankung die Hodenfunktion eingeschränkt ist. Der hypogonadotrope Hypogonadismus ist gekennzeichnet durch die erniedrigte Konzentration an Gonadotropin (FSH, LH). Dadurch können die Hoden nicht ausreichend stimuliert werden und deren Funktion ausüben. Die Hoden selbst haben jedoch keine Störung und sie sind prinzipiell funktionsfähig. (27)

Eine weitere endokrine Störung wird durch den Überschuss von Androgenen (Testosteron) ausgelöst. Dies kann entweder durch den Missbrauch von anabolen Steroiden oder durch erhöhte Produktion von Testosteron hervorgerufen werden. Die erhöhte Menge an Androgenen führt zu einer Erniedrigung der Ausschüttung von Gonadotropin, welches zu einer Hemmung der Spermatogenese führt.

Ein Östrogenüberschuss führt ebenfalls wie ein Androgenüberschuss zu einer erniedrigten Ausschüttung von Gonadotropin. (27)

Hyperprolaktinämie ist durch einen Überschuss von Prolaktin gekennzeichnet. Das Hormon Prolaktin hat eine inhibierende Funktion auf den Hypothalamus, was in weiterer Folge zu einer erniedrigten Ausschüttung von Gonadotropin führt. (27)

Auch eine Störung der Schilddrüse kann eine negative Auswirkung auf die Fertilität des Mannes haben. Es ist bekannt, dass bei einer Hyperthyreose und Hypothyreose das freie Testosteron erniedrigt ist und die Spermienqualität stark eingeschränkt ist. (27)

2.5.2.6 Toxine und Medikamente

Der Einfluss von Toxinen und Medikamenten auf die Spermienqualität ist bereits gut erforscht. (28,29)

Folgende Substanzen spielen hierbei eine Rolle und sollten im Falle eines Kinderwunsches vermieden werden.

- Strahlentherapie
- Chemotherapie
- Ketoconazol
- Kalziumkanalblocker
- Cimetidin
- Spironolacton
- Valproinsäure
- Allopurinol
- Alpha-Blocker
- Trizyklische Antidepressiva
- Drogen

2.5.2.7 Mechanische Faktoren

Eine Hodentorsion (Hodenverdrehung) oder eine Verletzung der Hoden kann die Spermatogenese und somit die Fertilität beeinträchtigen. Die Blutgefäße werden abgeschnürt und der Hoden kann nicht mehr genügend versorgt werden.

2.6 Samenanalyse

2.6.1 Spermogramm

Eine Samenanalyse wird als Spermogramm bezeichnet und gibt Auskunft über die Qualität der Samenzellen und somit über die Zeugungsfähigkeit des Mannes. Als Leitfaden für die Untersuchung dient das „WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen“ das 2021 auf die Version 6 aktualisiert wurde. (30)

Für eine reproduzierbare Ejakulatuntersuchung wird eine Karenzzeit von zwei bis sieben Tagen empfohlen. Die Samengewinnung soll bestenfalls nahe dem Labor in einem sterilen ruhigen Raum stattfinden, damit der Zeitraum von einer Stunde zwischen Abgabe und Ejakulatuntersuchung bei einer Temperatur von über 20 °C eingehalten werden kann. Direkt nach der Samenabgabe hat das Ejakulat eine dickflüssige Konsistenz, das sich nach wenigen Minuten bis maximal 60 Minuten verflüssigt. (30)

Bei der Samenanalyse ist es wichtig, dass die Probe bei Entnahme einer Teilmenge vorab gut gemischt wurde, damit ein reproduzierbares Ergebnis erreicht wird.

Am Beginn der Untersuchung wird das **Aussehen** und die **Konsistenz** der Probe beurteilt. Im Normalfall ist die Farbe des Ejakulats grau-opal, diese kann jedoch bei Vorhandensein von Erythrozyten rot-bräunlich oder bei einer sehr geringen Samenanzahl durchsichtig erscheinen. (30)

Im Anschluss wird das **Volumen** des Ejakulats gemessen bzw. abgewogen. Ein Volumen unter 1,4 ml wird dabei als Hypospermie bezeichnet. (30)

Zur Beurteilung des pH-Wertes der Probe wird ein pH-Papier, welches einen Wert zwischen sechs und zehn misst, verwendet. Ein **pH-Wert** von unter 7,2 deutet auf eine Fehlbildung oder Verschluss der Samenwege hin. Dies ist durch den vorwiegenden Anteil an saurem Prostatasekret und einen Mangel an alkalischer Flüssigkeit, welches durch die Bläschendrüse produziert wird, zurückzuführen. Eine Verunreinigung der Probe durch Urin kann jedoch auch ein Grund für diesen erniedrigten pH-Wert sein. Ein pH-Wert über 8, kann auf eine Infektion hindeuten.

Die Beurteilung der **Konzentration** und der Beweglichkeit wird mithilfe einer Maklerkammer, die auf 37 °C erwärmt wurde, durchgeführt. Es werden 10 µl der gut gemischten Probe aufgetropft und ohne Bildung von Luftblasen mit einem Deckglas bedeckt.

Bei einer Maklerkammer handelt es sich um eine Zählkammer, die aus insgesamt 100 Quadraten, also 10 Zeilen und 10 Spalten, besteht. Zwischen Deckglas und Objektträger befindet sich genügend Platz damit sich die Samenzellen ungehindert bewegen können. (30) (Abbildung 4)

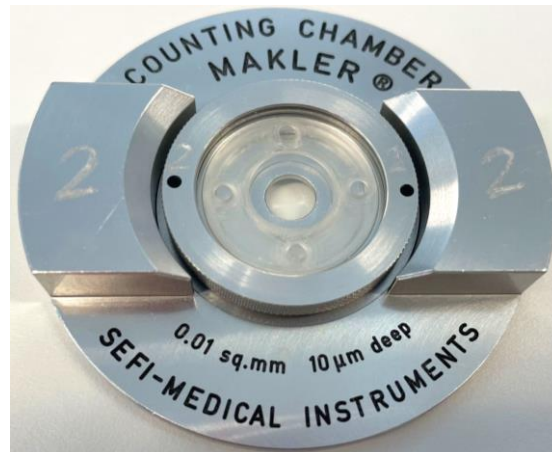


Abbildung 4: Zählkammer – Maklerkammer

fotografiert am 14.07.2022 im „Kinderwunschzentrum an der Wien – Obruca & Strohmayer“

Zur Bestimmung der Konzentration pro Milliliter (ml) wird eine Zeile mit 10 Quadraten ausgezählt und mit 10^6 multipliziert. Um den Wert der Gesamtkonzentration zu erhalten, wird die Konzentration pro Milliliter mit dem Ejakulatvolumen multipliziert. Diese Werte sollten $\geq 16 \times 10^6$ Spermien pro Milliliter bzw. $\geq 39 \times 10^6$ Spermien pro Ejakulat sein. Befinden sich diese Werte unterhalb des Referenzwertes, spricht man von einer Oligozoospermie. (30)

Um die **Motilität** zu bestimmen, werden die Spermien in progressiv (PR), nicht-progressiv (NP) und immotil unterteilt. Der Referenzwert liegt dabei bei 30% der progressiv beweglichen Samenzellen und 42% der motilen Samenzellen (PR+NP). Ein Wert unterhalb von 30% motilen Samenzellen wird als Asthenozoospermie bezeichnet. (30)

Sowohl die Konzentration, als auch die Motilität haben einen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate. (31,32,33)

Ein **Vitalitätstest** wird durchgeführt, wenn weniger als 42% beweglichen Samenzellen in der Probe vorhanden sind. Da eine unbewegliche Samenzelle nicht bedeutet, dass diese nicht mehr vital ist, wird beim Vitalitätstest mittels einer Eosin-Nigrosin Färbung oder eines hypoosmotischen Tests die Vitalität, die bei über 54% liegen sollte, bestimmt. (30)

Zur Beurteilung der **Morphologie** wird ein Ausstrich des Ejakulats angefertigt, mittels einer Haema-Schnellfärbung (Diff-Quick) gefärbt und anschließend im Mikroskop mit Immersionsöl unter 1000-facher Vergrößerung ausgewertet. In der Abbildung 5 ist ein repräsentatives Beispiel einer Diff-Quick Färbung zu sehen. Es werden 200 Samenzellen bewertet und das Ergebnis wird in Prozent angegeben. Für die Auswertung müssen einige Regeln eingehalten werden, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten: Der Kopf des Spermiums muss oval sein und die Akrosomregion muss 40-70% des Kopfes ausmachen. In der Akrosomregion dürfen nur maximal zwei kleine Vakuolen vorhanden sein. Der Rest des Kopfes, der postakrosomale Bereich genannt wird, muss frei von Vakuolen sein. Das Mittelstück des Spermiums sollte in der Mitte des Kopfes verankert sein und ca. dieselbe Länge haben wie der Kopf. Der Schwanz sollte ca. die 10-fache Länge des Kopfes betragen und durchgängig ohne Knickstellen sein. (30)

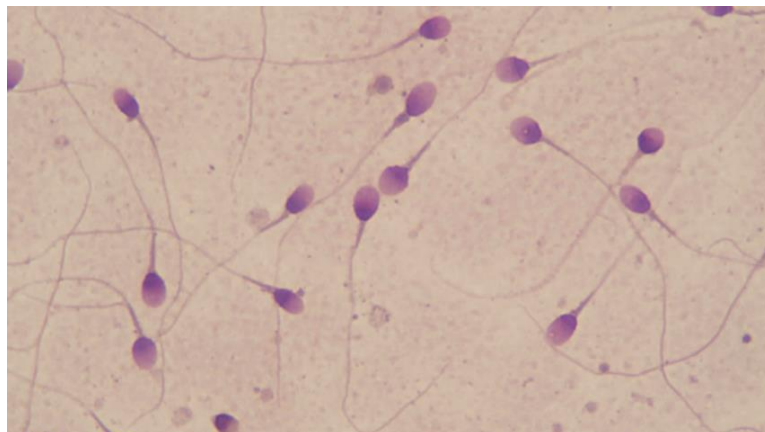


Abbildung 5: Beurteilung der Morphologie mittels Diff-Quick Färbung
Färbung, Auswertung und Fotografie des Bildes am 15.07.2022
im Kinderwunschzentrum an der Wien Obruca & Stroherer“

Befinden sich Anlagerungen bzw. Verklumpungen von Spermien, welche als Agglutinate bezeichnet werden, im Ejakulat, kann mittels eines **MAR-Tests** (Mixed-Antiglobulin-Reaction-Test) das Vorhandensein von Spermienantikörpern untersucht werden. Dabei handelt es sich um Anti-Spermatozoen-Antikörper (ASA), die fast ausschließlich zu den Immunglobulinklassen IgA und IgG gehören. Beim MAR-Test werden antikörperbeschichtete Partikel verwendet, die gegen IgA bzw. IgG gerichtet sind und sich bei Vorhandensein von Spermienantikörpern an die Samenzellen anlagern. (30)

2.6.2 Spermium-Hyaluronan-Bindungstest (HBA)

Der Spermium-Hyaluronan-Bindungstest (HBA) ist ein qualitativer Test zur Prüfung auf Vorhandensein von Hyaluronan-bindenden Samenzellen im Ejakulat.

Er dient zur Prüfung der Spermienreife und -qualität und ermöglicht so eine Aussage über das Fertilisationspotential des Mannes.

Für eine Befruchtung und die Wechselwirkung von Eizelle und Spermium spielt Hyaluronan eine wichtige Rolle. Da die extrazelluläre Matrix des Cumulus-Oophorus-Komplexes, der die Eizelle umgibt, Hyaluronan enthält, ist es ein entscheidender Faktor, ob ein Spermium daran binden kann. (34)

Der Hyaluronsäurerezeptor wird während der Spermio-genese auf der Kopf-fläche des Spermiums gebildet. Ist das Spermium unreif und enthält keinen Rezeptor, kann daher keine Akrosomreaktion und somit Befruchtung stattfinden. (34)

Während des HBA wird die Bindungsfähigkeit auf einen Hyaluronan-beschichteten Objektträger geprüft. Zur Auswertung des Testes werden die beweglichen, gebundenen und die beweglichen, ungebundenen Samenzellen gezählt und mit einer Formel der Prozentsatz ermittelt. An Hyaluronan gebundene Samenzellen besitzen keine Vorwärtsbewegung, jedoch eine schnelle Bewegung des Schwanzes. Nicht gebundene Samenzellen bewegen sich frei in der Kammer. Bindet nur eine geringe Anzahl an Spermien auf dem Objektträger, liegt eine Einschränkung der Fertilität vor. (34)

2.6.3 Anilinblau-Färbung

Mittels der Anilinblau-Färbung ist es möglich die Chromatinkondensation der DNA zu beurteilen und auszuwerten.

Das Chromatin ist aufgebaut aus DNA und Proteinen, welche in kondensierter Form im Kopf des Spermiums liegen.

Die Samenzellen enthalten einen Komplex aus DNA, welcher lysinreiche Histone enthält und Arginin-/Cysteinreiche Protamine. Gibt es einen fehlerhaften Histon-Protamin-Austausch, bindet Anilinblau an die Lysinreste der Histone und färbt sie dadurch dunkelblau an. Ist der Komplex vollständig, kann das Anilinblau nicht binden und daher sind die Samenzellen ungefärbt bzw. hellblau. (35,36)

Da es jedoch keine klare Abgrenzung der Färbung gibt, unterscheidet man zwischen verschiedenen Stufen.

Laut einer Studie von Henkel, R. et al. erfolgt die Einteilung zwischen ungefärbten, schwach gefärbten (+), mittel gefärbten (++) und stark gefärbten (+++) Spermienköpfen. (36)

Da das Spermiumchromatin das genomische Material des Vaters trägt, welches an die Nachkommen weitergegeben wird, kann ein Defekt im Chromatin Ursache für eine geringere Befruchtungsrate und einen erhöhten Schwangerschaftsverlust sein. Weiters kann mittels Anilinblaufärbung das Fruchtbarkeitspotential des Mannes bestimmt werden und liefert daher Informationen über die Empfängnisfähigkeit des Paares. (35,37,38)

In der Abbildung 6 ist ein repräsentatives Beispiel einer Anilinblau-Färbung unter dem Mikroskop zu sehen.

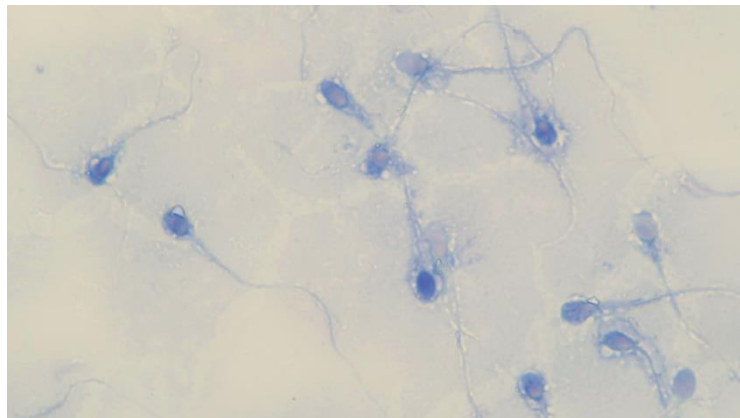


Abbildung 6: Anilinblau-Färbung

Färbung, Auswertung und Fotografie des Bildes am 15.07.2022
im Kinderwunschzentrum an der Wien Obruca & Strohmayer

2.7 Methoden der Samenaufbereitung

Ein wichtiger Schritt in der In-Vitro-Fertilisation ist die Samenaufbereitung.

Um im weiblichen Genitaltrakt eine Schwangerschaft zu erzielen, müssen die Spermien eine hohe Qualität aufweisen und mehrere Schritte, wie zum Beispiel die Kapazitation, durchlaufen. Da dieser Selektionsschritt bei einer In-Vitro-Fertilisation wegfällt, muss mithilfe der Samenaufbereitung dieser Akt der Spermien im weiblichen Organismus nachgeahmt werden, um die Samenzellen mit dem höchsten Potential zum Erzielen einer Schwangerschaft zu gewinnen. Diese Aufbereitungsart sollte schnell und kostengünstig durchführbar sein, so viele bewegliche Samenzellen wie möglich isolieren und keine Schäden an den Samenzellen verursachen. Weiters sollen die Samenzellen von dem restlichen Ejakulat, welches auch andere Zellen, wie Epithelzellen, Bakterien und Leukozyten, enthält, getrennt werden und toxische Stoffe, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), vermieden werden. Ziel der Aufbereitung ist somit die Samenzellen mit dem höchsten Befruchtungspotential zu isolieren, um anschließend eine hohe Schwangerschaftsrate zu erzielen. (39,40)

Die gängigsten Samenaufbereitungsmethoden beruhen auf einem Dichtegradienten oder Swim-Up. Weiters gibt es auch neuere Methoden, wie zum Beispiel die Mikrofluidik.

2.7.1 Dichtegradient

Bei der Aufbereitungsmethode mittels Dichtegradient (DG) werden Lösungen mit unterschiedlicher Dichte verwendet. Die untere Schicht enthält eine hohe Dichte und die obere Schicht eine niedrige Dichte. Die Samenprobe wird im Anschluss über den Dichtegradienten, welcher aus kolloidalem, mit Silan beschichteten Siliziumdioxid besteht, zentrifugiert. Da sich die Spermien, je nach Qualität, in der Dichte unterscheiden, können diese daher mit den verschiedenen Gradienten getrennt werden. Ein reifes, morphologisch normales Spermium besitzt eine Dichte von ca. 1,1 g/ml. Ein unreifes, pathologisches Spermium besitzt eine geringere Dichte zwischen 1,06 bis 1,09 g/ml. Nach Zentrifugation befinden sich die Spermien entsprechend deren Dichte in der Probe. Nur die beweglichen, morphologisch normalen Spermien gelangen auf den Boden des Röhrchens und bilden ein Pellet. Die restlichen Zelltrümmer und Samenzellen, die den Weg nicht bis an den Boden

schaffen, werden anschließend verworfen und nur die am Boden befindlichen Samenzellen, werden nach anschließendem Waschen für die Befruchtung verwendet. (41,42,43)

Die Abbildung 7 veranschaulicht den Prozess der Aufbereitungstechnik mittels Dichtegradientenzentrifugation.

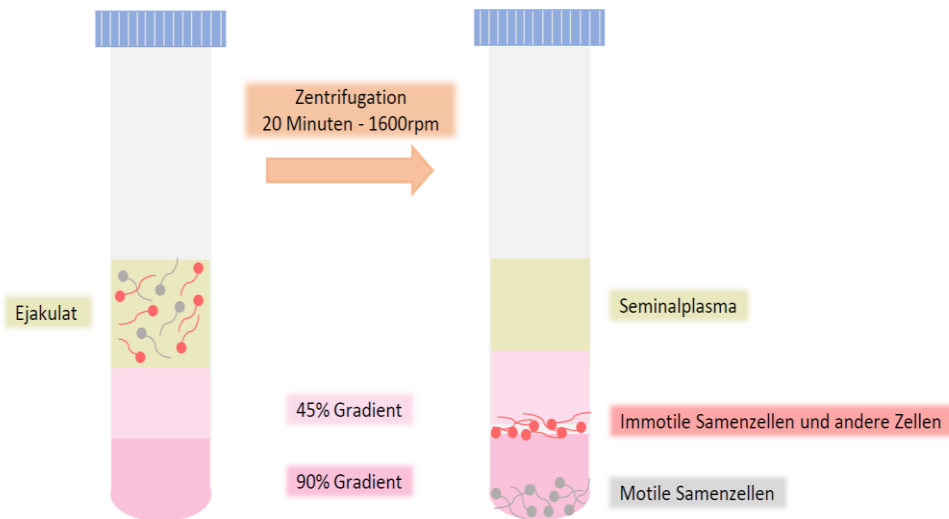


Abbildung 7: Samenaufbereitung mittels Dichtegradienten

2.7.2 Mikrofluidik

Die ZyMot Multi (850 μ l) ist eine Mikrofluidik Methode zur Aufbereitung frischer Samenproben ohne Zentrifugationsschritt. Es wird ein Filterchip verwendet, der aus einer Probeneinlassöffnung (Inlet Port), Probenauslassöffnung (Outlet Port) und einer feinporigen Membran mit 8 μ m großen Poren besteht. Nur die besten und beweglichen Spermien können diese Membran passieren und gelangen durch die Poren an die Oberfläche. (44)

Da sich die Samenzellen bei dieser Methode ihren eigenen Weg durch die feinporige Membran an die Oberfläche machen müssen, soll dadurch der natürliche Vorgang im weiblichen Organismus und die Barriere des Gebärmutterhalskanals schonend nachgeahmt werden. (44)

In der Abbildung 8 ist eine ZyMot Multi 850 μ l Kammer zu sehen, die gerade durch das Inlet Port mit dem nativen Ejakulat beladen wird.

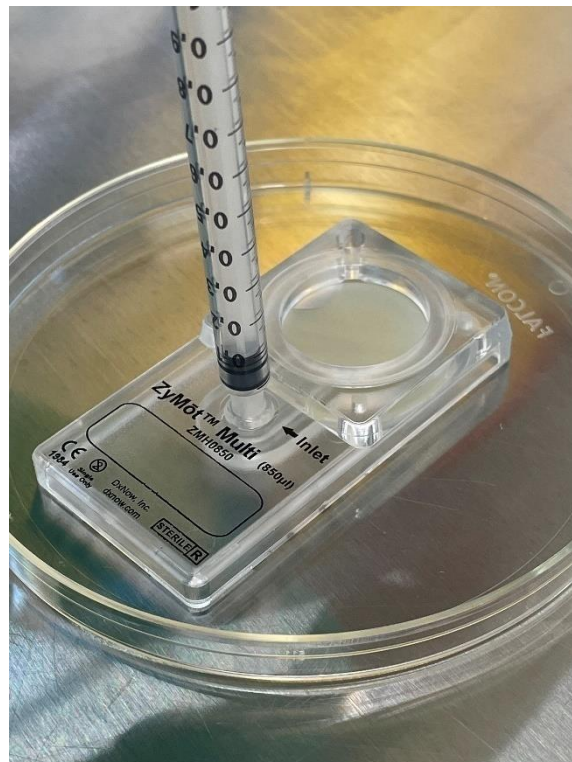


Abbildung 8: ZyMot Multi 850 μ l

Selbst fotografiert am 14.07.2022 im „Kinderwunschzentrum an der Wien – Obruca & Strohmer“

2.8 Material und Methoden

2.8.1 Studiendesign

In dieser Pilotstudie wurden 20 männliche Patienten, sowohl mit einer Normozoospermie, als auch mit einem eingeschränkten Befund herangezogen. Verwendet wurden Samenproben ab einem Volumen von 1,0 ml, die in zwei gleich große Teile geteilt und mit den zwei verschiedenen Aufbereitungsmethoden (Dichtegradient und Mikrofluidik (ZyMot-Kammer)) verarbeitet wurden. Die Proben wurden im Zeitraum von Juni bis Juli 2022 im „Kinderwunschzentrum an der Wien - Obruca & Strohmer“ bei Patienten, die in diesem Zeitraum eine IVF-Behandlung vorgenommen haben, gesammelt.

Um in einer anschließenden Studie eine Aussage über die Befruchtung und die Entwicklung des Embryos im Vergleich der beiden Samenaufbereitungsarten machen zu können, wurde weiters darauf geachtet, Paare mit einer Eizellanzahl von größer/gleich acht in diese Studie einzuschließen. Somit konnte die Hälfte der

Eizellen mit der Dichtegradienten-Aufbereitung und die andere Hälfte mit der ZyMot-Kammer-Aufbereitung befruchtet werden.

Tabelle 1: Patientenkollektiv

Patient	Alter (Jahre)	Karenzzeit (Tage)	Volumen (ml)	Befund
1	44	2	3,0	Teratozoospermie (2%)
2	39	2	3,7	Normozoospermie
3	33	2	5,3	Normozoospermie
4	30	2	2,5	Normozoospermie
5	25	2	1,2	Teratozoospermie (3%)
6	31	3	3,6	Normozoospermie
7	34	2	3	Teratozoospermie (3%)
8	40	2	1,9	Normozoospermie
9	57	2	1,6	Normozoospermie
10	39	1	2,6	Teratozoospermie (3%)
11	37	2	2,9	Teratozoospermie (2%)
12	40	2	1,8	Normozoospermie
13	48	3	2,1	Normozoospermie
14	49	2	2,3	Normozoospermie (grenzwertig)
15	33	1	2,9	Normozoospermie
16	35	2	2	Teratozoospermie (3%)
17	40	3	3,5	Normozoospermie
18	29	7	3	Normozoospermie
19	27	1	2,4	Oligoteratozoospermie (2%)
20	46	2	1,5	Teratozoospermie (2%)

Unter dem gesammelten Patientenkollektiv befinden sich zwölf Patienten mit einer Normozoospermie, sieben Patienten mit einer Teratozoospermie und ein Patient mit einer Oligoteratozoospermie. Das Alter der Patienten liegt zwischen 25 und 57

Jahren, wobei sich der Mittelwert bei $37,8 \pm 8,1$ Jahren befindet. Das geringste Ejakulat-Volumen liegt bei 1,2 ml und das höchste bei 3,7 ml. Der Mittelwert des Volumens liegt bei $2,6 \pm 0,9$ ml.

Nach Erstellung eines Spermogramm Befundes wurde das Ejakulat in zwei gleich große Teile aufgeteilt und mit den beiden Aufbereitungsmethoden verarbeitet.

Da für beide Aufbereitungsmethoden ein Volumen von 1,7 ml benötigt wird, musste bei einem Volumen unter 1,7 ml das Ejakulat mit SpermActive (Gynemed Medizinprodukte GmbH; Lensahn, Deutschland) auf die angegebene Menge verdünnt werden. Nach Aufbereitung mit den unterschiedlichen Methoden wurden die Proben weiter analysiert und die Werte verglichen.

In der Abbildung 9 ist ein Flussdiagramm zur bildlichen Darstellung der experimentellen Durchführung der Masterarbeit ersichtlich.



Abbildung 9: Flussdiagramm der experimentellen Durchführung der Masterarbeit

2.8.2 Aufbereitung Samenprobe

2.8.2.1 Dichtegradient

Zur Aufbereitung mittels Dichtegradienten wurde 1,0 ml 90% SpermGrad (Vitrolife Göteborg, Schweden) in ein Röhrchen vorgelegt und mit 1,0 ml 45% SpermGrad (Vitrolife Göteborg, Schweden) vorsichtig überschichtet. Im Anschluss wurde 850 µl des Ejakulates, welches vorher gut gemischt wurde, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, auf den vorgelegten Dichtegradienten vorsichtig überschichtet. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 20 Minuten wurden die am Boden befindlichen Samenzellen mit einer Pipette in ein frisches Röhrchen überführt und mit SpermActive auf 5 ml aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde die Lösung bis auf 500 µl abgehoben und die weiterführende Analyse im Anschluss gemacht.

2.8.2.2 Mikrofluidik

Zur Aufbereitung mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer (ZyMot Fertility; Gaithersburg, USA)) wurde die Kammer vorsichtig aus der Verpackung entnommen ohne die Membran zu berühren. 850 µl des Ejakulates wurden im Anschluss in das Inlet Port geladen. 750 µl SpermActive wurde in eine Spritze aufgezogen. Davon wurden 50 µl in das Outlet Port geladen und die restlichen 700 µl auf die Membran mit einem Abstand von circa 2 cm aufgetropft. Nach einer 30-minütigen Inkubation der geladenen Kammer in einem befeuchteten 37°C Inkubator wurden 500 µl der aufbereiteten Probe aus dem Outlet Port aufgezogen und für die weitere Analyse verwendet.

2.8.3 Analyse der Samenqualität

2.8.3.1 Konzentration

Nach Aufbereitung mittels der beiden Methoden wurden je 10 µl auf eine auf 37°C vorgewärmte Maklerkammer geladen und die Samenzellen in den ersten 10 Quadranten gezählt. Um ein genaues und aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden die Samenzellen in allen 100 Kästchen gezählt und dieser Wert im Anschluss durch 10 dividiert.

Die Konzentrationsbestimmung wurde für die Auswertung in zwei Gruppen unterteilt.

In der Gruppe „Konzentrationsbestimmung gesamt“ wurden alle Samenzellen (progressiv beweglich, ortsbeweglich, unbeweglich) gezählt und der Wert in der Einheit Millionen/ml angegeben. In der Gruppe „Konzentrationsbestimmung motil“ wurden nur die progressiv vorwärtsbeweglichen Samenzellen gezählt und ebenfalls in der Einheit Millionen/ml angegeben. Pro Gruppe wurden die Werte der beiden Aufbereitungstechniken im Anschluss miteinander verglichen.

Um die Gesamtkonzentration zu erhalten, wurde diese Menge mit dem vorhandenen Volumen von 500 µl multipliziert.

2.8.3.2 Motilität

Um eine Aussage über die Beweglichkeit der Spermien machen zu können, wurden die vorhanden Samenzellen in rasch und langsam progressiv beweglich, ortsbeweglich und unbeweglich unterteilt. Mindestens 100 Samenzellen wurden ausgezählt und der Prozentsatz ermittelt.

Um die Motilitätsbestimmung beider Aufbereitungsarten zu vergleichen, wurden drei Gruppen festgelegt. In der Gruppe „Motilitätsbestimmung: progressiv bewegliche Samenzellen“ wurde der Prozentsatz der rasch und langsam progressiv beweglichen Samenzellen herangezogen. Die Gruppe „Motilitätsbestimmung: progressiv und ortsbewegliche Samenzellen“ beinhaltet den Prozentsatz aller beweglichen Samenzellen (Gesamtbeweglichkeit). In der Gruppe „Motilitätsbestimmung: unbewegliche Samenzellen“ wurde der prozentuelle Wert der unbeweglichen Samenzellen erfasst. Für jede Gruppe wurde der gezählte Prozentsatz der beiden Aufbereitungstechniken miteinander verglichen.

2.8.3.3 Spermium-Hyaluronan-Bindungstest

Die Bestimmung der Hyaluronan-Bindungsfähigkeit der Samenzellen wurde mit dem HBA der Firma CooperSurgical (CooperSurgicalTrumbull, Connecticut, USA) durchgeführt.

10 µl der aufbereiteten Probe wurde auf die vorgesehene Fläche pipettiert und mit dem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden im Anschluss die beweglich, gebunden und unbeweglich, gebunden

Samenzellen im Raster ausgezählt. Wenn es die Konzentration zuließ, wurden insgesamt 200 Samenzellen gezählt. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, mussten mindestens 30 Samenzellen im Raster zu finden sein.

Mittels folgender Formel wurde der Prozentsatz der Hyaluronan-bindenden Samenzellen ermittelt:

$$\% \text{Hyaluronan - Binder} = 100 \times \frac{\text{gebundene bewegliche Spermien}}{\text{gebunden bewegliche Spermien} + \text{ungebundene bewegliche Spermien}}$$

Video HB-Assay:



2.8.3.4 Anilinblau-Färbung

Mittels einer Anilinblau-Färbung wurde die Chromatinkondensation beurteilt. Dazu wurden 10µl der aufbereiteten Probe auf einen Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Nach einem 10-minütigen Fixierungsschritt mit Ethanol (96%) wurde das Slide fünf Minuten mit einer 5%igen Anilinblau-Lösung (Morphisto Laborchemikalien & Histologieservice; Offenbach am Main, Deutschland) gefärbt. Im Anschluss wurde der Objektträger mit Aqua dest abgespült, bis der gewünschte Blauton erreicht wurde. Der Objektträger wurde danach luftgetrocknet und 200 Samenzellen mit einer 1000-fachen Vergrößerung und Immersionsöl ausgewertet.

2.8.4 Geräte und Reagenzien

2.8.4.1 Geräte

Tabelle 2: verwendete Geräte mit dazugehöriger Firma und Seriennummer

Geräte	Firma	Seriennummer
Mikroskop Olympus CX43	Olympus; Tokyo, Japan	8M41153/201812
Centrifuge 5804	Eppendorf; Hamburg, Deutschland	5804JK068155
Inkubator C16	Labotect GmbH Rosdorf, Deutschland	14209-0759
Wärmeplatte Hotplate 062	Labotect Rosdorf, Deutschland	13854-1517

Wärmeplatte Steuergerät HT400	Minitüb Tiefenbach, Deutschland	020245
Laminar Flow Cabinet LVG-4AG-F8	Esco Lifesciences Singapore, Asien	2019-139305
Pipette 100-1000µl	Eppendorf Hamburg, Deutschland	4183038
Pipette 200µl	Eppendorf Hamburg, Deutschland	R20595K
Pipette Microman 10-100µl	Gilson Middleton, USA	QE05386
Counting Chamber Makler®	Sefi-Medical Instruments Haifa, Israel	3242

2.8.4.2 Reagenzien

Tabelle 3: verwendete Reagenzien mit dazugehöriger Firma und Lot-Nummer

Reagenzien	Firma	Lot-Nummer
Samenabgabebecher	Sarstedt Biedermannsdorf, Deutschland	-
Zentrifugenröhrchen 11ml	IVF Express GmbH Bergheim bei Salzburg, Österreich	171234
Petrischale	Corning Corning, USA	1225005
Microscope Slides	VWR Radnor, USA	190921
Cover Glass	VWR Radnor, USA	631-0147
Disposable Plastic Pipette 2ml	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA	MA445260
Pasteurpipette 3ml	Vitrolife Göteborg, Schweden	220301
Spritze 1ml Omnifix®-F Luer Solo	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland	20M18C8
SpermGrad	Vitrolife Göteborg, Schweden	042169, 04288
ZyMot Multi 850µl	ZyMot Fertility Gaithersburg, USA	Z03032202013
SpermActive	Gynemed Medizinprodukte GmbH Lensahn, Deutschland	WASH-2203PRG, WASH-2205PRG
HBA	CooperSurgical Trumbull, Connecticut, USA	220215-004652, 220215-004653
Anilinblau 5%	Morphisto Laborchemikalien&Histologieservice Offenbach am Main, Deutschland	35920-3

96% Ethanol	Allerheiligen Apotheke 1200 Wien, Österreich	210322
Aqua dest	Allerheiligen Apotheke 1200 Wien, Österreich	220322

Verwendete Reagenzien pro Patient:

- 1x Samenabgabebecher
- 3x Zentrifugenröhrchen
- 1x ZyMot Multi 850µl
- 2x Plastic Pipette 2ml
- 3x Spritze 1ml
- 1x Petrischale
- 2x Microscope Slides
- 2x Cover Class
- 1ml SpermGrad 90%
- 1ml SpermGrad 45%
- ~ 5ml SpermActive
- 2x HBA
- Anilinblau 5%
- 96% Ethanol
- Aqua dest

2.8.4.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 9.4.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und Excel ausgewertet und auf statistische Signifikanz geprüft.

Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde ein Shapiro-Wilk Test (Alpha=0,05) angewendet.

Die Daten beider Aufbereitungsarten wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test ausgewertet.

Eine statistische Signifikanz wurde mit einem Wert von größer/gleich 0,05 ($p \geq 0,05$) festgelegt. Weiters wurde folgende Signifikanzlevel festgelegt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

3 Ergebnisse

Jede Probe wurde mittels zwei unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden (Dichtegradienten und Mikrofluidik (ZyMot-Kammer)) verarbeitet und danach mit unterschiedlichen Methoden verglichen: Konzentrationsbestimmung, Motilitätsbestimmung, HBA und Anilinblau-Färbung.

3.1 Konzentrationsbestimmung

3.1.1 Konzentrationsbestimmung gesamt

Die Werte der Konzentration gesamt der aufbereiteten Probe nach der Dichtegradientenzentrifugation befinden sich zwischen 1 und 87 Millionen/ml wobei der Mittelwert bei $15,5 \pm 22,0$ Millionen/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung) liegt.

Die Werte der Konzentration gesamt (bewegliche, ortsbewegliche und unbewegliche Samenzellen) der aufbereiteten Probe nach der Mikrofluidik Technik (ZyMot-Kammer) befinden sich zwischen 1,2 und 87 Millionen/ml wobei der Mittelwert bei $25,2 \pm 27,0$ Millionen/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung) liegt.

Die Werte beider Aufbereitungsmethoden sind nicht normalverteilt und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz geprüft, welcher einen Wert von $p = 0,2504$ ergibt. Dies zeigt somit keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich beider Aufbereitungstechniken.

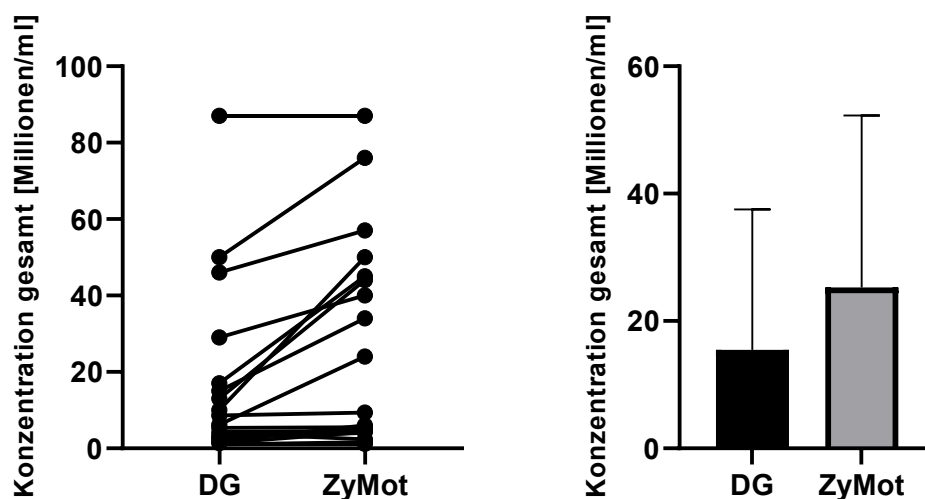


Abbildung 10: Konzentrationsbestimmung gesamt im Vergleich beider Aufbereitungstechniken
Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung: motile Samenzellen

Die Werte der Konzentration der beweglichen Samenzellen nach Aufbereitung mittels Dichtegradientenzentrifugation liegen zwischen 0,1 und 75 Millionen/ml wobei sich der Mittelwert bei $10,9 \pm 19,1$ Millionen/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung) befindet.

Die Werte der Konzentration der beweglichen Samenzellen nach Aufbereitung durch die Mikrofluidik Technik (ZyMot-Kammer) liegen zwischen 1 und 86 Millionen/ml, wobei sich der Mittelwert bei $24,5 \pm 26,7$ Millionen/ml (Mittelwert \pm Standardabweichung) befindet.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede im Vergleich beider Methoden ergab einen p-Wert von 0,0240, welcher einen statistischen signifikanten Unterschied zeigt. Da die Daten beider Aufbereitungstechniken nicht normalverteilt sind, wurde für die Prüfung ein Mann-Whitney-U-Test angewendet.

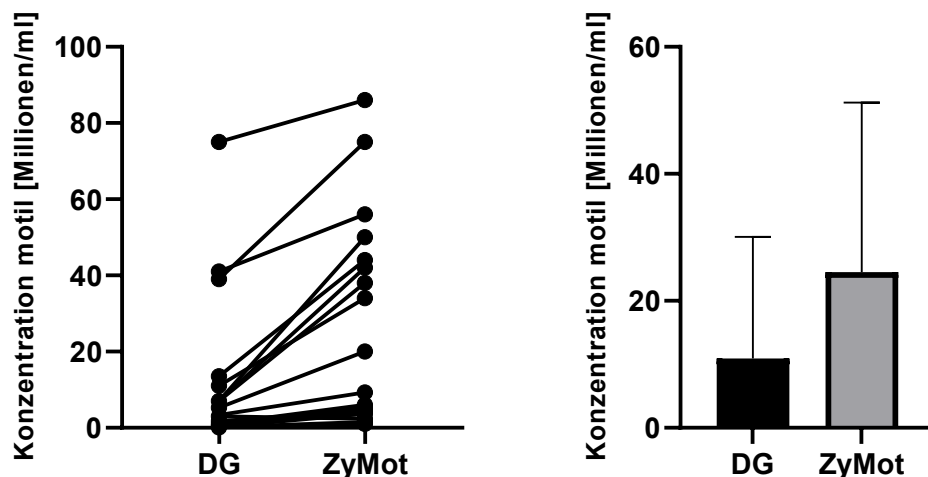


Abbildung 11: Konzentrationsbestimmung motil im Vergleich beider Aufbereitungstechniken
Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.2 Motilitätsbestimmung

3.2.1 Motilitätsbestimmung: progressiv bewegliche Samenzellen

Die Werte der Motilität der progressiv beweglichen Samenzellen nach Aufbereitung mittels Dichtegradientenzentrifugation befinden sich zwischen 4% und 88%, wobei der Mittelwert bei $47,5\% \pm 26,7\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) liegt.

Die Werte der Motilität der progressiv beweglichen Samenzellen nach Aufbereitung mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer) befinden sich zwischen 88% und 100%, wobei der Mittelwert bei $96,3\% \pm 3,5\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) liegt.

Die Daten beider Aufbereitungsmethoden sind nicht normalverteilt und wurden somit mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Dies ergibt einen p-Wert von kleiner 0,0001, welcher einen signifikanten Unterschied im Vergleich beider Methoden zeigt.

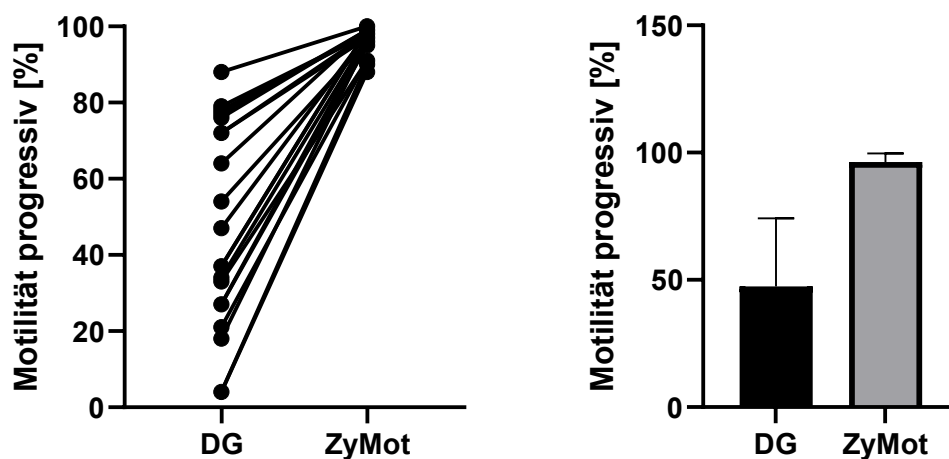


Abbildung 12: Motilitätsbestimmung progressiv im Vergleich beider Aufbereitungstechniken
Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.2.2 Motilitätsbestimmung: progressiv und ortsbewegliche Samenzellen

Die prozentuellen Werte der Motilität der progressiven und ortsbeweglichen Samenzellen nach Aufbereitung mittels Dichtegradientenzentrifugation liegen zwischen 15% und 95%, wobei sich der Mittelwert bei $66,1\% \pm 25,3\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) befindet.

Nach der Samenaufbereitung mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer) liegen die prozentuellen Werte zwischen 93% und 100%, wobei sich der Mittelwert bei $98,2\% \pm 1,8\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) befindet.

Die Prüfung der nicht normalverteilten Daten auf statistische Signifikanz mittels des Mann-Whitney-U-Tests ergibt einen p-Wert von kleiner 0,0001, welcher einen statisch signifikanten Unterschied im Vergleich beider Aufbereitungstechniken zeigt.

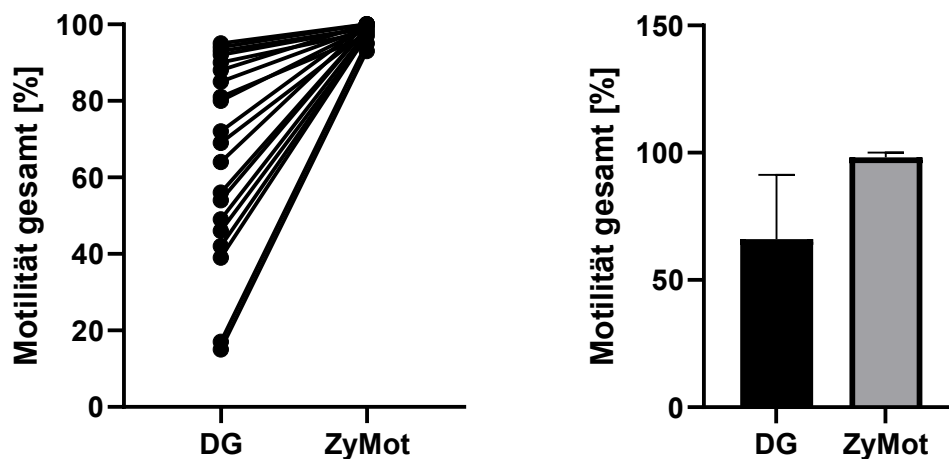


Abbildung 13: Motilitätsbestimmung gesamt im Vergleich beider Aufbereitungstechniken
Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.2.3 Motilitätsbestimmung: unbewegliche Samenzellen

Die prozentuellen Werte der unbeweglichen Samenzellen nach der Aufbereitungsmethode mittels Dichtegradientenzentrifugation liegen zwischen 5% und 85%. Der Mittelwert befindet sich bei $34,0\% \pm 25,3\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Nach der Aufbereitungstechnik mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer) liegen die prozentuellen Werte der unbeweglichen Samenzellen zwischen 0% und 7%, wobei sich der Mittelwert bei $1,8\% \pm 1,8\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) befindet.

Da die Werte beider Aufbereitungstechniken nicht normalverteilt sind, wurde die statistische Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Dies ergibt einen signifikanten Unterschied beider Methoden mit einem p-Wert von kleiner 0,0001.

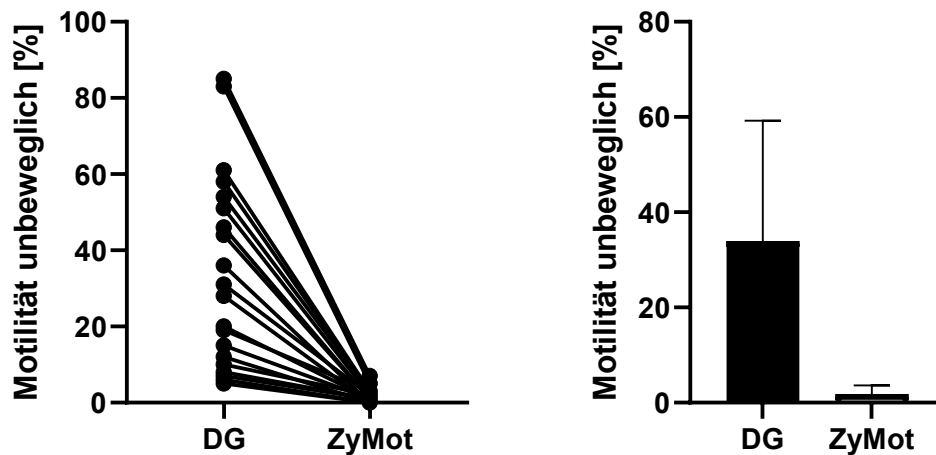


Abbildung 14: Motilitätsbestimmung unbeweglich im Vergleich beider Aufbereitungstechniken
Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.3 HBA

Die prozentuellen Werte der Hyaluronan-bindenden Samenzellen der aufbereiteten Probe nach Dichtegradientenzentrifugation befinden sich zwischen 51,5% und 97,2%. Der Mittelwert liegt nach dieser Aufbereitungstechnik bei 89,3% \pm 10,7% (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Nach der Aufbereitungstechnik mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer) befinden sich die prozentuellen Werte der Hyaluronan-bindenden Samenzellen zwischen 54,8% und 97,7%. Der Mittelwert liegt nach dieser Aufbereitungstechnik bei 90,7% \pm 10,1% (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die Ergebnisse des HBA wurden nach Prüfung der Nicht-Normalverteilung mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede im Vergleich beider Aufbereitungstechniken geprüft. Hier konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3726$) beider Methoden festgestellt werden.

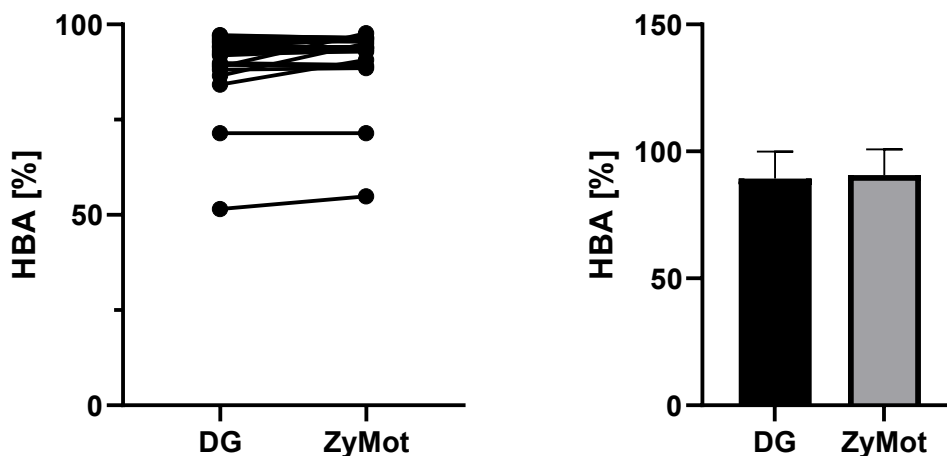


Abbildung 15: HBA im Vergleich beider Aufbereitungstechniken

Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3.4 Anilinblau – Färbung

Die prozentuellen Werte der Samenzellen mit einer normalen Chromatinkondensation bzw. Anilinblau-negativen Anfärbung liegen nach der Aufbereitungstechnik mittels Dichtegradienten zwischen 22,0% und 87,4%. Der Mittelwert liegt nach dieser Methode bei $68,9\% \pm 16,8\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Nach der Aufbereitungstechnik mittels Mikrofluidik (ZyMot-Kammer) befinden sich die prozentuellen Werte der Anilinblau-negativ angefärbten Samenzellen zwischen 24% und 90%, wobei der Mittelwert bei $70,6\% \pm 17,8\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) liegt.

Da die Daten der Anilinblau-Färbung nicht normalverteilt sind, wird ein Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dies ergibt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich beider Methoden mit einem p-Wert von 0,5417.

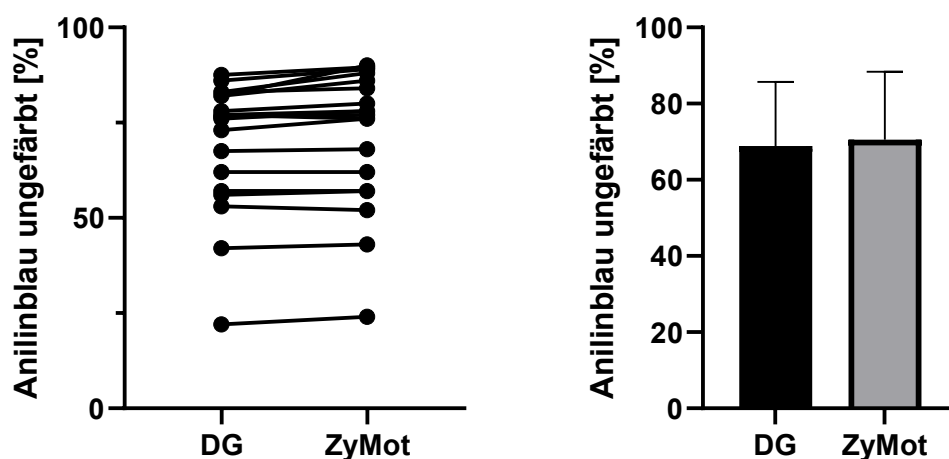


Abbildung 16: Anilinblau-Färbung im Vergleich beider Aufbereitungstechniken

Zur Erstellung beider Grafiken wurden dieselben Datensätze verwendet. Auf der linken Seite wird die paarweise Darstellung beider Techniken gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Daten als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4 Diskussion

Die Samenaufbereitung spielt im Bereich der MAR eine wesentliche und entscheidende Rolle. Da der Selektionsschritt der Spermien, der üblicherweise im weiblichen Organismus stattfindet, bei einer In-Vitro-Fertilisation wegfällt, muss dieser Akt mithilfe der Samenaufbereitung nachgeahmt werden, um die Samenzellen mit dem höchsten Potential zum Erzielen einer Schwangerschaft zu gewinnen.

Ziel meiner Arbeit war es hierbei zwei unterschiedliche Samenaufbereitungsmethoden zu vergleichen. Dazu zählen die Dichtegradientenzentrifugation, die eine der gängigsten Aufbereitungstechniken darstellt, und die Mikrofluidik-Technik (ZyMot-Kammer), die eine eher neuere Methode zur Isolierung von hochqualitativen Spermien ist.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass nach mikrofluidischer Aufbereitung Spermien mit einer eindeutig höheren Motilität im Vergleich zu der Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden können. Die Gesamtkonzentration an Spermien zeigte im Vergleich beider Aufbereitungsmethoden keinen signifikanten Unterschied. Die Konzentration an motilen Spermien hingegen konnte mittels ZyMot-Kammer signifikant gesteigert werden. Der HBA und die Anilinblaufärbung zeigen im Vergleich der beiden Aufbereitungstechniken keinen statistisch signifikanten Unterschied und die Messungen liegen nah beieinander. Dies legt nahe, dass der HBA und die Chromatinkondensation durch die Aufbereitungsart dieser beiden Methoden nicht beeinflusst wird und keine der beiden Techniken reifere bzw. „genomisch intaktere“ Spermien anreichert.

In der Literatur finden sich ähnliche Gegenüberstellungen dieser beiden Aufbereitungstechniken, obwohl die Auswahl der gewählten Methoden abweicht.

In der Studie von Parrella A. et al. konnte gezeigt werden, dass mittels mikrofluidischer Aufbereitungsmethode (ZyMot) die schnellsten Spermien mit besserer Morphologie und höchster genomischer Integrität isoliert werden. (45)

Auch die Studie von Quinn M. M. et al. kam zu dem Ergebnis, dass die DNA-Schäden der Spermien nach mikrofluidischer Aufbereitung (ZyMot) signifikant niedriger sind als mittels Dichtegradienten und Swim-Up. (46)

In der Studie von Brousard A. et al. wurde die mikrofluidische Aufbereitungsmethode (ZyMot) mit der Dichtegradienten- und Swim-Up-Methode

verglichen. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass der DNA-Fragmentations-Index (DFI), der Oxidative-stress-adduct (OSA)-Wert und der High-DNA-stainability (HDS)-Wert nach mikrofluidischer Aufbereitung (ZyMot) im Vergleich zu den beiden anderen Aufbereitungsmethoden reduziert waren. Dieses erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass gesunde Spermien für die Befruchtung verwendet werden. (47)

Die Studie von Palmerola K. L. et al. zeigte, dass die Schwangerschaftsrate nach Einsetzen eines euploiden Embryos bei der mikrofluidischen Samenaufbereitungsmethode (ZyMot) höher liegt als im Vergleich zur Dichtegradienten-Methode. Diese Ergebnisse lassen sich durch die geringere DNA-Fragmentierung und die dadurch verbesserte Embryoqualität der resultierenden Embryonen erklären. (48)

In einer Studie von 2022 von Godiwala P. et al. wurde die Blastulationsrate nach Aufbereitung des Samens mittels Dichtegradient und Mikrofluidik verglichen. Dabei zeigte sich, dass nach Verwendung der Mikrofluidik-Kammer eine höhere Blastulationsrate, Befruchtungsrate und Euploidierate pro entnommener Eizelle erzielt werden konnte. In dieser Studie konnte somit gezeigt werden, dass die embryologischen Ergebnisse durch die Aufbereitung mittels Mikrofluidik verbessert werden können. (49)

Die Verbesserung der Motilität ist sowohl in den oben genannten Publikationen wie auch in meiner Masterarbeit nach Aufbereitung mittels ZyMot-Kammer deutlich zu sehen. Dies lässt sich auf das mikrofluidische Design des Chips zurückführen, welches den Gebärmutterhalskanal im weiblichen Organismus nachahmen soll. Da die Spermazellen eigenständig ihren Weg an die Membranoberfläche finden müssen, kommt es zu einer massiven Absonderung der unbeweglichen Spermazellen und dadurch zu einer natürlichen Selektion. (44) Im Gegensatz dazu beruht die Dichtegradientenzentrifugation rein auf einem Unterschied der Dichte der Spermienköpfe. Dies geschieht nicht durch eigenständige Bewegung der Spermazellen, sondern durch einen Zentrifugationsschritt, der die hochqualitativen Spermien abtrennt.

In den oben genannten Publikationen wurde die Verbesserung der DNA-Qualität nach Aufbereitung mittels ZyMot-Kammer festgestellt. (45-49) In dieser Masterarbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich beider Techniken nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass in

den oben erwähnten Studien die DNA-Fragmentierung zur Bestimmung der DNA-Qualität herangezogen wurde und nicht die Chromatinkondensation anhand der Anilinblau-Färbung.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Motilität der Samenzellen mit einer Verminderung von DNA-Strangbrüchen korreliert. (50-53)

Die Studie von Ebner T. et al. stellt dabei eine Hypothese für diesen Zusammenhang auf: Die Spermienmotilität korreliert mit dem Volumen der Mitochondrien im Mittelstück der Spermien. Gleichzeitig konnten Mutationen, Deletionen und DNA-Strangbrüche in der mitochondrialen DNA mit einer verminderten Motilität der Samenzellen in Verbindung gebracht werden. Dies wiederum führt zu einer Störung der ATP-Produktion in den Spermien, was sich negativ auf deren Beweglichkeit auswirkt. (50)

Da in meiner Studie das Vorliegen von DNA-Strangbrüchen nicht ausgewertet wurde, konnte dieser Zusammenhang von Motilität und DNA-Qualität nicht direkt festgestellt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass in meiner Arbeit ebenfalls Spermien mit hoher genomischer Integrität durch die Aufbereitung mittels ZyMot-Kammer angereichert werden konnten.

Eine potenzielle Einschränkung der ZyMot-Kammer könnte die für die Aufbereitung vorgeschriebene Probenmenge sein. Im Gegensatz zur ZyMot-Kammer, die 850 µl Probenmaterial vorschreibt, kann das Volumen im Dichtegradienten variabel angepasst werden. Im Falle einer Oligozoospermie, bei der sich nur sehr wenige Samenzellen im gesamten Ejakulat befinden, kann es notwendig sein das gesamte Probenmaterial zu verarbeiten, um genügend Samenzellen nach Aufbereitung für die weitere Befruchtung zu isolieren. Beim Einsetzen der vorgeschriebenen Menge bei Verwendung der ZyMot-Kammer ist es fraglich, ob diese benötigte Anzahl an Spermien beim Auftreten einer Oligozoospermie erreicht werden kann.

Trotz vielversprechender Ergebnisse weist meine Studie jedoch einige Limitierungen auf. Da sich die Studiengröße auf lediglich 20 männliche Probanden begrenzt, kann diese Arbeit nur als Pilotstudie angesehen werden. Eine Studie mit einer größeren Probandenzahl wäre erforderlich, um eine statistisch fundierte Aussage bezüglich der geeignetsten Samen-Aufbereitungstechnik zu treffen.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit hauptsächlich Patienten mit einer Normozoospermie (n=12) und Teratozoospermie (n=7) und lediglich ein Patient mit einer Oligoteratozoospermie behandelt. Eine Einschränkung in der Beweglichkeit der

Samenzellen (Asthenozoospermie) wurde in dieser Studie nicht getestet. Dabei ergibt sich die Fragestellung, ob die Aufbereitungstechnik mittels ZyMot-Kammer auch bei einem eingeschränkten Befund in der Beweglichkeit der Samenzellen eine positive Wirkung zeigt. Um zu validieren, dass die ZyMot-Kammer eine bessere Aufbereitungstechnik im Vergleich zu der Dichtegradientenzentrifugation darstellt, ist es notwendig Patienten mit allen möglichen Einschränkungen des Spermogrammes mit einer größeren Fallzahl zu inkludieren.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Krause W, et al. *Andrologie*. Thieme. 2011; 4: 303
- (2) Rohen J W, and Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Anatomie des Menschen*. Schattauer. 2006; 11: 213
- (3) Kirsch J, et al. *Taschenlehrbuch Anatomie*. Thieme. 2010; 472-491
- (4) Kretser D, et al. *Spermatogenesis*. *Hum Reprod*. 1998; 13(1): 1-8
- (5) Sadler T. *Medizinische Embryologie*. 11. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme. 2008; 11: S. 39 ff., 346
- (6) Lüllmann-Rauch R. *Spermatogenese*. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage; Kapitel 20.1.2. Kiel und Erlangen: Georg Thieme Verlag; 2012; p.494-498
- (7) Sadler T W. *Taschenlehrbuch Embryologie*. Thieme. 2020; 13: 63-66
- (8) Bianchi E, et al. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*. 2014; 508: 483-487
- (9) Gardner A, et al. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent by multiple sperm. *Reproduction Fertility and Development*. 2006; 18(1-2): 53-61
- (10) Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*: 2018; 15(6): 369-384
- (11) Calogero A E, et al. Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017; 40: 705–712
- (12) Belling K, et al. Klinefelter syndrome comorbidities linked to increased X chromosome gene dosage and altered protein interactome activity. *Human Molecular Genetetics*. 2017; 26: 1219–1229
- (13) Vorona E, et al. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92: 3458–3465
- (14) Skaletsky, H, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003; 423: 825–837
- (15) Vincent MC, et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *Journal of Andrology*. 2002; 23: 15–18
- (16) Tuttelmann F, et al. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLOS One*. 2011; 6: 19426

- (17) Liu T, et al. Early detection of Y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of China. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(5): 14350
- (18) Kent-First M, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction and Development*. 1999; 53: 27–41.
- (19) Gottlieb B, et al. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human Mutation*. 2012; 33: 887–894
- (20) Galani A, et al. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones (Athens)*, 2008; 7: 217-229
- (21) Ping P, et al. Fertility outcome of patients with testicular tumor: Before and after treatment. *Asian Journal of Andrology*. 2014; 16(1): 107-111
- (22) Jensen C, et al. Varicocele and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2017; 14(9): 523-533.
- (23) Parnham A, Serefoglu E C. Retrograde ejaculation, painful ejaculation and hematospermia. *Translational Andrology and Urology*. 2016; 5(4): 592-601
- (24) Sironen A, et al. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020; 77: 2029-2048
- (25) Liu W, et al. Viral threat to male fertility. *Andrologia*. 2018; 50(11): 13140
- (26) Agarwal A, et al. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. *Andrologia*. 2018; 50: 13126
- (27) Sengupta P, et al. Endocrinopathies and Male Infertility. *Life*. 2022; 12(1):10
- (28) Semet M, et al. The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology*. 2017; 5(4): 640-663
- (29) Jequier A. *Male Infertility – A Clinical Guide*. Cambridge University Press. 2011; pp 197-208.
- (30) WHO Laboratory Manuel for the Examination and processing of human semen. 2021; 6 Edition
- (31) Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*. 1988; 11(5): 379-94.

- (32) Zinaman M J, Brown C C, Selevan S G, Clegg E D. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*. 2000; 21(1): 145-53.
- (33) Larsen L, et al. Computer- assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*. 2000; 15(7): 1562-7.
- (34) Huszar G, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility*. 2003; 79: 1616-1624.
- (35) Pourmasumi S, et al., Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2019; 20(2): 95-101
- (36) Henkel R R, et al. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1994; 11(8): 395-400
- (37) Lewis S, Aitken R. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research*. 2005; 322(1): 33–41.
- (38) Zini A, Boman J M, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2008; 23(12): 2663–8.
- (39) Henkel R R, Scholl W B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1: 108
- (40) Baldini D, et al. Sperm Selection for ICSI: Do we have a winner? *Cell*. 2021; 10(21): 3566
- (41) Malvezzi H, et al. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014; 12: 121
- (42) Allamaneni S S, et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatazoa. *Asian Journal of Andrology*. 2005; 7: 86–92.
- (43) Beydola T, Sharma R K, Lee W, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. *Male Infertility Practice*. 2013; pp. 244–251.

- (44) Zhang X, et al. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab Chip*. 2011; 11(15): 2535–40.
- (45) Parrella A, et. al. Microfluidic selection of spermatozoa retains chromatin integrity and yields higher pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 2018; 110(4): 343
- (46) Quinn M M, et al. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Human Reproduction*. 2018; 33(8): 1388–1393
- (47) Broussard A, et al. Sperm DNA fragmentation (SDF) was most effectively improved by a sperm separation device compared to different gradient and swimup methods. *Fertility and Sterility*. 2019; 111(4): 15
- (48) Palmerola K L, et al. Superior sperm selection? Microfluidic sperm sorting improves euploid embryo ongoing pregnancy rate compared to density gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*. 2020; 114(3): 126
- (49) Godiwala P, et al. Embryologic outcomes among patients using a microfluidics chip compared to density gradient centrifugation to process sperm: a paired analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022; 39: 1523-1529
- (50) Ebner T, et al. Easy sperm processing technique allowing exclusive accumulation and later usage of DNA-strandbreak-free spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011; 22: 37-43
- (51) Seiringer M, et al. Efficacy of sperm-selection chamber in terms of morphology, aneuploidy and DNA packaging. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013; 27: 81-88
- (52) Belloc S, et al. Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2014; 31: 527-532
- (53) Belloc S, et al. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and Sterility*. 101(6): 1588-93

6 Anhang (Rohdaten)

Befund	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4		Patient 5		Patient 6		Patient 7	
	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie
Alter Patient	Mann 44 - Frau 38	Mann 39 - Frau 39	Mann 33 - Frau 34	Mann 30 - Frau 27	Mann 25 - Frau 30	Mann 31 - Frau 34	Mann 34 - Frau 31	Mann 30 - Frau 27	Mann 25 - Frau 30	Mann 31 - Frau 34	Mann 34 - Frau 31	Mann 30 - Frau 27	Mann 25 - Frau 30	Mann 31 - Frau 34
Karenztage	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen	5	3,7	5,3	2,5	1,2	5,3	1,2	1,2	5,3	1,2	5,3	1,2	5,3	1,2
Konzentration (netiv-Ejakulat)	58	118	92	59	58	160	51	58	160	51	58	160	51	58
DG														
ZyMot														
Konzentration	2,7	4,9	17	45	15	34	4	4	1,8	6	50	76	50	76
Konzentration bewegliche SZ	0,5	4,5	13,5	44	11	34	2,4	2,4	1,3	6	39	75	39	75
Motilität	5	76	3	84	61	91	86	86	8	79	59	93	59	93
langsam progressiv (A)	13	20	76	14	27	91	38	38	20	20	5	26	5	26
langsam progressiv (B)	18	96	79	98	88	100	72	72	37	99	78	98	78	99
progressiv gesamt (A+B)	24	1	14	1	6	0	1	1	0	14	1	38	1	38
ortsbeweglich C	58	3	7	1	6	0	20	20	46	1	8	1	28	0
ortsbeweglich (D)	42	97	93	99	94	100	80	80	54	99	92	99	72	100
Beweglichkeit gesamt (PR + NP)														
HBA-Assay														
gebunden	35	106	239	205	131	77	79	79	160	353	107	129	353	107
nicht gebunden	1	4	40	30	6	4	4	4	7	25	8	9	25	8
Prozentsatz	97,20%	96,36%	84,19%	90,70%	88,85%	97,71%	86,58%	95,06%	95,18%	92,38%	93,89%	92,38%	92,38%	93,89%
Anilinfärbung														
nicht angefärbt (normal)	67,50%	68%	86%	89%	82%	90%	22%	24%	57%	73%	77%	78%	73%	77%
angefärbt	32,50%	32%	14%	11%	18%	10%	78%	76%	42%	27%	23%	22%	27%	23%

Befund	Patient 8		Patient 9		Patient 10		Patient 11		Patient 12		Patient 13		Patient 14	
	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie
Alter Patient	Mann 40 - Frau 35	Mann 57 - Frau 49	Mann 39 - Frau 39	Mann 37 - Frau 38	Mann 40 - Frau 35	Mann 48 - Frau 44	Mann 37 - Frau 38	Mann 40 - Frau 35	Mann 48 - Frau 44	Mann 40 - Frau 35	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44
Karenztage	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen	1,9	1,6	2,6	2,9	1,8	2,1	1,8	1,8	2,1	1,8	2,1	1,8	2,1	2,3
Konzentration (netiv-Ejakulat)	65	126	30	18	18	145	18	217	145	145	145	145	145	35
DG														
ZyMot														
Konzentration	8,6	9,4	10	50	5,4	5,5	4,3	4,3	46	57	87	87	4,2	1,2
Konzentration bewegliche SZ	3,4	9,3	7	50	1,3	5,2	0,8	4	41	56	75	86	0,1	1
Motilität	17	79	47	79	67	67	57	57	63	81	69	93	0	28
langsam progressiv (A)	20	20	27	24	22	24	22	24	14	18	7	6	4	60
langsam progressiv (B)	37	99	64	99	33	91	27	97	77	99	76	99	4	88
progressiv gesamt (A+B)	19	0	24	1	16	7	42	1	18	1	9	0	11	5
ortsbeweglich C	44	1	12	1	51	2	31	2	5	1	15	1	11	5
ortsbeweglich (D)	56	99	88	100	49	98	69	98	95	100	85	99	15	93
Beweglichkeit gesamt (PR + NP)														
HBA-Assay														
gebunden	203	210	222	253	31	71	56	56	200	328	299	358	17	17
nicht gebunden	18	15	10	12	2	5	1	1	12	21	18	15	16	14
Prozentsatz	91,86%	93,33%	95,69%	95,47%	93,94%	93,42%	96,97%	96,55%	94,34%	93,98%	94,32%	95,98%	51,51%	54,84%
Anilinfärbung														
nicht angefärbt (normal)	76%	78%	83%	88%	57%	57%	82%	86%	76,50%	77%	83%	84%	62%	62%
angefärbt	24%	22%	17%	12%	43%	43%	18%	14%	23,50%	23%	17%	16%	38%	38%

Befund	Patient 15		Patient 16		Patient 17		Patient 18		Patient 19		Patient 20	
	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie	Teratozoospermie (%)	Normozoospermie
Alter Patient	Mann 33 - Frau 32	Mann 33 - Frau 32	Mann 33 - Frau 31	Mann 40 - Frau 38	Mann 40 - Frau 38	Mann 29 - Frau 36	Mann 27 - Frau 37	Mann 27 - Frau 37	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44	Mann 48 - Frau 44
Karenztage	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen	2,9	2,9	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Konzentration (netiv-Ejakulat)	75	75	25	81	81	91	91	91	91	91	91	101
DG												
ZyMot												
Konzentration	4,3	4,3	3	6,3	6,3	13	13	13	1,5	1,5	29	38
Konzentration bewegliche SZ	0,2	0,2	0,8	3,7	3,7	7	7	7	0,2	0,2	7	7
Motilität	0	46	6	73	73	44	44	44	1	1	82	5
langsam progressiv (A)	4	44	15	18	18	28	28	28	6	6	26	13
langsam progressiv (B)	4	90	21	97	97	75	75	75	27	27	95	47
progressiv gesamt (A+B)	13	5	18	18	18	1	1	1	19	19	2	17
ortsbeweglich C	83	5	63	3	3	10	10	10	54	54	3	36
ortsbeweglich (D)	17	95	39	97	97	81	81	81	46	46	97	64
Beweglichkeit gesamt (PR + NP)												
HBA-Assay												
gebunden	25	25	59	41	189	210	241	241	52	54	151	227
nicht gebunden	10	10	7	5	11	8	8	8	7	7	17	27
Prozentsatz	71,43%	71,43%	89,39%	89,13%	94,03%	94,06%	96,02%	96,02%	89,14%	88,52%	89,88%	89,37%
Anilinfärbung												
nicht angefärbt (normal)	56%	57%	78%	80%	87,50%	89,50%	53%	53%	42%	43%	77%	76%
angefärbt	44%	43%	22%	20%	12,50%	10,50%	47%	48%	58%	57%	23%	24%