

**Etablierung eines Verfahrens zur Kryokonservierung einzelner
Spermatozoen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Cornelia Koch
aus Köln
2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Apl. Prof. Dr. M. Montag
2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Klingmüller

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.02.2016

Aus dem Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universitätsklinik Bonn

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walther Kuhn

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	8
1.1	Natürliche Befruchtung.....	8
1.2	Struktur eines Spermiums.....	9
1.3	Infertilität.....	9
1.3.1	Begriffserläuterung.....	10
1.3.2	Männliche Infertilität.....	10
1.3.2.1	Das Spermogramm.....	11
1.3.2.2	Oligoasthenoteratozoospermie.....	11
1.3.2.3	Mikrochirurgische Spermengewinnung.....	12
1.3.3	Weibliche Infertilität.....	13
1.4	Assistierte Reproduktion (ART).....	13
1.4.1	IVF.....	14
1.4.1.1	Indikation.....	14
1.4.1.2	Zyklusstimulation.....	14
1.4.1.3	Eizellentnahme (Follikelpunktion).....	15
1.4.1.4	Embryonentransfer.....	15
1.4.1.5	Lutealphasenstützung.....	16
1.4.2	ICSI.....	16
1.4.2.1	Indikation.....	16
1.4.2.2	Vorbereitung der Eizellen und der Spermien.....	16
1.4.2.3	Spermieninjektion.....	17
1.5	Ziel der Arbeit.....	20
2.	Material und Methoden	22
2.1	Ethikvotum.....	23
2.2	Vergleich von verschiedenen Formen der Folienzuschnitte.....	23
2.3	Findung einer geeigneten Tropfengröße.....	24
2.4	Verschiedene Auftaumethoden.....	25
2.5	Ermittlung des zu verwendenden Mediums zum Einfrieren.....	26

2.6	Folienmaterial	26
2.7	Effizienz der Methode	277
2.8	Statistik	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Methodenoptimierung	28
3.1.1	Tropfengröße	28
3.1.2	Folienzuschnitte	29
3.1.3	Auftaumethoden	30
3.1.4	Medium zur Vorbereitung zur Kryokonservierung	35
3.1.5	Folienmaterial	39
3.2	Endgültiger Versuchsaufbau und Versuchsbeschreibung	40
3.3	Effizienz der Methode	47
4.	Diskussion	51
5.	Zusammenfassung	55
6.	Materialverzeichnis	57
7.	Abbildungsverzeichnis	59
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Danksagung	63

Abkürzungsverzeichnis

ART	Assistierte Reproduktion
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hCG	Humanes Choriongonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
MESA	Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration
MRT	Magnetresonanztomographie
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PZD	Partielle Zonadissektion
SUZI	Subzonale Insemination
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Um zu verstehen, welche Vorteile die erfolgreiche Entwicklung einer Methode zur Kryokonservierung einzelner Spermatozoen haben könnte, sind die Kenntnisse einiger Grundlagen im Bereich der Reproduktionsmedizin unabdinglich. Die Einleitung dieser Arbeit soll diese Grundlagen kurz erläutern und somit auf das Ziel der vorliegenden Arbeit hinführen.

1.1 Natürliche Befruchtung

Die natürliche Befruchtung der Eizelle ist ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Faktoren, das beim Menschen im Eileiter stattfindet. Für das Erreichen der Eizelle durch das Spermium sind vor allem peristaltische Kontraktionen des weiblichen Genitaltraktes sowie die Bewegung der Spermien durch Geißeln von Bedeutung. Desweiteren spielen auch Sexuallockstoffe eine Rolle, die von der Eizelle abgeschieden werden (Hirsch-Kauffmann et al., 2009).

Die Penetration des Spermiums in die Eizelle wird durch das sogenannte Akrosom ermöglicht, das aus proteolytischen Enzymen wie z. B. Hyaluronidase besteht und das Durchdringen der Eizellmembran ermöglicht. Um das Eindringen weiterer Spermien zu verhindern, bildet sich nach dem Eindringen des Spermiums eine Befruchtungsmembran aus (Müller und Hassel, 2005).

Nach dem Ablösen des Spermienschwanzes verschmelzen der männliche und der weibliche Kern zu einem gemeinsamen Kern. Nach Abschluss der Befruchtung wandert der sich entwickelnde Embryo in den Uterus, wo es zur Implantation kommt (Hirsch-Kauffmann et al., 2009).

1.2 Struktur eines Spermiums

Wie in 1.1 beschrieben sind verschiedene Teile des Spermiums für den erfolgreichen Befruchtungsvorgang von Bedeutung. Die folgende Abbildung stellt die grundlegende Struktur eines Spermiums dar.

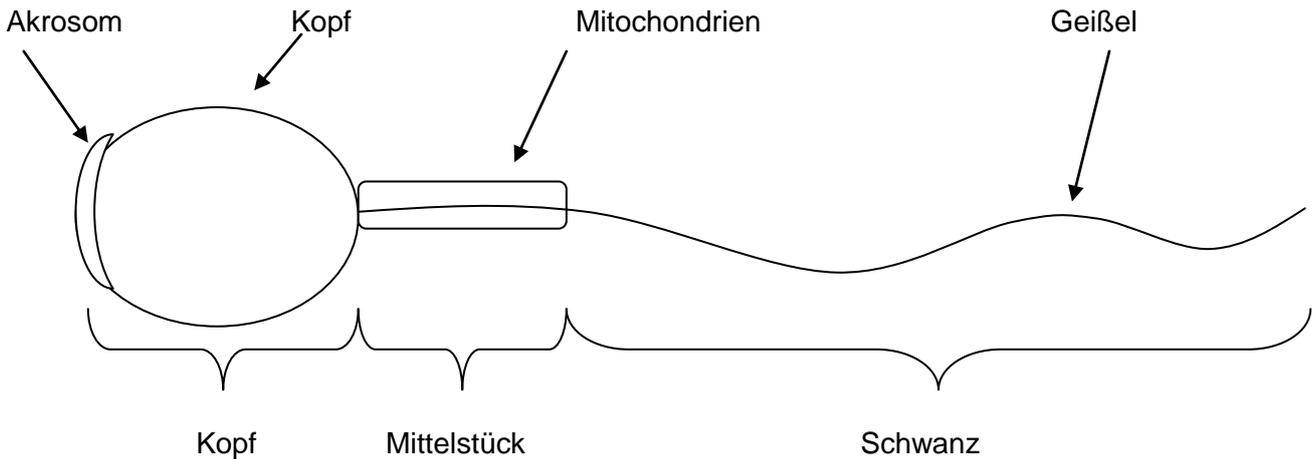


Abb. 1: Struktur eines Spermiums: Ein Spermatozoon kann in drei Teile unterteilt werden: Den Kopf, das Mittelstück und den Schwanz. Der Kopf enthält einen haploiden Zellkern. An den Kopf angelagert findet sich das Akrosom, das aus proteolytischen Enzymen zur Penetration der Eizellhüllen besteht. Das Mittelstück zeichnet sich durch seine vielen Mitochondrien aus, die zur Energiegewinnung notwendig sind. Der Schwanz besteht aus einer Geißel, die der Fortbewegung des Spermiums dient (Schwegler und Lucius, 2011).

1.3 Infertilität

Infertilität ist ein Problem, von dem aktuell ca. 15 % der Paare betroffen sind. Dabei kann man zwischen männlichen und weiblichen Faktoren für die Infertilität unterscheiden. Häufig ist aber auch eine Kombination von mehreren Faktoren ursächlich für den unerfüllten Kinderwunsch (Jungwirth et al., 2012; Lee und Seo, 2012).

Seit der Einführung der ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*) im Jahre 1992 haben viele Männer mit geringer Spermienqualität dennoch die Möglichkeit ein leibliches Kind zu zeugen (Palermo et al., 1992).

1.3.1 Begriffserläuterung

Es ist wichtig zwischen Sterilität und Infertilität zu unterscheiden. Die Begriffe werden häufig irreführend eingesetzt und wurden daher schon häufig kontrovers diskutiert.

Unter Sterilität versteht man die absolute Unfähigkeit ein Kind zu zeugen, auszutragen oder zu gebären, wohingegen Infertilität ein relativer Begriff ist, der beschreibt, dass es bei einem Paar nach einem Jahr ungeschützten, regelmäßigen Geschlechtsverkehr nicht zur Empfängnis gekommen ist (Jenkins et al., 2004). Diskutiert wird auch, ob dieser Zeitrahmen von einem Jahr angemessen ist oder z. B. auf zwei Jahre verlängert werden sollte.

1.3.2 Männliche Infertilität

Männliche Faktoren der Infertilität spielen insgesamt bei 45-50 % der Paare, die von Infertilität betroffen sind, als Ursache eine Rolle, wobei sie in 20 % der Fälle als Hauptursache anzusehen ist und in 27 % der Fälle mit Auffälligkeiten bei der Partnerin zusammentreffen (Ammar et al., 2012; Jungwirth et al., 2012).

Mögliche Gründe für eine Infertilität des Mannes können in prä-testikuläre, testikuläre und post-testikuläre Ursachen unterteilt werden. Zu den prä-testikulären Ursachen gehören z. B. jegliche endokrinologische Störungen. Zu den testikulären Ursachen zählen sowohl angeborene als auch erworbene Störungen des Urogenitaltrakts wie z. B. die Varikozele, aber auch genetisch verursachte Störungen. Als post-testikuläre Ursachen werden z. B. die obstruktive Infertilität oder die erektile Dysfunktion bezeichnet. Desweiteren können auch Entzündungen des Urogenitaltraktes und immunologische Störungen zu einer Infertilität des Mannes führen. In vielen Fällen bleibt die Ursache allerdings unklar, und wird als idiopathische Infertilität bezeichnet (Ammar et al., 2012). Außerdem sollte nicht vergessen werden, dass auch psychische Konflikte zu Problemen der Fertilität führen können.

Es ist wichtig, soweit möglich zwischen den Ursachen für die Infertilität zu unterscheiden, um evtl. lebensbedrohliche Erkrankungen auszuschließen und möglicherweise behbbare Probleme zu identifizieren und so auch die richtige Therapie für jeden Patienten zu finden. Dazu sollte zunächst eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung erfolgen sowie ein Spermogramm des Patienten angefertigt werden. Anschlie-

ßend können, wenn notwendig, Laboruntersuchungen folgen, die z. B. hormonelle Parameter und Entzündungsmarker erfassen. Desweiteren spielen auch bildgebende Verfahren wie die Ultraschalluntersuchung oder das MRT eine wichtige Rolle um z. B. eine Varikozele, eine obstruktive Aspermie oder auch eine onkologische Erkrankung zu identifizieren (Krausz, 2011).

1.3.2.1 Das Spermiogramm

Die Analyse des Ejakulats ist eine der wichtigsten Untersuchungen bei ungewollter Kinderlosigkeit und somit fester Bestandteil der Diagnostik.

Zur Erstellung eines Spermiogramms wird das Ejakulat nach einer sexuellen Karenzzeit von ca. 5 Tagen durch Masturbation gewonnen. Anschließend werden folgende Parameter untersucht: Verflüssigungszeit (Norm: 5-20 Minuten), Viskosität, Farbe/Geruch, Volumen (Norm: 2-8 ml), pH-Wert (Norm: 6,0-8,0). Im Nativpräparat können dann Spermiedichte (Norm: 20-250 Mio/ml), Motilität und Morphologie beurteilt werden.

Die Motilität wird nach der WHO in drei Stufen unterteilt: schnell progressiv (WHO A), langsam progressiv (WHO B) und ortsständig (WHO C), wobei als „Norm“ bezeichnet wird, wenn mindestens 20 % der Spermien in Stufe A, bzw. 40 % in die Stufen A + B zugeordnet werden können.

Als morphologisch „normal“ gilt es, wenn mindestens 30 % der Spermien als Normalformen bezeichnet werden können (WHO). Teratozoospermie beginnt ab 70 % abnormalen Formen. Beurteilt werden kann die Morphologie z. B. nach der Klassifikation der „strikten Kriterien“ nach Kruger (Feige, 2006).

Desweiteren können auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, die z. B. die Mukuspenetration oder die Überlebensfähigkeit der Spermatozoen testen.

Weiterhin ist wichtig zu erwähnen, dass auch Formen der Sterilität vorkommen, bei denen das Spermiogramm des Mannes normal ist und es trotzdem durch IVF nicht zur Befruchtung kommt.

1.3.2.2 Oligoasthenoteratozoospermie

Als OAT-Syndrom wird die Kombination der drei Faktoren (verminderte Dichte, reduzierte Beweglichkeit und abnorme Morphologie der Spermien) bezeichnet. Die Gründe für

das Entstehen eines solchen Syndroms können sehr vielfältig sein und reichen von genetischen Ursachen und Entzündungen bis hin zur ungeklärten Ursache, die am häufigsten diagnostiziert und dann als idiopathisches OAT-Syndrom bezeichnet wird. Das idiopathische OAT-Syndrom betrifft 30 % aller infertilen Männer und kann in drei Schweregrade eingeteilt werden. Die leichteste Form ist die isolierte Asthenospermie, bei der lediglich die Beweglichkeit der Spermatozoen eingeschränkt ist, eine Veränderung der Morphologie ist dabei definitionsgemäß nicht zwingend notwendig und eine Veränderung der Spermiedichte ist nicht vorhanden. Bei der mäßigen Form des OAT-Syndroms ist die Spermiedichte $<20 \times 10^6/\text{ml}$ und $>5 \times 10^6/\text{ml}$. Ab einer Spermiedichte, die unter $5 \times 10^6/\text{ml}$ liegt, spricht man von einer schweren OAT (Cavallini, 2006).

1.3.2.3 Mikrochirurgische Spermengewinnung

Die mikrochirurgische Spermengewinnung findet besonders bei Patienten mit obstruktiver Azoospermie Anwendung. Am häufigsten findet sich bei obstruktiver Azoospermie eine epidymale Obstruktion. Diese kann z. B. durch vorhergegangene Entzündungen oder Traumata verursacht werden. Weitere Gründe für eine obstruktive Azoospermie können z. B. eine frühere Sterilisation oder Fehlbildungen sein.

Bei vielen Patienten mit epidymaler Obstruktion, ist es mittlerweile möglich, eine normale Funktion wiederherzustellen und die Azoospermie somit aufzuheben. Voraussetzung dafür ist das Fehlen von weiteren anatomischen Fehlbildungen (Popal und Nagy, 2013).

Wenn die operative Korrektur jedoch nicht geeignet oder erfolglos ist und Kinderwunsch besteht, können durch mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration (MESA) oder testikuläre Spermienextraktion (TESE) Spermien gewonnen werden, die zur IVF/ICSI genutzt werden können (Silber et al., 1995).

Bei der MESA handelt es sich um eine mikroskopisch kontrollierte Punktion des Nebenhodens, bei der vor allem im Falle einer obstruktiven Azoospermie Spermien gewonnen werden, die anschließend kryokonserviert werden oder auch direkt zur IVF/ICSI verwendet werden können (Cha et al., 1997).

Wenn die MESA erfolglos bleibt oder aber eine nicht-obstruktive Azoospermie, also eine Störung in der Spermatogenese vorliegt, können im Rahmen einer TESE Hodenbiopsien entnommen werden, die anschließend auf das Vorhandensein von Spermien und

deren Entwicklungsstadium überprüft werden. Wenn die Proben reife Spermien enthalten, können auch die so gewonnenen Samenzellen zur Befruchtung mittels IVF/ICSI verwendet werden (Popal und Nagy, 2013).

1.3.3 Weibliche Infertilität

Bei Frauen hat das Alter einen großen Einfluss auf die Fertilität. Dies konnte unter anderem durch die Schwangerschaftsraten nach einer IVF-Behandlung gezeigt werden, die bei Frauen unter 30 am höchsten liegen und mit dem Alter deutlich absinken. Dies ist vor allem hinsichtlich des steigenden Durchschnittsalters der Erstgebärenden ein Problem.

Als Ursache für die Infertilität der Frau kommen neben psychosozialen und genetischen Faktoren vor allem organische Ursachen in Frage. Die häufigsten sind:

- Tubare Infertilität
- Ovarielle Störungen
- Endometriose
- Unklare Ursache

(Healy et al., 1994).

Auch bei der Diagnostik der weiblichen Infertilität sollte mit einer sorgfältigen Anamnese und klinischen Untersuchung begonnen werden. Wichtig ist dabei das Zyklusgeschehen genau abzuklären, wobei auch Ultraschalluntersuchungen und Hormonanalysen von Bedeutung sind. Neben funktionellen Tests sind zur Abklärung von anatomischen Ursachen der Infertilität möglicherweise auch invasive Maßnahmen (z. B. eine Laparoskopie) notwendig, deren Indikationszeitpunkt während einer Infertilitätsabklärung allerdings umstritten ist (Feige, 2006; Healy et al., 1994).

1.4 Assistierte Reproduktion (ART)

Da die Kenntnis der Methoden der Reproduktionsmedizin und die damit verbundenen Behandlungsabläufe für das Verständnis der Arbeit wichtig sind, werden im Folgenden die IVF und die ICSI dargestellt.

1.4.1 IVF

1978 wurde Louise Brown als erstes Baby nach einer künstlichen Befruchtung geboren (Steptoe und Edwards, 1978).

Seit dem hat sich die IVF (*in vitro fertilization*) zu einer anerkannten Technik entwickelt und wird heute sowohl als therapeutische als auch als diagnostische Maßnahme häufig genutzt (Feige, 2006).

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Zahlen der erfolgreich durchgeführten Behandlungszyklen von Jahr zu Jahr steigen, was auf Verbesserungen in der Methodik und größere Erfahrungen der behandelnden Kliniken schließen lässt (De Mouzon et al., 2009 und 2012).

1.4.1.1 Indikation

Die ursprüngliche Indikation für eine IVF war der „tubare Faktor“, das heißt, die IVF war für Frauen gedacht, bei denen aufgrund undurchgängiger oder fehlender Tuben auf natürlichem Wege keine Empfängnis zustande kam.

Mittlerweile wird die IVF als Therapie der Wahl für jegliche Art von Infertilität oder Subfertilität angesehen, die mit anderen Methoden nicht behandelt werden konnte oder deren anderweitige Behandlung aussichtslos erscheint (Van Voorhis, 2007).

Genutzt wird die IVF desweiteren auch als diagnostische Maßnahme, um bei einem Paar mit unerfülltem Kinderwunsch die Befruchtungsfähigkeit zu überprüfen (Feige, 2006).

1.4.1.2 Zyklusstimulation

Da in einem spontanen Zyklus die Chance am Tag der Follikelpunktion eine Eizelle aufzufinden relativ gering ist, wird die Effizienz der IVF heutzutage durch eine hormoninduzierte „Superovulation“ gesteigert.

Für eine solche Behandlung existieren verschiedene Protokolle, die aber in ähnlichen Schritten ablaufen. Zunächst wird durch die Gabe von GnRH-Analoga eine Unterdrückung der Hypophysentätigkeit erzeugt, sodass ein vorzeitiger LH-Peak verhindert wird. Danach wird durch FSH-Gabe Wachstum und Reifung der Eizellen stimuliert bis ab einer Größe von 18-20 mm die Gabe von hCG begonnen wird, die schließlich die endo-

gene LH-Ausschüttung stimuliert und zur endgültigen Reife der Eizellen führt (Goldberg et al., 2007).

1.4.1.3 Eizellentnahme (Follikelpunktion)

34 bis 38 Stunden nach der hCG-Gabe werden die Eizellen entnommen. In den Anfängen der IVF wurde dazu eine Laparoskopie durchgeführt. Etwa zehn Jahre nach der ersten erfolgreichen IVF jedoch hat sich die Methode der ultraschallgesteuerten transvaginalen Follikelpunktion letztendlich durchgesetzt. Diese Methode muss nicht in Vollnarkose erfolgen und ist für die Patientin somit risikoarm und zudem erfolgreich (Goldberg et al., 2007; Tanbo et al., 1988). Im Durchschnitt werden 10-20 Eizellen gewonnen, die dann in einem Kulturmedium bei 37 °C inkubiert werden. Zur Befruchtung der Eizellen, welche 12-20 Stunden später durch die Entstehung von Vorkernen beobachtet werden kann, werden 100.000-200.000 Spermien in die Kulturschale zugegeben oder es wird eine ICSI durchgeführt. (Goldberg et al., 2007).

1.4.1.4 Embryonentransfer

Der „klassische“ Zeitpunkt für den Embryonentransfer ist 24-48 Stunden nach der Ausbildung des Vorkernstadiums, was einem frühen Embryonalstadium, meist mit vier bis acht Zellen, entspricht (Feige, 2006).

Für den Transfer wird zunächst die Zervix mit Hilfe eines Spekulum dargestellt. Mittels eines speziellen Katheters werden die Embryonen dann in den Uterus eingesetzt. Anschließend wird der Katheter auf zurückgebliebene Embryonen überprüft. Um Komplikationen, wie z. B. das Verletzen des Endometriums durch den Katheter oder das Einsetzen der Embryonen an einer suboptimalen Stelle zu verringern, kann der Embryonentransfer auch unter Ultraschallkontrolle erfolgen. Ausgeschlossen werden können diese Risiken dadurch jedoch nicht (Mains und Van Voorhis, 2010).

Laut Embryonenschutzgesetz ist der Transfer von maximal drei Embryonen erlaubt. Trotzdem geht man mittlerweile wieder dazu über nur einen Embryo zu transferieren, da eine Mehrlingsschwangerschaft sowohl für die Mutter als auch für die Kinder ein höheres Risiko darstellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der wiederholte Transfer von einzelnen Embryonen sogar zu höheren Schwangerschaftsraten geführt hat als der

gleichzeitige Transfer von mehreren Embryonen. Desweiteren wird der wiederholte Transfer durch die Möglichkeit der Kryokonservierung erleichtert (Tiitinen, 2012).

1.4.1.5 Lutealphasenstützung

Auch die Lutealphase wird hormonell unterstützt, um möglichst physiologische Bedingungen z.B. bezüglich des Endometriumaufbaus herzustellen. Da die Follikelphase und die Lutealphase ein zusammenhängendes, aufeinander abgestimmtes System darstellen, muss die Lutealphasenstützung der Stimulation in der Follikelphase angepasst werden. Grundsätzlich gilt: Bei intensiver Stimulation in der Follikelphase muss auch die Stützung in der Lutealphase intensiver ausfallen (Feige, 2006).

1.4.2 ICSI

1992 veröffentlichten Palermo et. al. die erste Studie, in der es durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) zu erfolgreichen Schwangerschaften gekommen ist.

1.4.2.1 Indikation

Die ICSI ist eine Methode, die vor allem bei Paaren mit sehr reduzierter Spermienqualität des Mannes angewandt wird, da bei diesen Paaren eine konventionelle IVF wenig erfolgsversprechend ist (Palermo et al., 1992).

Neben der ICSI gibt es noch andere Zusatzmaßnahmen im Rahmen der IVF, welche die Fertilisation erleichtern sollen: die PZD (partielle Zonadissektion) und die SUZI (subzonale Insemination). Diese Methoden haben sich aber im Gegensatz zur ICSI nicht durchsetzen können (Feige, 2006).

1.4.2.2 Vorbereitung der Eizellen und der Spermien

Bis zur Eizellentnahme läuft die Behandlung bei der ICSI ebenso ab wie bei einer „normalen“ IVF. Nach der Eizellentnahme müssen diese von den sie umgebenden Kumulus- und Granulosazellen befreit werden, was mit Hilfe von Hyaluronidase und mechanischen Methoden möglich ist (Parinaud et al., 1998).

Auch die Spermien müssen vor der Injektion vorbereitet werden. Meist wird die sogenannte „swim-up“-Methode verwendet, durch die gut mobile von den unbeweglichen

Spermien getrennt werden können. Dabei wird das Ejakulat zunächst zentrifugiert und nach Absaugen der Flüssigkeit wird ein Kulturmedium zugegeben, sodass die mobilen Spermien hochschwimmen können und somit selektiert werden (Henkel und Schill, 2003).

1.4.2.3 Spermieninjektion

Diese Spermien können, um sie zu verlangsamen in ein hochmolekulares Medium (z. B. PVP) gegeben werden, wodurch das Einsammeln eines einzelnen Spermatozoons mit der feinen Glaskapillare erleichtert wird. Für die Injektion werden ausschließlich vitale Samenzellen verwendet, welche meist anhand ihrer Beweglichkeit identifiziert werden können. Geachtet wird bei der Auswahl des Spermiums zudem auf eine möglichst normale Morphologie. Das ausgewählte Spermium wird durch Zuhilfenahme einer Injektionskapillare immobilisiert und in diese aufgezogen (s. Abbildung 2). Die Eizelle wird mit der Haltekapillare so fixiert, dass die Polkörperchen bei 6 Uhr oder bei 12 Uhr liegen, um das Verletzen des Spindelapparates zu verhindern. Verwendet werden nur reife Oocyten in der Metaphase 2. Das Spermium wird dann mit dem Kopf voran direkt in das Ooplasma injiziert (s. Abbildung 3), sodass die *Zona pellucida* und die Vitellinmembran umgangen werden (Nieschlag et al., 2009).



Abb. 2: Originalfoto aus dem Bonner ICSI-Labor. Zentral im Bild die Oocyte mit dem Polkörperchen bei etwa 12 Uhr. Rechts im Bild die Injektionskapillare, an deren Spitze das Spermium zu erkennen ist, das injiziert werden soll. Links ist die Haltekapillare zu sehen, mit deren Hilfe die Oocyte fixiert wird.



Abb. 3: Auf der Abbildung erkennt man den Vorgang der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion. Links im Bild befindet sich die Haltekapillare, mit der die Eizelle fixiert wird. Von der rechten Bildseite aus ragt die Injektionskapillare in das Ooplasma hinein, sodass das Spermium unter Umgehung der *Zona pellucida* und der Vitellinmembran direkt dorthinein injiziert werden kann. (Originalfoto aus dem Bonner ICSI-Labor)

1.5 Ziel der Arbeit

Die Kryokonservierung männlicher Samenzellen gehört mittlerweile zu den Standardverfahren in der Reproduktionsmedizin. Sie findet bei unterschiedlichen Indikationen Verwendung:

- Samenspende
- Erhaltung der Reproduktionsfähigkeit vor Chemotherapie
- im Rahmen einer ICSI-Behandlung
- Patientenwunsch

Während die Ergebnisse hinsichtlich der Überlebensrate und der IVF-Erfolge bei Samenspendern regelmäßig gut waren, scheinen die herkömmlichen Methoden jedoch nicht hinreichend zur Kryokonservierung der Spermien von Männern mit Subfertilität oder OAT-Syndrom geeignet zu sein. Dies ist durch die geringe Anzahl und die schlechte Beweglichkeit der Spermien dieser Männer zu erklären. Durch den Einfrier- und Auftauvorgang ist ein Qualitätsverlust der Spermien bisher unvermeidbar, sodass bei Männern mit geringer Spermienqualität die Anzahl von Spermien, die nach Kryokonservierung für eine Befruchtung genutzt werden können, niedrig ist. Da aber durch den Erfolg der ICSI immer mehr Männer mit OAT-Syndrom auch die Möglichkeit haben Kinder zu zeugen, wäre es ein großer Fortschritt eine Methode zur Kryokonservierung zu entwickeln, die auch bei geringer Spermienqualität gute Ergebnisse liefert. Desweiteren könnte durch die Möglichkeiten der mikrochirurgischen Spermengewinnung ein noch größerer Patientenkreis von einer solchen Methode profitieren (Oehninger et al., 2000). Eine effiziente Kryokonservierungsmethode könnte diese Patienten vor mehrfachen chirurgischen Eingriffen bewahren und somit möglicherweise verursachte Schäden, wie z. B. Fibrosierungen oder Hämatome vermeiden (Cohen et al., 1997). Hinzu kommt, dass durch eine Kryokonservierung die Schwierigkeiten in der ART-Behandlung vermindert werden könnten, die sich aus der Notwendigkeit der zeitlichen Abstimmung von Eizellentnahme und Spermengewinnung ergeben. Denn gerade bei Männern mit niedriger Spermienqualität kann es zu dem Problem kommen, dass zu dem gewünschten Zeitpunkt keine oder zu wenige Spermien im Ejakulat enthalten sind (AbdelHafez et al., 2009).

Gute Ergebnisse hinsichtlich der Spermienmotilität konnten in Studien erzielt werden, die kleine Zahlen von Spermatozoen in leeren menschlichen *Zonae pellucidae* einfroren (Cohen et al., 1997; Levi-Setti et al., 2003; Montag et al., 1999). Beachten sollte man bei dieser Methode jedoch das Problem der Verfügbarkeit menschlicher *Zonae pellucidae* und die sich daraus eventuell ergebenden ethischen Konflikte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu optimieren, die es ermöglicht einzelne Spermien einzufrieren. Diese könnten auch aus Spermaproben, die sehr wenige Spermien enthalten, mittels einer Glaskapillare am ICSI-Mikroskop eingesammelt werden. Anschließend werden sie in einen Medium-Tropfen gegeben und eingefroren, so dass das Auffinden der Spermien nach dem Auftauen erleichtert wird. Zusätzlich ist Ziel der Methode, den Qualitätsverlust durch die Optimierung des Einfrier- und Auftauvorganges zu minimieren. Das Einfrieren der Spermien in Medium-Tropfen, die frei von den weiteren Bestandteilen des Ejakulates, wie z. B. Epithelzellen, sind, könnte dabei von Vorteil sein.

2. Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Spermatozoenproben aus der Universitätsfrauenklinik in Bonn, die in der Abteilung für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin im Rahmen von Fertilitätsuntersuchungen gewonnen wurden. Vorbereitet wurden die Spermien nach der sogenannten „swim-up“-Methode, die es ermöglicht die mobilen von den unbeweglichen Spermien zu selektieren (s. 1.4.2.2).

Die Grundidee der Methode bestand darin, einzelne Spermien mit Hilfe der Injektionskapillare an einem ICSI- Mikroskop (Leica; LEITZ DM IRB) zu sammeln, in kleine Medium-Tropfen zu überführen und anschließend in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Nach diesem Vorgang sollten die Spermien wieder aufgetaut und auf ihre Vitalität und Beweglichkeit überprüft werden.

Um den endgültigen Versuchsaufbau sowie die zu verwendenden Materialien festzulegen, wurden einige Testversuche und Vergleiche durchgeführt. Diese Optimierungsversuche werden im Folgenden genau dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche, die zum endgültigen Versuchsablauf der Methode geführt haben, werden in 3.1 erläutert.

Unabhängig von den Optimierungsversuchen wurden bei allen Versuchen für das Einsammeln der einzelnen Spermien mit dem ICSI-Mikroskop jeweils zwei Kulturschalen benötigt. In eine der Schalen wurde ein Tropfen PVP-Medium mit einem Volumen von ca. 10 µl pipettiert, in den die einzusammelnden Spermien eingesetzt wurden. In die zweite Schale wurde ein etwa 50 µl Gamete-Tropfen gegeben, der dazu dient die zum Einsammeln der Spermien verwendete Injektionskapillare einzustellen. Beide Schalen wurden mit Mineralöl aufgefüllt und bis zur Verwendung auf einer Wärmeplatte gelagert. Eingesammelt wurden die Spermien durch langsames Einsaugen mit Hilfe der Injektionskapillare des ICSI-Mikroskopes, dabei wurde darauf geachtet die Spermien möglichst nicht durch Streifen des Schwanzes mit der Kapillare schon vor der Kryokonservierung zu immobilisieren. Nach Einsammeln der gewünschten Anzahl an Spermien wurde die Schale mit dem PVP-Tropfen gegen die entsprechend vorbereitete Schale mit dem Folienzuschnitt zur Kryokonservierung ausgetauscht und die Spermien in den darauf vorbereiteten Medium-Tropfen entlassen. Der weitere Ablauf und Aufbau des Versuches wurde während der im Folgenden beschriebenen Testversuche modifiziert und den Ergebnissen entsprechend angepasst.

2.1 Ethikvotum

Für die vorliegende Arbeit war ein Ethikvotum aus mehreren Gründen nicht erforderlich. Wichtig ist, dass die verwendeten Proben nicht aus laufenden IVF- oder ICSI-Behandlungen stammten, sondern es sich um Proben aus reinen Spermogramm-Analysen handelte. Da es sich bei den verwendeten Proben lediglich um überschüssiges Material handelte, wurde dieses nicht mehr für anderweitige Untersuchungen benötigt. Zusätzlich wurden die betroffenen Probanden vorab um Erlaubnis gefragt, das übrigbleibende Material zu Forschungszwecken zu verwenden. Die Proben wurden vollständig anonymisiert. Desweiteren entstehen aus der durchgeführten Studie keine Ergebnisse, die für einen der Probanden in Zukunft Relevanz haben könnte.

2.2 Vergleich von verschiedenen Formen der Folienzuschnitte

Die einzeln eingesammelten Spermien sollen in einen Medium-Tropfen gegeben werden. Dieser soll auf einem Folienzuschnitt platziert und auf diesem dann in Stickstoff eingefroren werden. Um sowohl den Versuchsablauf als auch die Ergebnisse zu optimieren, wurde in diesem Teilversuch die beste Form der Folienzuschnitte (aus einer einfachen Deckfolie einer Dokumentenhülle geschnitten) ermittelt. Dazu wurden drei verschiedene Formen verglichen (s. Abbildung 4).

Ansicht der Zuschnitte von oben:

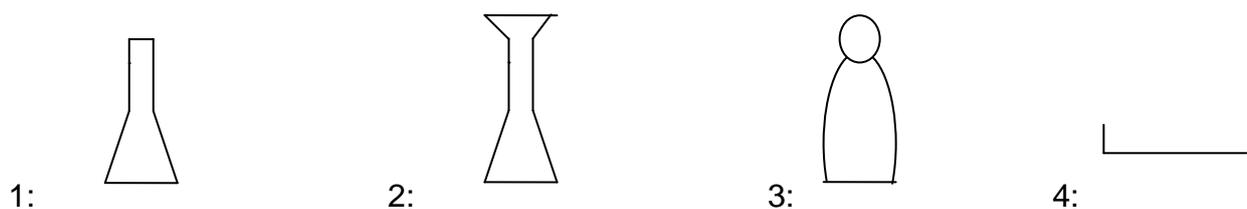


Abb. 4: Um die geeignete Form der Folienzuschnitte zu ermitteln, wurden drei verschiedene Formen hergestellt und in Bezug auf die beste Handhabung und einfachste Herstellung verglichen (Formen 1-3). Alle Formen wurden mit einem Knick zum Greifen mit der Pinzette versehen (4: seitliche Ansicht der Folienzuschnitte).

Von diesen drei Formen wurden jeweils drei Folienzuschnitte angefertigt und mit jeweils einem Medium-Tropfen in einer Größe von 2 μ l versehen. Diese wurden im Stickstoff-

dampf eingefroren. Hierzu wurde eine ca. 2 cm dicke Styropor-Platte auf den Metallständer in dem Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben. Auf die Styropor-Platte wurde eine Kulturschale platziert und die Folie wurde wiederum in die Kulturschale gelegt (siehe Abb.10 in 3.2). Anschließend wurden sie mit Hilfe einer Pinzette in die Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, ob der eingefrorene Tropfen bei der Überführung in das Reaktionsgefäß, sowie beim Auf- und Zuschrauben des Gefäßes an der Folie haften bleibt. Desweiteren war es wichtig zu prüfen welche Form der Folienzuschnitte am besten mit einer Pinzette zu handhaben ist.

2.3 Findung einer geeigneten Tropfengröße

Die Medium-Tropfen, in die die gesammelten Spermatozoen zum Einfrieren eingesetzt wurden, wurden auf kleinen Folienzuschnitten platziert, die dann nach der Kryokonservierung zur weiteren Lagerung in Reaktionsgefäße überführt und eingefroren werden konnten (s. Abbildung 5).

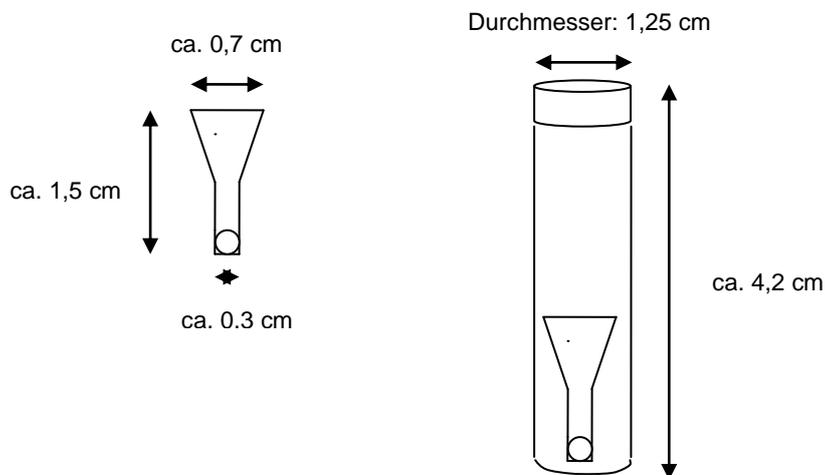


Abb. 5: Links ist ein Medium-Tropfen auf einem Folienzuschnitt abgebildet. In diesen Medium-Tropfen werden die eingesammelten Spermatozoen eingesetzt. Rechts ist der Folienzuschnitt mit dem Medium-Tropfen in einem Reaktionsgefäß dargestellt, in welchem die Probe nach Kryokonservierung gelagert werden kann.

Um die geeignete Größe für diese Medium-Tropfen zu finden, musste beachtet werden, dass die Folienzuschnitte in die Reaktionsgefäße passen müssen und die Größe derer also nicht überschreiten dürfen (s. Abbildung 5). Weiterhin wurde in diesem Schritt

überprüft, wie schnell verschiedene Medium-Tropfen auf der verwendeten Folie unter dem verwendeten Mikroskop verdunsten, um die zur Verfügung stehende Arbeitszeit bis zum Einfrieren zu explorieren.

Dies war vor allem wichtig, da es sich bei dem verwendeten Kryomedium „SpermStore“ (Gynemed) um ein HEPES-gepuffertes Medium handelt, das neben anderen Inhaltsstoffen auch Glycerol enthält. Glycerol soll das Sperma vor Schäden durch den Einfriervorgang schützen, allerdings führt es auch zu einer schnelleren Verdunstung. Eine zu große Verdunstung des Mediums vor dem eigentlich Einfriervorgang könnte in dem getesteten Verfahren zu Qualitätsverlusten führen, da es dadurch zu einer erniedrigten Alkoholkonzentration und somit zu einem erniedrigten Schutz der Spermien während des Einfriervorgangs kommen würde. Desweiteren würde die Verdunstung zu einer erhöhten Osmolarität des Mediums führen, was zusätzlich zu Schädigungen der Spermien und somit zu einer erniedrigten Vitalität und Mobilität der Spermien führen könnte.

Um das Ausmaß der Verdunstung zu testen, wurden zwei Versuchsreihen mit jeweils unterschiedlichen Medien durchgeführt. Medium A beinhaltet Gamete-Medium (Cook) und SpermStore im Verhältnis 2:1, wohingegen Medium B ein Verhältnis von 3:2 aufweist.

Mit jedem Medium wurden insgesamt 9 Verdunstungsversuche durchgeführt, davon jeweils drei mit einer Tropfengröße von 1 µl, 2 µl und 5 µl.

2.4 Verschiedene Auftaumethoden

Um die Spermatozoen nach der Kryokonservierung wieder aufzutauen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die im weiteren Verlauf der Versuche noch genauer verglichen wurden.

Im Folgenden wird die Auftaumethode (im weiteren Verlauf Auftaumethode a) genannt) dargestellt, die zu Beginn der Arbeit verwendet wurde:

Zum Auftauen der kryokonservierten Spermatozyten wird eine Schale („nunc“ IVF product line) mit einem Tropfen 10 µl Gamete-Medium vorbereitet. Die Folie mit dem eingefrorenen Tropfen wird zügig aus dem Reaktionsgefäß entnommen und umgedreht auf den Medium-Tropfen aufgelegt (s. Abbildung 6), sodass der eingefrorene Tropfen auf dem Medium-Tropfen zu liegen kommt und darin auftaut.

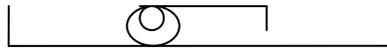


Abb. 6: Bei Auftaumethode a) wurde die umgedrehte Folie mit dem eingefrorenem Medium-Tropfen auf den Gamete-Tropfen aufgelegt und so aufgetaut. Anschließend konnte die Folie entfernt und die Schale mit Mineralöl aufgefüllt werden.

Dabei ist ein zügiges Arbeiten notwendig, um zu vermeiden, dass der Tropfen antaut und von der Folie abrutscht, bevor er auf den Medium-Tropfen aufgelegt wurde.

Die Schale wurde anschließend mit Mineralöl aufgefüllt und kurz gewärmt bevor sie dann zum Auffinden und Beurteilen der Spermien mikroskopiert werden konnte.

Mit dieser Auftaumethode als Ausgangspunkt wurden im weiteren Verlauf durch Testversuche Optimierungen vorgenommen, die zu Modifikationen geführt haben, welche in 3.1.3 vorgestellt und hinsichtlich ihrer Ergebnisse verglichen werden.

In den folgenden Versuchen zur Evaluierung des bestgeeigneten Mediums wurde nach der Ausgangs-Auftaumethode a) verfahren.

2.5 Ermittlung des zu verwendenden Mediums zum Einfrieren

Um die Vitalität und Beweglichkeit der Spermatozoen nach dem Auftauen zu optimieren, wurde in diesem Schritt ermittelt, welches Medium sich am besten zur Kryokonservierung der Spermatozoen mit dieser Methode eignet.

Dazu wurde mit jedem Medium (A und B) eine Versuchsreihe durchgeführt und deren Ergebnisse verglichen. Verwendet wurden jeweils 1 µl Tropfen des jeweiligen Mediums und alle Proben wurden mit Methode a) in einem 10 µl Gamete-Tropfen aufgetaut.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen werden in 3.1.4 dargestellt.

2.6 Folienmaterial

Im Laufe der verschiedenen Versuchsreihen wurde festgestellt, dass das Auffinden der Spermien bei einer modifizierten Auftaumethode (Methode c) dadurch erschwert wird, dass die Folie während des Mikroskopierens unter dem Medium-Tropfen verbleibt. In der Hoffnung dieses Problem durch ein anderes Folienmaterial lösen zu können, wurde

eine Versuchsreihe mit Folienzuschnitten aus Membranen von ibidi-Schalen (μ -Dish, ibidi[®]) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden in 3.1.5 dargelegt.

2.7 Effizienz der Methode

Um nach dem Optimierungsprozess die Effizienz des Verfahrens zu evaluieren, wurden abschließend zwei Versuchsreihen untersucht. Bei diesen Versuchsreihen wurde gleichbleibend nach dem in 3.2 beschriebenen Ablauf vorgegangen.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl der wieder gefundenen Spermatozoen und deren Vitalität werden in 3.3 erläutert.

2.8 Statistik

Um während des Optimierungsprozesses die bestmögliche Variante der getesteten Methode zu finden, musste an einigen Stellen zwischen verschiedenen Vorgehensweisen (z. B. verschiedene Auftaumethoden) entschieden werden. Um diese Entscheidungen zu treffen, wurde anhand der Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihen ein T-Test durchgeführt. Dadurch konnte bestimmt werden, ob die verglichenen Ergebnisse sich statistisch signifikant unterscheiden. Es wurde ein zweiseitiger T-Test für Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch) gewählt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt, sodass ein P-Wert unter 0,05 einen signifikanten Unterschied anzeigt.

3. Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es die Methode zur Kryokonservierung weniger Spermien im Rahmen von Testversuchen zu optimieren. Somit ist der endgültige Versuchsablauf, der im Verlauf der Arbeit als optimale Variante der getesteten Möglichkeiten herausgearbeitet wurde, als Hauptergebnis der Arbeit anzusehen. Dieser wird in 3.2 detailliert beschrieben. Zunächst werden die Ergebnisse der Optimierungsversuche, die zum letztendlichen Versuchsablauf geführt haben, dargestellt.

3.1 Methodenoptimierung

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der in 2 beschriebenen Versuche zur Optimierung des Versuchsablaufs dargestellt. Aus diesen Ergebnissen ergaben sich im Verlauf der Arbeit immer wieder Erkenntnisse zur Verbesserung der Methode und somit Änderungen im Versuchsaufbau und -ablauf.

3.1.1 Tropfengröße

Bei dem in 2.2 beschriebenen Versuch zur Optimierung der Tropfengröße ergaben sich folgende Zeiten bis zur vollständigen Verdunstung der Tropfen (s. Tabellen 1 und 2):

Tab. 1: Verdunstungsversuch mit Medium A; ermittelt wurde die durchschnittliche Zeit bis zur vollständigen Verdunstung des Tropfens, um eine geeignete Tropfengröße zu finden.

Tropfengröße	Zeit bis zur vollständigen Verdunstung des Tropfens: Gerundeter Mittelwert (Einzelwerte)
1 µl	9 Min., 11 Sek. (9 Min., 53 Sek.; 8 Min., 37 Sek.; 9 Min., 4 Sek.)
2 µl	15 Min., 22 Sek. (14 Min., 9 Sek.; 14 Min., 54 Sek.; 17 Min., 2 Sek.)
5 µl	24 Min., 50 Sek. (22 Min., 40 Sek.; 25 Min., 33 Sek.; 26 Min., 18 Sek.)

Tab. 2: Verdunstungsversuch mit Medium B; ermittelt wurde die durchschnittliche Zeit bis zur vollständigen Verdunstung des Tropfens, um eine geeignete Tropfengröße zu finden.

Tropfengröße	Zeit bis zur vollständigen Verdunstung des Tropfens: Gerundeter Mittelwert (Einzelwerte)
1 μl	8 Min., 42 Sek. (9 Min., 25 Sek.; 8 Min., 47 Sek.; 7 Min., 55 Sek.)
2 μl	15 Min., 14 Sek. (14 Min., 28 Sek.; 15 Min., 0 Sek.; 16 Min., 15 Sek.)
5 μl	27 Min., 38 Sek. (26 Min., 44 Sek.; 28 Min., 1 Sek.; 28 Min., 10 Sek.)

Somit hat sich gezeigt, dass die Arbeitszeit von in der Regel etwa 2-3 Minuten bis zum Verdunsten des Medium-Tropfens bei beiden Medien und bei allen getesteten Tropfengrößen ausreicht. Generell wurde jedoch bei allen Versuchsreihen darauf geachtet, die Arbeitszeit möglichst gering zu halten, um die auftretende Verdunstung und somit einen Qualitätsverlust zu minimieren.

Allerdings ist aufgefallen, dass die Tropfengröße von 5 μl die Größe der Folienzuschnitte überschreitet und deswegen die Größe der Medium-Tropfen maximal 2 μl betragen sollte.

3.1.2 Folienzuschnitte

Bei dem in 2.3 beschriebenen Versuch zur Optimierung der Form des Folienzuschnittes hat sich herausgestellt, dass Form 1 (s. Abbildungen 7 und 8) bevorzugt werden sollte:

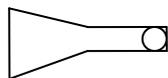


Abb. 7: Folienzuschnitt in der Ansicht von oben mit dem Kryomedium als Tropfen auf dem schmalen Ende der Folie platziert



Abb. 8: Folienzuschnitt in der seitlichen Ansicht mit dem Kryomedium als Tropfen an der Spitze platziert

Diese Form ist in der Anfertigung am einfachsten und am besten mit der Pinzette zu handhaben. Zusätzlich passt sie gut in die verwendeten Reaktionsgefäße und kann aus diesen auch gut wieder entnommen werden. Die Verbreiterung am oberen Ende des Zuschnittes (Form 2; s. Abbildung 5) schien keinen Vorteil zu bringen und ist somit nicht notwendig. Es hat sich als nützlich erwiesen, das untere Ende des Folienzuschnittes mit einem Knick zu versehen, der dem Greifen mit der Pinzette dient.

Bei allen Formen der Zuschnitte blieb der eingefrorene Medium-Tropfen bei der Entnahme aus dem Reaktionsgefäß gut an der Folie haften.

3.1.3 Auftaumethoden

Im Verlauf der Testversuche mit der in 2.4 beschriebenen Auftaumethode a) wurden sowohl Vor- als auch Nachteile dieses Verfahrens festgestellt. Im Folgenden werden diese erläutert und der sich daraus ergebende Optimierungsprozess der Auftaumethode dargestellt.

Es hat sich gezeigt, dass vor allem verhindert werden muss, dass ein Teil der eingefrorenen Spermatozoen während des Auftauvorgangs nicht von der Folie gelöst wird und somit anschließend in einem Medium-Tropfen nicht mehr aufzufinden ist.

Ein Vorteil bei Auftaumethode a) war, dass durch das umgedrehte Auflegen auf den Medium-Tropfen die Folie anschließend entfernt werden konnte und somit das Mikroskopieren nicht durch diese erschwert wurde.

Um das Anhaften der Spermatozoen auf den Folien zu verhindern und dadurch die Zahl derer, die nach dem Auftauen wiedergefunden wurden, zu erhöhen, wurden zwei weitere Auftaumethoden entwickelt:

Auftaumethode b): Die Folie wird wie bei Auftaumethode a) auf den Medium-Tropfen aufgelegt, zusätzlich wird dann die Folie beim Abheben mit 1-2 µl Gamete-Medium abgespült, sodass noch darauf befindliche Spermatozoen abgelöst werden können.

Um zu überprüfen, ob und wie viele der Spermatozoen verloren gehen, indem sie an der Folie hängen bleiben, wurde bei diesen beiden Methoden bei einigen Versuchen stichprobenartig auch die übrigbleibende Folie nach dem Auftauvorgang mikroskopiert. Dabei zeigte sich, dass auf diesen Folien jeweils noch einige Spermatozoen zu finden wa-

ren, die zum Teil auch noch vital waren. Durch die Entwicklung von Auftaumethode c) konnte im Hinblick darauf eine Verbesserung erzielt werden.

Auftaumethode c): Um keine Spermatozoen zu verlieren, wurde bei dieser Methode der Folienzuschnitt in eine Schale gelegt, ein Tropfen mit 10 μ l Gamete-Medium auf den noch gefrorenen Tropfen pipettiert (s. Abbildung 9) und anschließend mit Mineralöl überschichtet.



Abb. 9: Bei Auftaumethode c) wird ein Gamete-Tropfen auf den gefrorenen Tropfen pipettiert. Die Folie verbleibt zusammen mit dem aufgetauten Tropfen in der Schale.

Der Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass die Folie aufgrund des Materials schlecht zu mikroskopieren ist und das Auffinden vor allem der unbeweglichen oder nur schwach beweglichen Spermatozoen erschwert ist. Dies kann in gewissem Maße durch die Form des aufpipettierten Tropfen beeinflusst werden. Es zeigte sich als vorteilhaft diesen nicht als gleichmäßige Halbkugel zu pipettieren, sondern einen flachen Tropfen mit großer Oberfläche zur Schale zu machen, um das anschließende Mikroskopieren zu erleichtern.

Bei allen Auftaumethoden wurde darauf geachtet, das verwendete Gamete-Medium vorher im Wärmeinkubator aufzubewahren. Desweiteren wurden alle Schalen nach den beschriebenen Vorgängen mit Öl aufgefüllt, um das Verdunsten zu verhindern und somit das Mikroskopieren zu ermöglichen. Dabei musste bei Methode c) darauf geachtet werden, dass beim Befüllen der Schale mit Öl die eingesetzte Pipette nicht genau auf den auf der Folie befindlichen Tropfen zielt, da dies dazu führte, dass sich der Tropfen von der Folie löst und somit aus der Ebene gelangt und dann nahezu unmöglich zu mikroskopieren war. Desweiteren wurde darauf geachtet die Schalen vor dem Mikroskopieren ein paar Minuten zu erwärmen, sodass die Spermatozoen zum Zeitpunkt des Mikroskopierens die maximal mögliche Vitalität aufweisen konnten.

Um das anschließende Mikroskopieren zu erleichtern, wurde in einer Versuchsreihe mit Auftaumethode a) der Gamete-Tropfen zum Auftauen von 10 µl auf 5 µl reduziert. Dies war von Vorteil, da ein kleineres Volumen auf überlebende Spermien durchsucht werden musste. In der Versuchsreihe wurde kontrolliert, ob sich hinsichtlich der Ergebnisse durch diese Veränderung Nachteile ergeben (s. Tabelle 3).

Tab. 3: Ergebnisse der Versuchsreihe mit Auftaumethode a) und auf 5 µl reduziertem Auftau-Tropfen (1-2 µl Einfriertropfen). Ausgewertet wurde die Anzahl der Spermatozoen, die nach dem Auftauen unter dem Mikroskop wieder gefunden werden konnten sowie der Anteil der Spermien, die nach dem Auftauen als beweglich identifiziert wurden. Schließlich wurde der Anteil der beweglichen an den wiedergefundenen Spermatozoen ermittelt.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	9/20 (45,00 %)	5/20 (25,00 %)	5/9 (55,56 %)
Probe 2	12/32 (37,50 %)	6/32 (18,75 %)	6/12 (50,00 %)
Probe 3	12/25 (48,00 %)	4/25 (16,00 %)	4/12 (33,33 %)
Probe 4	17/44 (38,64 %)	9/44 (20,45 %)	9/17 (52,94 %)
Probe 5	16/35 (45,71 %)	6/35 (17,14 %)	6/16 (37,50 %)
Gesamt	66/156 (42,31 %)	30/156 (19,23 %)	30/66 (45,45 %)

Da die Unterschiede in den Ergebnissen nur gering waren und daher vermutlich nicht auf die reduzierte Tropfengröße zurückzuführen sind, wurde die Größe des Auftautropfens mit 5 µl für alle Auftaumethoden beibehalten, um das Auffinden der Spermatozoen unter dem Mikroskop zu erleichtern.

Um den endgültigen Versuchsaufbau festzulegen wurden die beschriebenen Auftaumethoden hinsichtlich ihrer Ergebnisse nochmals verglichen, wobei bei allen Versuchen der Einfriertropfen ein Volumen von 1-2 µl nicht überschritt.

Dazu wurde zu jeder der oben skizzierten Auftaumethoden (a/b/c) eine weitere Versuchsreihe mit jeweils fünf Proben unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Zum Einfrieren wurden alle Proben zunächst in 1 µl reines Gamete-Medium

pipettiert, das Kryomedium (0,3 µl) wurde anschließend hinzugegeben. Im Unterschied dazu wurden Kryomedium und Gamete-Medium in vorherigen Versuchen in festgelegtem Mischverhältnis zusammenpipettiert und die Spermien in das bereits gemischte Medium gegeben (Erläuterung siehe 3.1.4). Zum Auftauen wurden jeweils 5 µl angewärmtes Gamete-Medium verwendet. Die Auftaumethoden a), b) und c) wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse werden im Folgenden tabellarisch dargestellt (s. Tabellen 4-6):

Tab. 4: Ergebnisse der Versuchsreihe mit Auftaumethode a). Alle drei Auftaumethoden wurden durch jeweils eine weitere Versuchsreihe hinsichtlich der wiedergefundenen und beweglichen Spermatozoen miteinander verglichen.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	17/32 (53,13 %)	6/32 (18,75 %)	6/17 (35,29 %)
Probe 2	8/35 (22,86 %)	1/35 (2,86 %)	1/8 (12,50 %)
Probe 3	5/37 (13,51 %)	2/37 (5,41 %)	2/5 (40,00 %)
Probe 4	12/45 (26,67 %)	3/45 (6,67 %)	3/12 (25,00 %)
Probe 5	3/42 (7,14 %)	1/42 (2,38 %)	1/3 (33,33 %)
Gesamt	45/191 (23,56 %)	13/191 (6,81 %)	13/45 (28,89 %)

Tab. 5: Ergebnisse der Versuchsreihe mit Auftaumethode b). Die Folie wurde zusätzlich mit Gamete-Medium abgespült (in Probe 1 mit 1 µl, in Probe 2-5 mit 2 µl). Alle drei Auftaumethoden wurden durch jeweils eine weitere Versuchsreihe hinsichtlich der wiedergefundenen und beweglichen Spermatozoen miteinander verglichen.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	6/25 (24,00 %)	3/25 (12,00 %)	3/6 (50,00 %)
Probe 2	6/20 (30,00 %)	1/20 (5,00 %)	1/6 (16,67 %)
Probe 3	9/18 (50,00 %)	5/18 (27,78 %)	5/9 (55,56 %)
Probe 4	6/29 (20,69 %)	3/29 (10,34 %)	3/6 (50,00 %)
Probe 5	8/24 (33,33 %)	6/24 (25,00 %)	6/8 (75,00 %)
Gesamt	35/116 (30,17 %)	18/116 (15,52 %)	18/35 (51,43 %)

Tab. 6: Ergebnisse der Versuchsreihe mit Auftaumethode c). Ein Gamete-Tropfen wird auf den gefrorenen Tropfen pipettiert. Die Folie verbleibt zusammen mit dem aufgetauten Tropfen in der Schale. Alle drei Auftaumethoden wurden durch jeweils eine weitere Versuchsreihe hinsichtlich der wiedergefundenen und beweglichen Spermatozoen miteinander verglichen.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	10/30 (33,33 %)	9/30 (30,00 %)	9/10 (90,00 %)
Probe 2	10/30 (33,33 %)	8/30 (26,67 %)	8/10 (80,00 %)
Probe 3	9/30 (30,00 %)	9/30 (30,00 %)	9/9 (100,00 %)
Probe 4	9/30 (30,00 %)	9/30 (30,00 %)	9/9 (100,00 %)
Probe 5	12/30 (40,00 %)	10/30 (33,33 %)	10/12 (83,33 %)
Gesamt	50/150 (33,33 %)	45/150 (30,00 %)	45/50 (90,00 %)

Auftaumethode c) zeigte die konstantesten Ergebnisse mit den höchsten Werten an beweglichen Spermatozoen (30 % im Vergleich zu 15,52 % bzw. 6,81 %). Auch die Wiederfindungsraten waren bei Auftaumethode c) mit 33,33 % im Vergleich zu 30,17 % bzw. 23,56 % am besten. Zu beachten ist jedoch, dass das Auffinden der unbeweglichen Spermatozoen durch die in der Schale verbleibende Folie deutlich erschwert wird. Dennoch wurde diese Auftaumethode beibehalten, da sie trotz dieser Schwierigkeiten die besten Ergebnisse lieferte. Desweiteren war der Arbeitsablauf bei Auftaumethode c) gut durchzuführen.

Aufgrund der guten Ergebnisse mit dieser Auftaumethode wäre denkbar, dass die Ergebnisse hinsichtlich der Auffindbarkeit der Spermatozoen durch speziell zu diesem Zweck hergestelltes Material verbessert werden könnten.

Auch statistisch zeigten sich anhand des durchgeführten T-Testes signifikante Unterschiede zwischen den drei Auftaumethoden. Während die Anzahl der wiedergefundenen Spermatozoen keinen signifikanten Unterschied erbrachte, unterschieden sich die Auftaumethoden deutlich bezüglich der Beweglichkeit der wiedergefundenen Spermien. Es zeigten sich sowohl im Hinblick auf die Beweglichkeit der insgesamt eingefrorenen Spermien als auch im Hinblick auf die beweglichen als Anteil von den wiedergefundenen Spermien signifikante Unterschiede im jeweiligen Vergleich der Auftaumethoden a und b mit der Auftaumethode c (s. Tabelle 7).

Tab. 7: In der Tabelle sind die Ergebnisse des durchgeführten T-Testes aufgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % zeigt ein P-Wert $< 0,05$ einen signifikanten Unterschied zwischen den jeweils verglichenen Auftaumethoden an. So konnte Auftaumethode c bezüglich der Beweglichkeit der Spermien sowie bezüglich des Anteils der beweglichen Spermien an den wiedergefundenen Spermien als beste der getesteten Methoden ermittelt werden.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
A vs B	P = 0,4849	P = 0,1418	P = 0,10436
A vs C	P = 0,3397	P = 0,0008	P = 0,00001
B vs C	P = 0,7626	P = 0,0319	P = 0,00838

3.1.4 Medium zur Vorbereitung zur Kryokonservierung

Um das am besten geeignete Vorbereitungs-Medium für das Verfahren zu ermitteln, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die in 2.5 genauer dargelegt wurden. Deren Ergebnisse werden nachfolgend erläutert (s. Tabellen 8 und 9).

Tab. 8: Ergebnisse der Versuchsreihe Medium A. Medium A enthält Gamete-Medium und SpermStore im Verhältnis 2:1. Die Spermien wurden direkt in das fertig vorgemischte Medium auf dem Folienträger einpipettiert.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	9/16 (56,25 %)	0	0
Probe 2	11/20 (55,00 %)	0	0
Probe 3	9/15 (60,00 %)	0	0
Probe 4	11/20 (55,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/11 (18,18 %)
Gesamt	40/71 (56,34 %)	2/71 (2,82 %)	2/40 (5,00 %)

Tab. 9: Ergebnisse der Versuchsreihe Medium B. Medium B enthält Gamete-Medium und SpermStore im Verhältnis 3:2. Die Spermien wurden direkt in das fertig vorgemischte Medium auf dem Folienträger einpipettiert.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	7/13 (53,85 %)	4/13 (30,77 %)	4/7 (57,14 %)
Probe 2	12/20 (60,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/12 (16,67 %)
Probe 3	11/19 (57,90 %)	1/19 (5,26 %)	1/11 (9,10 %)
Probe 4	12/19 (63,16 %)	0	0
Probe 5	10/19 (52,63 %)	1/19 (5,26 %)	1/10 (10,00 %)
Gesamt	52/90 (57,78 %)	8/90 (8,89 %)	8/52 (15,38 %)

Um zu ermitteln, ob zwischen den beiden getesteten Medien ein signifikanter Unterschied besteht, wurde auch an dieser Stelle ein T-Test durchgeführt (s. Tabelle 10). Dabei zeigte sich anhand der P-Werte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden getesteten Medien A und B (Gamete-Medium im Verhältnis 2:1 bzw. im Verhältnis 3:2).

Tab. 10: Aufgeführt sind die Ergebnisse des durchgeführten T-Testes zum Vergleich der beiden getesteten Medien. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Medium A und Medium B festgestellt werden.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
A vs B	P = 0,3877	P = 0,2814	P = 0,2976

Aufgrund der relativ geringen Beweglichkeitsrate der wiedergefundene Spermatozoen wurde der Einfriervorgang nochmal modifiziert. Anstatt ein vorher in festem Verhältnis gemischtes Medium zu verwenden, wurden die eingesammelten Spermatozoen zunächst in einen 1 µl großen Tropfen reines Gamete-Medium gesetzt und anschließend eine bestimmte Menge (in späteren Versuchen getestet; s.u. im gleichen Kapitel) des Kryomediums SpermStore hinzu pipettiert. Dies könnte von Vorteil sein, da es durch das direkte Einsetzen der Spermatozoen in das gemischte Medium zu osmotischen Schäden kommen kann, die die Beweglichkeit und Vitalität beeinflussen.

Mit dieser Veränderung wurde wiederum eine Versuchsreihe durchgeführt (s. Tabelle 11).

Tab. 11: Um osmotische Schäden zu vermeiden, wurde das Kryokonservierungsmedium in dieser Versuchsreihe erst nach dem Einsetzen der Spermien in den Gamete-Tropfen hinzu pipettiert.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1	7/21 (33,33 %)	6/21 (28,57 %)	6/7 (85,71 %)
Probe 2	15/25 (60,00 %)	9/25 (36,00 %)	9/15 (60,00 %)
Probe 3	10/20 (50,00 %)	5/20 (25,00 %)	5/10 (50,00 %)
Gesamt	32/66 (48,48 %)	20/66 (30,30 %)	20/32 (62,50 %)

Wie oben beschrieben, wurde das Kryomedium (SpermStore) zur Vermeidung von osmotischen Schäden nach dem Einsetzen der Spermatozoen in Gamete-Medium vorsichtig hinzupipettiert. In der folgenden Versuchsreihe wurde die hinzuzugebende Menge an SpermStore ermittelt. Dazu wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden 5 Proben kryokonserviert, bei denen jeweils unterschiedliche Vo-

lumina des Kryomediums von 0,1-0,5 µl hinzu pipettiert wurden (s. Tabelle 12). In der zweiten Versuchsreihe wurden dann nochmal 4 Proben verglichen. Bei zwei davon wurde jeweils ein Volumen von 0,3 µl Kryomedium hinzugegeben, die dritte und vierte Probe wurde mit 0,4 µl Kryomedium kryokonserviert (s. Tabelle 13). Diese beiden Volumina sollten nochmals verglichen werden, da bei diesen in der ersten Versuchsreihe die besten Ergebnisse erzielt wurden.

Tab. 12: Versuchsreihe 1 zur Ermittlung der Menge des Kryomediums. In dieser Versuchsreihe wurde 0,1-0,5 µl SpermStore nach dem Einsetzen der Spermien in den Gamete-Tropfen hinzugegeben und diese Mengen hinsichtlich ihrer Ergebnisse bezüglich der Beweglichkeit der Spermien verglichen.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1 (0,2 µl)	7/30 (23,33 %)	5/30 (16,67 %)	5/7 (71,43 %)
Probe 2 (0,3 µl)	9/27 (33,33 %)	7/27 (25,93 %)	7/9 (77,78 %)
Probe 3 (0,4 µl)	10/30 (33,33 %)	8/30 (26,67 %)	8/10 (80,00 %)
Probe 4 (0,5 µl)	6/30 (20,00 %)	4/30 (13,33 %)	4/6 (66,67 %)
Probe 5 (0,1 µl)	6/30 (20,00 %)	4/30 (13,33 %)	4/6 (66,67 %)
Gesamt	38/147 (25,85 %)	28/147 (19,05 %)	28/38 (73,68 %)

Tab. 13: Versuchsreihe 2 zur Ermittlung der geeigneten Menge Kryomedium. Verglichen wurden Versuche mit 0,3-0,4 µl Kryomedium, das nach Einsetzen der Spermien in den Gamete-Tropfen hinzugegeben wurde.

	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
Probe 1 (0,3 µl)	9/30 (30,00 %)	6/30 (20,00 %)	6/9 (66,67 %)
Probe 2 (0,3 µl)	13/30 (43,33 %)	8/30 (26,67 %)	8/13 (61,54 %)
Probe 3 (0,4 µl)	5/30 (16,67 %)	4/30 (13,33 %)	4/5 (80,00 %)
Probe 4 (0,4 µl)	12/30 (40,00 %)	9/30 (30,00 %)	9/12 (75,00 %)
Gesamt	39/120 (32,50 %)	27/120 (22,50 %)	27/39 (69,23 %)

Aufgrund der zum Teil relativ geringen Anzahlen der Spermatozoen, die in diesem Versuch wiedergefunden wurden, ist die Beurteilbarkeit hinsichtlich der Beweglichkeit eingeschränkt. Da die Tropfen mit einem geringeren Volumen besser zu handhaben sind und somit eventuelle Fehler reduziert werden können, wurde die Menge des Kryomediums auf 0,3 µl festgelegt.

3.1.5 Folienmaterial

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Folienzuschnitte aus einem anderen Material (Membranen aus „ibidi-Schalen“) angefertigt, in der Hoffnung, dass dieses das Mikroskopieren nach dem Auftauen erleichtern und somit die Wiederfindungsrate erhöhen würde. Allerdings zeigten sich bei der Verwendung des Materials einige Probleme: die Medium-Tropfen lösten sich sowohl in flüssiger als auch in gefrorener Form häufig von den Folienzuschnitten ab. Auftaumethode c) war mit diesem Material nicht durchführbar, da es während des Auftauvorgangs zum Lösen des Tropfens von der Folie kam und dieser sich somit aus der mikroskopierbaren Ebene entfernte. Dies führte dazu, dass diese Proben nicht mehr auswertbar und somit verloren waren. Daher wurde die Versuchsreihe mit dem neuen Material nach Methode a) aufgetaut. Dabei fiel allerdings auf, dass die Folienzuschnitte nach dem Einfrieren sehr brüchig waren und meist durch das Anfassen mit der Pinzette während des Auftauvorgangs zerbrachen. Auch dies führte zu Probenverlusten und Störungen im Versuchsablauf, sodass das Material schließlich als ungeeignet für den Kryokonservierungsvorgang angesehen werden musste.

Die Ergebnisse der Versuche mit dem geänderten Folienmaterial werden im Folgenden dargestellt (s. Tabelle 14).

Tab. 14: Versuch 4 (13.04.11; Folienzuschnitte aus „ibidi-Membranen“). In dieser Versuchsreihe wurde bei sonst identischem Versuchsaufbau und -ablauf ein anderes Folienmaterial verwendet.

Probe	Wiedergefundene Spermatozoen	Bewegliche Spermatozoen	Beweglich/Gefunden
1	7/20 (35,00 %)	5/20 (25,00 %)	5/7 (71,43 %)
2	10/20 (50,00 %)	4/20 (20,00 %)	4/10 (40,00 %)
3	4/20 (20,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/4 (50,00 %)
4	6/20 (30,00 %)	1/20 (5,00 %)	1/6 (16,67 %)
5	3/20 (15,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/3 (66,67 %)
6	10/20 (50,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/20 (20,00 %)
7	9/20 (45,00 %)	0/20 (0,00 %)	0/9 (0,00 %)
Gesamt	49/140 (35,00 %)	16/140 (11,43 %)	16/49 (32,65 %)

3.2 Endgültiger Versuchsaufbau und Versuchsbeschreibung

Da das Ziel der Arbeit war, die Methode zu optimieren und auf ihre Durchführbarkeit und die Qualität der Ergebnisse zu prüfen, ist der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau als ein Hauptergebnis der Arbeit anzusehen. Durch die in 2 dargestellten Versuchsreihen und den dazugehörigen in 3.1 dargelegten Ergebnissen wurde dieser Aufbau und Ablauf ermittelt und als bestmögliche Variante der getesteten Optionen befunden. Im Rahmen der Arbeit war jedoch nicht beurteilbar, inwiefern die Ergebnisse durch kommerziell und speziell für diesen Zweck hergestelltes Material verbessert werden könnten.

Für den endgültigen Versuchsaufbau wird folgendes Material benötigt:

SpermStore-Medium, Gamete-Medium, PVP-Medium, 4 Pipetten (0,3 µl; 1 µl; 5-10 µl; 50 µl), PlastikSTR|pette (10 ml), Öl, Folienzuschnitte, Mikroskop mit Injizierkapillare (Leica, LEITZ DM IRB), Plastik- Schalen („nunc“ IVF product line), Pinzette, Reaktionsgefäße („nunc: Cryo Tube Vials“), 2 Eppendorf-Cups, Styropor-Kiste mit Deckel, darein

passende Metallkiste, Metallständer, Plastikständer für Reaktionsgefäße, Styroporplatte, flüssiger Stickstoff, Spermatozoen-Probe

Zuerst wurde die Metallkiste in der Styroporkiste platziert. Dorthinein wurde sowohl der Ständer für die Reaktionsgefäße (s. Abbildung 10 und 11) als auch der Metallständer gestellt, auf den die Styroporplatte und eine Plastikschaale gelegt wurde. Desweiteren wurde eine Markierung angebracht um den Stickstoffstand zu kontrollieren und diesen somit konstant zu halten (s. Abbildung 10).



Abb. 10: Versuchsaufbau in der Ansicht von oben: In die Styropor-Kiste wurde eine passende Metallkiste gestellt. Diese enthält einen Plastikständer für die Reaktionsgefäße sowie einen Metallständer. Der Metallständer wurde mit einer Styroporplatte und einer IVF-Schale versehen, um die Proben zunächst langsam einfrieren zu lassen, bevor sie in die Reaktionsgefäße überführt wurden. Der Stickstoff-Füllstand wurde mit Hilfe einer Markierung durch ein Klebeband angezeigt.



Abb. 11: Versuchsaufbau in der Ansicht von der Seite: Die Abbildung zeigt alle relevanten Bestandteile des Versuchsaufbaus. Die Dicke der Styroporplatte auf dem Metallständer reguliert die Geschwindigkeit des Einfrierens der Probe in der IVF-Schale, bevor sie in eins der Reaktionsgefäße überführt wird. Auch der Stickstoffstand in der Metallkiste kann den Einfriervorgang je nach Höhe beschleunigen oder verlangsamen. Er wird durch eine Markierung konstant gehalten.

Zu Beginn des Versuchs wurden zwei vorbereitete Schalen benötigt: Eine mit einem Gamete-Tropfen (ca. 50 μl) zum Einstellen der Injektionskapillare mit der die Spermien eingesammelt wurden, die zweite mit einem PVP-Tropfen (ca. 10 μl), in den die Spermien eingesetzt wurden. Beide Schalen wurden mit Öl aufgefüllt und auf einer Wärmeplatte aufbewahrt. In den PVP-Tropfen wurde je nach Spermogramm der Probe ca. 0,5-1 μl an Spermien eingesetzt. Die Injektionskapillare wurde in das Mikroskop eingespannt (s. Abbildung 13) und mit Hilfe des Gamete-Tropfens eingestellt. Pro Probe, die eingefroren sollte, wurde ein Folienzuschnitt in folgender Form benötigt (s. Abbildung 12):

Ansicht von oben:



Ansicht von der Seite:



Knick zum Anfassen mit der Pinzette

Abb. 12: Form der Folienzuschnitte in der Ansicht von oben und von der Seite. Jeder Folienzuschnitt hat einen Knick, an dem die Folie mit der Pinzette gut gegriffen werden kann.

Des Weiteren wurden ein Eppendorf-Gefäß mit etwas Spermstore-Medium und ein anderes mit Gamete-Medium bereitgestellt sowie die Pipetten für die benötigten Mengen entsprechend eingestellt (0,3 μl und 1 μl). Pro Probe wurde ein Reaktionsgefäß in den dafür vorgesehenen Ständer gestellt, welcher wie der Metallständer mit der Styroporplatte in die Metallkiste gestellt wurde (s. Abbildung 10). Anschließend wurde die Kiste bis zur Markierung mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Es musste während des gesamten Einfriervorgangs auf den Stickstoffstand geachtet und gegebenenfalls nachgefüllt werden, um die Bedingungen während des Verfahrens konstant zu halten. Auf der Styroporplatte wird eine Plastikschaale ohne Deckel platziert, wonach die Styroporkiste verschlossen werden konnte.

Die Vollständigkeit der notwendigen Vorbereitungen war von großer Bedeutung, da es während des eigentlichen Einfriervorgangs nicht zu einer vermeidbaren Unterbrechung und damit einer Verlängerung der Arbeitszeit kommen sollte.

Zum Einfrieren der Probe wurde zunächst die gewünschte Anzahl von Spermien mit Hilfe der Injektions-Kapillare (s. Abbildung 13) aus dem PVP-Tropfen eingesammelt.

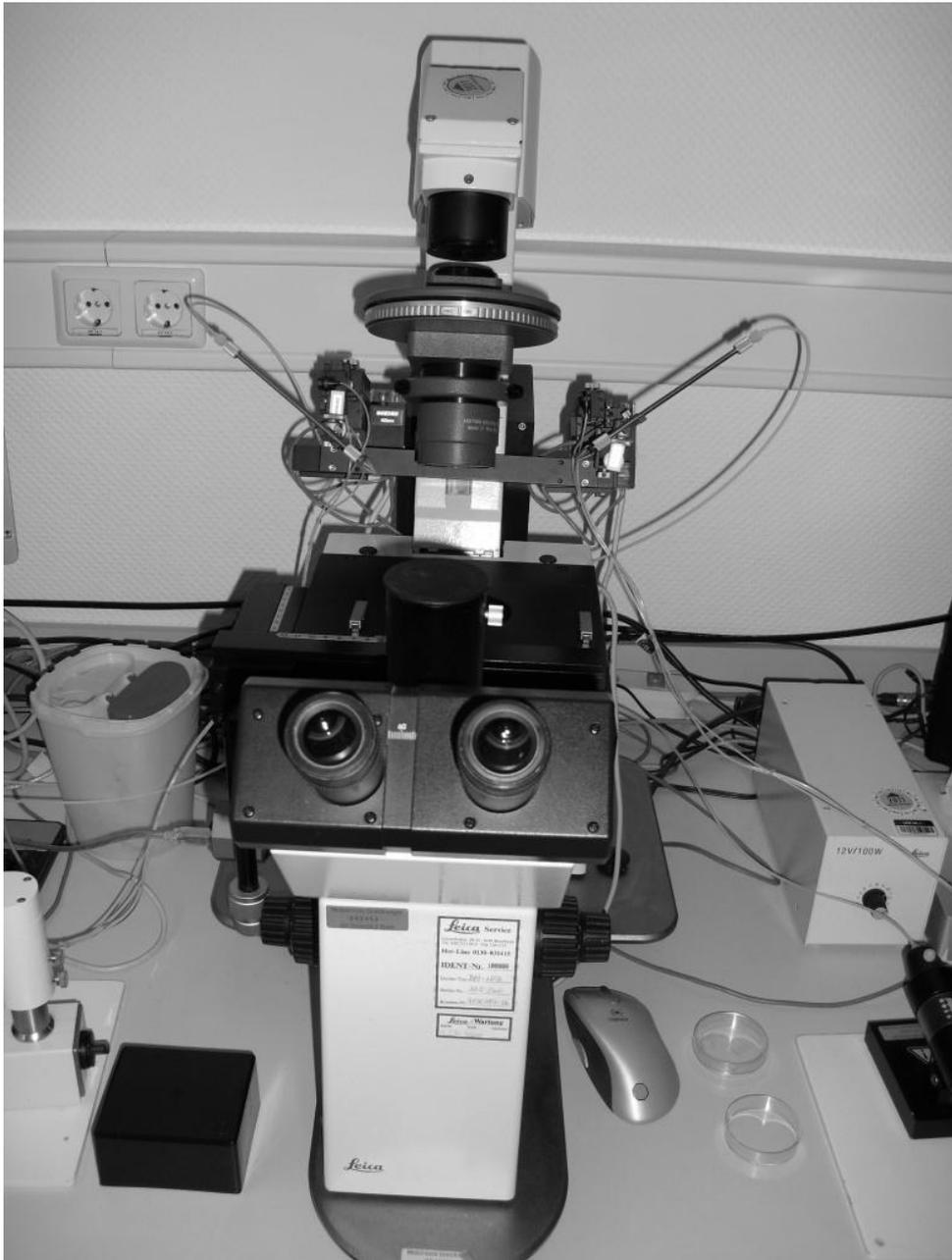


Abb. 13: Die Abbildung zeigt das für die Methode verwendete ICSI-Mikroskop. Zu erkennen sind die Halterungen für die beiden Kapillaren: Links im Bild wird die Haltekapillare eingespannt, rechts die für den Versuch benötigte Injektionskapillare.

Dann wurde ein Folienzuschnitt in eine Plastikschaale gelegt (s. Abbildung 14) und ein Gamete-Tropfen (1 μ l) darauf pipettiert (s. Abbildung 15).



Abb. 14: Das Foto zeigt einen Folienzuschnitt in einer IVF-Schale. Auf die Folie wird zunächst der Medium-Tropfen pipettiert, in den dann die eingesammelten Spermatozoen zum Kryokonservieren eingesetzt werden.

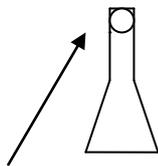


Abb. 15: Die Abbildung zeigt einen Medium-Tropfen, der auf dem Folienzuschnitt platziert wurde.

Diese Schale wurde dann anstatt der PVP-Schale auf das Mikroskop gestellt und die eingesammelten Spermien wurden durch die Kapillare in den Tropfen entlassen. Dabei

war es wichtig zu beobachten, ob sich die Spermien noch bewegen, da es sonst später zu falschen Schlussfolgerungen hätte kommen können.

Anschließend wurde diese Schale wieder herunter genommen und zu dem Tropfen, der nun die Spermien enthält, wurde vorsichtig 0,3 µl SpermStore pipettiert. Dann wurde der Folienzuschnitt mit der Pinzette gegriffen und auf die Plastikschaale in der Styroporkiste gelegt. Dort wurde die Folie solange belassen, bis der Tropfen im Stickstoffdampf gefroren war. Erst dann wurde die Folie mit der Pinzette in das vorgesehene Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden während des vorhergehenden Pipettiervorganges bereits in der Styroporkiste mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Es wurde darauf geachtet die Gefäße schon vorher zu beschriften und dann entsprechend zu befüllen, um Probenverwechslungen zu vermeiden. Während des Einfriervorganges wurden an dem Mikroskop das 5 x- und das 40 x-Objektiv verwendet, wobei die kleinere Vergrößerung der Übersicht diente und die Größere zum Einsammeln und Entlassen der Spermien benutzt wurde. Beim Schalenwechsel war wichtig darauf zu achten, dass die Kapillare vorher etwas hochgefahren wurde, um das Abbrechen der Spitze zu vermeiden. Dies war vor allem dann von Bedeutung, wenn die Schale mit der Folie mikroskopiert wurde. Da die Folie in der Ebene des Schalenbodens eine leichte Erhöhung darstellte, konnte die Kapillare vor allem zu diesem Zeitpunkt des Versuches beschädigt werden und musste dementsprechend neu eingestellt werden.

Wenn die gewünschte Anzahl von Proben eingefroren wurde, konnte mit dem Auftauen der ersten Proben begonnen werden.

Dazu wurde folgendes Material benötigt: Eine Plastikschaale pro aufzutauender Probe, Öl, Gamete-Medium, Pipette (5 µl), PlastikSTRIPette (10 ml), Pinzette, Mikroskop (10er Objektiv).

Die Folie wurde mit Hilfe der Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen und auf die bereitgestellte Plastikschaale gelegt. Auf den noch gefrorenen Tropfen wurde dann 5 µl Gamete-Medium pipettiert, welches vorher im Wärme- Inkubator aufbewahrt wurde. Dabei wurde darauf geachtet den Gamete-Tropfen wie in 3.1.3 beschrieben relativ breit zu pipettieren, um das spätere Durchsuchen des Tropfens zu erleichtern. Anschließend wurde die Folie und Tropfen mit Öl überschichtet. Um das Lösen des Tropfens von der Folie zu vermeiden, wurde dabei darauf geachtet mit der Pinzette nicht unmittelbar an

diesem anzusetzen. Einen von der Folie gelösten Tropfen zu mikroskopieren und dabei auf überlebende Spermien zu durchsuchen zeigte sich als äußerst schwierig und hätte somit zu verschlechterten Ergebnissen geführt.

Die Schale wurde dann ein paar Minuten warmgestellt und anschließend mit einem 10 x Objektiv nach überlebenden Spermien durchsucht. Dabei waren die progressiv beweglichen Spermien, wesentlich einfacher zu identifizieren als die unbeweglichen. Die progressiv beweglichen Spermien hielten sich häufig im Randbereich des Tropfens auf. Um kleinere Bewegungen beurteilen zu können, die auf Vitalität der Spermien hinweisen, wurde auch das 40 x Objektiv verwendet.

Unter diesen Bedingungen wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt und deren Ergebnisse hinsichtlich Auffindbarkeit und Beweglichkeit der Spermatozoen dokumentiert.

3.3 Effizienz der Methode

Nachdem der endgültige Versuchsaufbau und -ablauf festgelegt war, wurden zwei Versuchsreihen mit insgesamt 29 Proben untersucht, um die Effektivität der Methode zu ermitteln. Dabei wurden alle Versuche unter gleichen, in 3.2 beschriebenen, Bedingungen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe mit insgesamt zehn Proben wurden jeweils 30 Spermien in einem Medium-Tropfen eingefroren, während in der zweiten Versuchsreihe mit insgesamt 19 Proben jeweils 20 Spermien zusammen eingefroren wurden.

Beurteilt wurden bei allen Proben folgende Kriterien:

- Anzahl der wiedergefundenen Spermien von denen, die eingefroren wurden
- Anzahl der beweglichen und somit als vital einzustufende Spermien von denen, die eingefroren wurden
- Anteil der beweglichen Spermien an der Anzahl der wiedergefundenen Spermien

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt (s. Tabellen 15-17):

Tab. 15: Versuchsreihe 1 (Zeitraum: 02.03.11-11.03.11): Unter immer gleichen Voraussetzungen mit gleichem Aufbau und Ablauf des Versuchs wurden zehn Proben mit jeweils dreißig Spermatozoen kryokonserviert und wieder aufgetaut. Ermittelt wurden schließlich die Anzahl der wiedergefundenen und die anteilig beweglichen Spermien.

Probe	gefunden/eingesetzt	beweglich/eingesetzt	beweglich/ gefunden
1	10/30 (33,33 %)	9/30 (30,00 %)	9/10 (90,00 %)
2	10/30 (33,33 %)	8/30 (26,67 %)	8/10 (80,00 %)
3	9/30 (30,00 %)	9/30 (30,00 %)	9/9 (100,0 %)
4	9/30 (30,00 %)	9/30 (30,00 %)	9/9 (100,0 %)
5	12/30 (40,00 %)	10/30 (33,33 %)	10/12 (83,33 %)
6	7/30 (23,33 %)	4/30 (13,33 %)	4/7 (57,14 %)
7	10/30 (33,33 %)	7/30 (23,33 %)	7/10 (70,00 %)
8	7/30 (23,33 %)	5/30 (16,67 %)	5/7 (71,43 %)
9	9/30 (30,00 %)	5/30 (16,67 %)	5/9 (55,56 %)
10	8/30 (26,67 %)	7/30 (23,33 %)	7/8 (87,50 %)
Gesamt	91/300 (30,33 %)	73/300 (24,33 %)	73/91 (80,22 %)

In dieser ersten Versuchsreihe wurden zehn Proben eingefroren, die jeweils 30 Spermatozoen enthielten. Von diesen insgesamt 300 eingefrorenen Spermatozoen konnten nach dem Auftauen 91 (30,33 %) wiedergefunden werden und wiederum 73 konnten als beweglich identifiziert werden. Der Anteil der beweglichen und somit vitalen Spermien bezogen auf die, die nach dem Auftauen wiedergefunden wurden, lag insgesamt bei 80,22 %.

Tab. 16: Versuchsreihe 2 (Zeitraum: 15.03.11-21.03.11): Im Unterschied zu Versuchsreihe 1, in der jede Probe 30 Spermien enthielt, wurden in dieser zweiten Versuchsreihe 19 Proben mit jeweils zwanzig Spermatozoen kryokonserviert. Analog zu Versuchsreihe 1 wurden auch hier die wiedergefundenen Spermien gezählt und auf ihre Beweglichkeit geprüft.

Probe	gefunden/eingesetzt	beweglich/eingesetzt	beweglich/ gefunden
1	8/20 (40,00 %)	6/20 (30,00 %)	6/8 (75,00 %)
2	7/20 (35,00 %)	6/20 (30,00 %)	6/7 (85,71 %)
3	9/20 (45,00 %)	6/20 (30,00 %)	6/9 (66,67 %)
4	6/20 (30,00 %)	5/20 (25,00 %)	5/6 (83,33 %)
5	10/20 (50,00 %)	9/20 (45,00 %)	9/10 (90,00 %)
6	8/20 (40,00 %)	7/20 (35,00 %)	7/8 (87,50 %)
7	5/20 (25,00 %)	2/20 (10,00 %)	2/5 (40,00 %)
8	11/20 (55,00 %)	7/20 (35,00 %)	7/11 (63,60 %)
9	5/20 (25,00 %)	3/20 (15,00 %)	3/5 (60,00 %)
10	10/20 (50,00 %)	5/20 (25,00 %)	5/10 (50,00 %)
11	7/20 (35,00 %)	4/20 (20,00 %)	4/7 (57,14 %)
12	7/20 (35,00 %)	4/20 (20,00 %)	4/7 (57,14 %)
13	11/20 (55,00 %)	8/20 (40,00 %)	8/11 (72,73 %)
14	7/20 (35,00 %)	4/20 (20,00 %)	4/7 (57,14 %)
15	9/20 (45,00 %)	7/20 (35,00 %)	7/9 (77,78 %)
16	6/20 (30,00 %)	3/20 (15,00 %)	3/6 (50,00 %)
17	9/20 (45,00 %)	7/20 (35,00 %)	7/9 (77,78 %)
18	6/20 (30,00 %)	3/20 (15,00 %)	3/6 (50,00 %)
19	8/20 (40,00 %)	6/20 (30,00 %)	6/8 (75,00 %)
Gesamt	149/380 (39,21 %)	102/380 (26,84 %)	102/149 (68,46 %)

In dieser zweiten Versuchsreihe wurden insgesamt 19 Proben untersucht, bei denen diesmal jeweils 20 Spermien eingefroren wurden. Im Vergleich zu der ersten Versuchsreihe lagen hier sowohl die Rate der wiedergefundenen Spermatozoen mit 39,21 % als auch die insgesamt beweglichen Spermatozoen mit 26,84 % etwas höher. Von den 149 wiedergefundenen Spermien waren 102 beweglich (68,46 %).

Tab. 17: Gesamtergebnisse: Die Tabelle fasst die Anzahl der insgesamt kryokonservierten Spermatozoen zusammen. Sie stellt dar, wie viele der Gesamtanzahl der Spermatozoen nach dem Auftauvorgang wieder gefunden wurden und wie viele der Gesamtanzahl als beweglich identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurde der Anteil der beweglichen Spermien an den wiedergefundenen Spermien ermittelt.

gefunden/eingesetzt	beweglich/eingesetzt	beweglich/ gefunden
240/680 (35,3 %)	175/680 (25,7 %)	175/240 (72,9 %)

In beiden Versuchsreihen zeigten sich tendenziell ähnliche Ergebnisse. Die Gesamtzahl der nach dem Auftauen wiedergefundenen Spermatozoen liegt bei 35,3 % mit einer Spannweite zwischen 23,33 % und 55 %. Dementsprechend liegt der Anteil der Spermatozoen, die nach dem Auftauen als beweglich identifiziert wurden mit einem Gesamtwert von 25,7 % und einer Spannweite zwischen 10 % und 45 % etwas niedriger. Gezeigt werden konnte allerdings auch, dass der Anteil an beweglichen Spermatozoen von den insgesamt wiedergefundenen mit einem Gesamtwert von 72,9 % und einer Spannweite zwischen 40 % und 100 % relativ hoch ist.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Versuchsreihe, in der jeweils 30 Spermien eingefroren wurden, zu der, in der pro Medium-Tropfen nur 20 Spermien eingefroren wurden, konnte nicht gezeigt werden. Tendenziell waren die Wiederauffindungsraten bei den Versuchen mit weniger Spermien etwas höher, wobei nicht sicher zu sagen ist, dass diese Ergebnisse mit der Anzahl der Spermatozoen in direktem Zusammenhang stehen.

Im Bezug auf die praktische Anwendung der Methode im Rahmen einer assistierten Reproduktion ist vor allem der Gesamtanteil der Spermien von Bedeutung, die nach dem Auftauen beweglich wiedergefunden werden konnten. Dieser Anteil betrug in den vorliegenden Versuchen mit 25,7 % etwa ein Viertel der im Vorfeld gesammelten und eingefrorenen Spermien. Für eine Injektion von 10-20 Eizellen mit jeweils einem beweglichen Spermium wäre somit das Einsammeln und anschließende Einfrieren von 40-80 Spermien notwendig.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Kryokonservierung einzelner Spermatozoen zu etablieren. Im Verlauf der Studie gelang es viele Optimierungen bezüglich der genauen Arbeitsschritte des Einfrier- und Auftauvorganges vorzunehmen. In abschließenden Versuchsreihen, die die Effizienz der Methode prüfen sollten, zeigten sich gute Ergebnisse hinsichtlich der Beweglichkeit der wiedergefundenen Spermien. Insgesamt konnten 72,9 % der wiedergefundenen Spermien als beweglich identifiziert werden. Schwierigkeiten machte jedoch vor allem das Wiederfinden der Spermien nach dem Auftauvorgang unter dem ICSI-Mikroskop, es wurden insgesamt 35,3 % der eingefrorenen Spermien nach dem Auftauen unter dem Mikroskop wiedergefunden.

Ein wesentlicher Unterschied der vorliegenden Methode zur bisher üblichen Kryokonservierung von Spermien besteht in dem Gesamt-Volumen, in dem die Spermien kryokonserviert werden. Bei herkömmlichen Kryokonservierungsmethoden wird in Volumina von 100-1500 µl eingefroren, nach dem Auftauen zentrifugiert und dann im entstandenen Pellet nach den Spermien gesucht. Im Vergleich dazu wurden bei der getesteten Methode bewusst wesentlich kleinere Volumina (Gesamtvolumen pro eingefrorener Probe: 1,3 µl) verwendet. Durch das bei der vorliegenden Methode klein gewählte Volumen und die zuvor mit Hilfe des ICSI-Mikroskops eingesammelten Spermien sollte das Wiederfinden der Spermien nach dem Auftauen erleichtert werden. Während der Optimierungsversuche wurde festgestellt, dass der Folienzuschnitt, der als Träger für die zur Kryokonservierung verwendeten Medium-Tropfen diente, für das Auffinden der Spermien nach dem Auftauen eine bedeutende Rolle spielt.

Während die progressiv beweglichen Spermien sich meist im Randbereich aufhielten und gut zu erkennen waren, erschwerte der Folienzuschnitt das Mikroskopieren der weniger beweglichen Spermien enorm. Da jedoch auch weniger bewegliche Spermien durchaus vital sein können und somit für ART verwendbar wären, könnte es perspektivisch für die Methode von großer Bedeutung sein, das Material der Folienzuschnitte zu optimieren. Es zeigten sich während der Studie mehrere wichtige Anforderungen, die das Folienmaterial erfüllen müsste: Die Medium-Tropfen müssen sowohl in gefrorenem als auch in flüssigem Zustand gut an der Folie haften bleiben, um Probenverluste zu

vermeiden. Desweiteren darf das Folienmaterial durch die extreme Temperatur des flüssigen Stickstoffes nicht brüchig werden. Zuletzt ist bezüglich der Wiederfindungsraten der Spermien vor allem wichtig, dass das Material unter dem ICSI-Mikroskop gut zu durchblicken ist, damit eine maximal mögliche Anzahl an Spermien zur Verfügung steht.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass vor allem die Qualität der Spermien von Männern mit OAT-Syndrom unter dem Vorgang der Kryokonservierung leiden. Es kommt zu Veränderungen von Zellstrukturen, wie z. B. Störungen der Plasma-Membran und DNA-Fragmentation, die das Überleben, die Beweglichkeit und letztendlich die Befruchtungsfähigkeit der Spermien negativ beeinflussen (Brugnon et al., 2013).

Auch die Spermien, die mit Hilfe mikrochirurgischer Verfahren, wie MESA oder TESE gewonnen wurden, sind bezüglich dieser Veränderungen empfindlicher (Esteves und Varghese, 2012).

Besonders im Hinblick auf diese Patientengruppen wurde in den letzten Jahren in vielen Studien versucht, die Methoden zur Kryokonservierung anzupassen und somit eine Optimierung des ART-Prozesses zu erreichen.

Cohen et al. publizierten 1997 eine Methode zur Kryokonservierung einzelner Spermatozoen, bei der die Spermien in leere *Zonae pellucidae* injiziert und dann kryokonserviert wurden. Die *Zonae* stammten dabei von Menschen, Mäusen und Hamstern. Obwohl die Ergebnisse der Studie hinsichtlich der Überlebens- und Befruchtungsmöglichkeiten der Spermien gut waren, bleibt offen inwiefern es möglich ist, dieses Verfahren in den klinischen Alltag zu übernehmen. Dabei könnten die Verfügbarkeit der benötigten *Zonae* und ethische Aspekte bezüglich deren Verwendung zum Hindernis werden.

2009 veröffentlichten AbdelHafez et al. ein Review, das sich mit den verschiedenen Techniken zur Kryokonservierung kleiner Anzahlen von Spermien und deren Ergebnissen beschäftigt. Obwohl einige der Studien erfolgreich hohe Überlebensraten der Spermien erreichten, wird in dem Artikel die Schlussfolgerung gezogen, dass noch keine der Methoden geeignet ist, in die klinischen Standards aufgenommen zu werden. Auf dem Gebiet sei laut AbdelHafez et al. (2009) noch weitere Forschung notwendig.

Endo et al. veröffentlichten 2011 eine Studie zur Kryokonservierung einzelner Spermien mit Hilfe des sogenannten *Cryo Tops* (Kitazato Biopharma, Japan). Dabei handelt es sich um einen Träger aus Polypropylen, der üblicherweise zur Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen verwendet wird. Da es sich bei dem Kryotop allerdings um ein offenes System handelt, das die eingefrorenen Spermatozytenproben in direkten Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff bringt, wurde dabei die Gefahr einer mikrobiellen Infektion gesehen. Daher publizierten Endo et al. 2012 eine Studie, die den sogenannten *Cell Sleeper* (Nipro/Japan) als Träger verwendete. Bei diesem handelt es sich im Gegensatz zu dem *Cryo Top* um ein geschlossenes System.

Das Prinzip des Verfahrens mit dem *Cell Sleeper* ist der in dieser Arbeit durchgeführten Methode ähnlich. Der *Cell Sleeper* besteht dabei aus einem zuschraubbaren Gefäß (vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsgefäß) und einem Einsatz, auf dem die Proben platziert wurden (vergleichbar mit den in dieser Arbeit verwendeten Folienzuschnitten). In beiden Studien konnten Endo et al. (2011 und 2012) erfolgreich einzelne Spermien kryokonservieren. Im Vergleich der beiden Träger konnten hinsichtlich der Überlebens- und Beweglichkeitsraten keine Unterschiede festgestellt werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Kryokonservierung einzelner Spermatozoen mit dem beschriebenen Verfahren möglich ist. Die Studien von Endo et al. (2011 und 2012), die zeitlich parallel unabhängig durchgeführt wurden, weisen in eine ähnliche Richtung.

Da die Materialien, die für die Methode notwendig sind, nicht-biologischen Ursprungs sind und somit kommerziell herstellbar und universell einsetzbar, wäre ein Einsatz im klinischen Alltag grundsätzlich denkbar. Im Vergleich zur herkömmlichen Kryokonservierung von Spermproben ist der Zeitaufwand der in dieser Arbeit durchgeführten Methode deutlich erhöht, zusätzlich ergeben sich durch das benötigte Material höhere Kosten. Für Männer mit unauffälligem Spermogramm ist der erhöhte Zeit- und Materialaufwand nicht notwendig, da bei ihnen auch durch herkömmliche Kryokonservierung gute Ergebnisse erzielt werden können, sodass ausreichende Mengen an vitalen Spermatozoen zur Verfügung stehen. Besonders profitieren könnten von der in dieser Arbeit optimierten Methode Patienten, die an Oligoasthenoteratozoospermie leiden und somit nur wenige Spermien und schlechte

Spermienqualität vorweisen. Da deren Spermien durch herkömmliche Kryokonservierung besonders stark an Vitalität und Qualität abnehmen, könnte durch das einzelne Einsammeln und Kryokonservieren der Spermatozoen für diese Männer die Chance erhöht werden, den Qualitäts- und Quantitätsverlust so gering wie möglich zu halten. Somit würde sich sowohl für diese Gruppe von Männern als auch für Männer, deren Spermien durch mikrochirurgische Maßnahmen gewonnen wurden, der erhöhte Zeit- und Kostenaufwand lohnen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht einzelne Spermatozoen (ohne die übrigen Bestandteile des Ejakulats) mittels flüssigen Stickstoffs einzufrieren. Diese könnte vor allem für Männer mit niedriger Spermienqualität (z. B. OAT-Syndrom) sowie für mikrochirurgisch gewonnene Spermien genutzt werden, um den Qualitätsverlust der Spermatozoen während der Kryokonservierung zu minimieren. Desweiteren könnte eine solche Methode bei Männern, die unter Kryptozoospermie leiden, dazu beitragen eine operative Spermengewinnung aus dem Hoden zu vermeiden.

Ausgehend von der Grundidee die Spermien mit Hilfe der Injektionskapillare eines ICSI-Mikroskops (Leica; LEITZ DM IRB) einzusammeln und vor dem Einfrieren in kleine Medium-Tropfen zu überführen, wurden zunächst einige Versuche zur Optimierung des Einfriervorgangs und der Auftaumethode durchgeführt. Daraus ergab sich das im Folgenden beschriebene Verfahren.

Zum Einfrieren wurden die aus PVP-Medium eingesammelten Spermien (20-45 pro eingefrorene Probe) zunächst in einen 1 μ l Tropfen Gamete-Medium überführt, welcher sich auf einem Folienzuschnitt (aus einer einfachen Deckfolie einer Dokumentenhülle geschnitten) befand, der als Träger für den Kryokonservierungsvorgang und die spätere Lagerung im Reaktionsgefäß verwendet wurde. Anschließend wurden 0,3 μ l Kryokonservierungsmittel dazu pipettiert. Dann wurde die gesamte Folie mit dem Tropfen in einer speziellen, einfach zu realisierenden Vorrichtung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Bezüglich des Auftauvorgangs wurden während der Versuchsreihen unterschiedliche Methoden hinsichtlich ihrer Ergebnisse in den Wiederfindungs- und Beweglichkeitsraten der Spermien verglichen.

Als optimal wurde es schließlich befunden den eingefrorenen Tropfen zum Auftauen auf der Folie zu belassen und 5 μ l gewärmtes Gamete-Medium auf die Probe zu pipettieren. Diese Methode erschwerte zwar das Mikroskopieren und somit das Auffinden der Spermien nach dem Auftauen, war hinsichtlich der Ergebnisse aber dennoch am erfolgreichsten und wurde daher in den endgültigen Versuchsablauf aufgenommen.

Mit diesem Verfahren wurde eine Wiederfindungsrate von insgesamt 35,3 % erreicht. Von diesen wiedergefundenen Spermien waren 72,9 % als beweglich und somit vital zu erkennen.

Vorherige Versuche die Folie zum Auftauen umgedreht auf einen 5 µl Gamete-Tropfen in einer Kulturschale aufzulegen, ermöglichten zwar das Entfernen der Folie und erleichterten somit das anschließende Mikroskopieren, allerdings zeigte sich die Problematik, dass bei diesem Verfahren noch vitale und progressiv bewegliche Spermien an die Folie haften blieben und somit verloren gingen.

Auch der Versuch, diese an der Folie haftenden Spermien durch nachträgliches Abspülen der Folie mit Gamete-Medium abzulösen, konnte dieses Problem letztendlich nicht lösen, sodass das erschwerte Mikroskopieren durch den Verbleib der Folie in Kauf genommen wurde.

Nach der Entwicklung der als optimal angesehenen Methode, müsste diese im klinischen Alltag auf die Möglichkeit des Routine-Einsatzes weiter getestet werden. Erst im Rahmen dieser Tauglichkeits-Prüfung können eventuell noch weiter zu verbessernde Details aufgespürt werden.

6. Materialverzeichnis

Kryokonservierungs-Medium	GM501 SpermStore (Gynemed, Lensahn, Schleswig-Holstein, Deutschland)
Gamete-Medium	Sydney IVF Gamete Buffer (Cook, Bloomington, Indiana, USA)
PVP-Medium	Sydney IVF PVP (Cook, Bloomington, Indiana, USA)
4 Pipetten (0,3 µl; 1 µl; 5-10 µl; 50 µl)	Research; Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
10 mL PlastikSTRipetten	Corning® Costar® Stripette® (Corning, New York, USA)
Öl	GM501 Mineral Oil (Gynemed, Lensahn, Schleswig-Holstein, Deutschland)
Folienzuschnitte	(aus einer einfachen Deckfolie einer Dokumentenhülle geschnitten)
Inverses Mikroskop	LEITZ DM IRB, Ausstattung: Hofmann Modulations Contrast, Heiztisch, Objektive: x5, x10, x40 (Leica, Wetzlar, Hessen, Deutschland)
Injektionskapillare	Precision Microinjection Pipette (Cook, Bloomington, Indiana, USA)
Petri-Dishes	IVF product line (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)

Pinzette	Sondermodell (Everhards, Meckenheim, Nordrhein-Westfalen, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Cryo Tube Vials (Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)
Eppendorf-Cups	Eppendorf Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Ibidi-Schalen	μ -Dish (Ibidi [®] , Martinsried, Bayern Deutschland)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (S. 9):	Struktur eines Spermiums	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 2 (S. 18):	ICSI	Originalfoto aus dem Bonner ICSI-Labor
Abbildung 3 (S. 19):	ICSI	Originalfoto aus dem Bonner ICSI-Labor
Abbildung 4 (S. 23):	Folienzuschnitt mit Medium-Tropfen und Kryotube	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 5 (S.24):	Verschiedene Formen der Folienzuschnitte	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 6 (S. 25):	Auftaumethode a)	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 7 (S.29):	Folienzuschnitt Ansicht von oben	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 8 (S. 29):	Folienzuschnitt von der Seite	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 9 (S.31):	Auftaumethode c)	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 10 (S. 41):	Versuchsaufbau von oben	Selbstaufgenommenes Foto
Abbildung 11 (S: 42):	Versuchsaufbau von der Seite	Selbstaufgenommenes Foto
Abbildung 12 (S. 43):	Form der Folienzuschnitte	Selbsterstellte Grafik
Abbildung 13 (S.44):	ICSI-Mikroskop	Selbstaufgenommenes Foto
Abbildung 14 (S.45):	Folienzuschnitt in IVF-Schale	Selbstaufgenommenes Foto
Abbildung 15 (S. 45):	Gamete-Tropfen auf Folienzuschnitt	Selbsterstellte Grafik

8. Literaturverzeichnis

AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, Sabanegh E, Desai N. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 153-164

Ammar T, Sidhu PS, Wilkins CJ. Male infertility: the role of imaging in diagnosis and management. *Br J Radiol* 2012; 85: 59-68

Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 2013; 28: 2045-2057

Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; 8: 143-157

Cha KY, Oum KB, Kim HJ. Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 985-995

Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT. Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 994-1001

De Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D. World Collaborative Report on Assisted Reproductive Technology, 2002. *Hum Reprod* 2009; 24: 2310-2320

De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012; 27: 954-966

Desai N, Goldberg J, Austin C, Sabanegh E, Falcone T. Cryopreservation of individually selected sperm: methodology and case report of a clinical pregnancy. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 375-379

Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Single Spermatozoon Freezing Using Cryotop. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 47-52

Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2012; 24: 301-307

Feige A, Rempen A, Würfel W, Jawny J, Rohde A, Geithövel F. Frauenheilkunde: Fortpflanzungsmedizin Geburtsmedizin Onkologie Psychosomatik. München - Jena: Urban & Fischer, 2006

Goldberg JM, Falcone T, Attaran M. In vitro fertilization update. *Cleve Clin J Med* 2007; 74: 329-338

Healy D, Trounson A, Andersen A. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 1994; 343: 1539-1544

Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:108

Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger MR. Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart - New York: Thieme, 2009

Jenkins J, Daya S, Kremer J, Balasch J, Barratt C, Cooke I, Lawford-Davies J, De Sutter P, Suikari AM, Neulen J, Nygren K. European Classification of Infertility Taskforce (ECIT) response to Habbema et al., 'Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal'. *Hum Reprod* 2004; 19: 2687-2688

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol* 2012; 62: 324-332

Krausz C. Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 271-285

Lee HS, Seo JT. Advances in Surgical Treatment of Male Infertility. *World J Mens Health* 2012; 30: 108-113

Levi-Setti PE, Albani E, Negri L, Cesana A, Novara P, Bianchi S. Cryopreservation of a small number of spermatozoa in yolk-filled human zonae pellucidae. *Arch Ital Urol Androl* 2003; 75: 195-198

Mains L, Van Voorhis BJ. Optimizing the technique of embryo transfer. *Fertil Steril* 2010; 94: 785-790

Montag M, Rink K, Dieckmann U, Delacrétaç G, van der Ven, H. Laser-assisted cryopreservation of single human spermatozoa in cell-free zona pellucida. *Andrologia* 1999; 31: 49-53

Müller WA, Hassel M. Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren. Berlin: Springer DE, 2005

Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. Berlin: Springer DE, 2009

Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 3-10

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18

Parinaud J, Vieitez G, Milhet P, Richoilley G. Use of a plant enzyme preparation (Coronase) instead of hyaluronidase for cumulus cell removal before intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 1933-1935

Popal W, Nagy ZP. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes?. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68: 125-130

Schwegler JS, Lucius R. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2011

Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, Van Steirteghem AC. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 2031-2043

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 312: 366

Tanbo T, Henriksen T, Magnus O, Abyholm T. Oocyte retrieval in an IVF program. A comparison of laparoscopic and transvaginal ultrasound-guided follicular puncture. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988; 67: 243-246

Tiitinen A. Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26: 829-840

Van Voorhis BJ. Clinical practice. In vitro fertilization. *N Engl J Med* 2007; 356: 379-386

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit für mich nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich meinen Doktorvater Apl.-Prof. Dr. Markus Montag erwähnen, der nicht nur das Thema bereitgestellt hat, sondern mich in allen Phasen der Arbeit wissenschaftlich betreut und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Desweiteren bin ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Universitäts-Frauenklinik in Bonn Dank schuldig. Ich wurde im IVF-Labor herzlich willkommen geheißen und fand bei Fragen immer jemanden, der ein offenes Ohr für mich hatte.

Besonders erwähnen möchte ich dabei Dr. Maria Köster, die mich während der Arbeit im Labor immer wieder unterstützt hat und Jana Liebenthron, die mir sowohl während der Arbeit im Labor als auch während der Fertigstellung der Arbeit unzählige Fragen beantwortet und stets große Hilfsbereitschaft gezeigt hat.

Zum Schluss aber nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Freund David und all meinen Freunden für ihr unendliches Verständnis und ihre große Unterstützung bedanken. Mir wurde immer wieder der Rücken frei gehalten, sodass ich die Möglichkeit hatte, mich auf diese Arbeit zu konzentrieren.