

Journal für
Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

**Der Einfluß verschiedener
Gefriermethoden bezüglich
Morphologie und Chromatinintegrität
auf menschliche Spermatozoen von
fertilen und subfertilen Männern**

Hammadeh ME, Dehn C, Georg T
Greiner S, Hippach M, Rosenbaum P
Schmidt W

*Journal für Urologie und
Urogynäkologie 2000; 7 (4) (Ausgabe
für Schweiz), 27-33*

*Journal für Urologie und
Urogynäkologie 2000; 7 (6) (Ausgabe
für Österreich), 30-37*

Indexed in Scopus

Member of the



Homepage:

www.kup.at/urologie

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

www.kup.at/urologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P. b. b. 022031116M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

Unsere Räucherkegel fertigen wir aus den feinsten **Kräutern** und **Hölzern**, vermischt mit dem wohlriechenden **Harz** der **Schwarzföhre**, ihrem »Pech«. Vieles sammeln wir wild in den Wiesen und Wäldern unseres **Bio-Bauernhofes** am Fuß der Hohen Wand, manches bauen wir eigens an. Für unsere Räucherkegel verwenden wir reine **Holzkohle** aus traditioneller österreichischer Köhlerlei.

»Eure Räucherkegel sind einfach wunderbar.
Bessere Räucherkegel als Eure sind mir nicht bekannt.«
– Wolf-Dieter Storl

synthetische
OHNE
Zusätze

Waldweihrauch

»Feines Räucherwerk
aus dem *Schneeberg*«
L A N D



www.waldweihrauch.at

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER GEFRIER-METHODEN BEZÜGLICH MORPHOLOGIE UND CHROMATININTEGRITÄT AUF MENSCHLICHE SPERMATOZOEN VON FERTILEN UND SUBFERTILEN MÄNNERN

Summary

Some investigators have demonstrated that computer-controlled freezing methods preserve sperm quality better than vapour freezing, but others have found no beneficial effects, at least for human spermatozoa. The purpose of this study was to determine negative effects (cryoinjury) on human spermatozoa after freeze-thawing, and to determine whether freeze-thawing of spermatozoa with a programmed biological freezer is better than freezing with liquid nitrogen vapour with regard to alteration of sperm chromatin and morphology in semen from fertile and subfertile men. Thirty seven semen samples were obtained either from patients attending our IVF unit for treatment ($n = 15$) or from donors ($n = 22$) with proven fertility and normal sperm quality according to WHO guidelines (1992). Each semen sample was divided into two parts after liquefaction and addition of cryoprotectant (1/1, v/v) (HSPM). The first part was frozen using a programmed biological freezing machine (Planer serie 10) and the second part was frozen by means of liquid nitrogen vapour. Smears were made from each aliquot before and after the freeze-thawing procedure to assess morphology (strict criteria) and chromatin condensation (acridine orange). The mean percentage of chromatin condensed spermatozoa in the samples from donors (control group) was 94.1 ± 7.0 %

before freezing and decreased significantly ($p < 0.001$) to 89.1 ± 8.1 % after freeze-thawing with the programmed biological freezer and to 89.1 ± 7.7 % after using liquid nitrogen vapour ($p < 0.001$). The corresponding value for semen obtained from patients was 80.4 ± 9.9 % before freezing and decreased to 72.7 ± 10.1 and 62.7 ± 10.1 % respectively ($p < 0.001$). On the other hand, the mean percentage of normal sperm morphology in the control group decreased from 27.9 ± 6.5 % before freezing to 21.1 ± 4.7 % ($p < 0.001$) after freeze-thaw with the biological freezer and to 20.2 ± 4.7 % ($p < 0.001$) after freeze thaw with liquid nitrogen vapour. In the patients group, cryoinjury was higher than in the control group: the mean percentage of normal morphology decreased from 15.1 ± 6.5 to 9.7 ± 4.2 % after freezing with the biological freezer and to 8.9 ± 4.5 % after freezing with liquid nitrogen vapour. This study demonstrate that, compared with native semen samples, chromatin packaging and morphology of human spermatozoa decrease significantly after freeze-thawing, not only after freezing with liquid nitrogen but also after freezing with a programmed freezer. No significant difference was found between the two freezing methods with respect to morphology and chromatin structure injury as assessed by acridine orange test. Therefore both methods could be used unreservedly for cryopreservation.

ZUSAMMENFASSUNG

Einige Autoren haben gezeigt, daß die computergesteuerte Einfrier-methode die Spermienqualität besser aufrechterhält als die Stickstoffdampf-Methode. Andere haben keinen Vorteil festgestellt, zumindest bei menschlichen Spermien. Das Ziel dieser Arbeit war es, zum einen negative Einflüsse der Einfrier-Auftau-Prozedur festzustellen (Kryoschädigung), zum anderen herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen der computergesteuerten Einfrier-Auftau-Technik und der Stickstoffdampf-Technik in Hinblick auf Chromatin- und Morphologieveränderungen sowohl von fertilen als auch von subfertilen Männern gibt.

Die Studie umfaßt 37 Spermaproben, 22 nachweislich fertiler Spender (Kontrollgruppe, G2) und 15 Proben von Patienten mit Fertilitätsstörungen (G1), beurteilt nach WHO Richtlinien (1992). Die Proben wurden mit dem Kryoprotektivum Glycerol (HSPM) 1:1 gemischt und jeweils in Stickstoffdampf und mit einer biologischen Friemaschine (Planer Serie 10) eingefroren. Vor und nach dem Einfrier-Auftau-Vorgang wurden mehrere Ausstriche angefertigt, um die Morphologie (strict criteria, Kruger 1986) und die Chromatinkondensation mittels Acridine-Orange-Färbung auszuwerten.

Der Anteil an kondensiertem Chromatin im nativen Sperma der fertilen Probanden zeigte einen signifikanten Abfall ($p < 0,001$) von $94,1 \% \pm 7,0$ auf $89,1 \% \pm 8,1$ nach Einfrieren mit der biologischen Friermaschine und auf $89,1 \% \pm 7,7$ nach Einfrieren mit Stickstoffdampf. Die entsprechenden Werte der subfertilen Probanden zeigten die gleiche Tendenz und fielen ebenso signifikant ($p = 0,001$) von $80,4 \% \pm 9,9$ auf $72,7 \% \pm 10,1$ bzw. $62,7 \pm 10,1$ ab. Die Morphologie der Spermien zeigte die gleiche Tendenz: Die Anzahl der morphologisch normalen Spermien ($27,9 \% \pm 6,5$), eingefroren mit der biologischen Friermaschine, zeigte in der fertilen Gruppe einen signifikanten Abfall ($p = 0,001$) auf $21,1 \% \pm 4,7$ (mittlerer prozentualer Abfall auf 65 %) und nach Einfrieren mit Stickstoffdampf auf $20,2 \% \pm 4,7$. In der subfertilen Gruppe war der Kryoschaden höher als in der Kontrollgruppe, die Werte fielen hier ebenfalls signifikant ($p = 0,001$) von $15,1 \% \pm 6,5$ auf $9,7 \% \pm 4,2$ nach Einfrieren mit der biologischen Friermaschine und auf $8,9 \% \pm 4,5$ nach Einfrieren mit Stickstoffdampf ab. Dennoch ist festzustellen, daß sich der Kryoschaden hinsichtlich Morphologie und Chromatinstruktur der Spermatozoen zwischen beiden Methoden nicht signifikant unterscheidet.

Die Einfrier-Auftau-Prozedur führt zu einem negativen Effekt (Schädigung) auf die Morphologie und die Chromatinstruktur sowohl bei subnormalen als auch bei normalen Probanden. Beim Vergleich der beiden Einfrier-Auftau-Techniken zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Morphologie und dem Anteil an

kondensiertem Chromatin bei Anwendung des Acridin-Orange-Test sowohl in der fertilen als auch in der subfertilen Gruppe. Daher kann man beide Methoden für die Einfrier-Auftau-Prozedur im Rahmen der assistierten Reproduktionsmedizin gleichermaßen anwenden.

EINLEITUNG

Neben der Spermienzahl und der Spermienmotilität spielt die Spermienmorphologie für die männliche Fertilität eine wichtige Rolle. Damit Spermatozoen ihre Aufgabe erfüllen können, sind eine bestimmte Struktur, wie zum Beispiel ein intaktes Flagellum, ein Akrosom, eine postakrosomale Region, sowie ein Kern Voraussetzung. Die Kryokonservierung von menschlichen Spermatozoen führt zu Veränderungen von Morphologie, Chromatinintegrität und auch zum Absterben der Zellen. Die ursächlichen Faktoren sind zum einen in der Wahl des Friermediums und zum anderen in der Wahl des verwendeten Frierprogramms zu suchen [1].

Die Hauptursache der Spermien-schädigung durch Kryokonservierung ist die Eiskristallbildung. Die kritische Temperatur für die Eiskristallbildung liegt zwischen 0 und -10 Grad Celsius. Die meisten Einfrierprozeduren benutzen eine langsame Temperaturabsenkung von Zimmertemperatur bis auf -5°C [2–4]. Jenseits von -10°C beginnt dann auch das Zellwasser zu frieren (abhängig von der Zellart und der Spezies). Im Verlaufe des Frierprozesses

entsteht ein intrazellulärer osmotischer Druck, der den extrazellulären übersteigt und zu einem Abstrom von Zellwasser in den extrazellulären Raum führt, was den intrazellulären osmotischen Druck weiter ansteigen läßt, bis die Zelle schließlich gänzlich dehydriert ist und/oder intrazelluläre Eiskristalle bildet [5].

„Supercooling“ erfolgt, wenn die Zellen schnell gekühlt werden. In diesem Fall kann das Wasser die Zelle nicht in ausreichender Menge verlassen und es kommt zu Bildung von Eiskristallen in den Zellen, die die Zellen schädigen [6–7]. In den meisten Fällen, in denen sich intrazellulär Eiskristalle bilden, sterben die Zellen ab [8–10]. Ist hingegen die Temperaturabsenkung langsam, verlieren die Zellen ausreichend Wasser und Supercooling wird verhindert. Mit anderen Worten, die Zelle dehydriert und es kommt nicht zur intrazellulären Kristallisation. Morphologische und ultrastrukturelle Untersuchungen von Spermien, die schnell gekühlt wurden, zeigten extreme Schädigungen an der Plasmamembran mit der Folge der Zerstörung des Akrosoms [11–12]. Jedes Frieren von Spermatozoen kann zu einer latenten Schädigung führen, die nicht in einem Routinetestverfahren erfaßt werden kann. Obwohl es einige Hinweise gibt, daß Bestandteile des Zytoskeletts sensibel auf das Einfrieren reagieren [13], sind die Konsequenzen der Einfrier-Techniken auf die Chromatinintegrität und die Morphologie noch nicht ausreichend geklärt.

Der Kryoschaden der Spermatozoen kann in vielen Spezies durch langsames Einfrieren ($\leq 10^\circ$

C/Min) wesentlich reduziert werden. Aus diesem Grunde ist die Anwendung einer optimalen Einfriergeschwindigkeit ein kritischer Faktor im Rahmen der Kryokonservierung von vielen verschiedenen Zellarten, weil davon das Ausmaß der Zelldehydrierung abhängt. Die Stickstoffdampftechnik (schnelles Einfrieren) von menschlichen Spermatozoen und die anschließende Lagerung bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist eine weltweit verbreitete Methode [14]. Hingegen erlaubt eine langsame Einfriertechnik (mit einem computergesteuerten Einfriergerät) eine stufenweise Temperatursenkung, bis die Probe in flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingetaucht wird. Durch diese Technik ist die Kryoschädigung, insbesondere bei schlechter Spermienqualität, am geringsten [15].

Ziel dieser vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen des Einfrier-Auftau-Prozesses auf die morphologische Struktur und die Chromatinintegrität von fertilen und subfertilen Männern nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur im Stickstoffdampf und nach Anwendung einer computergesteuerten Friermaschine zu vergleichen. Es sollte festgestellt werden, welche Methode besser geeignet ist, die Chromatinstruktur und die Morphologie der Spermatozoen aufrechtzuerhalten.

MATERIAL UND METHODE

Die Spermproben wurden von 15 Patienten (G1) unseres IVF- und ICSI-Programmes und von 22 Probanden (G2) mit nachgewiese-

ner Fertilität nach einer 3tägigen Karenzzeit durch Masturbation gewonnen. Die Präparation erfolgte nach den Richtlinien der WHO (1992). Jede Probe wurde für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur verflüssigt, zahlreiche Ausstriche wurden angefertigt ($5\text{ }\mu\text{l}$ /Objekträger) und luftgetrocknet. Nachfolgend wurden die Proben in einem swim up-Verfahren aufbereitet und Konzentration, Motilität und Vitalität (HOS-Test) bestimmt sowie die Proben im Verhältnis 1:1 mit HSPM (human sperm preservation medium) vermischt. Diese Mischung wurde in mehrere $0,5\text{ ml}$ French straws gefüllt. Ein Teil der French straws wurde daraufhin mit einem computergesteuerten Einfriergerät und ein anderer Teil in Stickstoffdampf wie folgt eingefroren:

1. Stickstoffdampf

Die Samenröhrchen wurden für 10 Minuten in Stickstoffdampf gefroren, danach in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

2. Biologische Friermaschine

Die Samenröhrchen wurden in die Frierkammer eingebracht und mit einer Kühlungsrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann mit einer Frierrate von $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, schließlich mit einer Frierrate von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

Die gefrorenen Proben wurden nach einer zweimonatigen Lagerungszeit aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 5 Minuten in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad aufgetaut. Nach dem

Auftauen wurden wieder zahlreiche Ausstriche angefertigt ($5\text{ }\mu\text{l}$ /Objekträger) und luftgetrocknet.

Die morphologische Beurteilung erfolgt nach Objekträgerfärbung mit Papanicolaou [16] in Anlehnung an die strict criteria [17]: Die Färbung wurde durchgeführt, wie im WHO Handbuch [16] beschrieben. Die Auswertung erfolgte durch einen Betrachter unter einem Phasenkontrastmikroskop unter Verwendung eines 100-fachen Ölimmersionsobjektives. Ein Spermogramm wird dann als gut gewertet, wenn von 200 bewerteten Spermatozoen $> 14\%$ normale Spermatozoen mit normaler Morphologie ausgezählt werden können. Ein Spermatozoon wird dann als normal gewertet, wenn der Kopf $3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ lang, $2\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$ breit ist und das Akrosom $40\text{--}70\%$ des Kopfes einnimmt. Das Mittelstück muß axial angeheftet sein, die 1,5-fache Länge des Kopfes betragen und frei von zytoplasmatischen Anhängseln sein. Der Schwanz soll dünner als das Mittelstück und $45\text{ }\mu\text{m}$ lang sein. Die Chromatinstruktur wurde nach Färbung der Objekträger mit Acridine-Orange wie folgt beurteilt: Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in Carnoy's-Lösung (3 Teile Methanol auf 1 Teil Eisessig) fixiert, luftgetrocknet und mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Acridine-Orange Farblösung (Sigma Chemical; $0,19\text{ mg/ml}$ in $0,1\text{ M}$ Zitronensäure und $0,3\text{ M}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ pH 2,5) überschichtet und für 10 min gefärbt, danach mit destilliertem Wasser abgespült, mit einem Deckglas eingedeckt und unverzüglich in der Dunkelkammer ausgewertet. Ein Untersucher wertete unter einem Phasenkontrastmikroskop mit einem

100 x Ölimmersionsobjektiv 200 Spermatozoen aus. Alle Spermatozoen mit grüner Fluoreszenz wurden als gut gewertet und das Spermogramm als normal, wenn > 75 % gute Spermatozoen ausgezählt wurden.

ERGEBNISSE

Die Spermatozoen mit regelrechter Chromatinkondensation zeigten in G1 (Spermproben von schlechter Qualität) einen Abfall von 80,4 % ± 9,9 auf 72,5 % ± 10,1 unter Einsatz der biologischen Friemaschine und eine Reduzierung auf 72,7 % ± 10,1 unter Verwendung von Stickstoffdampf. Nach dem Einfrieren mit der biologischen Friemaschine zeigte sich in G2 (Spermproben von guter Qualität) eine Reduzierung von 94,1 % ± 7,0 auf 89,1 % ± 8,1 und ein Abfall auf 89,1 % ± 7,7 mit Stickstoffdampf. Alle ermittelten Werte zeigten eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$).

Der Prozentsatz morphologisch intakter Spermatozoen fiel in G1 unter Verwendung der biologischen Friemaschine von 15,1 % ± 6,5 auf 9,7 % ± 4,2 (um durchschnittlich 64 %) und in G2 von 27,9 % ± 6,5 auf 21,1 % ± 4,7 (um durchschnittlich 76 %) ab. Unter dem Einsatz von Stickstoffdampf zeigte sich ein Abfall auf 8,9 % ± 4,5 (um durchschnittlich 59 %) in G1 und auf 20,2 % ± 4,7 (um durchschnittlich 72 %) in G2. Die ermittelten Ergebnisse waren hochsignifikant ($p < 0,001$).

Der Anteil an Chromatin-kondensierten und morphologisch normalen Spermatozoen, die mit Stickstoffdampf eingefroren wurden, sind vergleichbar mit denjenigen, die mit der computergesteuerten Einfrieremaschine tiefgefroren wurden, nicht nur in der fertilen Gruppe (G2) (89,1 ± 7,7 % und 20,2 ± 4,7 % gegen 89,1 ± 8,1 % und 21,1 ± 4,7 %), sondern auch in der subfertilen Gruppe (72,74 ± 10,1 % und 8,9 ± 4,5 % gegen 72,5 ± 10,1 % und 9,7 ± 4,2 %). Kein Unterschied konnte festgestellt werden

in der Häufigkeit des Chromatinschadens und der veränderten Morphologie der Spermatozoen hinsichtlich der Methode des Einfrierens (Stickstoffdampf- oder computergestütztes Einfriergerät), sowohl bei hoher Spermaqualität ($p = 0,061$, $p = 0,106$) als auch bei Sperma mit niedriger Qualität ($p = 0,061$ und $p = 0,234$) (Tab. 1 und 2).

DISKUSSION

Der häufigste beschriebene negative Effekt der Einfrier-Auftau-Prozedur ist eine deutliche Beeinträchtigung der Spermienbeweglichkeit [18]. Andere Autoren haben mehr Gewicht auf Veränderungen der Spermienmorphologie, des Geißelapparates, der Membran- und Akrosomenstrukturen gelegt [19–20]. Die Wirkungen der Kryokonservierung auf die Integrität des Spermienkerns, der Chromatinstabilität und der Zentrosomen sind weniger erforscht. Normale Kondensation und Stabilisierung

Tabelle 1: Einfluß des Einfrier-Auftau-Prozesses auf die Chromatinstabilität und Morphologie der Spermatozoen subfertiler Männer.

G1	Parameter	Natives Sperma	Stickstoffdampf-Methode	Computergesteuertes Einfriergerät	Signifikanz zwischen den beiden Methoden
Subfertile Gruppe (n = 15)	Morphologie	15,1 ± 6,5 % [♯]	8,9 ± 4,5 % [♯]	9,7 ± 4,2 % [♯]	P = 0,234
	Chromatin	80,4 ± 9,9 % [♭]	72,7 ± 10,1 % [♭]	72,5 ± 10,1 % [♭]	P = 0,061

[♯] p = 0,001; [♭] p = 0,001

Tabelle 2: Einfluß des Einfrier-Auftau-Prozesses auf die Chromatinstabilität und Morphologie der Spermatozoen fertiler Männer

G2	Parameter	Natives Sperma	Stickstoffdampf-Methode	Computergesteuertes Einfriergerät	Signifikanz zwischen den beiden Methoden
Fertile Gruppe (n = 22)	Morphologie	27,9 ± 6,5 % [♯]	20,2 ± 4,7 % [♯]	21,1 ± 4,7 % [♯]	p = 0,106
	Chromatin	94,1 ± 7,0 % [♭]	89,1 ± 7,7 % [♭]	89,1 ± 8,1 % [♭]	p = 0,061

[♯] p = 0,001; [♭] p = 0,001

des Spermienchromatins erlauben einen sicheren Transport des männlichen Genoms, und die Dekondensation nach der Spermienpenetration oder -injektion in das Zytoplasma der Eizelle ist eine wichtige Voraussetzung für die Fertilisation.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß die Anzahl der normal geformten Spermatozoen (die Morphologie) signifikant abfällt, unabhängig davon, ob mit Stickstoffdampf oder mit computergesteuerter Friermaschine eingefroren wurde (Tab. 1 und 2). Dieser Abfall wurde sowohl bei schlechter (Tab. 1) wie auch bei guter Spermienqualität (Tab. 2) festgestellt. Jedoch war der Unterschied der morphologischen Spermienbeschädigung zwischen beiden Einfriermethoden nicht signifikant verschieden, sowohl in der fertilen ($p = 0,106$), als auch bei der infertilen Gruppe ($p = 0,234$). Andere Autoren [21] haben schon früher gezeigt, daß der Einfrier-Auftau-Vorgang von menschlichen Spermien signifikant die Anzahl der Spermien mit normaler Kopfstruktur, Motilität und Befruchtungsfähigkeit reduziert.

Andererseits fällt der Anteil der Spermatozoen mit kondensiertem Chromatin von fertilen Männern nach computergesteuertem Einfrieren ($94,1 \pm 7,0\%$ auf $89,1 \pm 8,1\%$, $p < 0,001$) wie auch nach Benutzung der Stickstoffdampf-Methode ($94,1 \pm 7,0\%$ auf $89,1 \pm 7,7\%$, $p < 0,001$) signifikant ab. Die gleiche Tendenz konnte bei der Gruppe der subfertilen Männer beobachtet werden (Tab. 2). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Studien von Huret und

Miquereau [22], die in ihren Untersuchungen gezeigt haben, daß die Chromatinstruktur von wieder aufgetauten Spermatozoen wie in den nativen Spermien unverändert geblieben ist. In Einklang stehen unsere Ergebnisse mit Royere et al. [23] und Hammah et al. [24], die ebenfalls einen Abfall der Chromatinstabilität nach Färbung mit Acridine-Orange und Feulgen-DNA nachweisen konnten.

Des weiteren berichteten Eliason und Enquist [25], daß der Kern von Spermatozoen infertiler Männer weniger stabil ist als die Kerne von Spermatozoen fertiler Männer. Hughes et al. [26] haben kürzlich gezeigt, daß die Spermien-DNA von infertilen Männern empfindlicher gegenüber Strahlen ist als im Vergleich zu fertilen Männern. Hammitt et al. [27] demonstrierten, daß ein kontrollierter Einfriervorgang mit anschließendem Auftauen bei 40 Grad Celsius signifikant motilere Spermien, bzw. einen besseren Motilitätsindex aufweisen als diejenigen, die nach unkontrolliertem Einfrieren nur bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut wurden. Check et al. [28] beobachteten, daß der Anteil der motilen Spermien nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur signifikant höher war, wenn der Einfriervorgang mit einem semi-programmierbaren Einfriergerät (cellevator) stattfindet als im Vergleich zu einem unkontrollierten und schnellen Einfrieren mittels Stickstoffdampf. Verheyen et al. [29] beschrieben, daß Spermien mit ursprünglich guter Qualität unabhängig von der Einfriermethode gleich gute Ergebnisse zeigten. Morell et al. [30] haben nachgewiesen, daß

bei Spendersamen (gute Qualität), eingefroren entweder durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder mit Hilfe eines programmierbaren Einfriergerätes, kein signifikanter Unterschied bezüglich der Motilität und der 30-Minuten-Überlebensrate nach Wiederauftauen besteht.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, daß die einfache Stickstoffdampfmethode eine effektive Einfriermethode ist, die vergleichbare Ergebnisse wie ein computergesteuertes Einfriergerät bringt. Die aufgeführten Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß der Anteil morphologisch normaler und Chromatin-kondensierter Spermien nicht nur bei infertilen, sondern auch bei den fertilen Probanden nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur signifikant abfällt, gleich welche Einfriermethode man anwendet. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Einfriermethoden bezüglich des Anteils der Schädigung der Spermien nach Wiederauftauen gibt, trotz der Tendenz, daß die initial qualitativ schlechten Spermien eine größere Schädigung aufweisen. Deshalb wurde die computergesteuerte Einfriermethode für das Kryokonservieren von Sperma subfertiler Männer empfohlen, um zusätzliche Schädigung am Chromatin und der Morphologie zu vermeiden.

Literatur:

1. Farrant J. General principles of cell preservation. In: Richardson DW, Joce D, Symond EM (eds). Frozen human semen. Martinus Nijhoff, Boston; 1980.
2. Foote RH. Semen quality from the bull to the freezer: An Assessment. Theriogenology 1975; 4: 219-35.

**Dr. vet. med. et Dr. rer. nat.
Mohammed Eid Hammadeh**



Geboren 1954 in Syrien. Von 1972 bis 1977 Studium der Veterinärmedizin an der Universität in Aleppo, Syrien. Promotion an der Justus-Liebig-Universität Gießen 1984 bis 1988. Von 1988 bis 1989 Forschungstätigkeit (immunhistochemische Techniken) an der Universität Liverpool, GB. 1989 bis 1990 Diplommanagement an der Universität in Kassel. Bis 1995 Tätigkeit in einer Privatpraxis für Frauenheilkunde und Reproduktionsmedizin (IVF/Embryotransfer) in Saarbrücken. Von 1991 bis 1995 Biologiestudium an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, Promotion 2000.

Seit 1995 Laborleiter an der Frauenklinik und Poliklinik, Bereich Reproduktionsmedizin, Universität des Saarlandes in Homburg.

Forschung und Publikationen im Bereich IVF/ICSI/ET mit den Schwerpunkten Chromatinkondensation, Einflußfaktoren auf die Chromatinkondensation, Eizellbefruchtung und IVF/ICSI-Ergebnisse.

Korrespondenzadresse:

Dr. Dr. M. E. Hammadeh
Universitätskliniken des Saarlandes, Frauenklinik und Poliklinik
D-66421 Homburg/Saar

3. Graham EG. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: The integrity of frozen spermatozoa. National Academy of Science, Washington, DC, 1978; 4–44.

4. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 871–91.

5. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 368.

6. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at superoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14: 251–72.

7. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium and non equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 1990; 17: 53–92.

8. Farrant J. Mechanism of injury and protection in living cells and tissues at low temperatures. In: Smith AU (ed).

Current trends in Cryobiology. Plenum, New York, 1970; 139–52.

9. Fujikawa S. Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. *Cryobiology* 1980; 17: 351–62.

10. Muldrew K, Mc Gann LE. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J* 1994; 66: 532–41.

11. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11: 73–88.

12. Alvarez JG, Storey BT. Evidence of increased lipid peroxidase damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of lethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992; 13: 232–41.

13. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transmsition in ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 451–61.

14. Sherman JK. Current status of clinical cryobanking of human sperm. In: Paulson JD, Negro-Vilar A, Lucena E, Martinia (eds). *Andrology: male fertility and sterility*. Academic Press, New York, 1986; 517–49.

15. Ragni G, Caccamo AM, Dalla Serra A et al. Computerized slow-stage freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapour freezing. *Fertil Steril* 1990; 53: 1072–5.

16. World Health Organization. *Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen Cervical Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

17. Krüger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Matta JF, Simons KF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112–7.

18. Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T, Yajima A. Fertilization of fresh and frozen human spermatozoa. *Assist Reprod Technol Androl* 1990; 1: 164–72.

19. Critser JK, Arenson BW, Aaker DV, Huse Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa II. postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 1987; 9: 1214–9.

20. Check MI, Check JH, Long R. Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 1991; 27: 155–60.

21. Serafini P, Marrs RP. Computerized stage-freezing technique improves sperm survival and preservation of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1986; 45: 857–58.

22. Huret JL, Miquereau MA. Nuclear chromatin decondensation abilities of human spermatozoa. *Arch Androl* 1984; 13: 147–52.

23. Royere D, Hammamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res* 1988; 21: 51–7.

24. Hammamah S, Royere D, Nicolle JC, et al. Effect of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30: 59–64.
25. Eliasson R, Enquist AM. Chromatin stability of human spermatozoa in relation to men fertility. *Int J Androl* 1981; 3 (Suppl.): 73–4.
26. Hughes CM, Lewis SE. M, Mc Kelvey-Martin V, et al. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 613–9.
27. Hammit DG, Hade Dk, Williamson RA. Survival of human sperm following controlled and noncontrolled rate cryopreservation. *Andrologia* 1989; 21: 311–7.
28. Check ML, Check DJ, Katsoff JH. Improved results of thawed sperm cryopreserved with slow stage cooling with a cellevator. *Arch Androl* 1996; 37: 61–4.
29. Verheyen G, Pletinex I, Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution / washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod* 1993; 8: 1678–84.
30. Morrell DR, Matson PL, Troup SA, Izzard H, Prior JR, Burslem RW, Lieberman BA. The cryopreservation of donor semen by a simplified method: Use in IVF and GIFT program. *Int J Androl* 1990; 13: 352–60.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)