

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität

Paasch U, Grunewald S, Glander HJ

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2007; 4 (3), 124-139

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

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](#)

DNA-Schäden ejakulierter Spermatozoen: ein prädiktiver Faktor der männlichen Infertilität

U. Paasch, S. Grunewald, H.-J. Glander

Das im Spermatozoon in einzigartiger Weise verpackte paternale Genom muß unbeschadet die Eizelle erreichen und dort decondensieren, um die Weitergabe der männlichen Gene und damit das Entstehen neuen Lebens zu ermöglichen. DNA-Schäden lassen sich neuerdings mit verschiedenen Tests erfassen. Unabhängig vom Ort und der Ursache der Entstehung scheint die Rate fragmentierter DNA in Spermatozoen ein von den Standardsamenzellparametern unabhängiger Parameter zu sein, mit dessen Hilfe prädiktiv die fertile Kompetenz *in vivo* und *in vitro* bestimmt werden kann. So nimmt die Fekundität bei Überschreiten des Schwellenwertes von 30 % progressiv ab. Die besondere klinische Relevanz resultiert aus der Tatsache, daß eine Assoziation zu natürlichen Konzeptionszyklen und solchen der assistierten Reproduktion bestehen. Der Erfassung der DNA-Fragmentation im Rahmen der andrologischen Abklärung der männlichen Infertilität kommt somit zunehmende Bedeutung zu. Die Evaluation vorhandener und in Entwicklung befindlicher Spermatozoenseparationsmethoden hinsichtlich des Potentials iatrogenen Vermittlung von DNA-Schäden bestimmt schon jetzt deren weitere Entwicklung.

Schlüsselwörter: DNA-Fragmentation, Mensch, Infertilität, Spermatozoen, oxidativer Streß

Role of Sperm Chromatin Abnormalities and DNA Damage in Male Infertility. Sperm DNA integrity is crucial for the precise conduction of male genetic information onto the next generation. This process is dependent on a highly compact and complex structure and the capability of its decondensation. Any form of sperm DNA abnormalities or DNA fragmentation may contribute to male infertility. In support of this conclusion, it was reported that *in vivo* fecundity decreases progressively when more than 30 % of the spermatozoa are identified as having DNA damage. Several tests are used to investigate sperm DNA fragmentation, which is considered an independent measure of sperm quality that may yield better diagnostic and prognostic approaches than standard sperm parameters (concentration, motility and morphology). The clinical significance of this assessment lies in its association not only with natural conception rates, but also with assisted reproduction success rates. Also, it has serious impact on the offspring and is highly prognostic in the assessment of cancer patients' fertility. Therefore, screening for sperm DNA damage may provide useful information in cases of male idiopathic infertility and in those men pursuing assisted reproduction. Treatment should include methods for prevention of sperm DNA damage. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2007; 4 (3): 124–39.**

Key words: DNA fragmentation, human, male infertility, sperm, oxidative stress

Die WHO rechnet ungeachtet der globalen Bevölkerungsexplosion pro Jahr weltweit mit einem Zuwachs von 2 Millionen infertilen Paaren. Für die Industrienationen wird eine durchschnittliche Prävalenz der männlichen Infertilität von 14 % angenommen [1, 2]. Somit ist jedes siebente Paar in Westeuropa betroffen [3]. Die alleinige oder partielle Verursachung durch den Mann ist in 50 % zu erwarten. Damit sind 7 % der Männer im Laufe ihres Lebens von einem Problem der Fertilität betroffen. Diese außerordentlich hohe Prävalenz liegt somit deutlich über der „Volkskrankheit“ Diabetes mellitus [4, 5]. Männliche Kinderwunschpatienten sind zudem häufiger adipös. In der sächsischen Bevölkerung wurde bei über 71 % der mit Kinderwunsch hilfesuchenden Paare ein Body-Mass-Index (BMI) > 24 identifiziert. Während die Kinderwunschpatienten im Mittel 33 Jahre alt waren, zeigte eine Screeninguntersuchung Wehrpflichtiger im Alter von 18–21 Jahren ebenfalls eine signifikant positive Korrelation von abnehmender Samenzellzahl und steigendem BMI (Publikation in Vorbereitung). Zudem werden Spermatozoenfunktionsstörungen und Fragmentierungen der männlichen Erbinformation (DNA-Fragmentationen) häufiger identifiziert [6, 7].

Im Rahmen einer gestörten Spermatogenese können chromosomale Aneuploidien und Veränderungen auf Genebene entstehen. Intensive Forschungsarbeiten des vergangenen Jahrzehnts haben zudem die besondere Be-

deutung von DNA-Fragmentierungen im Sinne von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in ejakulierten Spermatozoen herausgestellt [8–11]. Diese können sowohl während der Spermatogenese, der Nebenhodenpassage als auch im bereits ausdifferenzierten Spermium *post ejaculationem* entstehen. So gehen Infektionen, Überwärmung, Hormonentzug, Varikozelen und therapeutische Interventionen (z. B. Hodenkarzinom: Bestrahlung, Chemotherapie) mit einer Zunahme von Brüchen innerhalb der Nukleinsäuren einher [12–16]. Besonders häufig werden Fragmentationen der DNA bei vermehrtem Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species; ROS) nachgewiesen [17]. Auf molekularer Ebene beeinflussen ROS zahlreiche Zellfunktionen und führen so zu vielfältigen klinischen Komplikationen, z. B. bei Diabetes mellitus. Iatrogene Schädigungen der DNA wurden auch bei der routinemäßigen Ejakulataufarbeitung zur weiteren Verwendung im Rahmen der assistierten Reproduktion infolge ROS-Einwirkung beobachtet [18]. Bisher ist diese potentielle Gefahr selbst bei massenhaftem Einsatz von IUI und IVF in der Reproduktionsmedizin nicht konkret bewertet worden. Insbesondere die intrazytoplasmatische Injektion eines einzelnen Spermatozoons in eine Eizelle (intracytoplasmic sperm injection into oocytes; ICSI) [19] eröffnete Optionen einer Therapie selbst für Fälle mit schwersten Störungen der Spermatogenese jedweder Ursache [20]. Verbunden damit muß eine steigende Frequenz der Eizellpenetration von Spermatozoen mit DNA-Schäden sein. In der Konsequenz gelang es bisher nicht, trotz stetig steigender Inanspruchnahme von IUI, IVF und ICSI mit stetig verfeinerten Protokollen, die Erfolgsraten in hocheffiziente Bereiche zu führen [21, 22]. Die Überwindung wichtiger biologischer Selektionsbarrieren mittels ICSI bei Verwendung ejakulierter und testikulärer Spermatozoen und deren Vorläufer birgt zusätzliche Risiken der Transmission und Induktion genetischer Defekte auf die nachfolgende Generation [23]. Hierbei spielen epigenetische Einflüsse eine Rolle.

Eingegangen: 26.06.2007; akzeptiert nach Revision: 12.07.2007

Aus dem Europäischen Ausbildungszentrum für Andrologie, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Korrespondenzadresse: PD Dr. med. habil. Uwe Paasch, Europäisches Ausbildungszentrum für Andrologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Leipzig AöR, D-04103 Leipzig, Philipp-Rosenthal-Straße 23–25; E-Mail: uwe.paasch@medizin.uni-leipzig.de

Infolgedessen fokussierte sich das Forschungsinteresse auf die Integrität des genetischen Materials männlicher Gameten [24]. Das Chromatin im Spermatozoenkopf ist mit Hilfe von Nukleoproteinen organisiert verpackt. Diese Organisationsstruktur erlaubt eine äußerst dichte Kondensation. Es wird nicht nur die Kleinheit des Kopfes gewährleistet, sondern auch ein Schutz des Erbmaterials hergestellt. Damit einher geht die Transportfähigkeit durch die verschiedensten biologischen Kompartimente des männlichen und weiblichen Genitaltraktes und die Abwehr zahlreicher potentiell einwirkender Umwelteinflüsse [25].

Während die kompakte Organisation des Chromatins für den Transport der Erbinformation essentiell ist, kann eine Befruchtung der Eizelle nur dann stattfinden, wenn nach der Fusion der Gameten eine ordnungsgemäße Dekondensation des Chromatins in Gang kommt [26, 27]. Auf diesen Prozeß können sich zahlreiche inhärente nukleäre Faktoren störend auswirken: Anomalien der chromosomalen Struktur wie Mikrodeletionen, Translokationen, und Aneuploidien [28–30]. Die unvollständige morphologische Ausreifung ist mit einer persistierenden Aktivierung von DNA-spaltender Caspase-3 und der Disruption des mitochondrialen Membranpotentials korreliert [31]. Zunehmend kristallisiert sich heraus, daß Fragmentationen der DNA trotz Kondensation möglich und transient erforderlich sind. Allerdings müssen diese physiologischerweise erforderlichen Brüche zeitnah repariert werden. Im Falle einer Persistenz ist die fertile Kompetenz des Spermatozoons in vitro und in vivo negativ mit der Frequenz der DNA-Fragmentation korreliert [32–36].

Unter einer DNA-Fragmentation werden Strangbrüche verstanden. Solche Brüche können entweder an einem einzelnen Strang auftreten (single stranded, sog. Nicks) oder beide Stränge betreffen („double strand breaks“). Verschiedene Methoden zur Erfassung solcher Brüche werden in verschiedenen Variationen angewendet. Der SCSA-Test, der TUNEL-Test und der Comet-Assay werden am häufigsten eingesetzt [35, 37–39].

Finden sich mehr als 30 % der Spermien im Ejakulat mit fragmentierter DNA, ist die Erfüllung des Kinderwunsches auf natürlichem Wege stark behindert [40]. Im Vergleich hierzu sind konventionelle Spermiogrammparameter in ihrer Prädiktion unterlegen, zumal sie einer deutlichen Subjektivität und einer hohen Intra- und Interobserver-Variation unterliegen [41].

Diese Übersicht soll den aktuellen Wissensstand zur Problematik der DNA- bzw. Spermienchromatin-Fragmentation zusammenfassen und mögliche Implikationen zur Therapie der männlichen Infertilität und der assistierten Reproduktion herstellen. Basis der Arbeit sind Literaturrecherchen via Medline/Pubmed und OvidWeb unter Bezugnahme auf die Suchwörter „Sperm“, „Chromatin“ und „Damage“. Alle dort seit 1966 bis Januar 2007 verfügbaren Originalarbeiten in deutscher und englischer Sprache wurden berücksichtigt.

Struktur des Chromatins humaner Spermatozoen

Die Formierung des Chromatins humaner ejakulierter Spermatozoen bedarf einzigartiger sequentiell ablaufender Ausreifungsschritte während der Spermatogenese. Erforderlich sind neben der Herstellung eines haploiden

Chromosomensatzes die Neuformierung von Zytoplasma und Chromatin (zytoplasmatisches und nukleäres Remodelling) [40, 42].

Das nukleäre Remodelling erfordert den Ersatz somatozellulärer Histonproteine durch Transitionsproteine und schließlich den Einbau von Protaminen, die die dichte Packung des Chromatins überhaupt erst ermöglichen [43]. Die basische Natur der Protamine überführt das Chromatin in eine kristallartige Struktur, so daß eine 6fache Verkleinerung der Chromosomen resultiert [44]. Damit wird das Kernvolumen nahezu ausschließlich von den Protaminen ausgefüllt, während die eigentliche DNA den geringeren Teil ausmacht. Das sichert die stabile und gesicherte Lagerung des Chromatins im Nukleus.

Die im einzelnen ablaufenden Schritte umfassen zunächst die Verpackung der DNA somatischer Zellkerne in Nukleosomen [45]. Ein Oktamer von Histonen formiert zunächst einen Proteinkern, um den sich zwei Lagen von DNA wickeln. Diese Nukleosomen werden dann weiter in regelmäßigen Helices aufgewickelt [46]. Diese Variante der DNA-Packung vergrößert das Volumen des Chromatins [47], jedoch weisen Spermatozoenköpfe durchschnittlich nur die Hälfte des Volumens eines Nukleosoms von $9,9 \mu\text{m}^3$ auf [48]. Aus diesem Grund bedarf es einer vollständig differenten Packungsvariante des haploiden Chromosomensatzes in Spermatozoen.

Im Jahr 1991 wurde ein Vier-Ebenen-Modell der Packung vorgeschlagen [47]. Es beinhaltet die chromosomale Verankerung durch Bindung der DNA an den nukleären Anulus, die Formation von „DNA loop domains“, sobald diese an eine neu formierte nukleäre Matrix bindet, gefolgt vom Ersatz der Histone durch Protamine, welche dann die Kondensation in eine kompaktere, an Pfannkuchen oder Krapfen erinnernde Form („Doughnuts“) sowie die chromosomale Positionierung erlaubt [47].

Der Ersatz der somatischen Histone und anderer chromatinassoziiertes Proteine durch Protamine verschiedener Typen ist komplex und zeitaufwendig [49]. Protamine haben ca. 50 % der Größe typischer Histone (5–8 kDa) und sind stark basisch. 55–79 % der Aminosäuren sind Arginin, was eine außerordentliche Bindungsfähigkeit für die DNA ergibt [44].

Während der epididymalen Passage der Spermatozoen wird der Kondensationsprozeß abgeschlossen. Quervernetzende Disulfidbrücken werden an den zahlreichen Zysteinresiduen der Protamine ausgebildet. Die Formation von Intra- und Inter-Protaminvernetzungen führten zur abschließenden Stabilisierung des Chromatins. Säugerspermien zeichnen sich nach Abschluß dieser hochkomplexen Verpackung durch das am stärksten komprimierte Chromatin aus [50].

Schlußendlich befindet sich das gesamte haploide Genom auf in Ringen angeordneter DNA mit einer durchschnittlichen Länge von 27 Kilobasen. Sie sind dabei an der nukleären Matrix fixiert, was sich durch In-situ-Fluoreszenzanregung sichtbar machen läßt. Während der Dekondensation bleibt die Verankerung zunächst erhalten [51]. Damit wird sichergestellt, daß nicht nur eine intakte, vor chemischen und physikalischen Einflüssen geschützte DNA in die Eizelle gelangt, sondern auch das Ablesen des Genoms mit Beginn der Entwicklung des neuen Lebens möglich ist [52].

Entstehung von DNA-Fragmentationen

Im Ejakulat des Mannes findet sich eine höchst heterogene Population von Spermatozoen im Hinblick auf Reife, Packung und funktionelle Kompetenz der DNA. Das Ausmaß der Heterogenität ist sicher nicht ohne Zufall bei Kinderwunschpatienten mit nicht normwertigen klassischen SpermioGrammparametern erhöht. Die Frequenz von DNA-Fragmentationen ist dabei positiv mit der Verschlechterung der klassischen SpermioGrammparameter korreliert [34].

Chromosomale Anomalien, Veränderungen auf DNA-Ebene und äußere Einflüsse können mit den zahlreichen Abschnitten der Spermatogenese interferieren [53]. Bis zum finalen Prozeß der Chromatinkondensation kann die DNA intratestikulär Fragmentationen unterliegen [54]. Im Ergebnis kann eine DNA-Struktur entstehen, die nicht zur Entwicklung gesunden neuen Lebens führt [55].

Letztlich wurde gezeigt, daß selbst nach erfolgreicher Kondensation eines intakten haploiden Chromosomensatzes mit orthologer DNA-Struktur DNA-Fragmentierungen durch freie Sauerstoffradikale [56] oder apoptotische Prozesse wahrscheinlich möglich sind [57]. Die genauen Mechanismen, die zur unterschiedlichen Genese der in ejakulierten Spermatozoen nachweisbaren DNA-Fragmentationen führen, sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im wesentlichen werden derzeit drei Theorien favorisiert: (1) Defekte in der Chromatinkondensation, (2) Apoptose und (3) oxidativer Streß. Weitere Schäden können post-testikulär durch reaktive Sauerstoffspezies, Radio- und Chemotherapie, Reaktivierung von Caspasen oder endogene Nukleasen sowie durch Rauchen und vermutlich auch durch andere Lifestyle-Faktoren wie Adipositas, Konsum von Haschisch und Heilmitteln sowie chronische Wärmeapplikation vermittelt werden [58].

1. Defekte in der Chromatinkondensation

Diese Theorie fußt auf tierexperimentellen Studien, in denen die Funktion der endogenen Nuklease (Topoisomerase II) als wesentlich für den geordneten Ablauf der Kondensation herausgestellt wurde. Die Aktivität des Enzyms ist erforderlich, um sogenannte Nicks (Einzelsrangbrüche) einzufügen, die die Spannung der DNA beim Ersatz der Histone durch Protamine vermindern [59, 60]. Die Suszeptibilität der DNA steigt mit der Abnahme der Protamination [61]. Im Tiermodell finden sich solche Veränderungen infolge der kurzen Spermatozoenausreifungszeit häufiger in der Paarungszeit. Das Vorhandensein solcher DNA-Brüche in ejakulierten Spermatozoen könnte damit Abbild einer unvollständigen Maturation sein [62].

2. Apoptose

Unter Apoptose wird der in somatischen Zellen auf extrinsischem und intrinsischem Wege induzierbare programmierte Zelltod verstanden. Der Mechanismus ist jeder Zelle inhärent, genetisch gesteuert und läuft mit der Ausprägung spezifischer molekularer und morphologischer Veränderungen ab. Am Ende des energieabhängigen Prozesses wird die die Erbinformation der Zelle tragende DNA in einheitliche Bruchstücke zerlegt [63]. Diese Variante des Zelltodes wird im Rahmen von Differenzierung und Maturation wachsender Gewebe genauso

benötigt wie bei der Entfernung z. B. viral infizierter Zellen oder bei Entartung [64].

Im Säugerhoden expandiert das Germinalepithel klonal via Mitosen. Diese zunächst im Überschuß produzierten Zellen bedürfen im weiteren Verlauf der geordneten Reifung. Übernommen wird die Aufgabe von Sertoli-Zellen, deren Betreuungskapazität jedoch beschränkt ist [65]. Derzeit wird angenommen, daß die Apoptose die Wahrung der Gewebshomöostase gewährleistet. Insbesondere müssen Germinalzellen, die die vollständige Reifung wahrscheinlich nicht vollziehen können, entfernt werden.

Neben der Apoptose-typischen Fragmentation der DNA können während der Spermatogenese zahlreiche weitere assoziierte Signalkaskaden im aktiven Zustand gefunden werden. Insbesondere das Caspasensystem wird mit seinen extrinsischen und intrinsischen Triggern aktiviert. Zahlreiche pro- und anti-apoptotische Regulatoren kontrollieren diesen Prozeß. Die Aktivierung der Effektor-caspasen 3, 6 und 7 markiert den „point of no return“ des apoptotischen Zellabbaus. Terminal apoptotische Germinalzellen können wie somatische Zellen auch an der Externalisation von Phosphatidylserin (EPS) in den Tubuli seminiferi identifiziert werden [66, 67]. Dieser Mechanismus wurde an Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatischen bei vollständig normaler Spermatogenese, aber auch bei einer gestörten Ausreifung gefunden [68]. Anzunehmen ist daher ein universeller Markierungsweg zu eliminierender Zellen, wahrscheinlich via CD36-Rezeptoren [69].

Extern getriggert wird die Apoptosemaschinerie über verschiedene Todesrezeptoren. Am besten untersucht ist die Interaktion zwischen dem Fas-Rezeptor und seinem Liganden FasL [70]. Im Germinalepithel führt die Aktivierung des Rezeptors zu dessen Trimerisierung und über nachgeschaltete Signalkaskaden zur Aktivierung des Caspasesystems. Sertoli-Zellen von Mäusen und Ratten exprimieren FasL und regulieren darüber wahrscheinlich die Zahl der zu betreuenden Germinalzellen [71]. Korrespondierend finden sich im Ejakulat sehr wenige Fas⁺-Spermatozoen, solange die Spermatogenese ungestört ist. Wenn überhaupt, finden sich solche Zellen in der Fraktion unreifer Zellen. Solche Zellen haben außerdem aktivierte Caspasen und ein disruptiertes mitochondriales Membranpotential. Die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse lassen sich jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragen. Die Frequenz der Fas⁺-Spermatozoen erhöht sich bei Infertilitätspatienten drastisch auf bis zu 50 %. Demzufolge ist von einer gestörten Regulation der Apoptose während der Spermatogenese auszugehen. Hierfür wurde der Begriff der abortiven Apoptose vorgeschlagen [72, 73]. Alle anderen Spermatozoen sind gegenüber FAS-Stimulation resistent [74, 75].

Fehlermöglichkeiten ergeben sich auf mehreren Ebenen der Signaltransduktion. Im Falle einer Oligozoospermie infolge einer zu geringen Proliferationsrate der Germinalzellen könnte zum Beispiel die zu geringe Zellzahl Auslöser für eine unzureichende FasL-Produktion durch die Sertoli-Zelle sein [76]. Abortiv-apoptotische Fas⁺-Zellen könnten aber auch infolge einer gestörten intrazellulären Signaltransduktion im Ejakulat erscheinen. Diese Hypothese würde erklären, warum bei Infertilitätspatienten nicht nur eine höhere Frequenz von DNA-Fragmenta-

tionen, sondern auch andere Apoptosemarker der Spermatozoen nachweisbar sind [77]. Insbesondere die persistierende Aktivität oder post-testikuläre Reaktivierung des Caspasesystems könnte zu zahlreichen Beeinträchtigungen der Spermatozoenfunktion zum Beispiel durch post-testikuläre DNA-Fragmentationsinduktion führen, wengleich eine caspaseabhängige Fragmentation vollständig ortholog gepackter DNA nicht bewiesen ist.

3. Oxidativer Streß

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) sind in geringen Konzentrationen wesentlich für eine normale Spermatozoenfunktion und werden von diesen selbst gebildet [78]. Sobald jedoch die noch nicht näher charakterisierten physiologischen Konzentrationen überschritten werden, ist mit einer Gefährdung des Spermiums zu rechnen [79].

ROS sind hochreaktive, oxidativ wirksame freie Radikale. Als freies Radikal wird jedes Atom oder Molekül bezeichnet, welches ein oder mehrere überzählige Elektronen besitzt [80]. ROS in hoher Ausprägung wurden in 25–40 % der Ejakulate von Infertilitätspatienten gefunden [81]. Die DNA ejakulierter Spermatozoen wird gegenüber schädlicher ROS-Einwirkung durch ihre dichte Packung und antioxidativ wirksamen Substanzen des Seminalplasmas geschützt [82].

Oxidativer Streß entsteht im Falle einer Dysbalance von ROS-Produktion und der Absorptionskapazität der Antioxidantien [83]. Generell gelten die DNA-Basenpaare und das Phosphodiester-Gerüst als außerordentlich anfällig für eine Oxidation durch ROS. Auch die Plasmamembran der Spermatozoen mit ihrem hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird leicht von ROS oxidiert. Dem relativ kleinen Zytoplasmavolumen mangelt es an antioxidativen Substanzen, um eine Protektion aufzubauen [84].

Wirken ROS auf Spermatozoen ein, werden in hoher Frequenz Einzel- und Doppelstrangbrüche an der DNA, insbesondere bei Infertilitätspatienten, nachweisbar [35, 85–87]. Umgekehrt korreliert die ROS-Konzentration im Ejakulat signifikant positiv mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung [24, 88]. Die Ausbildung von 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin (8-Oxo-dG) an der DNA wird dabei als Schlüsselement oxidativer Schäden an der DNA angesehen [89]. Bei experimenteller Exposition von Spermatozoen gegenüber ROS waren Modifikationen aller Basentypen, basenfreie Stränge, Deletionen, sogenannte „frame shifts“ und „DNA cross-links“ sowie chromosomale Re-Arrangements dosisabhängig induzierbar, obwohl die Motilität noch keinerlei Veränderungen zeigte [90, 91]. Die Wahrscheinlichkeit einer Konzeption korreliert signifikant positiv zum 8-Oxo-dG-Spiegel im Ejakulat [92].

Während bei der durch Apoptose induzierten DNA-Fragmentation in der Regel nur Subpopulationen im Ejakulat betroffen sind, wirken sich oxidativer Streß und Bestrahlung auf nahezu alle Spermatozoen aus [93]. Wirkt das Hydroxylradikal auf die DNA ein, entsteht zunächst eine 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin-Verbindung, die später in einen Doppelstrangbruch mündet [94–96]. Solange der Doppelstrangbruch nicht vorliegt, kann ein solcher Schaden wahrscheinlich noch durch eine vollumfänglich funktionsfähige Eizelle repariert werden [97, 98].

Bestimmungsmöglichkeiten von DNA-Fragmentationen

Insbesondere im Rahmen der Apoptoseforschung wurden mehrere Testsysteme zum Nachweis von DNA-Veränderungen entwickelt und später auf Spermatozoen angewandt. Die Testaussagen unterscheiden sich zum Teil erheblich. Es ist dabei von außerordentlicher Wichtigkeit zu differenzieren, ob diese Tests das Vorhandensein tatsächlicher DNA-Fragmentationen (z. B. in situ nick translation assay, COMET-Assay unter neutralen Bedingungen und TUNEL-Assay [terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling assay]) oder eine erhöhte Suszeptibilität der DNA für Fragmentationen (z. B. SCSA [sperm chromatin structure assay], COMET unter alkalischen oder sauren Bedingungen, SCD [sperm chromatin dispersion test, Halosperm-Kit], single-cell electrophoresis und chromomycin A3-Test) anzeigen [58]. Interessant ist jedoch, daß Tests aus beiden Gruppen mit unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität am Spermatozoon DNA-Veränderungen nachweisen, die in positiver Korrelation zur männlichen Fertilität stehen. Der TUNEL-, SCSA-, und SCD-Test liefert vergleichbare Aussagen zur DNA-Fragmentation [99].

Nachweis vorhandener DNA-Fragmentationen

COMET-Assay

Der COMET-Assay quantifiziert Einzel- und Doppelstrangbrüche [100]. Fluoreszierender Farbstoff, der an DNA bindet, wird zur Markierung verwendet. Um die DNA-Fragmente zu visualisieren, erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung. Im elektrophoretischen Feld wandern Fragmente der DNA anders als intakte Abschnitte, sodaß kometartige Fluoreszenzbilder entstehen. Die Länge des Kometen und der Durchmesser der Zelle sowie einige andere Variablen werden herangezogen, um das Ausmaß der DNA-Fragmentation zu bestimmen [101]. Doppelsträngige DNA mit einzelnen Nicks verbleibt im Kopf des Kometen, während die Fragmente den Schweif bilden [102]. Demzufolge bildet sich mit zunehmender Doppelstrangbrüchigkeit ein längerer und intensiver fluoreszierender Kometenschwanz aus [103, 104]. Reproduzierbare Ergebnisse werden nur bei akkurater Standardisierung der Meßbedingungen erreicht. Normalwerte konnten bisher nicht aufgestellt werden (pers. Kommunikation mit N. P. Singh).

In-situ nick translation Assay

Der In-situ nick translation Assay quantifiziert die Inkorporation von biotinyliertem Deoxyuridin-Triphosphat (dUTP) in Bereichen von Einzelstrangbrüchen. Die Reaktion von dUTP mit der DNA wird durch Zugabe von DNA-Polymerase I vermittelt. Am Spermatozoon lassen sich somit endogene DNA-Schäden nachweisen [62]. Allerdings ist sein klinischer Wert eingeschränkt, da keinerlei In-vivo-Korrelation erhoben wurde [105]. Zudem ist dieser Test deutlich weniger sensitiv [90].

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling Assay (TUNEL)

Der TUNEL-Assay quantifiziert die Inkorporation von Deoxyuridin-Triphosphat an Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA in Anwesenheit des katalysierenden Enzyms, der terminalen Deoxynucleotidyl-transferase (TdT) [106]. Gebundenes dUTP kann via Fluoreszenzmikroskopie oder im FACS gemessen werden. Obwohl

spezifische Brüche der DNA nachweisbar werden, kann mit Hilfe des TUNEL-Assays nicht das Ausmaß eines DNA-Schadens pro Zelle erfaßt werden. Die mittels TUNEL gemessenen DNA-Fragmentationsraten korrelieren invers zur Konzentration [107]. Der klinische Wert des TUNEL-Tests spiegelt sich in der Tatsache wider, daß bei ICSI-Paaren unter Verwendung von Spermatozoen mit > 15 % TUNEL-Positivität eine 5,6%ige Schwangerschaftsrate gemessen wurde, aber bei den gleichen Paaren in der Wiederholung der ICSI im Falle eines TUNEL von < 6 % die Schwangerschaftsrate auf 44,4 % stieg [108]. Es besteht eine gute Vergleichbarkeit zum SCSA-Test [109].

Suszeptibilitätsbestimmungen

Sperm chromatin structure Assay (SCSA)

Der SCSA erfaßt die Suszeptibilität von Spermatozoen gegenüber einer Säuredenaturierung der DNA in situ [110]. Diese wird durch Färbung mit Akridinorange im FACS gemessen [111, 112]. Das Ausmaß einer DNA-Schädigung wird anhand des metachromatischen Wechsels von grüner Fluoreszenz (Bindung an Doppelstrang-DNA) zu roter Fluoreszenz (Bindung an Einzelstrang-DNA) quantifizierbar [113]. Ausgegeben wird der DNA-Fragmentationsindex DFI in Prozent. Repräsentiert wird die Population von Spermatozoen mit geschädigter DNA [55]. Zusätzlich werden Zellen mit stark gefärbter DNA (high DNA stainability cells, HDS) angegeben. Diese Subpopulation besteht aus Zellen, bei denen intakte Doppelstrang-DNA aufgrund einer fehlerhaften Histon-Protamin-Transition vermehrt anfärbbar werden [55]. Der DFI und die HDS korrelieren nicht miteinander und bilden daher unterschiedliche aberrante Spermatozoenpopulationen ab.

Der SCSA mißt quantitativ kontinuierlich das Ausmaß eines potentiellen DNA-Schadens und ist daher besser geeignet, Aussagen zum reproduktiven Potential eines Mannes zu liefern [114]. Insbesondere haben der DFI und die HDS einen geringeren Variationskoeffizienten als die klassischen Samenzellparameter [115].

Mit Hilfe des DFI kann unabhängig von den klassischen Variablen des SpermioGRAMMS das Zustandekommen einer Schwangerschaft *via naturalis* eingeschätzt werden [40]. Werte > 27–30 % sind mit einer signifikant erniedrigten Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft assoziiert [114, 116]. Die Aussagekraft des SCSA nimmt bei Anwendung auf die Verfahren der assistierten Reproduktion (IUI, IVF und ICSI) mit zunehmender Überwindung natürlicher Barrieren ab. Es besteht eine gute Vergleichbarkeit zum TUNEL-Test [109].

Akridinorange-Test

Akridinorange wird zur Bestimmung der DNA-Fragmentation auch dann einsetzbar, wenn die zu untersuchenden Zellen nur mit dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert werden können [117]. Diese Vereinfachung bedeutet jedoch eine subjektive Evaluation der Zellen. Insbesondere das graduelle Ausprägungsverhalten des gebundenen Akridinorange an die DNA im kontinuierlichen Spektrum von grün zu orange erschwert die exakte Differenzierung. Neben der schwierigen Farberkennung beeinflussen die Instabilität des Fluoreszenzsignals und heterogene Färbeergebnisse die Qualität des Testergebnisses [118]. Diese umfänglichen Schwächen empfehlen diese Untersuchungsmethode im Repertoire der DNA-Fragmentationsteste wenig, obwohl eine gute Korrelation zur

TUNEL-Methode besteht. Zudem ist die prädiktive Aussagekraft hinsichtlich der Fertilitätsbewertung des Mannes umstritten [119], obwohl eine negative Korrelation zur Motilität nachgewiesen wurde [41].

Sperm chromatin dispersion Test (SCD)

Der Chromatin-Dispersionstest wurde kürzlich als einfach zu handhabende und kostengünstige Methode zur Bestimmung der DNA-Fragmentation in ejakulierten Spermatozoen vorgestellt. Dabei können nur Spermatozoen mit intakter DNA den charakteristischen Halo nach Inkubation in wäßriger Agarose mit nachfolgender Säuredenaturierung ausbilden [120]. Für diesen Test wurden bisher weder Standardwerte noch dessen Vorhersagewert zum Eintritt einer Schwangerschaft publiziert.

Andere Testverfahren

DNA-Fragmentationen in ejakulierten Spermatozoen lassen sich an einzelnen DNA-Abschnitten auch mittels Elektronenmikroskopie erfassen [121]. Daneben wurde der Einsatz von ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) [122], der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [123] und die HPLC (high-performance liquid chromatography) zur Messung von 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin (8-Oxo-dG) beschrieben [124]. Die Bestimmung von 8-Oxo-dG ist neuerdings auch via ELISA möglich und damit einfacher zugänglich. Der Marker zeigt eine schwach negative Korrelation zur Spermienkonzentration. Dagegen konnte mit zunehmendem Nachweis von 8-Oxo-dG eine geringere Schwangerschaftswahrscheinlichkeit vorausgesagt werden. Zudem ist dieser Test unabhängig von anderen Lifestyle-Faktoren. Im Zusammenhang mit der relativ geringen intra-individuellen Variation des Nachweises von 8-Oxo-dG könnte dessen Bestimmung ein interessanter Biomarker der männlichen Fertilität sein [92].

Klinik der DNA-Fragmentation in Spermatozoen

Ein erhöhter Prozentsatz von ejakulierten Spermatozoen mit fragmentierter DNA wurde in der jüngeren Vergangenheit bei einer Reihe von Erkrankungen, Therapien oder auch nur im Zusammenhang mit anderen klinischen Symptomen, begleitenden Laborbefunden oder auch nur Lebensgewohnheiten wie z. B. Adipositas, Leukozytospemie und Rauchen nachgewiesen.

Adipositas

Die regelrechte Ausreifung gepackten Chromatins zeigt auch eine Abhängigkeit zum Körpergewicht. Infertilitätspatienten haben eine höhere Histon/Protamin-Ratio [125]. Patienten mit einem BMI > 25 kg/m² haben eine signifikant geringere Zahl von Spermien mit intaktem Chromatin als Normalgewichtige [7]. Kürzlich wurde im Rahmen eines EU-weiten Projektes zur Entwicklung der männlichen Fertilität in Deutschland gezeigt, daß subnormale SpermioGRAMMparameter mit erhöhtem BMI korrelieren (Publikation in Vorbereitung). Zudem finden sich unter den Infertilitätspatienten im eigenen Patienten-gut über 70 % Männer mit einem BMI > 24. Demzufolge scheint Adipositas möglicherweise die Ejakulatqualität zu beeinflussen, wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen vollständig unbekannt sind. Erste Untersuchungen am Diabetes-Tiermodell zeigen zudem, daß sogenannte „advanced glycation endproducts“ (AGE) sowohl am Spermatozoon als auch im Germinalepithel nachweisbar sind. Auf molekularer Ebene führt die per-

manente diabetische Stoffwechsellage via ROS-Produktion zur Aktivierung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und nachfolgender Signalwege [126]. Sowohl PARP und seine apoptotischen Spaltprodukte als auch atypisch gespaltenes PARP, wie es im Rahmen der Nekrose anfällt, konnten im ejakulierten Spermatozoon nachgewiesen werden [127].

Adnexitis und Leukozytospermie

Leukozyten finden sich im Ejakulat relativ häufig. Mit ihrer einzigartigen Ausstattung an Abwehrmechanismen tragen sie zum Erhalt des Immunprivilegs und der phagozytischen Clearance abnormaler Spermatozoen bei [128]. Infektionen des Genitaltraktes lassen sich anhand erhöhter Konzentrationen von Leukozyten nachweisen. Dies korreliert positiv mit der Frequenz unreifer Spermatozoen [129]. Alterationen der DNA sind dabei insbesondere in der Fraktion immaturer Spermatozoen nachweisbar [16]. Aktivierte Entzündungszellkaskaden mit elevierten Zytokinen könnten dabei zur direkten Interaktion in der Spermatogenese mit konsekutiver Ausbildung von DNA-Addukten und DNA-Fragmentation führen [130]. Plausibel erscheint jedoch auch eine intra- und posttestikulär vermittelte Schädigung via ROS-Generation aus untergehenden Leukozyten [131, 132]. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, daß auch bei systemischen Infekten, die mit hohem Fieber einhergehen, Fragmentationen der DNA gefunden werden [133]. Ätiologie und Ausmaß entzündungsassoziierter Induktion von DNA-Schäden durch Erreger wie Ureaplasma urealyticum sind nicht abschließend geklärt [132]. Nach den gültigen WHO-Grenzwerten sind Leukozytenkonzentrationen < 1 Mio/ml Ejakulat zulässig [134]. Kürzlich wurde jedoch unter Verwendung von TUNEL-Assays gezeigt, daß die DNA-Integrität auch bei Unterschreitung dieses Grenzwertes signifikant gefährdet ist [135].

Iatrogene Fragmentationsinduktion

Die verfügbaren konventionellen Aufbereitungsverfahren entziehen dem Spermatozoon seine physiologische Umgebung. Insbesondere die Auswirkungen der Zentrifugation mit Entfernung des antioxidativ wirksamen Seminalplasmas auf die Spermatozoenfunktion wurden herausgearbeitet. Auf molekularer Ebene konnte auch hier der schädigende Einfluß von ROS nachgewiesen werden [136]. Physiologischerweise werden durch das Seminalplasma freie Sauerstoffradikale mit verschiedenen Systemen abgefangen. Enzymatisch wirkende Radikalfänger sind Cu, Zn-Superoxiddismutase (SOD) und Katalase [137]. Zudem ist das Seminalplasma reich an Ascorbat, Ureat, Albumin, Glutathion und Taurin [138, 139]. Die Entfernung eines solch effizienten Radikalschutzes muß daher negative Auswirkungen haben. Antioxidativer Schutz wird bereits während der Nebenhodenpassage wirksam, weshalb TESE-Spermien gleichermaßen gefährdet sind [140]. Auch die Kryokonservierung birgt potentielle Angriffspunkte. Konnte in einer Studie eine Erhöhung der DNA-Fragmentationsraten nach der Kryokonservierung testikulärer Spermatozoen nicht bewiesen werden [141], zeigen andere Untersuchungen eine klare Zunahme der DNA-Fragmentationen nach dem Einfrieren [142]. Der Verzicht auf ein Kryoprotektivum führte zu einer signifikanten Zunahme fragmentierter DNA mit der Anzahl der Wiederholungen der Einfrier- und Auftauzyklen im Vergleich zur nativen Probe [143]. Allerdings wurde auch gezeigt, daß blitzartiges Einfrieren ohne Kryoprotektivum die Methode mit geringster DNA-Frag-

mentationsinduktion war [144]. Die Zugabe von Vitamin E und C oder von Hydroxytoluen bewirkt zwar eine Verbesserung der Motilität und der Akrosomenreaktion, hatte aber keinen Einfluß auf die Chromatinstabilität [145].

Ursache für die z. T. sehr widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse könnte sein, daß verschiedene Kollektive untersucht wurden. Die individuelle Suszeptibilität für Kryoschäden variiert stark und ist bei Infertilitätspatienten erheblich mehr ausgeprägt. Bedingt wird dies u. a. durch die erhöhte Irregularität der Chromatinpackung bei Infertilitätspatienten, die schlußendlich zur erhöhten Empfindlichkeit des paternalen Genoms gegenüber iatrogenen Einflüssen führt [146].

DNA-Schäden bei Tumorpatienten

Leukämien, Lymphome und Hodenkarzinome sind im reproduktiven Alter des Mannes die am häufigsten auftretenden Malignome [147]. Insbesondere die Inzidenz von Hodenkarzinomen hat mit einer lokoregionären Fokussierung dramatisch zugenommen [148–151]. Die verfügbaren Therapieoptionen konnten zugleich dramatisch verbessert werden. Trotzdem ist mit einer nicht immer nur passageren Azoospermie und therapieabhängigen Induktion von DNA-Fragmentationen zu rechnen [152]. In dieser Situation rücken Fragen der posttherapeutischen Fertilität zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses der Patienten [153–161].

In der Regel ist heute auch bei dringlicher Interventionsindikation eine kurzfristige Anlage eines Kryodepots prinzipiell möglich. Mit der prätherapeutischen Ejakulatasservation kann zumindest der Versuch unternommen werden, eine Fertilitätsreserve anzulegen. Die Malignom-erkrankung an sich führt jedoch bereits zu einer deutlichen Verschlechterung der Ejakulatqualität mit deutlich reduzierter Kryotoleranz [162–164] und signifikant erhöhten DNA-Fragmentationsraten [165], wozu widersprüchliche Studienergebnisse vorliegen [109, 166]. Die Defekte sollen dabei ursächlich durch die entarteten Germinalzellen vermittelt werden [167]. Bei ca. 52 % der Hodentumorpatienten und bei 40 % der Patienten mit anderen Malignomen findet sich eine verminderte Spermatozoenkonzentration bei Diagnosestellung [168]. Trotz der deutlich reduzierten Auftauqualität kryokonservierter Ejakulate von Malignompatienten wurden bereits Lebendgeburten berichtet [169]. Die Auftauqualität humaner Spermatozoen läßt sich heute experimentell verbessern, indem vor dem Einfrierprozeß mittels molekularer Spermatozoenselektion im Magnetfeld (Annexin-V-MACS) nur solche Zellen aus der Zellpopulation selektiert wurden, die über eine intakte Membran und somit geringere Frequenz der DNA-Fragmentation verfügen [170].

Chemotherapie und Bestrahlung

Chemotherapeutika wie Fludarabin, Zyklophosphamid und Busulphan wirken direkt toxisch und bewirken bei Testosterondefizienz eine Volumenabnahme, Oligozoospermie, elevierte FSH- und LH-Spiegel [13]. Ausgeprägte DNA-Fragmentationen ejakulierter Spermatozoen werden schon nach einmaliger Applikation beobachtet und können über Jahre persistieren [109, 171–173]. Dabei werden DNA-Fragmentationen über die kritische Schwelle von 27 % hinaus auch bei mindestens einem Drittel der Patienten mit prätherapeutischer Normozoospermie über 1–2 Jahre beobachtet [109].

Die Germinalzellen des Hodens sind strahlensensibel. Unmittelbar nach Bestrahlung werden Strangbrüche nachweisbar, die über Jahre persistieren können [109]. Trotzdem konnte keine Zunahme genetischer Defekte oder kongenitaler Malformationen bei Konzeption nach stattgehabter Radiotherapie nachgewiesen werden [174].

Lifestyle-Faktoren und Umwelteinflüsse

Nikotin-getriggerte DNA-Fragmentation

Bekanntermaßen haben die zahlreichen Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches in vitro und in vivo mutagene Auswirkungen. Hinsichtlich der Beeinflussung der Ejakulatqualität ist insbesondere eine Abnahme der Zellzahl und der Motilität bei gleichzeitiger Zunahme unreifer Zellen beobachtet worden [175, 176]. Auf DNA-Ebene finden sich in direkter Korrelation Strangbrüche. Werden der SCSA- oder TUNEL-Test eingesetzt, lassen sich signifikant höhere Fragmentationsraten bei Rauchern nachweisen [35, 177–179]. Allerdings finden sich widersprüchliche Aussagen zur Korrelation von 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin-Verbindungen und Zigarettenkonsum [92, 180].

Inwiefern Inhaltsstoffe des Rauches oder die bei Rauchern vermehrt nachweisbaren Leukozyten im Ejakulat ursächlich verantwortlich sind, ist nicht geklärt. Denkbar ist eine durch Rauchen vermittelte Entzündungsreaktion, in deren Gefolge Leukozyten attrahiert werden. Inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-8 bewirken ursächlich das Vorhandensein von Leukozyten im Ejakulat [131]. Aktivierte Leukozyten können mit konsekutiver Überforderung der organeigenen antioxidativen Kapazität sehr hohe Spiegel von ROS generieren [181]. Das Seminalplasma von Rauchern zeichnet sich zudem durch geringere antioxidative Kapazität aus [86]. Zudem ist das Zigarettenrauchen bei Männern direkt mit oxidativen

Schäden an der DNA der Spermatozoen assoziiert [86, 177, 179], darüber hinaus finden sich häufiger morphologisch abnormale Zellen [182].

Neue Erkenntnisse weisen klar aus, daß maternales Rauchen in der Schwangerschaft mit einer deutlich reduzierten Ejakulatqualität des männlichen Nachkommens und ggf. mit weiteren Risiken wie Hodenkarzinomen, Epi- oder Hypospadien und Kryptorchismus assoziiert sein kann [183–185]. Bereits passives Rauchen der Schwangeren ist mit reduzierten Schwangerschafts- und Implantationsraten sowie einer beeinträchtigten Embryoqualität assoziiert [186].

Alkohol, Kaffee und Drogen

Moderater Alkohol- und Kaffeegenuß scheinen keinen signifikant negativen Einfluß auf die Integrität ejakulierter Spermatozoen zu haben [92]. Werden jedoch mehr als 3 Tassen Kaffee täglich konsumiert, besteht zumindest einer Studie zufolge die Gefahr der Zunahme von Doppelstrangbrüchen [187]. Der Konsum von Kokain führt ebenso zu Schäden an der DNA [188]. Bei eigenen Patienten fanden sich bereits nach unregelmäßigem Rauchen von Haschisch Raten von über 62 % fragmentierter DNA in ejakulierten Spermatozoen. Untersuchungen zu anderen Drogen liegen noch nicht vor.

Heilmittel und Arbeitsstoffe

Der weltweit zunehmende Einsatz alternativer Heilverfahren und Substanzen wie Johanniskraut, Gingko biloba und Echinacea purpura zeigt mutagene Einflüsse an Spermatozoen [189]. Die weiterhin diskutierte Vermittlung durch Arbeitsstoffe oder Umweltgifte ist nicht abschließend beurteilbar [190]. Phytoöstrogene bewirken zumindest im Tiermodell eine Zunahme der Apoptose [191].

Tabelle 1: Korrelationen zwischen DNA-Schädigung und männlicher Fertilität in vivo

Autor/Jahr	Studienpopulation		Technik	Parameter	Ergebnis		
	Spender	Infertilitätspatienten			Spender	Infertilitätspatienten	Signifikanz
Hughes et al., 1996 [103]	n = 20	Norm (n = 20) Oligo (n = 20)	Comet	DF	81,7 ± 24,5	79,9 ± 42,3 85,1 ± 28,6	> 0,05 > 0,05
Hughes et al., 1996 [103]	n = 20	Norm (n = 20) Oligo (n = 20)			Nach Exposition mit H ₂ O ₂	81,7 ± 24,5	56,1 ± 68,3 45,0 ± 36,7
Kodama et al., 1997 [87]	n = 17	n = 19	HPLC	OhdG	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	< 0,05
Shen et al., 1999 [192]	n = 54	n = 60	HPLC	OhdG	10,03	4,79	< 0,001
Spano et al., 2000 [36]	215 neu untersuchte Männer		SCSA	DFI	Fekundabilität sinkt, wenn > 20 % Keine Schwangerschaft, wenn > 40 %		
Gandini et al., 2000 [193]	n = 23	OAT (n = 29) Hodgkin's (n = 28) TC (n = 30)	TUNEL	DF	2,5 ± 1,2	11,0 ± 4,3 11,3 ± 4,9 11,3 ± 4,4	< 0,001
Zini et al., 2001 [41]	n = 7	n = 33	AO	DD	25,4 ± 3,0	10,2 ± 2,3	0,028 DD und DF: (r = 0,71; p < 0,0001)
Zini et al., 2002 [194]		Norm (n = 13) Non-Azo (n = 75)	TUNEL	DF	13,3 ± 2,5	27,6 ± 2,5	0,016
Saleh et al., 2002 [79]	n = 16	Norm (n = 21) Non-Azo (n = 71)	AO	DD		11,1 % ± 3,7 23,1 % ± 1,8	< 0,001
			SCSA	DFI	15 (11,20)	23 (15,32) 28 (18,41)	0,002* 0,27*

AO = Akridinorange; DD = DNA-Denaturation; DF = DNA-Fragmentation; DFI = DNA-Fragmentationsindex; HPLC = high-performance liquid chromatography; Non-Azo = non-Azoospermie (Nachweis u. a. multipler Störungen); Norm = Normozoospermie; OAT = OhdG = 8-hydroxydeoxyguanosin; Oligoasthenoteratozoospermien; Oligo = Oligozoospermie; SCSA = sperm chromatin structure; TC = testikuläres Karzinom.
*Verglichen mit Spendern

Konsequenzen hoher DNA-Fragmentationen humaner Spermatozoen

Männliche Infertilität

Zunehmend kristallisiert sich heraus, daß jedwede Störung der Organisation des paternalen Genoms während der Spermatogenese negativ mit der fertilen Kapazität korreliert ist (Tab. 1). Derzeit scheint gesichert zu sein, daß eine wie auch immer geartete Störung der Chromatinstruktur mit männlicher Subfertilität einhergeht, wenn gleich Konzentration, Motilität und sogar Morphologie im Ejakulat nicht unbedingt von der Norm abweichen müssen. Die mittels SCSA ermittelte Frequenz intakter DNA war in einer prospektiv angelegten Studie der beste prädiktive Parameter [40]. Zahlreiche Studien haben unter Anwendung nahezu aller verfügbaren Testmethoden gezeigt, daß Infertilitätspatienten jeweils höhere Raten fragmentierter DNA aufwiesen. Die DNA-Fragmentation erweist sich zudem als unabhängiger, mit den konventionellen Verfahren nicht zu detektierender prädiktiver Parameter [195–198]. Von einer normwertigen Samenprobe kann ausgegangen werden, wenn nicht mehr als 30 % der Zellen Anzeichen für eine erhöhte Suszeptibilität im SCSA-Test aufweisen [40].

Anomalien der Chromatinorganisation spielen wahrscheinlich auch bei spezifischen Spermatogenesestörungen eine Rolle (Maturationsarrest). So wurden höhere DNA-Fragmentationsraten in testikulären Spermatozoen von Patienten mit komplettem Arrest gefunden [40, 66]. Neben der primären, zur Fragmentation der DNA führenden Ausreifungsstörung erweisen sich Spermatozoen von Infertilitätspatienten als verstärkt empfindlich gegenüber Bruchinduktionen, z. B. durch H₂O₂ oder Strahlung [100]. In eingeschränktem Umfang konnte dies durch Applikation von Ascorbat oder Alpha-Tocopherol inhibiert werden [199].

Korrelation der DNA-Fragmentation mit konventionell erhobenen Samenzellparametern

Eine Übersicht zu publizierten Korrelationen der Standardsamenzellparameter mit der Frequenz nachweisbarer DNA-Fragmentationen gibt Tabelle 2. Spermatozoen aus Ejakulaten, die eine subnormale Konzentration, Motilität oder Morphologie aufweisen, haben jeweils erhöhte Raten fragmentierter DNA. Denaturierte DNA in Spermatozoen zeigt dabei den geringsten Variationskoeff-

izienten, gefolgt von Motilität und Konzentration ermittelt aus zwei konsekutiven Proben infertiler Männer [41].

Bedeutung der DNA-Fragmentation für die Methoden der assistierten Reproduktion

Der weltweit zunehmende Einsatz der assistierten Reproduktion bei zunehmend abgesicherter Evidenz der Notwendigkeit der Beachtung von inhärenter und ggf. iatrogen zugefügter DNA-Fragmentation erfordert die Re-Evaluation aller in der ART eingesetzten Verfahren. Erste Studien zum Thema liegen vor [171, 202, 203]. Einen Überblick zur Korrelation von DNA-Fragmentation mit dem Erfolg der assistierten Reproduktion zeigt Tabelle 3.

Intrauterine Insemination

Die intrauterine Insemination ist weit verbreitet und zeichnet sich durch die geringste Beeinflussung der natürlichen Konzeption unter Aufbereitung des Ejakulates aus. Die Erfolgsraten streuen stark zwischen 5 % und 66 % pro Zyklus [202, 209], wobei die in den zugrundeliegenden Untersuchungen nicht erfaßte DNA-Fragmentation möglicherweise verursachend eingewirkt hat. Mittels TUNEL-Assay wurde ermittelt, daß in Fällen einer erfolgreichen Schwangerschaft die Fragmentationsrate im Mittel unter 7,3 % lag, während keine Schwangerschaft bei Fragmentationsraten größer 12 % eintrat. Mit steigenden Fragmentationsraten werden zudem Fehlgeburten häufiger [206].

In-vitro-Fertilisation (IVF)

Traditionell wurden schlechte Embryoqualitäten nach IVF als Eizellproblem angesehen. Standardsamenzellparameter sind insgesamt ungeeignet, eine erfolgreiche Schwangerschaft vorherzusagen, sodaß alsbald dem paternalen Genom zugrunde liegende Faktoren als verursachend vermutet wurden [207, 210]. Anhand der Messung der Fragmentation konnte die direkte positive Korrelation zu den Ergebnissen von IVF und ICSI hergestellt werden [211]. Unmittelbar beeinflusst wird die Entwicklung bis zur Blastozyste [212, 213]. Schäden der Spermien-DNA korrelieren signifikant negativ mit einer erfolgreichen klinischen Schwangerschaft [200].

Intrazytoplasmische Injektion von Spermatozoen in die Eizelle (ICSI)

Weil bei einer ICSI nahezu alle biologischen Selektionsbarrieren ausgeschaltet werden, ist der Erfolg nur mit

Tabelle 2: Korrelation von DNA-Schaden und Spermatozoenqualität

Autor/Jahr	Studienpopulation		Technik	Parameter	Ergebnis*			
	Spender	Patienten			Konzentration	Morphologie	Motilität	Fertilisationskapazität
Kodama et al., 1997 [87]	n = 17	n = 19	HPLC	8-Oxo-dG	-0,49 (0,001)			
Shen et al., 1999 [192]	n = 54	n = 60	HPLC	8-Oxo-dG	-0,42 (< 0,001)	0,38 (< 0,001)	-0,24 (< 0,01)	
Irvine et al., 2000 [105]	n = 12	n = 29	Comet NT	DF DF	-0,54 (0,001) -0,66 (< 0,0001)	-0,37 (0,026) -0,38 (0,016)	-0,37 (0,026) -0,38 (0,016)	
Chan et al., 2001 [39]		n = 39	Comet	DF			0,493 (< 0,05)	
Tomlinson et al., 2001 [200]		n = 140	NT	DF	-0,24 (0,01)		-0,20 (0,004)	
Saleh et al., 2003 [201]	n = 16	n = 92	SCSA	DFI	-0,31 (0,001)	-0,040 (< 0,0001)	-0,47 (< 0,0001)	

8-Oxo-dG = 7-Hydro-8-Oxo-2'-Deoxyguanosin; DF = DNA-Fragmentation; HPLC = high-performance liquid chromatography; NT = in situ nick translation; SCSA = sperm chromatin structure. * Verglichen mit Spendern

Tabelle 3: Korrelation von DNA-Fragmentation und Erfolg der assistierten Reproduktion

Autor/Jahr	Studienpopulation*	ART-Prozedur	Technik	Parameter	Ergebnis [#]		
					Fertilisationsrate	Embryonalentwicklung	Schwangerschaft
Sun et al., 1997 [35]	n = 298	IVF	TUNEL	DF	-0,16 (0,05)	-0,20 (0,02)	
Lopes et al., 1998 [34]	n = 150	ICSI	TUNEL	DF	-0,23 (0,0117)	Keine Korrelation	
Larson et al., 2000 [204]	n = 24	ICSI	SCSA	DFI			15,4 ± 4,6 vs. 31,3 ± 3,2; p = 0,001 ⁺ ; keine Schwangerschaft, wenn > 27 %
Host et al., 2000 [196]	Oligo (n = 50)	IVF	TUNEL	DF	-0,61 (< 0,01)		
Tomlinson et al., 2001 [200]	Oligo (n = 50)	ICSI			0,06 (> 0,05)		
Tomlinson et al., 2001 [200]	n = 140	IVF	NT	DF		-0,20 (0,004)	2,0 ± 0,3 vs. 4,0 ± 0,7 ⁺ ; p = 0,02
Raman et al., 2001 [205]	n = 15	IVF	Comet	DF	0,567 (< 0,05)		
Duran et al., 2002 [206]	n = 119	IUI	TUNEL	DF			7,3 ± 3,5 vs. 13,9 ± 10,8 ⁺ ; p = 0,044; keine Schwangerschaft, wenn > 12 %
Tomsu et al., 2002 [207]	n = 40	IVF	Comet	DF		-0,567 (< 0,044)	
Morris et al., 2002 [208]	n = 60	ICSI	Comet	DF		-12,77 (0,003) mit 100 % Embryonteilungsrate	
Saleh et al., 2003 [201]	n = 16	IUI (n = 19) IVF (n = 10) ICSI (n = 4)	SCSA	DFI	-0,70 (0,03)	-0,70 (0,03)	p < 0,0001

ART = assistierte Reproduktion; DF = DNA-Fragmentation; DFI = DNA-Fragmentationsindex; ICSI = intrazytoplasmische Injektion von Spermatozoen in Eizellen; IUI = intrauterine Insemination; IVF = In-vitro-Fertilisation; NT = in situ nick translation. * Zahl der eingeschlossenen Patienten; [#] r = Korrelationskoeffizient und P-Werte in Klammern; ⁺ Vergleich Schwangerschaften vs. keine Schwangerschaften

geringer Aussagekraft anhand der klassischen Spermiogrammvariablen vorhersagbar. Maßgeblichen Einfluß auf den Ausgang der Prozedur hat die funktionelle Kompetenz des paternalen Genoms. Allerdings bedeutet das Vorliegen von Fragmentationen nicht das Ausbleiben von Fertilisation und die Ausbildung von Vorkernstadien [90]. Prinzipiell besteht jedoch eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Fragmentationen und der Schwangerschaftsrate nach ICSI [34, 204, 214]. Die korrekte Pakung des Chromatins um das Protamingerüst wird als entscheidend für eine optimale Entfaltung des männlichen Genoms angesehen. Obwohl im Rahmen einer ICSI-Prozedur nach Morphologie und Motilität subjektiv selektiert wird, werden derzeit Erfolgsraten von nicht höher als 65 % erzielt [215]. Möglicherweise spielen Schäden an der DNA auch hier eine Rolle [216, 217]. Mittels SCSA wurde ein Versagen nach IVF und ICSI immer dann festgestellt, wenn der DFI 27 % überschritt [114].

Testikuläre Spermatozoenextraktion

Chirurgisch extrahierte testikuläre Spermatozoen werden häufig zur ICSI verwandt. Solche Spermatozoen weisen besonders ausgeprägt Fragmentationen auf, womöglich durch das lange Persistieren im Hoden vermittelt [218]. Allerdings schneiden testikuläre Spermatozoen besser als epididymale ab, woraus der Schluß gezogen werden könnte, daß immature Spermatozoen besonders suszeptibel für äußere Einflüsse sind. Im Falle einer obstruktiven Azoospermie wurde empfohlen, eher testikuläre als epididymale Spermatozoen zu verwenden [219].

Embryoqualität

Die im Ejakulat meßbare Fragmentationsrate korreliert negativ mit der weiteren Embryonalentwicklung nach IVF und ICSI [220]. Die an Histone gebundene DNA des männlichen Pronukleus wird während der frühen Embryonalentwicklung aktiv abgelesen [221]. Ausgeprägte Störungen können bis zum frühen Tod des Embryos führen [213].

Auswirkungen auf die Nachkommen

Anomalien in der Chromatinstruktur können die Initiation und Regulation der paternalen Genaktivität und somit die Embryonalentwicklung beeinflussen [221]. Inwiefern sich solche Störungen auswirken können, hängt u. a. von der Reparaturkapazität der Oozyte ab.

Infertilität der Nachkommen

Eine wichtige Konsequenz einer erhöhten DNA-Fragmentation in Spermien für die Nachkommen ist deren potentielle Infertilität [222]. Zu erwarten ist diese hauptsächlich bei Y-chromosomalen Formen (Mikrodeletionen) der Infertilität [223].

Im nicht-rekombinierenden Areal des Y-Chromosoms finden sich die als Azoospermiefaktoren bezeichneten Regionen AZF-a, -b und -c, mit wichtigen Genen für die Spermato-genese [224]. Deletionen in diesen Gebieten führen zu spezifischen testikulären Phänotypisierungen. So führen Deletionen in AZFa zu Sertoli cell only-Syndromen; in AZFb entsteht ein Spermato-genese-arrest im Pachytänstadium. Bei Mikrodeletionen in der Region

AZFc wird die Spermatogenese auf der Höhe der Spermatiden arretiert [225]. Diese Y-Chromosom-Mikrodeletionen entstehen *de novo*, man findet sie kaum bei Vätern betroffener Patienten [226].

Reparatur und Prävention der DNA-Fragmentation

- **Intraoozytäres Remodelling des paternalen Genoms:**
Fertilisierte Oozyten verfügen in begrenztem Umfang über Reparaturkapazitäten, die nach der Spermatozoenpenetration bis zum Beginn der nächsten S-Phase wirksam werden können [98, 227]. Die Auswirkungen geschädigter Spermatozoen-DNA auf die Nachkommen werden somit direkt von der Eizelle mitbestimmt [97, 228].
- **Transitionsproteine:**
Transitionsproteine von Säugern werden in hohem Maße während der Spermio-genese parallel zum Chromatinremodelling exprimiert. Letzteres umfaßt Reparaturen und die Insertion sog. Nicks. TP1 kann die Reparatur stimulieren, was am Beispiel UV-induzierter Einzelstrangbrüche experimentell belegt wurde. Im weiteren wurde geschlußfolgert, daß TP1 eine Rolle in der Reparatur genotoxischer Insulte zukommt [229, 230]. Reparaturenzyme haben eine entscheidende Bedeutung bei der Reparatur von Fehlern der Meiose [231].
- **Prävention der Fragmentationsinduktion:**
Zahlreiche Untersuchungen haben auf molekularer Ebene den deletären Einfluß verschiedener Aufbereitungsverfahren bestätigt. Insbesondere einfache Waschschr-ite, die Zentrifugation und die Kryokonservierung können zur Induktion von DNA-Fragmentationen führen.

Die direkte Ejakulation in Waschmedien wurde mit dem Ziel eingeführt, den Anteil von Spermatozoen ohne Antikörperbindung zu erhöhen und somit die Erfolgsraten der ART zu verbessern [232]. Parallel zeigte sich eine Reduktion von DNA-Fragmenten. Indirekt wurde gefolgert, daß via Verhinderung von Bakterieneinflüssen und ROS-Einwirkung die Fertilisationsraten verbessert werden können [233].

Unter Verzicht auf eine Zentrifugation konnte im Rahmen der IVF der Swim-up zur Verbesserung der Erfolgsraten beitragen [234]. Durch Nutzung der Gravitationskraft und Progressivmotilität erreicht die Glaswollfiltration bei adäquater Materialwahl ebenfalls sehr gute Aufreinigungen von Spermatozoen mit intakter DNA [235].

Parallel wurden die Zentrifugationsmethoden dahingehend optimiert, inhärente iatrogene DNA-Schäden zu verhindern. Die Anreicherung morphologisch ausgereifter Spermatozoen mit hoher DNA-Integrität mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde als Standardverfahren etabliert [236, 237]. Die Dichtegradientenzentrifugation erlaubt eine signifikante Anreicherung von Spermatozoen mit intakter DNA [238, 239]. In der Kombination mit Swim-up werden Spermatozoen mit höchster Qualität aufgereinigt. Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, daß diese Aufbereitung zu einer signifikanten Zunahme der Motilität, der Integrität des mitochondrialen Membranpotentials und einer Deaktivierung der Caspasen führt (Publikation in Vorbereitung).

Dieser nachhaltige Normalisierungseffekt effizienter Separationsverfahren scheint andererseits ursächlich dafür verantwortlich zu sein, daß die Standardsamenzell-

parameter nicht geeignet sind, prognostische Aussagen zu Fertilisierung und Schwangerschaft zu treffen [200].

Mit dem Einsatz der Methoden der assistierten Reproduktion und der damit verbundenen Umgehung natürlicher Selektionsgrenzen nimmt die Gefahr der Befruchtung einer Einzelle mit einem Spermatozoon mit fragmentierter DNA zu. Verbunden damit sind trotz primärer Fertilisierung die ausbleibende Embryonalentwicklung und normal ablaufende Schwangerschaft.

In der jüngeren Vergangenheit wurden mehrere neue Methoden der Spermatozoenseparation entwickelt, die es ermöglichen sollen, Spermatozoen mit intakter DNA, Struktur und Funktion aus dem Ejakulat anzureichern. Mittels der Annexin V-basierten Separation von Spermatozoen im Magnetfeld [240, 241] oder sogenannter molekularer Glaswolle [242], der Bindung an Hyaluronsäure [243, 244], der elektrophoretischen Auftrennung [245, 246] oder der manuellen Selektion unter sehr starker Vergrößerung [247–249] konnten bereits erste Erfolge erzielt werden.

Die Selektion mittels Annexin V führt zu verbesserten Befruchtungsraten im Rahmen von IVF und ICSI bei Probanden [203] und Patienten (Publikation in Vorbereitung) und kann sehr einfach mit konventionellen Selektionsmethoden kombiniert werden [202]. Auch vor der Kryokonservierung bietet sich eine Annexin V-Separation an [250].

Weiters wurde eine positive Beeinflussung der Motilität mittels In-vitro-Kultur für 48–72 h bei 37 °C beschrieben [251]. Zudem wurde eine Abnahme von Einzelstrangbrüchen bei obstruktiver Azoospermie nach Kultur über 3 Tage erzielt [251]. Ebenso konnte bei unreifen testikulären Spermatozoen mittels Kultur für 48 h die Zahl TUNEL-negativer Spermatozoen erhöht werden [252].

Unter der Annahme der posttestikulären Vermittlung von DNA-Schäden durch ROS wurde der präventive Effekt der Zugabe von Antioxidantien untersucht. In vitro gelingt eine Prävention von Bestrahlungsschäden durch Zugabe von Ascorbat, alpha-Tocopherol und Urat [253]. Isoflavone (Genistein, Equol) zeigen gegenüber diesen Substanzen bereits in sehr niedriger Dosierung überlegene protektive Eigenschaften, womit diesen oder neuen Substanzen möglicherweise eine größere Bedeutung zukommen wird [254].

Aufgrund der klar ausgewiesenen negativen Beeinflussung der Spermatozoenqualität und der Gesundheit insbesondere männlicher Nachkommen sollte eine unbedingte Abstinenz von aktivem und auch passivem Rauchen empfohlen werden. Hingegen ist der Einfluß von Drogen bzw. der Anwendung traditioneller Heil- und Hilfsmittel nicht genau bekannt. Wenn möglich, sollte jedoch die Vermeidung jedweder Noxen angestrebt werden. Die Belastung durch Arbeitsstoffe muß individuell geprüft werden.

Erfahrungen

Die Organisation des Chromatins im ejakulierten Spermatozoon ist hochkomplex. Grundlage für eine ordnungsgemäße Dekondensation, die ihrerseits Garant für die Ausbildung gesunder Nachkommen ist, ist die voll-

ständig ungestört ablaufende Verpackung des paternalen Genoms und der Schutz vor post-testikulären Beschädigungen.

Die Integrität der DNA im Spermatozoon stellt heute einen eigenständigen Parameter der männlichen Fertilität dar. Dieser kann mit zahlreichen neuen Tests gemessen werden. So lassen sich DNA-Fragmentationen quantifizieren und mit den in großen Untersuchungen aufgestellten Schwellenwerten die individuelle fertile Kapazität in vivo und in vitro besser abschätzen. Umfangreiche Evidenz besteht bisher jedoch nur für den SCSA-Test.

Hinweise für die Praxis

Der Stellenwert der traditionellen Ejakulatparameter in der Diagnostik der männlichen Infertilität wird anhaltend seit mehr als 60 Jahren diskutiert. Das klassische Spermogramm liefert in erster Instanz eine prognostische Information für das kinderlose Paar, wenngleich diese Parameter keine absoluten Schwellen anzeigen. Neue Tests, die die Spermatozoonfunktion mit Relation zum natürlichen Geschehen messen können, wurden eingeführt: die Messung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der DNA-Fragmentation. Die Messung der DNA-Fragmentation gewinnt aufgrund ihrer positiven Korrelation zu den Ergebnissen der assistierten Reproduktion zunehmend an Bedeutung. Von 1996 bis 2002 erhöhte sich der Anteil von ART-Behandlungen um 78 %, sodaß zunehmend Kinder mit Hilfe der ART geboren werden. Verschiedene Testsysteme wurden bisher mit Erfolg etabliert. Die allgemeine Akzeptanz der Erfassung der Integrität des paternalen Erbgutes im Ejakulat steht jedoch aufgrund der Komplexität und Heterogenität der Tests noch aus.

Literatur:

1. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Hum Reprod* 1991; 6: 811–6.
2. Braehler E, Stöbel-Richter Y, Glander HJ. Zur Epidemiologie gewollter und ungewollter Kinderlosigkeit in Ost- und Westdeutschland. *Reproduktionsmedizin* 2001; 17: 157–62.
3. Templeton A, Fraser C, Thompson B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. *BMJ* 1990; 301: 148–52.
4. WHO. WHO Task force on the Diagnosis and Treatment of Infertility. Towards more objectivity in diagnosis and management of male fertility. Results of a World Health Organization multicenter study. *Int J Androl* 1987 (Suppl 7).
5. Nieschlag E, Behre HM. *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1996.
6. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E, Jorgensen N, Andersson AM, Krarup T, Keiding N, Skakkebaek NE. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum Reprod* 2000; 15: 366–72.
7. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; 27: 450–2.
8. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International* 2005; 95: 503–7.
9. Matorini M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci* 2006; 11: 1491–9.
10. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8: 11–29.
11. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 428–32.
12. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 1): 33–44.
13. Chatterjee R, Haines GA, Perera DM, Goldstone A, Morris ID. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* 2000; 15: 762–6.
14. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002; 17: 1811–9.
15. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999; 61: 393–9.
16. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78: 319–29.
17. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912–21.
18. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 108.
19. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–8.
20. Schlegel PN, Girardi SK. Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 709–16.
21. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Deutsche Gesellschaft für gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin, Bundesverband Reproduktionsmedizinischer Zentren Deutschlands. *Deutsches IVF Register Jahrbuch* 2004. 2005.
22. Society for Assisted Reproductive Technology, and American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2004; 81: 1207–20.
23. Ludwig M, Katalinic A. Die deutsche ICSI-Follow-up-Studie – Zusammenfassung der Ergebnisse publizierter Arbeiten und Einordnung in die aktuelle Studienlage. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006; 2: 151–62.
24. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1338–44.
25. Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998; 30: 33–9.
26. Hammadeh ME, Bernardi A, Zeginiadou T, Amer A, Schmidt W. Relationship between nuclear chromatin decondensation (NCD) in vitro and other sperm parameters and their predictive value on fertilization rate in IVF program. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 301–5.
27. Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 1989; 10: 89–98.
28. Nagvenkar P, Zaveri K, Hinduja I. Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2005; 84: 925–31.
29. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6: 979–82.
30. Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 370–5.
31. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; 5: 1413–9.

32. Henkel RR, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81: 965–72.
33. O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 2005; 65: 16–22.
34. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528–32.
35. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602–7.
36. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43–50.
37. Evenson DP, Jost L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol* 1994; 42 (Pt B): 159–76.
38. Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005; 84: 130–40.
39. Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chana SR, King A. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 186–92.
40. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039–49.
41. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674–7.
42. Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005; 434: 583–9.
43. Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986; 105: 1–65.
44. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000; 45: 215–25.
45. Pienta KJ, Coffey DS. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci* 1984; 1 (Suppl): 123–35.
46. Finch JT, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1897–901.
47. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569–74.
48. van Holde K, Zlatanova J. What determines the folding of the chromatin fiber? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10548–55.
49. Loir M, Lanneau M. Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 1984; 86: 262–72.
50. Ward WS, Coffey DS. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 20–5.
51. Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* 1994; 15: 139–44.
52. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31–7.
53. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 337–49.
54. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; 16: 80–7.
55. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25–43.
56. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037–46.
57. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202–5.
58. Alvarez JG. The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Hum Reprod* 2005; 20: 2365–7.
59. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993; 37: 109–28.
60. McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 268–79.
61. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006; 27: 890–8.
62. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864–7.
63. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355–65.
64. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245–54.
65. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38–47.
66. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 757–62.
67. Berensztejn EB, Sciara MI, Rivarola MA, Belgorosky A. Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5113–8.
68. Jurisicova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF, Varmuza S. DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cgamma gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 323–30.
69. Gillot I, Jehl-Pietri C, Gounon P, Luquet S, Rassoulzadegan M, Grimaldi P, Vidal F. Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 3027–35.
70. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinol* 1997; 138: 2081–8.
71. Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 297–308.
72. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350–5.
73. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997; 56: 1020–4.
74. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, Beebe SJ. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 825–34.
75. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 2005; 83 (Suppl 4): 1106–12.
76. Francavilla S, D'Abrizio P, Rucci N, Silvano G, Properzi G, Straface E, Cordeschi G, Necozone S, Gnessi L, Arizzi M, Ulisse S. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2692–700.
77. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061–7.
78. De Iuliis GN. Definitive evidence for nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1968–75.

79. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 23: 737–52.
80. Warren JS, Johnson KJ, Ward PA. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol Immunopathol Res* 1987; 6: 301–15.
81. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67: 1115–20.
82. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13: 1429–36.
83. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851–62.
84. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835–50.
85. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497–506.
86. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351: 199–203.
87. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; 68: 519–24.
88. Oger I, Da Cruz C, Panteix G, Menezo Y. Evaluating human sperm DNA integrity: relationship between 8-hydroxydeoxyguanosine quantification and the sperm chromatin structure assay. *Zygote* 2003; 11: 367–71.
89. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915–22.
90. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 439–45.
91. Kemal DN, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74: 1200–7.
92. Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH, Giwercman A, Gylleborg J, Ernst E, Olsen J, Scheike T, Poulsen HE, Bonde JP. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Hum Reprod* 2003; 18: 1265–72.
93. Makhlof AA, Niederberger C. DNA integrity tests in clinical practice: it is not a simple matter of black and white (or red and green). *J Androl* 2006; 27: 316–23.
94. Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 2000; 14: 955–67.
95. Chen CS, Chao HT, Pan RL, Wei YH. Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43: 291–303.
96. Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 420–7.
97. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284: 696–704.
98. Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992; 89: 181–6.
99. Chohan KR, Griffin JT, LaFromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27: 53–9.
100. Kelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, Thompson W. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1) Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; (2) Human sperm and male infertility. *Mutat Res* 1997; 375: 93–104.
101. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184–91.
102. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996; 363: 89–96.
103. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. 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.
104. Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* 1998; 13: 75–9.
105. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33–44.
106. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202–5.
107. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 2000; 74: 245–50.
108. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 226–30.
109. Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman A. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006; 21: 3199–205.
110. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131–3.
111. Evenson DP, Darzynkiewicz Z. Acridine orange-induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure. *Exp Cell Res* 1990; 187: 328–34.
112. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Jost L, Janca F, Ballachey B. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry* 1986; 7: 45–53.
113. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2881–4.
114. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895–902.
115. Smit M, Dohle GR, Hop WC, Wildhagen MF, Weber RF, Romijn JC. Clinical correlates of the biological variation of sperm DNA fragmentation in infertile men attending an andrology outpatient clinic. *Int J Androl* 2007; 30: 48–55.
116. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006; 21: 1576–82.
117. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87–91.
118. Duran EH, Grgan T, Gnalp S, Enginsu ME, Yarali H, Ayhan A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13: 1235–9.
119. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634–9.
120. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59–66.
121. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 325–44.
122. Van Loon AA, Den Boer PJ, Van der Schans GP, Mackenbach P, Grootegeod JA, Baan RA, Lohman PH. Immunohistochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation. *Exp Cell Res* 1991; 193: 303–9.
123. Fernandez JL, Gosalvez J. Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol* 2002; 203: 203–16.
124. Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 841–6.

125. Zhang X, Gabriel MS, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 2006; 27: 414–20.
126. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615–25.
127. Paasch U. Der programmierte Zelltod humaner Spermatozeugen und ejakulierter Spermatozoen – Mechanismen der Signaltransduktion und assoziierte Membranveränderungen im physiologischen und pathologischen Kontext im Hinblick auf eine potentielle diagnostische und therapeutische Konsequenz. [The programmed cell death of human spermatogenesis and ejaculated spermatozoa – mechanisms of signal transduction under physiological and pathological conditions and the consequences for diagnostic and treatment.] Shaker Verlag, Aachen, 2002.
128. Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod* 1992; 7: 517–22.
129. Sigman M, Lopes L. The correlation between round cells and white blood cells in the semen. *J Urol* 1993; 149: 1338–40.
130. Horak S, Polanska J, Widlak P. High levels of bulky DNA adducts in human sperm correlate with impaired fertility. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 197–203.
131. Comhaire F, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Depuydt C, Dhooze W. Which efforts towards conservative treatment of male infertility will be successful? Reactive oxygen species, antioxidants, and sperm phospholipids. *Andrologia* 1999; 31: 295–6.
132. Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted ureaplasma urealyticum infection. *Biol Reprod* 2000; 63: 1041–8.
133. Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000; 21: 739–46.
134. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
135. Henkel RR, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005; 83: 635–42.
136. Zalata A, Hafez T, Comhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 1444–51.
137. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl* 2001; 22: 798–803.
138. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod* 1995; 10: 110–5.
139. Holmes RP, Goodman HO, Shihabi ZK, Jarow JP. The taurine and hypotaurine content of human semen. *J Androl* 1992; 13: 289–92.
140. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999; 14: 2513–6.
141. Steele EK, McClure N, Lewis SE. Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertil Steril* 2000; 74: 450–3.
142. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76: 892–900.
143. Linfor JJ, Meyers SA. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 2002; 23: 107–13.
144. Duty SM, Singh NP, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Huang T, Hauser R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod* 2002; 17: 1274–80.
145. Fernandez-Santos MR, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Estes MC, Soler AJ, Paz P, Anel L, Garde JJ. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J Androl* 2007; 28: 294–305.
146. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191–9.
147. Agarwal A, Shekarriz M, Sidhu RK, Thomas AJ. Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *J Urol* 1996; 155: 934–8.
148. Jorgensen N, Carlsen E, Nermeo I, Punab M, Suominen J, Andersen AG, Andersson AM, Haugen TB, Horte A, Jensen TK, Magnus O, Petersen JH, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002; 17: 2199–208.
149. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, Maisonneuve P, Levi F. Trends of cancer mortality in Europe, 1955–1989: III, breast and genital sites. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 927–98.
150. Schuz J, Schon D, Batzler W, Baumgardt-Elms C, Eisinger B, Lehnert M, Stegmaier C. Cancer registration in Germany: current status, perspectives and trends in cancer incidence 1973–1993. *J Epidemiol Biostat* 2000; 5: 99–107.
151. Wanderas EH, Tretli S, Fossa SD. Trends in incidence of testicular cancer in Norway 1955–1992. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2044–8.
152. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl* 2007; 28: 241–9.
153. Taksey J, Bissada NK, Chaudhary UB. Fertility after chemotherapy for testicular cancer. *Arch Androl* 2003; 49: 389–95.
154. Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J Androl* 2006; 27: 189–200.
155. Fossa SD. Long-term morbidity and quality of life in testicular cancer patients. *Scand J Urol Nephrol* 2006; 138: 241.
156. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Frederickx V, De Block G, Devroey P, van Steirteghem A. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 525–32.
157. Aass N, Fossa SD, Theodorsen L, Norman N. Prediction of long-term gonadal toxicity after standard treatment for testicular cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1087–91.
158. Palmieri G, Lotrecchiano G, Ricci G, Spiezia R, Lombardi G, Bianco AR, Torino G. Gonadal function after multimodality treatment in men with testicular germ cell cancer. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 431–6.
159. Petersen PM. Gonadal function in men with testicular cancer. *Semin Oncol* 2006; 25: 224–33.
160. Petersen PM, Skakkebaek NE, Rorth M, Giwercman A. Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *J Urol* 1999; 161: 822–6.
161. Turek PJ, Lowther DN, Carroll PR. Fertility issues and their management in men with testis cancer. *Urol Clin North Am* 1998; 25: 517–31.
162. Evenson DP. Male germ cell analysis by flow cytometry: effects of cancer, chemotherapy, and other factors on testicular function and sperm chromatin structure. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 468: 350–67.
163. Kamischke A, Jurgens H, Hertle L, Berdel WE, Nieschlag E. Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies. *J Androl* 2004; 25: 586–92.
164. Petersen PM, Skakkebaek NE, Vistisen K, Rorth M, Giwercman A. Semen quality and reproductive hormones before orchiectomy in men with testicular cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 941–7.
165. Kobayashi H, Larson KL, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ, Agarwal A. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2001; 75: 469–75.
166. Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman A. The impact of testicular carcinoma and its treatment on sperm DNA integrity. *Cancer* 2004; 100: 1137–44.
167. Sanger WG, Olson JH, Sherman JK. Semen cryobanking for men with cancer – criteria change. *Fertil Steril* 1992; 58: 1024–7.
168. Chapman RM, Sutcliffe SB, Rees LH, Edwards CR, Malpas JS. Cyclical combination chemotherapy and gonadal function. Retrospective study in males. *Lancet* 1979; 1: 285–9.
169. Khalifa E, Oehninger S, Acosta AA, Morshedi M, Veeck L, Bryzyski RG, Muasher SJ. Successful fertilization and pregnancy outcome in in-vitro fertilization using cryopreserved/thawed spermatozoa from patients with malignant diseases. *Hum Reprod* 1992; 7: 105–8.

170. Grunewald S, Paasch U, Said TM, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 99–104.
171. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res* 1987; 176: 259–68.
172. Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 1997; 56: 1490–7.
173. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6j mice. *J Androl* 2005; 26: 136–45.
174. Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 394–403.
175. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030–4.
176. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003; 79: 287–91.
177. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103–11.
178. Spano M, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A, Bonde JP. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepius. Hum Reprod* 1998; 13: 2495–505.
179. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 491–9.
180. Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 675–80.
181. Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod* 1995; 10: 2061–71.
182. Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology* 2000; 56: 463–6.
183. Jensen MS, Mabeck LM, Toft G, Thulstrup AM, Bonde JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005; 20: 2559–66.
184. Jensen TK, Jorgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B, Horte A, Andersen AG, Carlsen E, Magnus O, Matulevicius V, Nerموen I, Vierula M, Keiding N, Toppari J, Skakkebaek NE. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 49–58.
185. Lintsen AM, Pasker-de Jong PC, de Boer EJ, Burger CW, Jansen CA, Braat DD, van Leeuwen FE. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* 2005; 20: 1867–75.
186. Neal MS, Hughes EG, Holloway AC, Foster WG. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* 2005; 20: 2531–5.
187. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 2007; 22: 180–7.
188. Li H, Jiang Y, Rajpurkar A, Dunbar JC, Dhabuwala CB. Cocaine induced apoptosis in rat testes. *J Urol* 1999; 162: 213–6.
189. Ondrizek RR, Chan PJ, Patton WC, King A. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1999; 71: 517–22.
190. Moline JM, Golden AL, Bar-Chana N, Smith E, Rauch ME, Chapin RE, Perreault SD, Schrader SM, Suk WA, Landrigan PJ. Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 803–13.
191. Assinder S, Davis R, Fenwick M, Glover A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction* 2007; 133: 11–9.
192. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999; 20: 718–23.
193. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponechia L, Familiari G, Verleggia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 830–9.
194. Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K. Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 2002; 60: 1069–72.
195. Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 622–5.
196. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 313–8.
197. Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F. DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 336–9.
198. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 559–63.
199. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999; 14: 505–12.
200. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001; 16: 2160–5.
201. Saleh R, Agarwal A, Nada E, El-Tonsy MH, Sahram RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597–605.
202. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 740–6.
203. Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegel C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 2006; 74: 530–7.
204. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717–22.
205. Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A. Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2001; 16: 831–5.
206. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 17: 3122–8.
207. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002; 17: 1856–62.
208. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990–8.
209. Allen NC, Herbert CM III, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril* 1985; 44: 569–80.
210. Stalf T, Herrero J, Turley H, Hinz V, Muller B, Blank T, Henkel RR, Schill WB, Gips H. Different cumulative pregnancy rates in patients with repeated IVF- or ICSI-cycles: possible influence of a male factor. *Andrologia* 1999; 31: 149–56.
211. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18: 1023–8.

212. Shoukir Y, Chardonnes D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998; 13: 1632–7.
213. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 4): 11–9.
214. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, Kupker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* 1996; 11: 2468–71.
215. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 211–7.
216. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330–7.
217. Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JG, Muller II, van Rooyen LH. Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. *Andrologia* 2002; 34: 1–7.
218. Ramos L, Kleingeld P, Meuleman E, van Kooy R, Kremer J, Braat D, Wetzels A. Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 77: 233–7.
219. Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 831–5.
220. Gardiner-Garden M. Techniques for sorting X and Y spermatozoa may adversely affect histone-associated regions in human spermatozoa [letter; comment]. *Hum Reprod* 1999; 14: 1403–4.
221. Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res* 1995; 219: 604–11.
222. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115: 1–7.
223. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001; 29: 279–86.
224. Roberts KP. Y-chromosome deletions and male infertility: state of the art and clinical implications. *J Androl* 1998; 19: 255–9.
225. Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89: 491–6.
226. Cooke HJ. Y chromosome and male infertility. *Rev Reprod* 1999; 4: 5–10.
227. Matsuda Y, Tobar I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat Res* 1989; 210: 35–47.
228. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14: 2279–285.
229. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004; 70: 910–8.
230. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 437–43.
231. Richardson LL, Pedigo C, Ann HM. Expression of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 2000; 62: 789–96.
232. Elder KT, Wick KL, Edwards RG. Seminal plasma anti-sperm antibodies and IVF: the effect of semen sample collection into 50 % serum. *Hum Reprod* 1990; 5: 179–84.
233. Zollner U, Zollner KP, Dietl J, Steck T. Semen sample collection in medium enhances the implantation rate following ICSI in patients with severe oligoastheno-teratozoospermia. *Hum Reprod* 2001; 16: 1110–4.
234. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950–3.
235. Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod* 1999; 14: 2015–9.
236. Colleu D, Lescoat D, Gouranton J. Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedures. *Fertil Steril* 1996; 65: 160–4.
237. Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y, Lewin LM. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 47–54.
238. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1552–61.
239. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000; 15: 1112–6.
240. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activation of caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003; 24: 246–52.
241. Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Glander HJ, Paasch U. Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 336–9.
242. Grunewald S, Miska W, Miska G, Rasch M, Reinhardt M, Glander HJ, Paasch U. Molecular glass wool filtration as a new tool for sperm preparation. *Hum Reprod* 2007; 22: 1405–12.
243. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18: 260–7.
244. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Ravelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005; 84: 1665–73.
245. Ainsworth C, Nixon B, Jansen RP, Aitken RJ. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Hum Reprod* 2007; 22: 197–200.
246. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 2261–70.
247. Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 634.
248. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005; 20: 185–90.
249. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003; 80: 1413–9.
250. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Rasch M, Agarwal A, Glander HJ. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. *Fertil Steril* 2005; 83: 1442–6.
251. Emiliani S, Van Den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y. Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum Reprod* 2000; 15: 2371–4.
252. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. In vitro culture facilitates the selection of healthy spermatids for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999; 72: 809–13.
253. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13: 1240–7.
254. Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, Leatham AJ, Woodside JV. In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 227–3.

Mitteilungen aus der Redaktion

Die meistgelesenen Artikel



Speculum

Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

