

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

HAMMADEH ME, FISCHER-HAMMADEH C, ROSENBAUM P, SCHMIDT W
*Zusammenhang zwischen Kryokonservierungstechnik und
Spermienmorphologie, sowie Chromatinintegrität von fertilen und
subfertilen Männern*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (1) (Ausgabe
für Schweiz), 5-11*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2002; 12 (1) (Ausgabe
für Österreich), 7-14*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

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

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KRYOKONSERVIERUNGSTECHNIK UND SPERMIENMORPHOLOGIE, SOWIE CHROMATININTEGRITÄT VON FERTILEN UND SUBFERTILEN MÄNNERN

KRYOKONSERVIERUNGSTECHNIK UND SPERMIENMORPHOLOGIE

Summary

Some investigators have demonstrated that computer-controlled freezing methods preserve sperm quality better than vapour freezing, but others have found no beneficial effects, at least for human spermatozoa. The purpose of this study was to determine negative effects (cryoinjury) on human spermatozoa after freeze-thawing, and to determine whether freeze-thawing of spermatozoa with a programmed biological freezer is better than freezing with liquid nitrogen vapour with regard to alteration of sperm chromatin and morphology in semen from fertile and subfertile men. Sixty semen samples were obtained either from patients attending our IVF unit for treatment ($n = 35$) or from donors ($n = 25$) with proven fertility and normal sperm quality according to WHO guidelines (1992). Each semen sample was divided into two parts after liquefaction and addition of cryoprotectant (1/1, v/v) (HSPM). The first part was frozen using a programmed biological freezing machine (Planer serie 10) and the second part was frozen by

means of liquid nitrogen vapour. Smears were made from each aliquot before and after the freeze-thawing procedure to assess morphology (strict criteria) and chromatin condensation (acridine orange).

The mean percentage of chromatin condensed spermatozoa in the samples from donors (control group) was $88.14 \pm 7.9\%$ before freezing and decreased significantly ($p < 0.001$) to $80.70 \pm 6.6\%$ after freeze-thawing with the programmed biological freezer and to $78.90 \pm 7.3\%$ after using liquid nitrogen vapour ($p < 0.001$). The corresponding value for semen obtained from patients was $72.14 \pm 7.91\%$ before freezing and decreased to 64.13 ± 9.7 and $62.20 \pm 9.6\%$ respectively ($p < 0.001$). On the other hand, the mean percentage of normal sperm morphology in the control group decreased from $27.9 \pm 6.5\%$ before freezing to $23.80 \pm 4.80\%$ ($p < 0.247$) after freeze-thawing with the biological freezer and to $23.42 \pm 5.13\%$ ($p < 0.001$) after freeze-thawing with liquid nitrogen vapour.

In the patients group, cryoinjury was higher than in the control group: the mean percentage of normal morphology decreased from 15.13 ± 6.5 to $12.13 \pm 6.5\%$ after freezing with the biological freezer and to $10.0 \pm 4.8\%$ after freezing with liquid nitrogen vapour.

This study demonstrates that, compared with native semen samples, chromatin packaging and morphology of human spermatozoa in both groups decrease significantly after freeze-thawing, not only after freezing with liquid nitrogen but also after freezing with a programmed freezer. However, in control group, no significant difference was found between the two freezing methods with respect to morphology. In the contrary, in patients groups there was a significant difference between the two freezing methods with regard to morphology and chromatin integrity. Therefore, the computer-controlled freezing method should be recommended for freezing sperm especially from patients attending assisted reproduction therapy.

ZUSAMMENFASSUNG

Einige Autoren haben gezeigt, daß die computergesteuerte Einfrieremethode die Spermienqualität besser aufrechterhält, als die Stickstoffdampf-Methode. Andere wiederum konnten keinen Vorteil finden, zumindest bei menschlichen Spermien. Das Ziel dieser Arbeit war es, zum einen negative Einflüsse der Einfrier-Auftau-Prozedur festzustellen (Kryoschädigung), zum anderen herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen der computergesteuerten Einfrier-Auftau-Technik und der

Stickstoffdampf-Technik in Hinblick auf Chromatin- und Morphologieveränderungen, sowohl von fertilen als auch von subfertilen Männern, gibt.

Die Studie umfaßt 60 Spermproben, 25 nachweislich fertiler Spender (Kontrollgruppe G2) und 35 Proben von Patienten mit Fertilitätsstörungen (G1), beurteilt nach WHO-Richtlinien (1992). Die Proben wurden mit dem Kryoprotektivum Glycerol (HSPM) 1:1 gemischt und jeweils in Stickstoffdampf und mit einer biologischen Friemaschine (Planer Serie 10) eingefroren. Vor und nach dem Einfrier-Auftau-Vorgang wurden mehrere Ausstriche angefertigt, um die Mor-

phologie (strict criteria) und die Chromatinkondensation mittels Acridin-Orange-Färbung auszuwerten.

Der Anteil an kondensiertem Chromatin im nativen Sperma der fertilen Probanden zeigte einen signifikanten Abfall ($p < 0,001$) von $88,14 \pm 7,9\%$ auf $80,70 \pm 6,6\%$ nach Einfrieren mit dem computergesteuerten Einfriergerät und auf $78,9 \pm 7,3$ nach Einfrieren mit Stickstoffdampf. Die entsprechenden Werte der subfertilen Probanden zeigten die gleiche Tendenz und fielen ebenso signifikant ($p = 0,001$) von $72,14 \pm 7,91\%$ auf $64,13 \pm 9,7\%$ bzw. $62,20 \pm 9,6\%$ ab.

Die Morphologie der Spermien zeigte die gleiche Tendenz: Die prozentualen Anteile der morphologisch normalen Spermien ($27,9 \pm 6,5\%$), eingefroren mit computergesteuerten Friergeräten, zeigten in der fertilen Gruppe einen nicht signifikanten Abfall ($p = 0,247$) auf $23,8 \pm 4,80\%$; nach Einfrieren mit Stickstoffdampf auf $23,42 \pm 5,13\%$. In der subfertilen Gruppe war der Kryoschaden höher als in der Kontrollgruppe, die Werte fielen hier signifikant ($p = 0,048$) von $15,13 \pm 6,5\%$ auf $12,13 \pm 6,5\%$ nach Einfrieren mit der biologischen Friermaschine und auf $10,0 \pm 4,8\%$ nach Einfrieren mit Stickstoffdampf.

Die Einfrier-Auftau-Prozedur führt zu einem negativem Effekt (Schädigung) auf die Spermienmorphologie und die Chromatinstruktur, sowohl bei subfertilen als auch bei fertilen Probanden. Beim Vergleich der beiden Einfrier-Auftau-Techniken zeigt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Morphologie und dem Anteil an kondensiertem Chromatin bei Anwendung des Acridin-Orange-Testes in der subfertilen Gruppe. In der fertilen Gruppe ist festzustellen, daß die Kryoschäden hinsichtlich der Morphologie der Spermatozoen zwischen beiden Methoden nicht signifikant unterschiedlich sind.

Daher sollte die computergesteuerte Einfrieremethode zur Spermienkryokonservierung, insbesondere bei subfertilen Probanden, im Rahmen der assistierten Reproduktionsmedizin Anwendung finden, um zusätzliche Schädigungen zu vermeiden.

EINLEITUNG

Neben der Spermienzahl und der Spermienmotilität spielt die Spermienmorphologie für die männliche Fertilität eine entscheidende Rolle. Die Spermienmorphologie ist ein klinisch sehr wichtiger Parameter, der sehr gut mit der Inzidenz der Fruchtbarkeit und der Konzeption korreliert, gleichgültig, ob die Konzeption auf natür-

liche Art [1] oder mittels IVF entstanden ist [2, 3].

Das logistische Regressions-Modell zeigte, daß die Spermienmorphologie (Strict criteria) und die Konzentration progressiver motiler Spermien das Hauptkriterium zur Beurteilung der in vitro-Fertilisation zu sein scheint [4–7]. Darüber hinaus ist eine große Zahl morphologisch abnormaler Spermatozoen mit einer hohen Heterogenität in der Chromatinstruktur assoziiert [8, 9]. Es wurde angenommen, daß eine niedrige DNA-Rate in den Spermatozoen subfertiler Männer für deren Formveränderungen verantwortlich ist [10, 11]. Courtot [12] fand bei ultrastrukturellen Untersuchungen an subfertilen Männern eine Korrelation zwischen 70% der Spermatozoen mit Chromatinkondensationsdefekten und postakrosomalen Anomalien (PAS). Die positive Korrelation zwischen Spermienmorphologie und Chromatinkondensation unterstützt den Stellenwert der Morphologiebewertung [13].

In den letzten Jahren konnte die Kryokonservierung von Spermatozoen als Standardverfahren im Rahmen der „assistierten Reproduktionstechniken“ (ART) etabliert werden. Sie ist bei Patienten, deren Spermien durch aufwendige Verfahren, wie z. B. Aspiration aus dem Ductus epididymidis oder durch Hodenbiopsie entnommen wurden, von besonderer Bedeutung. So können die Spermien für noch beliebige Zyklen, z. B. nach Mißerfolg einer Schwangerschaft, verwendet werden, ohne den Patienten nochmals zu belasten.

Die Kryokonservierung der Spermien ist auch für die Lagerung von Spermien bei Männern, die sich aufgrund eines Tumorleidens einer Behandlung, wie z. B. einer Chemotherapie oder Radiatio, unterziehen müssen, nützlich. Hierbei besteht die Gefahr der Infertilität bei Patienten, deren Familienplanung noch nicht abgeschlossen ist, gerade in solchen Fällen bietet die Kryokonservierung eine Alternative.

Die Kryokonservierung menschlicher Spermatozoen führt zu Veränderungen in Morphologie, Chromatinintegrität und in manchen Fällen sogar zum Absterben der Zellen. Die ursächlichen Faktoren sind wie folgt zusammengefaßt: 1) die Wahl des geeigneten Gefrierschutzmittels und dessen Konzentration; 2) die Wahl der Einfrieremethode; 3) die Auftaugeschwindigkeit und 4) die Lagerungsdauer.

Im Zentrum der Überlegungen stand jedoch von Anfang an die Einfriereschwindigkeit. Mazur [14] führte die Begriffe der sub- und supraoptimalen Kühlrate in die kryobiologische Diskussion ein. Man versteht darunter Kühlraten, die niedriger bzw. höher sind, als die rechnerisch oder experimentell als optimal angesehenen Gefriereschwindigkeiten. Er nahm an, daß bei supraoptimalen Kühlraten die intrazelluläre Eisbildung sowie die während des Auftauens auftretende Rekristallisation zellschädigend wirken. Bei suboptimalen Kühlraten sah er hauptsächlich die Erhöhung der intra- und extrazellulär gelösten Substanzen (Osmolaritätseffekte) als Ursache einer Zellschädigung an.

Der Kryoschaden der Spermatozoen kann bei vielen Spezies durch langsames Einfrieren ($\leq 10^\circ \text{C/Min}$) wesentlich reduziert werden. Aus diesem Grunde ist die Anwendung einer optimalen Einfriereschwindigkeit ein kritischer Faktor im Rahmen der Kryokonservierung von vielen verschiedenen Zellarten, weil davon das Ausmaß der Zelldehydrierung abhängt. Die Stickstoffdampftechnik (schnelles Einfrieren) von menschlichen Spermatozoen und die anschließende Lagerung bei -196°C ist eine weltweit verbreitete Methode [15]. Eine langsame Einfrieretechnik (mit einem computergesteuerten Einfriergerät) erlaubt hingegen eine stufenweise Temperatursenkung, bis die Probe in flüssigen Stickstoff (-196°C) eingetaucht wird. Durch diese Technik ist die Kryoschädigung, insbesondere bei schlechter Spermienqualität, am geringsten [16].

Jedes Frieren von Spermatozoen kann zu einer latenten Schädigung führen, die nicht mit einem Routine-testverfahren erfaßt werden kann. Obwohl es einige Hinweise gibt, daß Bestandteile des Zytoskeletts sensibel auf das Einfrieren reagieren [17], sind die Konsequenzen der Einfrier-Techniken auf Chromatinintegrität und die Morphologie noch nicht ausreichend geklärt.

Die gegenwärtige Studie wurde durchgeführt, um die Wirkung des Einfrier-Auftau-Prozesses auf die Chromatinkondensation (durch Anilinblau-Färbung) und die Morphologie (strict criteria) menschlicher Spermatozoen von fertilen und subfertilen Männern nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur im Stickstoffdampf und nach Anwendung einer computerge- steuerten Einfriermaschine zu ver- gleichen und um somit festzustellen, welche Methode besser geeignet ist, die Chromatinstruktur und die Mor- phologie der Spermatozoen aufrecht- zuerhalten.

MATERIAL UND METHODEN

Die Spermproben wurden von 35 Patienten (G1) unseres IVF- und ICSI- Programmes und von 25 Probanden (G2) mit nachgewiesener Fertilität, nach einer 3-tägigen Karenzzeit, durch Masturbation gewonnen. Die Präparation erfolgte nach den Richt- linien der WHO [18]. Jede Probe wurde für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur verflüssigt, zahl- reiche Ausstriche wurden angefertigt (5 µl/Objekträger) und luftgetrocknet. Nachfolgend wurden die Proben in einem swim-up-Verfahren aufbereitet und Konzentration, Motilität und Vitalität (HOS-Test) bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit HSPM (human sperm preservation medium) vermischt. Diese Mischung wurde in 0,5 ml French straws gefüllt, ein Teil der French straws wurde daraufhin mit einem computerge- steuerten Einfriergerät und ein ande-

rer Teil in Stickstoffdampf wie folgt eingefroren:

- Stickstoffdampf: Die Samenröh- chen werden in horizontaler Lage, in einer Höhe von 10–15 cm über der Stickstoffoberfläche in stehen- dem Stickstoffdampf für 10 min. gehalten. Danach wurden sie direkt in flüssigen Stickstoff trans- feriert und gelagert.
- Biologische Friermaschine: Die Samenröhchen wurden in die Frierkammer eingebracht und mit einer Kühlungsrate von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $+20^{\circ}\text{C}$ auf $+5^{\circ}\text{C}$, dann mit einer Frierrate von $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -80°C , schließlich mit einer Frierrate von $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von -80°C bis -130°C gefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff transferiert und gelagert.

Die gefrorenen Proben wurden nach einer zweimonatigen Lagerungszeit aus dem flüssigen Stickstoff entnom- men und für 5 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden wieder zahlreiche Ausstriche angefertigt (5 µl/Objekträger) und luftgetrocknet.

Die morphologische Beurteilung erfolgt nach Objekträgerfärbung mit Papanicolaou [18] in Anlehnung an die strict criteria [19]: Die Färbung wurde wie in den WHO-Richtlinien [18] beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch einen Betrachter unter einem Phasenkon- trastmikroskop unter Verwendung eines 100-fachen Ölimmersionsob- jektives. Ein Spermatogramm wurde dann als gut bewertet, wenn von 200 bewerteten Spermatozoen $\geq 14\%$ normale Spermatozoen ausgezählt wurden. Ein Spermatozoon wurde dann als normal gewertet, wenn der Kopf 3–5 µm lang, sowie 2–3 µm breit ist und das Akrosom 40–70% des Kopfes einnimmt. Das Mittel- stück muß axial angeheftet sein, die 1,5-fache Länge des Kopfes betragen und frei von zytoplasmatischen Anhängseln sein. Der Schwanz soll dünner als das Mittelstück und 45 µm

lang sein. Die Chromatinstruktur wurde nach Färbung der Objekträger mit Acridin-Orange wie folgt beur- teilt: Die luftgetrockneten Ausstriche wurden in Carnoys-Lösung (3 Teile Methanol auf 1 Teil Eisessig) fixiert, luftgetrocknet und mit 100 µl Acridin-Orange-Farblösung [Sigma Chemical] (0,19 mg/ml in 0,1 M Zitronensäure und 0,3 M Na_2HPO_4 , 7 H_2O pH 2,5) überschichtet und für 10 min gefärbt, danach mit destillier- tem Wasser abgespült, mit einem Deckglas eingedeckt und unverzüg- lich in der Dunkelkammer ausgewer- tet. Ein Untersucher wertete unter einem Phasenkontrastmikroskop mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv 200 Spermatozoen aus. Alle Sperma- tozoen mit grüner Fluoreszenz wurden als gut und das Spermioogramm als normal gewertet, wenn $> 75\%$ guter Spermatozoen ausgezählt wurden.

Eine grün beurteilte Fluoreszenz bei der normalen Samenproben ist ein Zeichen für intakte Disulfid-Brücken und das intakte DNA-Molekül [20, 21], wohingegen eine rote Fluores- zenz als Merkmal von Strangbrüchen der DNA gedeutet werden kann.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem statistischen Auswertungs- programm SPSS 7.5. Der Vergleich zwischen den Einfrier-Auftau-Metho- den innerhalb der beiden Gruppen erfolgte mit dem verbundenen t-Test.

ERGEBNISSE

Die Spermatozoen mit regelrechter Chromatinkondensation zeigten in G1 (Spermproben von subfertilen Männer) einen Abfall von $72,14 \pm 7,91\%$ auf $64,13 \pm 9,7\%$ unter Ein- satz der biologischen Friermaschine und eine Reduzierung auf $62,20 \pm 9,7\%$ unter Verwendung von Stick- stoffdampf. Nach dem Einfrieren mit der biologischen Friermaschine zeig- te sich in G2 (Spermproben von fertilen Männer) eine Reduzierung von $88,14 \pm 7,9$ auf $80,70 \pm 6,6\%$

und ein Abfall auf $78,90 \pm 7,3\%$ mit Stickstoffdampf. Alle ermittelten Werte zeigten eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$).

Der Prozentsatz morphologisch normaler Spermatozoen fiel in G1 unter Verwendung der biologischen Friermaschine von $15,13 \pm 6,5$ auf $12,13 \pm 6,5$ und in G2 von $27,9 \pm 6,5\%$ auf $23,8 \pm 4,80\%$ ab. Unter dem Einsatz von Stickstoffdampf zeigte sich ein Abfall auf $10,0 \pm 4,8$ in G1 und auf $23,42 \pm 5,13$ in G2. Die ermittelten Ergebnisse waren hochsignifikant ($p < 0,001$).

Der prozentuale Anteil an chromatin-kondensierten Spermatozoen, die mit Stickstoffdampf eingefroren wurden, ist signifikant niedriger im Vergleich zu denjenigen, die mit der computer-gesteuerten Einfriermaschine tiefgefroren wurden, nicht nur in der subfertilen Gruppe (G1) ($62,20 \pm 9,6\%$ vs. $64,13 \pm 9,7\%$, $p = 0,014$), sondern auch in der fertilen Gruppe (G2) ($78,9 \pm 7,3\%$ vs. $80,7 \pm 6,6\%$, $p = 0,015$).

Der prozentuale Anteil morphologisch normaler Spermatozoen in der subfertilen Gruppe nach dem Einfrier-Auftau-Prozess mit der Stickstoffdampf-Methode fiel signifikant ($p = 0,048$) im Vergleich zu computerge-

steuerten Einfriergeräten ($10,0 \pm 4,8\%$ vs. $12,13 \pm 6,5\%$).

Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied in der Häufigkeit der veränderten Morphologie der Spermatozoen hinsichtlich der angewendeten Einfriermethode (Stickstoffdampf- oder computergestütztes Einfriergerät) in der fertilen Gruppe (G2) ($23,42 \pm 5,13\%$ vs. $23,8 \pm 4,80\%$, $p = 0,247$) festgestellt werden.

DISKUSSION

Der am häufigsten beschriebene negative Effekt der Einfrier-Auftau-Prozedur ist eine deutliche Beeinträchtigung der Spermienbeweglichkeit [22]. Andere Autoren haben mehr Gewicht auf Veränderungen der Spermienmorphologie, des Geißelapparates, der Membran- und Akrosomenstrukturen gelegt [23, 24]. Die Konsequenzen der Kryokonservierung auf die Integrität des Spermienkerns, der Chromatinstabilität und der Zentrosomen sind weniger erforscht. Eine normale Kondensation und Stabilisierung des Spermienchromatins erlaubt einen sicheren Transport des männlichen Genoms und die Dekondensation nach der Spermienpenetration oder -injektion in das Zytoplasma

der Eizelle und ist eine wichtige Voraussetzung für die Fertilisierung.

Der Prozess der Verpackung des Chromatins in seiner letzten Form im Spermienkern ist sehr komplex. Dieser Prozess beginnt in den frühen Phasen der Spermatogenese, wobei die Histone durch Übergangs-Proteine, die ebenso wiederum durch Protamine ersetzt werden, ausgetauscht werden [25–27]. Die Protamine sind kleine argininreiche Proteine, die sich enger an die DNA binden als die Histone. Daraus ergibt sich ein noch stabileres Chromatin im Spermienkern als in den anderen somatischen Zellen. Dieser Prozess wird als Spermienchromatinkondensation bezeichnet.

Die Stabilität des Chromatins setzt sich aus drei entscheidenden Faktoren zusammen: (1) die elektrostatischen Kräfte zwischen den essentiellen Amino- und Nucleinsäuren, (2) Wasserstoff und hydrophobe Substanzen, (3) die kovalenten Disulfidbindungen zwischen benachbarten freien Thiolbrücken der Cysteine, die während der Spermatogenese und der Epididymalpassage gebildet und gefestigt werden. Dadurch entstehen inter- und intrachromosomale Bindungen, die schließlich zur Stabilisierung des Chromatins beitragen [28].

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

| G1 Parameter | Natives Sperma | Stickstoffdampf-Methode | Computergesteuertes Einfriergerät | Signifikanz zwischen den beiden Methoden |
|----------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| Subfertile Gruppe (n = 35) | | | | |
| Morphologie | $15,13 \pm 6,5\%*$ | $10,0 \pm 4,8\%*$ | $12,13 \pm 6,5\%*$ | $P = 0,048$ |
| Chromatin | $72,14 \pm 7,91\%**$ | $62,2 \pm 9,6\%**$ | $64,13 \pm 9,7\%**$ | $P = 0,014$ |
| *p = 0,001; **p = 0,001 | | | | |

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

| G2 Parameter | Natives Sperma | Stickstoffdampf-Methode | Computergesteuertes Einfriergerät | Signifikanz zwischen den beiden Methoden |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| Fertile Gruppe (n = 25) | | | | |
| Morphologie | $27,90 \pm 6,5\%*$ | $23,42 \pm 5,13\%*$ | $23,8 \pm 4,80\%*$ | $p = 0,247$ |
| Chromatin | $88,14 \pm 7,9\%**$ | $78,90 \pm 7,30\%**$ | $80,7 \pm 6,60\%**$ | $p = 0,015$ |
| *p = 0,001; **p = 0,001 | | | | |

Es konnte gezeigt werden, daß die Befruchtungsfähigkeit in der IVF mit der Häufigkeit der Änderungen am Spermienchromatin in Verbindung gebracht werden kann [29, 30], und es wurde berichtet, daß die überwiegende Mehrheit der Spermatozoen an der Zona pellucida durch normale Chromatinpackung charakterisiert sind [29]. Inzwischen ist bekannt, daß bei Samenproben mit unvollständiger Chromatinverpackung bzw. beschädigter DNA eine Chromatinkondensation nicht stattfinden kann und eine Befruchtung daher nicht erfolgen kann [31, 32].

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Verminderung des prozentualen Anteils grün fluoreszierender Spermatozoen (chromatinkondensiert) von fertilen und subfertilen Männern nach dem Einfrier-Auftau-Prozeß, sowohl bei der Stickstoffdampf-Methode als auch nach computergesteuertem Einfrieren (Tab. 1 und 2) gezeigt werden. Eine Abnahme grüner Fluoreszenz ist somit ein Merkmal, welches auf Strangbrüche der DNA deuten kann, und kommt somit bei subfertilen Samenproben gehäuft vor [33–35].

Die Verschlechterung der Chromatinstabilität der Spermien ist wahrscheinlich auf eine Vielfalt physikalischer Belastungen zurückzuführen, denen eine Samenprobe während der Kryokonservierung ausgesetzt ist. Diese Belastung hat eventuell zu einer Reduzierung des prozentualen Anteils motiler Spermien und einer Zunahme morphologisch amorpher Formen geführt, dies kann unter anderem die Verschlechterung der Fertilität der wiederaufgetauten Spermien erklären.

Diese Ergebnisse sind kontrovers zu den Studien von Huret und Miquereau [36], die in ihren Untersuchungen gezeigt haben, daß die Chromatinstruktur von wieder aufgetauten Spermatozoen unverändert blieben. In Einklang stehen unsere Ergebnisse mit Royere et al. [37] und Hammamah et al. [38], die ebenfalls einen Abfall der Chromatinstabilität nach Färbung

mit Acridin-Orange und Feulgen-DNA nachweisen konnten.

Des weiteren berichteten Eliasson und Enquist [39], daß der Kern von Spermatozoen infertiler Männer weniger stabil ist als die Kerne von Spermatozoen fertiler Männer. Hughes et al. [40] haben kürzlich gezeigt, daß die Spermien-DNA von infertilen Männern empfindlicher gegenüber Strahlen ist als jene fertiler Männer. Hammitt et al. [41] demonstrierten, daß ein kontrollierter Einfriervorgang mit anschließendem Auftauen bei 40°C signifikant motilere Spermien, bzw. einen besseren Motilitätsindex aufweisen als diejenigen, die nach unkontrolliertem Einfrieren nur bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut wurden. Check et al. [42] beobachteten, daß der Anteil der motilen Spermien nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur signifikant höher war, wenn der Einfriervorgang mit einem semiprogrammierbaren Einfriergerät (Cellelevator) stattfindet, verglichen mit einem unkontrollierten und schnellen Einfrieren mittels Stickstoffdampf.

Verheyen et al. [43] beschrieben, daß Spermien mit ursprünglich guter Qualität unabhängig von der Einfrieremethode gleich gute Ergebnisse zeigten. Morell et al. [44] haben nachgewiesen, daß bei Spendersamen von guter Qualität, gefroren entweder durch direktes Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder mit Hilfe eines programmierbaren Einfriergerätes, kein signifikanter Unterschied bezüglich der Motilität und der 30-Minuten-Überlebensrate nach Wiederauftauen besteht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß die prozentuale Anzahl der morphologisch normal geformten Spermatozoen signifikant abfällt, unabhängig davon, ob mit Stickstoffdampf oder mit computergesteuerter Friermaschine eingefroren wurde (Tab. 1 und 2). Diese Abnahme wurde sowohl bei normaler (G1) wie auch bei subnormaler Spermienqualität (G2) festgestellt (Tab. 1 und 2). Jedoch war

der Unterschied der morphologischen Spermienbeschädigung zwischen beiden Einfrieremethoden nicht signifikant unterschiedlich in der fertilen Gruppe ($p = 0,247$). Bei der subfertilen Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,048$). Andere Autoren [45] haben schon früher gezeigt, daß der Einfrier-Auftau-Vorgang von menschlichen Spermien signifikant die Anzahl der Spermien mit normaler Kopfstruktur, Motilität und Befruchtungsfähigkeit reduziert.

Die gegenwärtigen Daten demonstrieren, daß die Kryoschäden auf Chromatin und Morphologie unterschiedlich verliefen, die Samenproben aus der subfertilen Gruppe haben eine höhere Schädigung bezüglich der Morphologie erlitten, jedoch in Hinsicht auf das Chromatin war der Schaden bei beiden Gruppen ähnlich groß ($p = 0,014$; $p = 0,015$, Tab. 1 und 2). Dieses Ergebnis ist auf die hohe Sensibilität des Chromatins bei der Kryokonservierung zurückzuführen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Die angeführten Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß der Anteil morphologisch normaler, sowie chromatinkondensierter Spermien nicht nur bei infertilen, sondern auch bei fertilen Probanden nach einer Einfrier-Auftau-Prozedur signifikant abfällt, unabhängig von der verwendeten Einfrieremethode. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Einfrieremethoden bezüglich des Anteils der Schädigung der Spermien nach Wiederauftauen gibt, trotz der Tendenz, daß die initial qualitativ schlechten Spermien eine größere Schädigung aufweisen. Deshalb wurde die computergesteuerte Einfrieremethode für die Kryokonservierung von Sperma subfertiler Männer empfohlen, um zusätzliche Schädigungen am Chromatin und der Morphologie zu vermeiden.

Literatur:

1. Eggert-Kruse W, Schwartz H, Rohr G, et al. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in vivo conditions of conception. *Hum Reprod* 1996; 11: 139–46.
2. De Geyter C, De Geyter M, Schneider HP, Nieschl A. Subnormal sperm parameters in conventional semen analysis are associated with discrepancies between fertilization and pregnancy rates in in vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Androl* 1992; 4: 485–97.
3. Krüger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, et al. Sperm morphology feature as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118–23.
4. Duran EH, Gurgan T, Gunalp S, Enginsu ME, Yarali H, Ayhan A. Logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13: 1235–9.
5. Coetzee K, Krüger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 73–82.
6. Ombelet W, Fourie FL, Vandepuut H, et al. Teratozoospermia and in vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum Reprod* 1994; 9: 1479–84.
7. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, et al. Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl* 1998; 41: 103–14.
8. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 240: 1131–3.
9. Ballachey BE, Hohebocken WD, Evenson DP. Heterogeneity of sperm nucleus chromatin structure and its relation to bull fertility. *Biol Reprod* 1987; 863: 915–25.
10. Fawcett DW, Anderson W, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of sperm head. *Dev Biol* 1979; 26: 20.
11. Highland HN, Rao MV, Chinoy NJ, Shah VC. Analysis of the functional and nuclear integrity of human spermatozoa. *Int J Fertil* 1991; 36: 43–7.
12. Courtot AM, Escalier D, Jouannet P, David G. Impaired ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster oocytes: is a postacrosomal sheath anomaly involved. *Gamete Res* 1987; 17: 145–56.
13. Classens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, et al. The acridine-orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7: 242–7.
14. Mazur P. The role of intracellular freezings in the death of cells cooled at superoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14: 251–72.
15. Sherman JK. Current status of clinical cryobanking of human sperm. In: Paulson JD, Negro-Vilar A, Lucena E, Martinia (eds). *Andrology: Male Fertility and Sterility*. Academic Press, New York, 1986; 517–49.
16. Ragni G, Caccamo AM, Dalla Serra A, et al. Computerized slow-stage freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapour freezing. *Fertil Steril* 1990; 53: 1072–5.
17. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transition in ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 451–61.
18. World Health Organization. *Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen Cervical Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.
19. Krüger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Matta JF, Simons KF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112–7.
20. Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol* 1991; 7: 297–304.
21. Evenson DP, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (eds). *Flow Cytometry*. Part B. 2nd edn. Academic Press, Orlando, USA, 1994; 159–75.
22. Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T, Yajima A. Fertilization of fresh and frozen human spermatozoa. *Assist Reprod Technol Androl* 1990; 1: 164–72.
23. Critser JK, Arenson BW, Aaker DV, Huse Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa II. postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 1987; 9: 1214–9.
24. Check ML, Check JH, Long R. Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 1991; 27: 155–60.
25. Meistrich ML. Nuclear morphogenesis during spermatogenesis. In: de Kretser D (ed). *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, USA, 1993; 67–97.
26. Banerjee S, Smallwood A, Hultien M. ATP-dependent reorganization of human sperm nuclear chromatin. *J Cell Sci* 1995; 108: 755–65.
27. Kramer JA, Krawetz SA. RNA in spermatozoa: Implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 473–8.
28. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298–305.
29. Hoshi K, Katayosi H, Yanagida K, et al. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634–9.
30. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, et al. Chromomycin A3 staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int J Androl* 1996; 19: 23–7.
31. Sakkas D, Uner F, Bianchi PG, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 837–43.
32. Samocha-Bone D, Klewin LM, Weissemberg R, et al. In vitro human spermatozoa nuclear decondensation assessed by flow cytometry. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 133–7.
33. Evenson DB, Melamed MR. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 248–53.
34. Engh E, Clausen Op, Scholberg A, et al. Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm D fluorescence using flow cytometry. *Int J Androl* 1992; 155: 407–15.
35. Golan R, Cooper TG, Oschry YY, et al. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as detected by flow cytometry. *Hum Reprod* 1996; 11: 1457–62.
36. Huret JL, Miquereau MA. Nuclear chromatin decondensation abilities of human spermatozoa. *Arch Androl* 1984; 13: 147–52.
37. Royere D, Hammamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J. Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies. *Gamete Res* 1988; 21: 51–7.

38. Hammamah S, Royere D, Nicolle JC, et al. Effect of freezing-thawing on the spermatozoa nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30: 59–64.
39. Eliasson R, Enquist AM. Chromatin stability of human spermatozoa in relation to men fertility. *Int J Androl* 1981; 3 (Suppl.): 73–4.
40. Hughes CM, Lewis SEM, Mc Kelvey-Martin V, et al. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 613–9.
41. Hammit DG, Hade DK, Williamson RA. Survival of human sperm following controlled and noncontrolled rate cryopreservation. *Andrologia* 1989; 21: 311–7.
42. Check ML, Check DJ, Katsoff JH. Improved results of thawed sperm cryopreserved with slow stage cooling with a cellerator. *Arch Androl* 1996; 37: 61–4.
43. Verheyen G, Pletinex I, Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution / washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod* 1993; 8: 1678–84.



Dr. med. vet. et Dr. rer. nat. Mohammed Eid Hammad

Geboren 1954 in Syrien. Von 1972 bis 1977 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Aleppo, Syrien. Promotion an der Justus-Liebig-Universität Gießen 1984 bis 1988. Von 1988 bis 1989 Forschungstätigkeit (immunhistochemische Techniken) an der Universität Liverpool, UK. 1989 bis 1990 Diplommanagement an der Universität in Kassel. Bis

1995 Tätigkeit in einer Privatpraxis für Frauenheilkunde und Reproduktionsmedizin (IVF/ET) in Saarbrücken. Von 1991 bis 1995 Biologiestudium an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, Promotion 2000. Seit 1995 Laborleiter an der Frauenklinik und Poliklinik, Bereich Reproduktionsmedizin, Universität des Saarlandes, in Homburg.

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

Korrespondenzadresse:

Dr. Dr. M. E. Hammad
Frauenklinik und Poliklinik der Universität des Saarlandes,
D-66421 Homburg/Saar
E-Mail: frmham@med-rz.uni-sb.de

44. Morrell DR, Matson PL, Troup SA, Izzard H, Prior JR, Burslem RW, Lieberman BA. The cryopreservation of donor semen by a simplified method: Use in IVF and GIFT program. *Int J Androl* 1990; 13: 352–60.

45. Serafini P, Marrs PP. Computerized stage-freezing technique improves sperm survival and preservation of zona-free hamster ova. *Ferti Steril* 1986; 45: 857–8.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

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

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

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

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

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)