

Aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. W. Schmidt

**Einfluss der Spermieninkubationszeit auf den
Chromatinkondensationsgrad und auf die Ergebnisse nach
intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2007

vorgelegt von: Tanja Dostert

geboren am: 22.02.1980 in Gerolstein

In ewiger Liebe und Dankbarkeit

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Zusammenfassung	14
1.1	Zusammenfassung	14
1.2	Summary	16
2	Einleitung	18
2.1	Allgemeine Einführung und Problematik der Reproduktionsmedizin	18
2.2	Grundlagen der Gametogenese	22
2.2.1	Spermatogenese	22
2.2.2	Oogenese	25
2.3	Fertilisation	26
2.4	Ursachen von Fertilitätsstörungen	28
2.4.1	Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen	28
2.4.2	Ursachen weiblicher Fertilitätsstörungen	30
2.5	Klassische Samenanalyse und Spermioigrammerstellung	32
2.6	Techniken der Reproduktionsmedizin	35
2.6.1	Ovarielle Stimulation und Follikelpunktion	35
2.6.2	Fertilisation mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)	37
2.7	Grundlagen zur Spermien- und Eizellanalyse	39
2.7.1	Bedeutung der Spermienmorphologie	39
2.7.2	Bedeutung des Chromatinkondensationsstatus	40

2.7.3	Bedeutung der Apptoserate	43
2.7.4	Gründe für das Auftreten nicht fertilisierter Oozyten nach ICSI	45
2.8	Eigene Fragestellung	47
3	Patientenkollektiv und Methoden	48
3.1	Patienten	48
3.2	Vorbereitung der Insemination	49
3.2.1	Gewinnung von Oozyten und Spermatozoen	49
3.2.2	Spermienaufbereitung mittels Swim-up Technik	49
3.2.3	Spermienaufbereitung mittels PureSperm Methode	50
3.3	Spermiogrammerstellung	50
3.3.1	Anfertigung von Spermienausstrichen	50
3.3.2	Volumenbestimmung	51
3.3.3	pH-Wert Bestimmung	51
3.3.4	Cyturtest	51
3.3.5	MAR-Test	52
3.3.6	Supravitalfärbung mit Eosin	53
3.3.7	Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)	53
3.3.8	Bestimmung der Spermiedichte (Konzentration)	54
3.3.9	Bestimmung der Spermienmotilität	54
3.4	Färbung nach Papanicolaou	55
3.4.1	Durchführung	55

3.4.2	Auswertung	56
3.5	Färbung mit Anilin Blau	57
3.5.1	Testprinzip	57
3.5.2	Durchführung	57
3.5.3	Auswertung	58
3.6	Fluoreszenzfärbung mit Chromomycin A ₃ (CMA ₃)	58
3.6.1	Testprinzip	58
3.6.2	Durchführung	58
3.6.3	Auswertung	59
3.7	Fluoreszenzfärbung nach dem TUNEL-Prinzip	60
3.7.1	Testprinzip	60
3.7.2	Durchführung	60
3.7.3	Auswertung	60
3.8	Zeitversetzte Fertilisation mittels Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)	62
3.8.1	Durchführung	62
3.8.2	Embryotransfer	66
3.8.3	Schwangerschaftsnachweis	66
3.9	Fluoreszenzfärbung der Oozyten mit Hoechst 33342	66
3.9.1	Testprinzip	67
3.9.2	Durchführung	67
3.9.3	Auswertung	67

3.10	Verwendete Standardlösungen	69
3.10.1	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	69
3.10.2	HAM'S F-10 Lösung	69
3.10.3	PureSperm-Lösungen	70
3.10.4	Schwelllösung für HOS-Test	70
3.10.5	Hyaluronidase-Lösung	71
3.11	Statistische Auswertung	72
4	Ergebnisse	74
4.1	Gesamtübersicht	74
4.1.1	Spermiogrammparameter und ICSI-Ergebnisse	74
4.1.2	Ergebnisse der Spermienfärbungen in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt	77
4.2	Zusammenhang zwischen der Spermiendiagnostik und den ICSI Ergebnissen	79
4.3	Ergebnisse der mit Hoechst 33342 gefärbten nicht fertilisierten Oozyten	86
4.4	Zusammenhang zwischen dem Gesamtergebnis der Spermiendiagnostik und den nicht fertilisierten Oozyten	88
4.4.1	Zusammenhang zwischen dem Spermienchromatin der nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik	88
4.4.2	Zusammenhang zwischen den nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik	89
4.5	Ergebnisse der Spermiogrammparameter, der ausgewerteten	

	Eizellen und die ICSI-Ergebnisse in Bezug auf das Erfolgskriterium „Schwangerschaft“	89
5	Diskussion	92
5.1	Vorbemerkung zur Diskussion	92
5.2	Bedeutung der Spermiemorphologie	92
5.3	Bedeutung des Chromatinkondensationsstatus	93
5.4	Bedeutung der DNA-Strangbrüche in der Färbung mit TUNEL	95
5.5	Die ICSI-Ergebnisse der beiden Injektionszeitpunkte	97
5.6	Ergebnisse der nicht fertilisierten Oozyten	98
5.7	Schlussfolgerung	101
6	Literaturverzeichnis	102
7	Danksagung	119
8	Lebenslauf	121

Abkürzungsverzeichnis

+/- SD	Standardabweichung
ART	Assisted reproductive technologies
CMA ₃	Chromomycin A ₃
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMAP	6-Dimethylaminopurin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
FITC	Fluorescein Isothiocyanate Conjugated
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropine releasing hormone
HCG	Human chorion gonadotropine
HMG	Human menopausal gonadotropine
HOS-Test	Hypoosmotischer Schwelltest
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IE	Internationale Einheit
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
LH	Luteinisierendes Hormon
MAR-Test	Mixed-antiglobulin-reaction-Test
MPF	M-phase promoting factor

OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
OHSS	Ovarielles Hyperstimulationssyndrom
p	Signifikanzkoeffizient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCO	Polyzystische Ovarien
PID	Präimplantationsdiagnostik
PKD	Polkörperdiagnostik
r	Korrelationskoeffizient
ROS	Reactive oxygen species
SAOAF	Sperm associated oocyte activation factor
SNDF	Sperm nucleus decondensing factor
SSW	Schwangerschaftswoche
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Menschliches Spermatozoon	23
Abb.2: Schema zur Akrosomreaktion	24
Abb.3: Graafscher Follikel	25
Abb.4: DNA Organisation in somatischen Zellen und Spermatozoen	41
Abb.5: MAR-Test: Bei positivem Testergebnis werden die Latexpartikel über die im Antiserum enthaltenen Antikörper (Anti-IgG), an die Spermien gebunden.	52
Abb.6: Papanicolaou Färbung	56
Abb.7: Chromomycin A ₃ Färbung	59
Abb.8: Zwei Spermien gefärbt nach dem TUNEL-Prinzip	61
Abb.9: reife Oozyte im Metaphase II Stadium mit 1. Polkörperchen	62
Abb.10: unreife Oozyte im Germinalvesikel-Stadium (GV)	63
Abb.11: unreife Oozyte im Metaphase I Stadium	63
Abb.12: ICSI mit Polkörperchen in 12 Uhr Position	65
Abb.13: Befruchtete Oozyte im Vorkernstadium	65
Abb.14: Embryo im Vierzellstadium am 2. Tag nach ICSI	66
Abb.15: partiell dekondensierter Spermatozooenkopf und maternales Chromatin in nicht fertilisierter Oozyte nach ICSI	68
Abb.16: Durchschnittliche Befruchtungsraten am 1. und 2. Injektionszeitpunkt	76
Abb.17: Vergleich der Ergebnisse der Spermienfärbungen am 1. und 2. Injektionszeitpunkt	79

Abb.18: Streudiagramm zur Beziehung zwischen Anilin Blau und der Befruchtungsrate	83
Abb.19: Streudiagramm zur Beziehung zwischen Chromomycin und der Befruchtungsrate	83
Abb.20: Streudiagramm zur Beziehung zwischen TUNEL und der Befruchtungsrate	84
Abb.21: Auswertung der nicht fertilisierten Oozyten	87

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Modifizierte Färbung nach Papanicolaou	55
Tab.2: PBS-Lösung nach Dulbecco	69
Tab.3: HAM'S F-10 Lösung	70
Tab.4: PureSperm-Lösungen	70
Tab.5: Lösung für HOS-Test	71
Tab.6: Herstellung von Hyaluronidase-Lösung	71
Tab.7: Gesamtübersicht Spermogrammparameter nach WHO (1999)	74
Tab.8: Zusammenfassende ICSI-Ergebnisse	75
Tab.9: ICSI Ergebnisse in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt	76
Tab.10: Vergleich der Spermienfärbungen vor und nach Aufbereitung	77
Tab.11: Vergleich der Spermienfärbungen am 1. und 2. Injektionszeitpunkt	78
Tab.12: Zusammenhang zwischen den Methoden der Spermiendiagnostik untereinander und der Befruchtungsrate am 1. Injektionszeitpunkt	80
Tab.13: Zusammenhang zwischen den Methoden der Spermiendiagnostik untereinander und der Befruchtungsrate am 2. Injektionszeitpunkt	81
Tab.14: Zusammenhang zwischen den Gesamtergebnissen der Methoden der Spermiendiagnostik untereinander und dem ICSI - Ergebnis	82
Tab.15: „schrittweise multiple Regressionsanalyse“ für den Zusammenhang zwischen der gesamten Befruchtungsrate und den Färbemethoden	85
Tab.16: Auswertung der nicht fertilisierten Oozyten	86

Tab.17: Zusammenhang zwischen dem Spermienchromatin der nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik	88
Tab.18: Zusammenhang zwischen den nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik	89
Tab.19: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium „Schwangerschaft“ und den Spermiogrammparametern	90
Tab.20: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium "Schwangerschaft" und den ICSI-Ergebnissen	90
Tab.21: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium "Schwangerschaft" und den Ergebnissen der nicht fertilisierten Oozyten	91

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war in erster Linie, den Einfluss der Spermieninkubationszeit auf den Chromatinkondensationsgrad der Spermien und auf die Ergebnisse nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) zu untersuchen.

Gleichzeitig wurde auch die Auswirkung einer verlängerten Inkubationszeit auf die Anzahl der DNA-Strangbrüche und ihre Bedeutung für die Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate dargestellt.

Weiterhin wurden die nicht fertilisierten Oozyten analysiert, um mögliche Gründe für Fehlbefruchtungen nach ICSI zu eruieren.

Im Wesentlichen soll diese Studie neben vielen anderen auf diesem Gebiet dazu beitragen, die Komplexität des Befruchtungsvorgangs tiefer zu verstehen und daraus Verbesserungsmöglichkeiten im Bereich sämtlicher assistierter reproduktiver Techniken (ART) ableiten zu können. Langfristiges Ziel ist dabei, nicht nur die Befruchtungs- und Schwangerschaftsraten, sondern vor allem die „baby-take-home-rate“ nach ICSI zu steigern.

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 40 Paare, die eine ICSI-Behandlung an der Frauenklinik der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchführen ließen und deren Follikelpunktion eine Mindestanzahl von 8 Oozyten ergab, in die Untersuchungen miteinbezogen. Nach Aufbereitung des Ejakulats ist die intrazytoplasmatische Spermieninjektion an der Hälfte der Eizellen wie gewohnt unmittelbar nach der Punktion vollzogen worden. Sowohl das restliche Ejakulat, als auch die verbliebenen Oozyten wurden für weitere 4 - 5 h inkubiert und anschließend erst der ICSI-Behandlung zugeführt. Sowohl vom Nativejakulat, als auch vom Ejakulat an beiden Injektionszeitpunkten, sind 4 Spermienausstriche zusätzlich zum Routine-Spermiogramm angefertigt worden.

Zur Beurteilung der Kernchromatinkondensation wurden die Spermien mit Anilin Blau und Chromomycin A₃ gefärbt. Die Morphologie ist in der für Spermien modifizierten

Färbung nach Papanicolaou beurteilt worden und um Strangbrüche der Spermien-DNA sichtbar zu machen, wurde die TUNEL-Färbung verwendet.

Insgesamt 127 nicht fertilisierte Oozyten sind in der Färbung mit Hoechst 33342 beurteilt worden.

Unseren Ergebnissen zufolge, scheint eine verlängerte Inkubationszeit von durchschnittlich 4,56 h eine hoch signifikante Verstärkung der Chromatinkondensation zu bewirken. Gleichzeitig konnten am Zweiten Injektionszeitpunkt hoch signifikant mehr DNA-Strangbrüche detektiert werden. Diese Ergebnisse hatten jedoch keinen Einfluss auf die Befruchtungsrate, die sich mit 62,41% am Ersten vs. 68,44% am Zweiten Injektionszeitpunkt nicht statistisch bedeutsam unterschieden.

Ebenfalls konnte eine hoch signifikante, starke Korrelation zwischen dem Anteil gut kondensierter Spermien und der Befruchtungsrate nach ICSI gefunden werden. Hinsichtlich der DNA-Strangbrüche konnte nachgewiesen werden, dass mit steigendem Anteil die Befruchtungsrate vermindert wird.

Bezüglich der nicht fertilisierten Oozyten lässt sich festhalten, dass ein Hauptgrund für die Fehlbefruchtung im Ausbleiben der Aktivierung der Oozyten zu suchen ist. 89,76% der nicht befruchteten Eizellen blieben in der Metaphase II arretiert, wohingegen in nur 10,24% eine aktivierte Eizelle zu finden war.

Betrachtet man die Spermienchromatinstruktur der untersuchten Oozyten, wird deutlich, dass die Mehrzahl der ausgewerteten Eizellen mit 58,27%, teildekondensiertes oder dekondensiertes Spermienchromatin enthielten. In 34,65% konnte ein intakter Spermienkopf mit noch kondensiertem Chromatin gefunden werden. In lediglich 7,08% der Oozyten konnte kein Spermienchromatin mehr nachgewiesen werden.

Zusammenfassend können wir somit postulieren, dass eine verlängerte Inkubationszeit der Spermien, wie sie beispielsweise bei hohem Arbeitsanfall im Labor auftreten kann, zwar zu strukturellen Veränderungen an den Spermien führt, jedoch keinen nachteiligen Effekt auf die Ergebnisse nach ICSI zu haben scheint.

1.2 Summary

The aim of this study was to analyse the impact of sperm incubation time on sperm chromatin condensation and on the outcomes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Furthermore, we investigated the influence of an extended incubation time on sperm DNA strand breaks and their relevance concerning fertilization and pregnancy rates. In addition we studied the unfertilized Oocytes to give reasons for fertilization failure.

Next to many others in this field, our study should contribute to explain fertilization procedure more detailed and to derive improved possibilities for all assisted reproductive techniques (ART). The ambition for the future is not only to improve fertilization and pregnancy rates, but also the so called “baby-take-home-rate”.

For this study we included 40 couples, undergoing ICSI at the Department of Obstetrics and Gynaecology at the University of Saarland, and with more than 8 oocytes after follicle puncture. After semen preparation, ICSI was done as usual with half of the gained oocytes directly after the puncture. Both, remaining sperm and oocytes were incubated for another period of 4 to 5 hours with following ICSI treatment. In addition to regular semen analysis, 4 sperm smears were taken out of native sperm as well as on first and second injection point.

In order to evaluate sperm chromatin condensation, sperm smears were stained with aniline blue and chromomycine A₃. Morphology was assessed with a modified Papanicolaou staining for sperm and DNA strand breaks were detected by TUNEL method. A total number of 127 unfertilized oocytes were examined by staining with Hoechst 33342.

Our findings suggest, that a prolonged incubation time of 4,56 hours leads to a higher chromatin condensation level (hypercondensation) and to a significantly increased number of DNA strand breaks. These results seem to have no influence on fertilization rates, which don't differ between the two injection times, with 62,41% on the first and 68,44% on the second one.

Additionally a strong correlation was found between well condensed sperm and a higher fertilization rate after ICSI. In regard to an increased number of DNA strand breaks we find out, that they seem to be responsible for a declining fertilization rate.

Towards the unfertilized oocytes we observed, that the absence of oocyte activation is a main reason for fertilization failure. 89,76% of the non fertilized oocytes remained arrested in metaphase II, whereas only 10,24% became activated.

Concerning the sperm chromatin structure of the analysed oocytes, we can conclude, that most of the oocytes contained particular or complete decondensed sperm chromatin. In 34,65% we detected an intact and condensed sperm head and in 7,08%, sperm chromatin was missing.

In conclusion we postulate that a prolonged sperm incubation time, for example during high laboratory workload, is responsible for some structural changes in sperm DNA, but does not influence ICSI outcome.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung und Problematik der Reproduktionsmedizin

Schätzungen zufolge sind in Deutschland ca. 10-15% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter ungewollt kinderlos (STAUBER, 2001). Diese Zahlen verdeutlichen, dass schon seit Jahren ein Interesse an der Entwicklung von Techniken besteht, um Paaren, mit nach herkömmlichen Methoden nicht therapierbaren Ursachen der Sterilität, zu helfen.

Der Beginn der Reproduktionsmedizin, der teilweise bis ins 18. Jahrhundert zurückgeht, erreichte einen bedeutenden Höhepunkt schließlich im Jahre 1978, als das erste mittels In-vitro-Fertilisation (IVF) entstandene Kind in England zur Welt kam (STEPTOE und EDWARDS, 1978).

Durch die Arbeit des deutschen Professors Dr. Trotnow, wurde schließlich 1982 das erste in Deutschland durch künstliche Befruchtung entstandene Kind in Erlangen geboren.

Das nächste bis heute sehr bedeutsame Verfahren publizierten 1992 PALERMO et al., denen es als erste gelang, durch die gezielte extrakorporale Injektion eines Spermatozoons in die Oozyte (ICSI), Frauen zu einer erfolgreichen Schwangerschaft zu verhelfen.

Auch aktuelle Neuerungen auf dem Gebiet der klinischen Reproduktionsmedizin können verzeichnet werden. Mit Hilfe der sogenannten In-vitro-Maturation (IVM), die schon 1983 von VEECK et al. angewandt wurde, wurde im Jahr 2005 das erste deutsche IVM-Kind in Lübeck geboren. Dabei versteht man nach DIEDRICH et al. (2005) unter IVM, die in vitro induzierte meiotische Reifung unreifer Oozyten im Germinalvesikelstadium zur befruchtungsfähigen Metaphase-II-Oozyte. Dieses Verfahren könnte zukünftig bei Patientinnen Anwendung finden, bei denen durch die herkömmliche Stimulation zur Induktion eines multifollikulären Wachstums und Reifung der Oozyten, ein zu hohes Risiko für das Auftreten eines ovariellen Hyperstimulationssyndroms (OHSS) besteht, wie zum Beispiel im Rahmen eines PCO-Syndroms (Syndrom der polyzystischen Ovarien). In einer 2005 publizierten

Studie nach CHA et al., scheint IVM eine gute Alternative für die normale IVF bei PCO-Patientinnen zu sein. Neben der Reduktion möglicher Nebenwirkungen einer IVF oder ICSI Therapie können auch die Kosten, die durch die hormonelle Stimulation bedingt sind, deutlich reduziert werden. Nach DIEDRICH et al. (2005) könnte die IVM bei weiterem Fortschritt die konventionelle ovarielle Stimulation ersetzen und die gängige IVF-Praxis revolutionieren.

Weltweit sind jedoch mit Hilfe der IVF und der ICSI, inzwischen vermutlich über 3 Millionen Kinder geboren worden. Allein in Deutschland wurden nach Angaben des Deutschen IVF Registers (D.I.R. 2004) im Jahre 2004, 61724 reproduktionsmedizinische Behandlungen durchgeführt, wovon 25339 Behandlungen auf die ICSI Methode entfielen. Somit werden in Deutschland jährlich ca. 6000-8000 Kinder durch künstliche Befruchtung geboren, was einem Anteil an der Geburtenrate von ca. 1% entspricht.

Gegenüber dem Jahre 2003 sind die Behandlungszahlen allerdings stark rückgängig, da das Gesundheitsmodernisierungsgesetz (GMG), welches am 1.1.2004 in Kraft trat, eine Eigenbeteiligung des Paares an den Behandlungskosten in Höhe von 50% vorsieht (Gesamtbehandlungskosten pro Zyklus ca. 3000 – 4000 Euro). Weiterhin werden nur noch drei statt vorher vier Versuche zur Herbeiführung einer Schwangerschaft von den Krankenkassen anteilig übernommen. Anspruch haben Frauen nur zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr und Männer nur bis zum 50. Lebensjahr.

Nicht nur Änderungen in der Kostenübernahme, sondern auch das in Deutschland 1991 in Kraft getretene, im weltweiten Vergleich eher restriktive Embryonenschutzgesetz (ESchG), sorgen im Hinblick auf die im Ausland teilweise erlaubten, erweiterten Behandlungsmethoden, die u.a. mit einer erhöhten Schwangerschaftsrate einhergehen können, für bundesweite Diskussionen. Demnach dürfen im Anschluss an die Befruchtung zwar mehrere Eizellen das sogenannte Vorkernstadium (zu diesem Zeitpunkt liegt das genetische Material von Spermatozoon und Oozyte noch getrennt vor) erreichen, aber nur maximal 3 Oozyten bis zur Verschmelzung der Vorkerne und dem somit per definitionem entstandenen Embryo, weiterkultiviert werden. Alle übrigen Oozyten müssen im Vorkernstadium vernichtet oder kryokonserviert werden. Die somit maximal 3 nach ESchG entstandenen „Embryonen“ müssen dann vollzählig in den Uterus der Frau

transferiert werden. Dadurch soll u.a. das Entstehen von überzähligen Embryonen verhindert werden.

In anderen Ländern besteht dagegen die Möglichkeit, vor dem Transfer die „besten Embryonen“ zu selektieren. Dazu werden alle befruchteten Eizellen bis zum Embryo kultiviert. Im Blastozystenstadium welches nach ca. 5 Tagen erreicht ist, wird nach morphologischen Kriterien und nach dem zeitlichen Ablauf der Teilungsstadien, die Qualität der Embryonen bestimmt. Danach werden nach Auswahl von 1-2 Blastozysten angeblich Implantationsraten von 30-40 % und Schwangerschaftsraten von über 50 % erzielt (GARDNER et al., 1998), die somit über der in Deutschland erzielten durchschnittlichen Schwangerschaftsrate von ca. 28% liegen (D.I.R. 2004). Dieser Vorteil entsteht dadurch, dass nicht alle Eizellen im Vorkernstadium das Blastozystenstadium erreichen. Möglicherweise liegt der in der Literatur jedoch stark differierende Anteil, nur zwischen 20 (MENEZO et al., 2001) und 50%. Die bei der Blastozystenkultur meist zwangsläufig entstehenden überzähligen Embryonen können kryokonserviert und bei einem eventuell späteren Behandlungszyklus verwendet werden. Da diese überzähligen Embryonen in Deutschland laut Gesetz nicht entstehen dürfen, wird in Deutschland lebenden Paaren diese erhöhte Chance auf den Eintritt einer Schwangerschaft verwehrt. Allerdings muss ergänzt werden, dass eine Kultivierung bis zum 5. Tag und somit ein Blastozystentransfer prinzipiell nicht verboten ist, jedoch nur bei max. 3 Embryonen erfolgen darf. In einer Untersuchung von EMILIANI et al. (2003), konnte sich jedoch bezüglich der Implantations- und Geburtenrate kein Vorteil des späten Transfers am 5. Tag gegenüber dem am 2. Tag nachweisen.

Eine weitere Möglichkeit um das Entwicklungspotential einer Eizelle einzuschätzen, ist die sogenannte Polkörperdiagnostik (PKD). Während der Eizellreifung und nach Eindringen des Spermatozoons in die Oozyte entstehen Polkörperchen, die prinzipiell den gleichen Chromosomensatz wie die Eizelle besitzen, die jedoch für die Entstehung und Entwicklung des Embryo an sich keine Bedeutung haben. Somit kann nach bisherigem Stand der Wissenschaft ein Polkörperchen der Eizelle auf Chromosomenanomalien untersucht werden, was insbesondere im Hinblick auf die mit mütterlichem Alter zunehmenden Aneuploidien durchgeführt wird. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass somit nur die mütterliche DNA einer Chromosomenanalyse zugänglich ist.

Eine weitere Technik, die die Untersuchung sowohl väterlicher als auch mütterlicher Chromosomen einschließt, ist die Präimplantationsdiagnostik (PID). Die Präimplantationsdiagnostik ist im Gegensatz zur Polkörperdiagnostik in Deutschland durch das ESchG verboten. Bei der Präimplantationsdiagnostik (PID) werden dem Embryo am 3. Tag 1-2 Zellen entnommen, die im Anschluss auf genetische Defekte untersucht werden können. Somit ist es möglich, bereits vor Implantation des Embryos in die Gebärmutter, Erkrankungen wie z.B. die Trisomie 21 oder die Zystische Fibrose auszuschließen oder eine Auswahl des gewünschten Geschlechts zu treffen.

In Zukunft wird es vielleicht jedoch auch möglich sein, mittels Techniken die im engeren Kontext die künstliche Befruchtung als Grundlage haben, nicht nur Erkrankungen im Vorfeld zu selektieren, sondern die entstandenen Krankheiten besser zu therapieren. Die vielversprechende, noch am Anfang stehende und hier nur namentliche erwähnte Forschung an sogenannten embryonalen Stammzellen (die u.a. aus überzähligen, in vitro fertilisierten Embryonen gewonnen werden können), führt weltweit zu heftigen Diskussionen und ist Hoffnungsträger für viele z.B. an Morbus Parkinson oder Querschnittslähmung erkrankte Patienten.

Die o.g. Techniken und Methoden verdeutlichen die Aktualität rund um das Thema Reproduktionsmedizin und lassen erkennen, dass sowohl Diskussionen um Rechtsfragen und ethisch-theologische Aspekte, als auch große wissenschaftliche Errungenschaften gerade erst am Anfang stehen.

2.2 Grundlagen der Gametogenese

2.2.1 Spermatogenese

In den mit Keimepithel ausgekleideten Tubuli seminiferi contorti des Hodens, beginnt mit der Pubertät die Entwicklung der Spermatozoen, deren Reifung und Speicherung anschließend in den Nebenhoden stattfindet.

Ausgangspunkt sind dabei die Urkeimzellen aus denen Spermatogonien hervorgehen, die jetzt beginnen, sich durch mitotische Teilung zu vermehren. Hierbei werden Typ A und B Spermatogonien unterschieden. Dabei gelten A-Spermatogonien als Stammzellen und B-Spermatogonien als weiterentwickelter Zelltyp. Die B-Spermatogonien sind die Ausgangszellen für die nun ebenfalls durch Mitose erfolgende Zellvermehrung, bei der die Spermatozyten I hervorgehen. Nun erfolgt die 1. Reifeteilung, die dazu führt, dass sich der Chromosomensatz auf die Hälfte reduziert. Somit sind die Spermatozyten II entstanden, die jetzt die 2. Reifeteilung vollziehen, bei der die nun mit einem haploiden Chromosomensatz ausgestatteten Spermatischen entstehen. Ab jetzt beginnt die sogenannte Spermio-genese, d.h. die Umwandlung der Spermatischen zu Spermatozoen. Dabei kommt es zur Differenzierung des Akrosoms und des Geißelapparates, sowie zur Chromatinkondensation im Kern des Spermatozoons. Nun können die fertigen Spermatozoen nach einer Entwicklungsdauer von ca. 64 Tagen den Hoden verlassen. In den kommenden 8-17 Tagen erfolgt die Nebenhodenpassage, bei der die Spermatozoen ihren begonnenen Reifungsprozess fortsetzen (SCHIEBLER et al., 1999).

Die aus dem Hoden freigesetzten Spermatozoen sind ca. 60 µm lang und gliedern sich in einen ovalen Kopf, dessen vordere zwei Drittel von einer bläschenförmigen Kappe, dem Akrosom, bedeckt sind, welches verschiedene Enzyme beinhaltet (u.a. Akrosin, Hyaluronidasen), die für die Penetration der Eihüllen eine bedeutende Rolle spielen, sowie einen Schwanz, der wiederum in ein kurzes Verbindungsstück (Hals), ein Mittelstück (Sitz der Mitochondrien und somit der „Bewegungsenergie“), ein Haupt- und Endstück unterteilt ist (SCHIEBLER et al., 1999)

Nach der Abgabe der Spermatozoen in das Lumen der Tubuli seminiferi contorti, gelangen diese über die Ductuli efferentes testis in den Ductus epididymidis und somit in den Nebenhoden. Hier erfolgt ein komplexer Reifungsprozess, der eine

Reihe von Veränderungen an den Spermatozoen bewirkt. Das Chromatin des Spermienkerns wird weiter kondensiert, um den Spermienkopf kleiner und kompakter zu gestalten. Zusätzlich wird das Zytoplasma reduziert und die Plasmamembran verändert. Eine weitere wichtige Funktion des Nebenhodens besteht darin, dem Spermatozoon die Fähigkeit zur Motilität zu geben, die jedoch durch das im Nebenhoden vorherrschende Milieu unterdrückt wird.

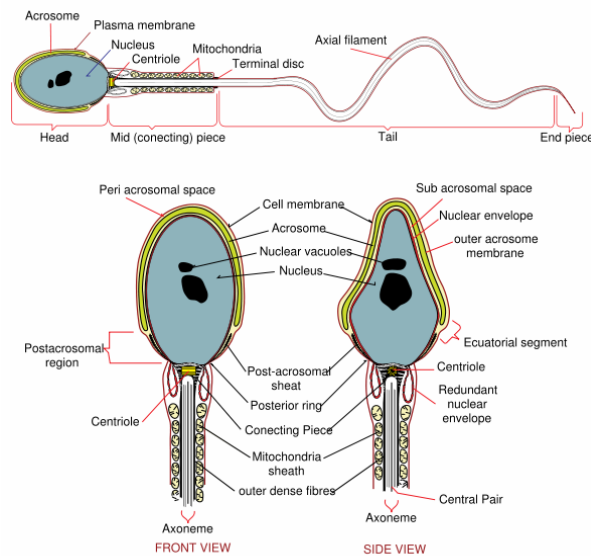


Abb.1: Menschliches Spermatozoon

Quelle: www.wikipedia.org

Bei der Ejakulation werden den Spermatozoen Sekrete aus der Prostata und den Bläschendrüsen (Vesiculae seminalis) beigemischt, die schließlich das leicht alkalische Seminalplasma mit einem durchschnittlichen Volumen von ca. 2-6 ml bilden. Dabei sezernieren die Bläschendrüsen ein alkalisches, fructose- und ascorbinsäurereiches Sekret, das ca. 70% des Gesamtejakulatvolumens ausmacht. Den zweitgrößten Volumenanteil bildet mit ca. 20-25% die Prostata. Sie sezerniert ein saures Sekret, welches u.a. Zink, Magnesium, Zitrat, Cholesterin und verschiedene Proteasen enthält.

Mit der Ejakulation der Spermatozoen in den weiblichen Genitaltrakt bzw. dem Kontakt zwischen den Spermatozoen und dem Seminalplasma, erhalten die Spermatozoen ihre benötigte Motilität, so dass sie in der Lage sind den Weg von der Portio zur Oozyte im ampullären Teil der Tuba uterina zurückzulegen. Gleichzeitig kommt es jetzt zu einer Anlagerung verschiedener Proteine an die Spermatozoenoberfläche, u.a. eines Dekapazitationsfaktors der dazu dient, eine vorzeitige Akrosomreaktion zu verhindern. Dieser wird jedoch nach mehreren Minuten und intrauteriner Aszension wieder abgespalten und somit die sogenannte Kapazitation eingeleitet. Dieser wichtige Reifungsprozess, bei dem es zu Veränderungen an Rezeptoren und membranständigen Proteinen (FRASER et al., 2006), sowie einer Hypermotilität der Spermatozoen kommt, leitet im Idealfall bei Kontakt mit der Oozyte, die Akrosomreaktion ein. Es kommt zu einer Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran, wobei verschiedene Penetrationsenzyme freigesetzt werden, u.a. das Akrosin, welches eine Schlüsselstellung zum Durchdringen der Zona pellucida einnimmt. Ebenfalls werden Hyaluronidase und Corona-Penetrating-Enzymes zum Überwinden der Interzellularbrücken des Cumulus oophorus sowie der Corona radiata freigesetzt.

Nach vollendeter Akrosomreaktion ist das Spermatozoon in der Lage, die Zona pellucida zu durchdringen und seine postakrosomale Membran mit der Zellmembran der Oozyte zu fusionieren (Imprägnation).

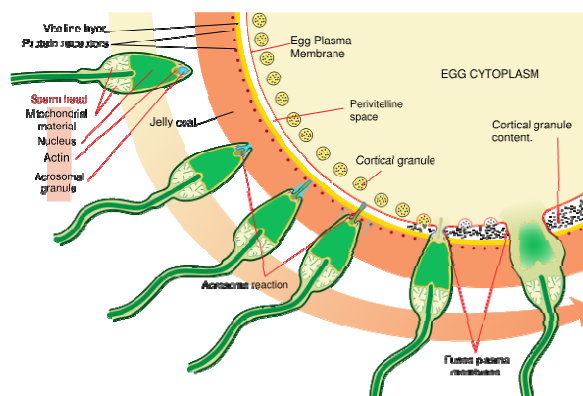


Abb.2: Schema zur Akrosomreaktion

Quelle: www.wikipedia.org

2.2.2 Oogenese

Bereits während der Embryonalphase entstehen aus den sogenannten Urkeimzellen im Ovar bis zu maximal 6 Millionen Oogonien. Davon differenzieren sich zwischen dem 3.-7. Fetalmonat bis zu 2 Millionen Oogonien zu primären Oozyten, die ihre 1. Reifeteilung begonnen haben und im Diaktyotänstadium bis kurz vor der Ovulation arretiert bleiben. Bis zu Beginn der Pubertät, vermindert sich die Zahl der primären Oozyten auf etwa 40000, wovon wiederum nur ca. 400 zur Ovulation gelangen (TESCHNER und ZUMBUSCH-WEYERSTAHL, 2001).

In jedem Menstruationszyklus werden mehrere, der seit Geburt arretierten Primärfollikel rekrutiert, aus denen sich über das Zwischenstadium des Sekundärfollikels pro Zyklus aber nur ein sprungreifer, sogenannter Graafscher Follikel entwickelt. Etwa eineinhalb Tage vor der Zyklusmitte steigt die Konzentration des Luteinisierenden Hormons (LH) stark an. 10 bis 12 h nach dem LH Peak rupturiert der Graafsche Follikel und setzt die ausgewachsene ca. 120 – 140 µm große Oozyte frei. Die Oozyte hat nun ihre 1. Reifeteilung vollendet und wird als sekundäre Oozyte bezeichnet, die jetzt die letzte und somit 2. Reifeteilung beginnt, welche jedoch erst nach der Fertilisation vollendet wird.

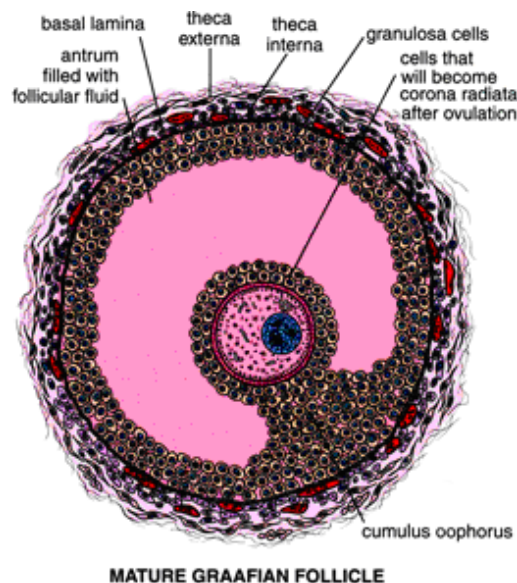


Abb.3: Graafscher Follikel

(Quelle: Internetpräsenz: Department of anatomy and cell biology, Indiana university school of medicine)

2.3 Fertilisation

Nach erfolgreicher Imprägnation wird jetzt vermutlich ein zytosolischer Faktor, der sogenannte SAOAF (sperm associated oocyte activating factor), aus dem Spermium freigesetzt, der zur Aktivierung der Eizelle führt, so dass diese ihre Meiose vollenden und das 2. Polkörperchen ausstoßen kann (DOZORTSEV et al., 1997, 1995a; RYBOUCHKIN et al., 1995; TESARIK et al., 1994a).

Inzwischen ist ein solcher Faktor, der intrazellulär auf Höhe des äquatorialen Segments des Spermiums zu finden ist, identifiziert worden und hat den Namen Oszillin erhalten (PARRINGTON et al., 1996). Nachdem Oszillin in das Ooplasma der Eizelle übergetreten ist, löst es dort repetitive intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen aus (SWANN et al., 2001; HOMA et al., 1994, TESARIK et al., 1994b).

Dies bewirkt u.a. eine Ca^{2+} - getriggerte kortikale Reaktion (CRAN und ESPER, 1990), bei der zahlreiche kortikale Granula die sich an der Innenseite der Oozytenmembran befinden, in den perivitellinen Spalt entleeren. Dadurch werden Enzyme freigesetzt, die verhindern sollen, dass weitere Spermatozoen die Eizelle penetrieren können. Dies wird mit dem Begriff „Polyspermieblock“ beschrieben.

Im Besonderen führen die Ca^{2+} -Oszillationen aber zur Aktivitätsabnahme des sogenannten M-phase promoting factor (MPF), der ein Komplex aus der Proteinkinase p34cdc2 und einem regulatorischen Protein, dem Cyclin B, darstellt und für den meiotischen Arrest der Eizelle im Metaphase II Stadium verantwortlich ist (HEIKINHEIMO und GIBBONS, 1998). Somit kann die Eizelle nun ihre Meiose vollenden und das 2. Polkörperchen ausstoßen.

Des Weiteren scheint das Vorhandensein eines sperm nucleus decondensing factor (SNDF) im Ooplasma der Eizelle für wahrscheinlich.

Dazu zählt man u.a. das Nukleoplasmin, welches in der Oozyte gebildet und während des Wachstums unter ATP-Verbrauch in den Germinalvesikel transportiert wird (PAINE et al., 1995) und schließlich aus dem Germinalvesikel (GV) bei dessen Zusammenbruch freigesetzt wird (MAEDA et al., 1998; PHILPOTT et al., 1991). Nukleoplasmin ist in der Lage, die Protamine der DNA zu entfernen und diese wieder durch die Histone H2A und H2B zu ersetzen. Dies bewirkt die Ausbildung von Nukleosomen und führt somit zur Dekondensation der Spermien-DNA (LASKEY et

al., 1993).

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Nukleoplasmin nach Befruchtung der Eizelle ebenfalls bei Prozessen wie Transkription und Translation eine Rolle spielt (RAMOS et al., 2005).

Einen weiteren wichtigen Beitrag zur Dekondensation, im Besonderen zur Reduzierung der Disulfidbrücken, scheint das in reifen Oozyten vorhandene Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH) zu leisten (SUTOVSKY und SCHATTEN, 1997; PERREAULT et al., 1984). Der Glutathiongehalt der Eizelle steigt während ihres Reifungsprozess an und ist in Metaphase II Zellen höher als im unreifen GV Stadium (ZUELKE et al., 2003; PERREAULT et al., 1988).

Somit bedingt das Glutathion zusammen mit dem Nukleoplasmin die Dekondensation und führt zur Schwellung des Spermienkopfes im Ooplasma (USUI und YANAGIMACHI, 1976).

Nun bildet sich der männliche Vorkern, der dann mit der DNA-Synthese beginnt. Zur gleichen Zeit dekondensiert auch das maternale Chromatin, so dass es auch hier zur Ausbildung eines Pronukleus mit anschließender DNA-Replikation kommt.

Während diesem ca. 24 h andauerndem Stadium verdoppeln die Vorkerne also ihre Chromosomen, bewegen sich mit Hilfe von Mikrotubuli aufeinander zu, fusionieren jedoch zu keinem Zeitpunkt (KÜPKER et al., 1998). Das im Spermium enthaltene Zentriol teilt sich, um die Zentrosomen der 1. Teilungsspindel zu bilden (SATHANANTHAN et al., 1996). Die Chromosomen rekondensieren, verbinden sich mit den Mikrotubuli und bewegen sich zum Äquator der Eizelle. Die 1. mitotische Teilung der neu entstandenen Zygote beginnt und beendet somit den Befruchtungsvorgang.

2.4 Ursachen von Fertilitätsstörungen

Fertilitätsstörungen können eine Reihe von Ursachen zu Grunde liegen. Im Folgenden werden sowohl die möglichen männlichen als auch weiblichen Ursachen dargelegt. Schätzungen zufolge sind die Sterilitätsursachen zu 50% bei der Frau, zu 30% beim Mann und in 20% bei beiden Partnern zu suchen (TAUBERT, 1998).

2.4.1 Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen

In Anlehnung an HOFMANN (2003) und werden nachfolgend die wichtigsten Ursachen männlicher Fertilitätsstörungen aufgeführt:

Primäre angeborene Hodenschäden:

- chromosomale Anomalien (z.B. Klinefelter-Syndrom),
- Spermatozoendefekt wie z.B. Globozoospermie (Fehlen des Akrosom), Immotile-Cilia-Syndrom (Bewegungsunfähigkeit der Spermien)
- Maldescensus testis
- Störungen der Testosteron-Biosynthese
- 5 α -Reduktasemangel oder Androgenrezeptordefekte

Primäre erworbene Hodenschäden:

- Tubulusinsuffizienz (Schädigung des Keimepithel) durch z.B. Medikamente, Virusinfektionen, Traumen, Wärmeschäden und Durchblutungsstörungen
- Leydigzellinsuffizienz

Sekundäre Hodenschäden (Störungen der übergeordneten hormonellen Regulationszentren im Hypothalamus oder Hypophysenvorderlappen)

Extratestikuläre genitale Störungen:

- Verschlüsse oder Stenosen der ableitenden Samenwege
- Störungen des Spermatozoentransportes z.B. durch Medikamente oder bei retrograder Ejakulation
- Störungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen
- Varikozele

Immunologische Ursachen (Bildung von Spermatozoen Autoantikörper kann zur Agglutination der Spermatozoen im Seminalplasma führen und auch die Penetration der Spermien durch den Zervikalmukus erschweren)

Psychische Ursachen wie z.B. eine gestörte Partnerbeziehung

Idiopathische Sterilität (bei ca. einem Drittel der infertilen Männer bleibt die Ursache ungeklärt)

2.4.2 Ursachen weiblicher Fertilitätsstörungen

In Anlehnung an STAUBER (2001) werden hier die wichtigsten Ursachen weiblicher Fertilitätsstörungen erläutert.

Ovarielle Sterilitätsursachen:

- Hypothalamisch-hypophysäre Ovarialinsuffizienz z.B. durch Stress, Hochleistungssport, Anorexia nervosa, Hypophysentumore
- Normogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz (anovulatorische Zyklen, Corpus-luteum-Insuffizienz, Amenorrhoe)
- Hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz (gesteigerte Androgenproduktion mit den möglichen Folgen der Sterilität, Virilisierungserscheinungen, polyzystische Ovarien)
- Hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz (erhöhter FSH-Spiegel z.B. bei Gonadendysgenesien, Ullrich-Turner-Syndrom)
- Erhöhte Prolaktinspiegel durch ein Prolaktinom oder Einnahme von Dopaminantagonisten

Tubare Sterilität:

- Adnexitiden nach Infektionen durch Chlamydien, Gonorrhoe, Lues oder Urogenitaltuberkulose
- Endometriose

Uterine Sterilität:

- Fehlbildungen wie z.B. der Uterus bicornis, Uterussepten oder die Hypoplasie des Uterus führen häufig zu Fehlgeburten
- Synechien im Cavum uteri durch Infektionen oder wiederholte Kürettage
- Myome

Zervikale Sterilitätsursachen:

- Anatomische Ursachen wie alte Zervixrisse, lokale Veränderungen durch chronische Entzündungen
- Störung des Zervixschleim
- Östrogenmangel (veränderter Aufbau und Sekretion der Zervixschleimhaut, beeinträchtigte Kapazitationsfähigkeit der Spermien)

Vaginale Sterilitätsursachen durch Fehlbildungen, rezidivierende Kolpitiden oder funktionelle Anomalien (Vaginismus)

Extragenitale Sterilitätsursachen:

- Tumoren der Hypophyse
- Schilddrüsenerkrankungen
- Diabetes mellitus
- Störungen der Nebennierenrinde
- Medikamente

Psychische Sterilitätsursachen

2.5 Klassische Samenanalyse und Spermigrammerstellung

Bei der Ejakulatanalyse werden die einzelnen Parameter in einem sogenannten Spermigramm festgehalten. Darin werden neben dem Volumen der Probe auch der pH-Wert, die Leukozytenzahl, die Viskosität, die Spermiedichte, Motilität und Morphologie, sowie die Ergebnisse des Eosin-, HOS- und MAR-Tests dokumentiert.

Nach OHL und MENGE (1996) wird im Allgemeinen unter einer normalen Spermienfunktion die Fähigkeit der Spermien verstanden, die Hürden des weiblichen Genitaltraktes und der Eizelle zu überwinden und die Eizelle zu befruchten. Deshalb ist das Spermigramm eine einfache Methode in der Basisdiagnostik männlicher Sterilität. Daraus lässt sich die Notwendigkeit weiterführender Diagnostik ableiten, bzw. die für dieses Paar am ehesten in Frage kommende Therapie finden. Hierbei sei erwähnt, dass ein Spermigramm zwar eine prognostische Einschätzung, aber keine definitive Beurteilung der Zeugungsfähigkeit des Mannes ermöglicht, denn auch bei Männern mit veränderten Spermigrammparametern können unter Umständen dennoch gute Konzeptionschancen bestehen (THIEL et al., 1983).

Nachfolgend sind die nach der World Health Organization (WHO) geltenden Referenzwerte aufgeführt. Im Kapitel 3.3 werden die einzelnen Methoden dann separat erläutert.

Als im Normalbereich liegend gelten nach WHO (1993) folgende Werte:

- Volumen: ≥ 2 ml
- pH-Wert: $\geq 7,2 - 8,0$
- Spermatozoenkonzentration (Dichte): $\geq 20 \times 10^6 / \text{ml}$
- Gesamt-Spermatozoen-Zahl: $\geq 40 \times 10^6$ pro Ejakulat
- Motilität: $\geq 50\%$ (WHO-Kategorie „a“ und „b“) oder $\geq 25\%$ (WHO-Kategorie „a“):
a = schnelle progressive Beweglichkeit
b = langsam progressive Beweglichkeit
c = nicht progressive Beweglichkeit
d = Immotilität
- Morphologie: $\geq 30\%$ mit normaler Form ($\geq 14\%$ nach Strict criteria)
- Leukozyten (Cyturtest): $< 1 \times 10^6 / \text{ml}$
- MAR-Test: $\leq 10\%$ Spermien mit adhärenen Partikeln
- Eosin-Test (Vitalität): $\geq 75\%$ vitale Spermien, d.h. die keinen Farbstoff annehmen (Eosin)
- HOS-Test: $> 60\%$ geschwollene Spermischwänze

Nomenklatur der Ejakulatparameter

Um Abweichungen von normalen Ejakulatparametern zu beschreiben, wurde eine Nomenklatur eingeführt, die die Art der Abweichung verdeutlichen soll (ELIASSON et al., 1970).

- | | |
|-----------------------------------|---|
| • Normozoospermie | Normale Ejakulatparameter |
| • Oligozoospermie | Reduzierte Spermienkonzentration |
| • Asthenozoospermie | Reduzierte Motilität |
| • Teratozoospermie | Reduzierter Anteil von Spermien mit normaler Morphologie |
| • Oligoasthenoteratospermie (OAT) | Kombination aus Oligozoospermie, Asthenozoospermie und Teratozoospermie |
| • Azoospermie | Keine Spermien im Ejakulat |
| • Aspermie | Kein Ejakulat |

2.6 Techniken der Reproduktionsmedizin

Sofern eine primäre Therapie der zur Sterilität führenden Ursachen nicht erfolgreich oder möglich ist, bzw. alle weiteren therapeutischen Optionen erschöpft sind, können verschiedene Techniken der Reproduktionsmedizin zum Einsatz kommen.

Sowohl bei der In-vitro-Fertilisation (IVF) als auch der in dieser Studie angewandten intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), besteht ein Behandlungszyklus aus den Elementen ovarielle Stimulation, Maßnahme der assistierten Reproduktion und Lutealphasenunterstützung (LUDWIG, 2002), die nachfolgend beschrieben werden.

2.6.1 Ovarielle Stimulation und Follikelpunktion

Damit möglichst viele Oozyten zur In-vitro-Fertilisation (IVF) oder zur intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) zur Verfügung stehen, erfolgt eine kontrollierte ovarielle Hyperstimulation.

Dazu werden heute meist Stimulationsprotokolle eingesetzt, die zu einer Down Regulation der Rezeptordichte mittels GnRH-Analoga nach dem sogenannten „langen Protokoll“ führen (DIEDRICH et al. 1998). Dadurch lässt sich die Hypophyse blockieren, so dass ein vorzeitiger LH-Anstieg mit verfrühter Ovulation vermieden wird und eine von der körpereigenen Hormonregulation relativ unabhängige Stimulation der Ovarien erfolgen kann (LUDWIG, 2002). Hierzu werden ab dem 20. Tag des Vorzyklus GnRH-Analoga wie z.B. Decapeptyl® oder Synarela® verabreicht und es kann zu einer kurzzeitigen Stimulation der Gonadotropinausschüttung kommen (sogenannter „Flare-up“ Effekt). Dies bewirkt eine vermehrte Follikelrekrutierung, deren weitere Entwicklung jedoch durch die Down Regulation und dem dadurch fehlenden Einfluss der Gonadotropine vorläufig sistiert. Nach ca. 14 Tagen beginnt dann die eigentliche ovarielle Stimulation mit der Gabe von rekombinantem FSH (Gonal-f®, Puregon®), HMG (Menogon®) oder einer Kombination von beiden bis zur Ovulationsinduktion.

Beim sogenannten „kurzen Protokoll“ erfolgt die Gabe der GnRH-Analoga nicht schon im Vorzyklus, sondern erst zu Beginn des Punktionszyklus zusammen mit der ovariellen Stimulation (wie oben beschrieben z.B. mit HMG oder rek. FSH).

Während die GnRH-Agonisten durch die dauernde Besetzung der Rezeptoren zu deren Down Regulation und zur Desensibilisierung der gonadotropen Zellen führen, binden GnRH-Antagonisten (Orgalutran®, Cetrotide®) kompetitiv an die GnRH-Rezeptoren und verhindern somit den Stimulus-Effekt auf die Hypophysenzellen und somit auch den oben beschriebenen „Flare-up“ Effekt (FELBERBAUM und DIEDRICH, 1999). Hierbei erfolgt die ovarielle Stimulation ähnlich wie im „kurzen Protokoll“ bereits zu Beginn des Punktionszyklus (ab dem 2. oder 3. Zyklustag) und wird durch die Gabe des GnRH-Antagonisten ab dem 6. Zyklustag, bis zur Ovulationsauslösung, ergänzt (FELBERBAUM und DIEDRICH, 1999).

Nach erfolgter Stimulation mittels einem der oben beschriebenen Stimulationsmethoden, wird nach dem sonographisch kontrollierten Erreichen einer Follikelgröße von ca. 16 – 20 mm, die Ovulation eingeleitet. Dazu werden nach DIEDRICH et al. (1998) 5.000 bis 10.000 IE HCG intramuskulär appliziert.

Circa 36 Stunden nach der HCG-Gabe erfolgt dann die transvaginale, ultraschallgesteuerte Follikelpunktion zur Gewinnung der Oozyten, die wahlweise in Intubationsnarkose, lokaler Anästhesie oder allgemeiner Sedierung durchgeführt wird (LUDWIG et al., 2002).

Die besonders beim „langen Protokoll“ stark gedrosselte körpereigene Progesteronsynthese führt meist zu einer insuffizienten Lutealphase, die eigentlich die Gebärmutterschleimhaut für das Einnisten eines Embryos optimal gestalten soll. NOSARKA et al. (2005) konnten einen positiven Einfluss der Unterstützung durch HCG oder Progesteron auf die Befruchtungsraten zeigen und halten daher eine Substitution für indiziert. Daher kann eine Lutealphasenunterstützung ab dem Tag des Embryotransfers z.B. mit 3 x täglich 200 mg Utrogest® oder 2 x täglich Crinone® 8% durchgeführt werden, die in der Untersuchung von KLEINSTEIN (2005) im direkten Vergleich keine Unterschiede in Bezug auf Implantation, Schwangerschaftsverlauf oder Abortrate zeigten. Bezüglich des Behandlungsbeginn der Progesterongabe am Tage vor der Punktion, am Tag der Punktion sowie ab dem Tag des Transfers, ergeben sich laut MOCHTAR et al. (2006) keine signifikanten Unterschiede. Auch bezüglich der Behandlungsdauer die entweder bis zum positiven Schwangerschaftstest oder beispielsweise bis zur 12. SSW erfolgen kann, konnten PROCTOR et al. (2006) hinsichtlich der Geburtenrate keine Unterschiede nachweisen.

2.6.2 Fertilisation mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)

Bei der Fertilisation mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI), als einem Standardverfahren der assistierten Reproduktion, wird ein einzelnes Spermatozoon in das Zytoplasma der Oozyte injiziert und nach erfolgreicher Befruchtung meist 2 Tage später in den Uterus transferiert. Dieses Verfahren ermöglicht es dem Spermatozoon, die natürliche Barriere der Zona pellucida zu überwinden, so dass nach KÜPKER et al. (1998) die Indikationen zur ICSI Behandlung wie folgt lauten:

- Schweres OAT-Syndrom
- Ausgeprägte Asthenozoospermie
- Akrosomdefekte
- Chromatinstörungen
- Krypto-/Nekrozoospermie: ($< 1 \times 10^6$ / ml) / (keine Beweglichkeit der Spermien)
- Immunologische Sterilität
- Versagen der IVF-Behandlung
- Retrograde Ejakulation / Anejakulation
- Nach Punktion geringe Oozytenanzahl (um Fertilisierung zu gewährleisten)

Nach STROWITZKI (2000) können sich jedoch u.a. noch folgende, zusätzliche relative Indikationen ergeben:

- Gering- bis mäßiggradige andrologische Subfertilität
- Reinsemination mit ICSI bei im IVF unfertilisierten Eizellen
- Reduzierte Motilität bei kryokonservierten Spermien
- Reduzierte Eizellqualität

Somit wird deutlich, dass die ICSI als extrakorporales Befruchtungsverfahren immer erst dann zum Tragen kommt, wenn eine primäre Therapie des ungewollt kinderlosen Paares nicht möglich ist oder erfolglos war.

Doch auch 15 Jahre nach Geburt des ersten ICSI-Kindes bleiben immer noch Fragen und Diskussionen darüber, ob oder in wiefern sich diese Kindern von denen, die nach einer natürlichen Konzeption geboren wurden, unterscheiden.

Wie BELVA (2006) auf der Jahrestagung der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) in Prag berichtete, kann von einer geringen Häufung schwerer Fehlbildungen nach ICSI ausgegangen werden, jedoch besteht kein Unterschied im Vergleich zu normal gezeugten Kindern hinsichtlich der körperlichen Entwicklung. Dies korreliert mit den Aussagen von IMBAR et al. 2006 nach Auswertung ausgewählter Literaturdaten, wonach Kinder nach ICSI ein erhöhtes Fehlbildungsrisiko haben und mit der Publikation von PONJAERT-KRISTOFFERSEN et al. (2005) wonach kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung zwischen 5-Jährigen ICSI Kindern und normal geborenen Kindern bezüglich geistiger und motorischer Entwicklung besteht.

BELVA (2006) geht davon aus, dass das leicht erhöhte Fehlbildungsrisiko nicht auf die ICSI Technik selbst, sondern auf den genetischen Hintergrund der Eltern zurückzuführen ist. Denn da ein Spermium unmittelbar in die Eizelle injiziert und die physiologische Selektion umgangen wird, werden vermutlich häufiger männliche Gendefekte, die in Zusammenhang mit der Unfruchtbarkeit stehen, an das Kind weitergegeben. Möglicherweise ist die Unfruchtbarkeit selbst ein Risikofaktor. Daher muss laut BUNDESÄRZTEKAMMER (Novelle 2006) vor einer ICSI-Therapie eine genaue Anamnese, insbesondere eine Stammbaumanalyse beider Partner über mindestens 3 Generationen (unter anderem Fehlgeburten, Totgeburten, Personen mit körperlichen oder geistigen Behinderungen, andere Familienmitglieder mit Fertilitätsstörungen) durchgeführt werden. Sollten sich Hinweise auf Chromosomenstörungen oder auf Erkrankungen, die genetisch bedingt sein könnten, ergeben, sollte das Angebot zur Beratung durch einen Humangenetiker erfolgen.

2.7 Grundlagen zur Spermien- und Eizellanalyse

2.7.1 Bedeutung der Spermienmorphologie

Die für Spermien modifizierte Papanicolaou-Färbung (PAPANICOLAOU, 1942), erlaubt eine differenzierte Auswertung der Spermatozoen hinsichtlich ihrer Morphologie, sowie den azidophilen und basophilen Zellkomponenten (WHO 1993). In mehreren Untersuchungen konnte diese Färbemethode als ein nützlicher Parameter zur Abschätzung der Spermienqualität bestätigt werden und kann daher zur Basisdiagnostik der männlichen Sterilität beitragen (EGGERT-KRUSE et al., 1996), sowie die Auswahl zwischen den für diesen Patienten in Frage kommenden Maßnahmen der assistierten Reproduktion erleichtern.

Im Ejakulat infertiler Männer konnte ein erhöhter Anteil von Spermien mit pathologischer Kopfmorphologie gefunden werden (BIELSA et al., 1994).

Darüber hinaus konnte in vielen Studien ein Zusammenhang zumindest bei der IVF, zwischen einer hohen Zahl morphologisch normaler Spermien und einer verbesserten Befruchtungs- bzw. Schwangerschaftsrate gezeigt werden – et vice versa (BERKOVITZ et al., 2005; BARTOOV et al., 2003; ESTERHUIZEN et al., 2002 und 2000a; HAMMADEH et al., 1998; KRUGER et al., 1986).

Möglicherweise kann dies durch eine Untersuchung von MENKVELD et al. (1991) erklärt werden, die eine Selektion normal geformter Spermatozoen durch die Zona pellucida postulieren.

Allerdings stimmen nicht alle Arbeiten mit diesen Ergebnissen überein bzw. gelten diese Ergebnisse nicht für die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). So konnten NAGY et al. (1998), HAMMADEH et al. (1996) und Sakkas et al. (1996), keine Korrelation zwischen der Morphologie und der Befruchtungsrate nach ICSI finden.

Des weiteren scheinen Spermatozoen die schlechte Morphologie-Werte aufweisen, häufig eine unzureichend kondensierte und somit unreife DNA zu besitzen und auch häufiger mit chromosomalen Veränderungen und DNA-Strangbrüchen einherzugehen (PIASECKA et al., 2006; SUN et al., 2006; ESTERHUIZEN et al., 2000a; LOPES et al., 1998; BIANCHI et al., 1996).

Um daher u.a. die Anzahl normomorpher Spermien für die Techniken der assistierten Reproduktion zu erhöhen, werden verschiedene Aufbereitungsmethoden verwendet. Die in dieser Studie verwendeten Methoden PureSperm und Swim-up konnten beide nachweislich eine Verbesserung bezüglich der Morphologie erzielen (HAMMADEH et al., 2001).

2.7.2 Bedeutung des Chromatinkondensationsstatus

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 erwähnt, durchlaufen Spermatozoen während ihrer Entwicklung eine mehrstufige Chromatinkondensation.

Dabei werden lysinreiche Histone durch kleine basische Proteine, sogenannte Protamine ersetzt (GRIMES, 1986; MANICARDI et al., 1995). Allerdings verbleibt ein kleiner Prozentsatz an Histone, der nicht durch Protamine ersetzt wird (WYKES und KRAWETZ, 2003).

Bisher konnten 2 verschiedene Arten von Protaminen im Spermienkern nachgewiesen werden, Protamin 1 (P1) und die Familie der Protamine 2 (P2, P3 und P4) (OLIVA, 2006).

Die basischen und vorwiegend aus Arginin bestehenden Protamine binden an die kleine Furche der DNA, vernetzen und neutralisieren Phosphatreste und es bilden sich zwischen und innerhalb der Protamine Disulfidbrücken aus, so dass es zur Stabilisierung des Chromatins kommt (BALHORN, 1982).

Nach der Ejakulation bindet das im Seminalplasma enthaltene Zink an die freien Thiol-Gruppen von Cysteinresten der Protamine und bewirkt über eine Stabilisierung der Quartärstruktur somit erneut eine verstärkte Kondensation (KVIST et al., 1987).

Diese starke Chromatinkondensation ist möglicherweise ein Schutzmechanismus gegenüber äußeren Einflüssen, da Spermien über keine oder nur wenige adäquate DNA-Reparaturenzyme verfügen (OLSEN et al., 2005; MATSUDA et al., 1985).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein schlechter Chromatinkondensationsgrad der Spermien mit verminderten Befruchtungsraten nach IVF/ICSI in Zusammenhang steht (NASR-ESFAHANI et al., 2004a; RAZAVI et al., 2003; ESTERHUIZEN et al., 2002; HAMMADEH et al., 1998; SAKKAS et al., 1996).

In den Spermienkernen infertiler Männer konnte ein verminderter Zinkgehalt gefunden werden, der somit wahrscheinlich eine erhöhte Instabilität des Chromatins zur Folge hat (KVIST et al., 1987), die allerdings auch durch einen fehlerhaften Ersatz der Histone durch Protamine entstehen kann (FORESTA et al., 1992).

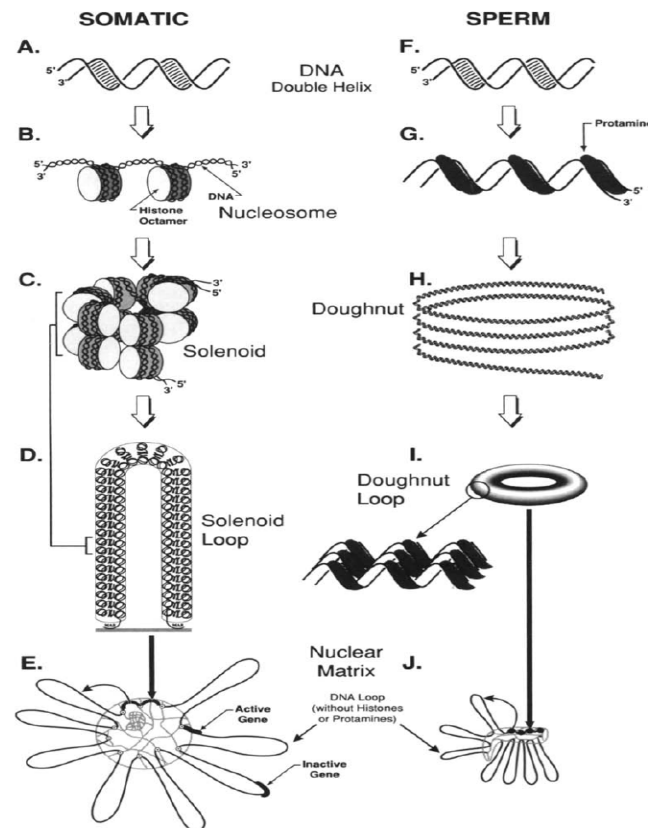


Abb.4: DNA Organisation in somatischen Zellen und Spermatozoen

(In Anlehnung an WARD, 1993)

Auch MOLINA et al. (2001) konnten zeigen, dass infertile Männer vermehrt Spermatozoen mit schlechter kondensiertem Chromatin besitzen. SAKKAS et al. (1996) vermuten einen Zusammenhang zwischen schlechter Chromatinkondensation und einem verminderten Dekondensationsvermögen des Spermatozoons innerhalb der Eizelle, was zu niedrigeren Befruchtungsraten führt.

Sollte es trotz fehlerhafter Chromatinkondensation doch zur Befruchtung kommen, ist es denkbar, dass es zu Problemen in der embryonalen Entwicklung kommt (JAGER, 1990).

Daher ist die Kenntnis über den Chromatinkondensationsgrad der Spermien zur Bewertung des Befruchtungspotentials von großer Bedeutung. ESTERHUIZEN et al. (2000b) kommen zu dem Entschluss, dass die Bestimmung der Chromatinkondensation bei jeder Diagnostik männlicher Infertilität zusätzlich durchgeführt werden sollte.

In dieser Studie wird u.a. der Einfluss der Spermieninkubationszeit auf die Chromatinkondensation untersucht. Nach Aufbereitung und ICSI bei ca. der Hälfte der gewonnen Eizellen, werden die Spermien weitere 4-5 Stunden bis zum 2. Injektionszeitpunkt inkubiert. BJÖRNDAHL et al. (2005) konnten zeigen, dass bei der Aufbereitungsmethode nach Swim-up in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unterschiedlich viel Zink vom Seminalplasma ins Swim-up Medium übergeht. Werden Spermatozoen längere Zeit im Seminalplasma inkubiert, kommt es zu einer Zunahme der Chromatininstabilität (MOLINA et al., 1995; KVIST (1980a). Die Untersuchung von KVIST (1980b) konnte zeigen, dass es durch Zink (Zn^{2+}), zu einer erschwerten Chromatinkondensation der Spermatozoen und somit also anscheinend zu einer vermehrten Stabilität des Spermienchromatins kommt. Daher kann vermutet werden, dass es u.a. durch den Zinkgehalt in der aufbereiteten Spermien suspension während der in dieser Studie längeren Inkubationsphase von 4-5 Stunden, zu einer Hyperkondensation des Spermienchromatins kommen kann, was zu einem vermehrten Auftreten von Fehlbefruchtungen führen könnte (HAMAMAH et al., 1990). HURET und MIQUEREAU (1984) sahen in der Hyperstabilität des Spermienchromatins einen nachteiligen Effekt indem sie vermuteten, dass hyperkondensiertes Chromatin innerhalb der Eizelle nicht adäquat decondensieren kann.

Um den Kondensationsgrad zu bestimmen, wurden in dieser Studie die Färbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Chromomycin A₃ (CMA₃) und mit Anilin Blau durchgeführt.

2.7.3 Bedeutung der Apoptoserate

Die klassische Samenanalyse wie in Kapitel 2.5 beschrieben, beinhaltet u.a. die Bestimmung der Spermienzahl, deren Beweglichkeit und die Beurteilung der Morphologie. Allerdings ist es mit diesen Methoden nicht möglich, Defekte in der Chromatinstruktur/DNA der Spermien zu identifizieren. Der Beschaffenheit der DNA kommt allerdings eine wesentliche Bedeutung zu, da eine normale Chromatinstruktur Voraussetzung für die Fähigkeit eines Spermatozoons zur Befruchtung ist (ERENPREISS et al., 2006).

Neben den im vergangenen Kapitel beschriebenen Fehlern in der Chromatinkondensation, können auch vermehrte DNA-Strangbrüche im Ejakulat infertiler Männer gefunden werden (MOUSTAFA et al., 2004; HOST et al., 1999; MANICARDI et al., 1995) und zu niedrigeren Befruchtungs-/Schwangerschaftsraten nach ICSI führen (BENCHAIB et al., 2003; HENKEL et al., 2003; LOPES et al., 1998; SAKKAS et al., 1996).

Das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in Spermien kann sowohl durch Fehler im Reifungsprozess (Chromatinkondensation, u.a. beim Ersatz der Histone durch Protamine) der Spermiogenese (SAKKAS et al., 2003, 2002; MANICARDI et al., 1995; SAILER et al., 1995), als auch durch Reaktivierung der apoptotischen Signalkaskade maturer Spermien entstehen (SAKKAS et al., 1999a; GORCZYCA et al., 1993). Normalerweise scheint die Apoptose ein wichtiger Mechanismus der Spermatogenese zu sein, um sowohl die Quantität der Keimzellen (LEE et al., 1997) als auch deren Qualität zu regulieren. Möglicherweise entgeht eine gewisse Anzahl von zur Apoptose bestimmten Spermien diesem Mechanismus (SAKKAS et al., 1999b), was mit dem Begriff „abortive apoptosis“ beschrieben wird und zu einer Verschlechterung der Spermienqualität führen (SHEN et al., 2002), sowie mit vermehrten DNA-Strangbrüchen einhergehen kann.

MOUSTAFA et al. (2004) fanden z.B. bei infertilen Männern erhöhte Apoptoseraten, die eine positive Korrelation zu DNA-Schäden aufwiesen.

Als dritte Ursache für das Auftreten von DNA-Strangbrüchen wird häufig oxidativer Stress genannt, der durch die sogenannten ROS (reactive oxygen species) verursacht wird (AGARWAL et al., 2006; MURATORI et al., 2006, 2003; MOUSTAFA et al., 2004) und in jedem Stadium der Spermatogenese, der Spermienreifung und Passage des männlichen Genitaltraktes auftreten kann (MURATORI et al., 2006).

Normalerweise herrscht im Ejakulat eine dynamische Wechselwirkung zwischen pro- und antioxidativen Substanzen. Durch Einfluss von ionisierender Strahlung, inflammatorischen Reaktionen, gesteigertem Zellstoffwechsel, Aktivierung von Oxidasen und Oxygenasen oder dem Verlust der antioxidativen Kapazität, können vermehrt freie Radikale wie z.B. $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\text{O}_2\cdot^-$ generiert werden, die für Schäden an der Membran und DNA von Spermatozoen verantwortlich sein können (SANOCKA und KURPISZ, 2004). Die Bedeutung dessen verdeutlichen AGARWAL et al. (2006), die bei erhöhten ROS-Leveln in Seminalplasma vermehrte DNA-Schäden und geringere Befruchtungsraten nach assistierten reproduktiven Techniken (ART) nachweisen konnten. Auch in der Untersuchung von D'AGATA et al. (1990) wurden bei infertilen Männern erhöhte ROS-Werte gefunden. Jedoch scheint es möglich zu sein, durch Einnahme antioxidativer Substanzen den Grad der DNA-Schädigung zu verbessern (GRECO et al., 2005).

Um die eventuell vorhandenen DNA-Strangbrüche, im Besonderen die während Apoptose entstandenen, in Spermien bzw. deren prozentualen Anteil im Ejakulat zu detektieren, wurden in der vorliegenden Studie die Fluoreszenzfärbung nach dem TUNEL-Prinzip durchgeführt. In der Untersuchung von SERGERIE et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass die mit TUNEL markierten DNA-Strangbrüche ein wichtiger Hinweis auf männliche Infertilität sein können.

In dieser Studie wird u.a. der Einfluss einer verlängerten Inkubationszeit bezüglich der auftretenden DNA-Strangbrüche untersucht. Nach CALAMERA et al. (2001) führt eine prolongierte Inkubationszeit zu einem erhöhten Anteil freier Radikale (ROS). Dies könnte mögliche negative Einflüsse auf die DNA-Integrität zur Folge haben.

2.7.4 Gründe für das Auftreten nicht fertilisierter Oozyten nach ICSI

Obwohl bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion vitale, morphologisch normale Spermien in reife Oozyten (Metaphase II Stadium) injiziert werden, kommt es in der Regel nur in durchschnittlich 63,17% der Fälle (D.I.R. 2004) zur Befruchtung.

Die Suche nach Ursachen für das Auftreten von Befruchtungsversagen nach ICSI, ist somit ein wichtiger Forschungsbereich der assistierten Reproduktion (ESTERHUIZEN et al 2000b) und hat zum Ziel, langfristig gesehen die Befruchtungsraten und im Besonderen die „baby take home rate“ nach ICSI zu verbessern.

Die Gründe für das Ausbleiben der Befruchtung scheinen vielseitiger Natur zu sein. Es können Fehler oder Defekte sowohl auf Seite der Spermatozoen, als auch im Bereich der Oozyte gefunden werden. Wie in den vorstehenden Kapiteln beschrieben, können neben einer schlechten Chromatinkondensation und Morphologie (ESTERHUIZEN et al., 2002), auch DNA-Strangbrüche innerhalb des Spermatozoons (BENCHAIB et al., 2003; LOPES et al., 1998) zum Ausbleiben der Befruchtung führen.

Die unmittelbar vor Injektion herbeigeführte Immobilisation des Spermatozoons soll gleichzeitig einen Defekt der Plasmamembran herbeiführen, so dass es möglich wird, die zytoplasmatischen Faktoren wie den sperm nucleus decondensation factor (SNDF) oder den sperm-associated oocyte activating factor (SAOAF) untereinander auszutauschen. Das der Spermien suspension zur Verlangsamung der Samenzellen vor Injektion zugefügte PVP, kann möglicherweise die Öffnung in der Spermienmembran abdichten und so die Aktivierungs- und Befruchtungsraten beeinträchtigen (DE GEYTER, 1997). Das im Zytoplasma der Oozyte enthaltene Glutathion und Nukleoplasmin, können somit ihre normale Funktion nicht ausüben, so dass es möglicherweise zu einem Ausbleiben der Spermien decondensation kommt. Gleichzeitig ist es jedoch auch denkbar, dass im Zytoplasma der Eizelle (noch) nicht genügend Glutathion und Nukleoplasmin enthalten ist, was häufig mit dem Begriff „cytoplasmic immaturity“ in Verbindung gebracht wird. GROSS et al. (1996) vermuten, dass einige der nicht befruchteten Eizellen zwar ihre nukleäre Reife, jedoch noch nicht den notwendigen zytoplasmatischen Reifegrad erreicht

haben und es somit zu keiner Spermiendekondensation kommt.

Ebenfalls scheint es, wie bereits erwähnt denkbar, dass der SAOAF wie z.B. das Oszillin, nicht ins Zytoplasma der Eizelle gelangen können, in zu niedriger Konzentration vorhanden, oder innerhalb der Eizelle nicht in der Lage ist, die zur Aktivierung der Oozyte notwendigen Ca^{2+} -Oszillationen auszulösen (ROSENBUSCH, 2000). Die ausbleibende Aktivierung der Eizelle ist für TESARIK und SOUSA (1995) mit ein Hauptgrund für das Auftreten nicht befruchteter Eizellen nach ICSI. Bleibt die Aktivierung der Eizelle aus, kann es nach SCHMIADY et al. (2005) zu einer vorzeitigen Chromosomenkondensation des Spermatozoons, der sogenannten „premature chromosome condensation“ (PCC), führen. Für NASR-ESFAHANI et al. (2004b) ist die PCC nach der Aneuploidie, der zweithäufigste Grund für eine Fehlbefruchtung nach ICSI.

Trotz erfolgreicher Injektion kann oft nach einer gewissen Zeit kein Spermatozoon mehr innerhalb der Eizelle gefunden werden. Wie FLAHERTY et al. (1995) vermuten, kann dies möglicherweise auf einem Austreten des Spermiums in den perivitellinen Spalt beruhen und scheint nicht Folge einer fehlerhaften Injektion zu sein. Dabei scheint es möglich, dass das Spermatozoon durch den entstandenen Defekt in der Plasmamembran der Oozyte, wieder ins Kulturmedium übergehen kann. Eine aktive Ejektion dagegen scheint eher unwahrscheinlich.

Um zur Eruiierung der Gründe einer ausbleibenden Befruchtung nach ICSI beizutragen, wurden die in dieser Studie nicht fertilisierten Oozyten mit der Fluoreszenzfärbung Hoechst 33342 gefärbt. Dabei wurde untersucht, ob die Oozyten im Metaphase II Stadium verblieben sind oder doch regelrecht aktiviert werden konnten, bzw. ob das Spermienchromatin kondensiert blieb oder die notwendige Dekondensation schon vollzogen oder begonnen hatte.

2.8 Eigene Fragestellung

In dieser Studie soll der Einfluss der Spermieninkubationszeit auf den Chromatinkondensationsgrad, die DNA-Integrität und die Befruchtungs-/Schwangerschaftsraten nach ICSI untersucht werden.

Weiterhin werden die nicht befruchteten Eizellen untersucht, um die häufigsten Gründe für eine Fehlbefruchtung eruieren und somit zukünftig Methoden zur Steigerung der Befruchtungsrate nach ICSI entwickeln zu können.

Die bedeutsamsten Fragestellungen lauten daher wie folgt:

- Einfluss der Inkubationszeit auf den mit Chromomycin A₃ bestimmten Chromatinkondensationsgrad?
- Einfluss der Inkubationszeit auf den mit Anilin Blau bestimmten Chromatinkondensationsgrad?
- Einfluss der Inkubationszeit auf die mit der TUNEL Reaktion detektierten DNA-Strangbrüche?
- Einfluss der Inkubationszeit auf die Morphologie in der Färbung nach Papanicolaou?
- Einfluss der Inkubationszeit auf die Befruchtungsrate nach ICSI?
- Hauptgründe für das Befruchtungsversagen der nicht fertilisierten Oozyten?
- Einfluss des Chromatinkondensationsgrad in der Färbung mit Anilin Blau und Chromomycin A₃ auf den Chromatinzustand in nicht fertilisierten Oozyten?
- Einfluss der mit der TUNEL Reaktion detektierten DNA-Strangbrüche auf den Chromatinzustand in nicht fertilisierten Oozyten?
- Einfluss der mit Papanicolaou bestimmten Morphologie auf den Chromatinzustand in nicht fertilisierten Oozyten?

3 Patientenkollektiv und Methoden

3.1 Patienten

Für diese Studie wurden 40 Patientenpaare untersucht, die sich in der Kinderwunschsprechstunde der Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar vorstellten und bei denen die Indikation zur intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) gestellt wurde. Ferner wurden nur solche Paare aufgenommen, bei denen die Follikelpunktion mindestens 8 Eizellen hervorbrachte, um die Eizellen auf 2 verschiedene Injektionszeitpunkte aufteilen zu können.

Das Durchschnittsalter der Männer lag bei 35,9 und das der Frauen bei 33,5 Jahren. Der Zeitraum der Untersuchungen erstreckte sich aufgrund der erschwerten Einschlusskriterien (≥ 8 Oozyten) von Juni 2002 bis April 2006.

Am Morgen der jeweiligen Follikelpunktion wurden von der Samenprobe des Mannes jeweils 4 Ausstrichpräparate vor und 4 Ausstrichpräparate nach Aufbereitung mit Hilfe der „Swim-up“ bzw. „PureSperm“ Methode angefertigt. Anschließend wurde die erste Hälfte der gewonnenen Eizellen direkt nach ihrer Punktion injiziert und die verbleibenden Oozyten, sowie das aufbereitete Ejakulat, bis zum Zweiten Injektionszeitpunkt am frühen Nachmittag, in den entsprechenden Medien inkubiert. An diesem Zeitpunkt der späten Injektion wurden weitere 4 Spermienausstriche hergestellt.

Somit wurden von jedem Patienten eine Gesamtzahl von 12 Ausstrichpräparaten erstellt und zu jedem der 3 Untersuchungszeitpunkte nachfolgend jeweils 1 Präparat nach Papanicolaou, mit Anilin Blau, mit Chromomycin A₃ und mit TUNEL gefärbt.

Insgesamt konnten bei den 40 Patientinnen 559 Oozyten gewonnen werden, wovon jedoch nur 493 das Metaphase-II-Stadium erreicht hatten, so dass die ICSI Methode zur Anwendung kam. Von der Gesamtzahl der 493 Eizellen wurden 253 Eizellen am Ersten und 240 Eizellen am Zweiten Injektionszeitpunkt injiziert.

Von den 493 injizierten Eizellen konnten 324 befruchtet werden. Von den 169 verbleibenden, nicht-fertilisierten Oozyten, bei denen 48 h nach ICSI mikroskopisch keine Vorkerne erkennbar waren, wurden 127 Oozyten mittels der Fluoreszenzfärbung Hoechst 33342 untersucht und ausgewertet. Die restlichen 42

nicht fertilisierten Oozyten konnten aufgrund von Degeneration oder anderen Gründen nicht in die Auswertung miteinbezogen werden.

3.2 Vorbereitung der Insemination

3.2.1 Gewinnung von Oozyten und Spermatozoen

Nach der in Kapitel 2.6.1 beschriebenen ovariellen Hyperstimulation, die überwiegend in Anlehnung an das „lange Protokoll“ und mit rekombinantem FSH durchgeführt wurde, erfolgte 36 h nach Ovulationsinduktion die ultraschallgesteuerte transvaginale Follikelpunktion. Dabei wurden die Follikel mit einer Kanüle punktiert, ihr Inhalt mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und in auf 37°C vorgewärmten Gefäßen aufgefangen. Noch im Operationssaal erfolgte die Auszählung der gewonnenen Oozyten, sowie eine Spülung in einem Medium aus HAM'S F-10 Lösung. Anschließend wurden die Oozyten in diesem Medium bei 37°C und 5% CO₂ für ca. 2-3 h, bzw. bis zum zweiten Injektionszeitpunkt am Nachmittag inkubiert.

Am Tag der Follikelpunktion wurde nach einer 3-4 tägigen Karenz, dass zur Untersuchung und Fertilisation benötigte Ejakulat durch Masturbation in ein graduiertes Plastikgefäß gewonnen und nach der Spermigrammerstellung mit den nachfolgend beschriebenen Techniken aufbereitet. Diese Methoden verfolgen das Ziel, einen hohen Prozentsatz morphologisch normaler und motiler Spermien zu selektieren, um im nachfolgenden Fertilisationsprozess ein optimales Ergebnis erzielen zu können.

3.2.2 Spermienaufbereitung mittels Swim-up Technik

Bei dieser Technik macht man sich zunutze, dass motile Spermien in der Lage sind, nach der Zentrifugation des Nativejakulats, aus dem Pellet an die Oberfläche zu schwimmen.

Dazu wird das Ejakulat mit Kulturmedium (HAM'S F-10 Lösung + Humanalbumin) vermischt, bei 500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wird nun erneut mit 1 ml Kulturmedium überschichtet, resuspendiert und für 1-2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während

dieser Zeit schwimmen die motilen Spermien in Richtung Oberfläche, so dass danach der Überstand, der eine große Anzahl motiler Spermien enthält, vorsichtig abpipettiert wird und nun zur Fertilisation und/oder zur Spermioigrammerstellung verwendet werden kann.

3.2.3 Spermienaufbereitung mittels PureSperm Methode

Das Prinzip der Spermienseparationsmethode mit PureSperm basiert auf der Herstellung unterschiedlicher Dichtegradienten.

Aus der dabei verwendeten 100%igen Gebrauchslösung (PureSperm 100, Nidaccon International AB, Mölndal, Schweden), werden jeweils unter Verwendung von Kulturmedium, 2 ml 80%ige und 40%ige Lösungen hergestellt, die in einem sterilen Konusröhrchen (PP-Test tubes, Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit abnehmender Dichte (unten 80%, oben 40%) übereinander geschichtet werden. Nun wird diese PureSperm Säule vorsichtig mit 1 ml Ejakulat überschichtet und anschließend bei 300 U/min für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert und erneut für 10 min bei 300 U/min zentrifugiert. Der letzte Schritt wird jetzt nochmals wiederholt. Danach wird das gewaschene Pellet mit Kulturmedium überschichtet und die vitalen Spermien haben nun 2 h Zeit, um nach oben zu schwimmen.

3.3 Spermioigrammerstellung

Innerhalb der ersten Stunde nach Probengewinnung erfolgte die Untersuchung des Ejakulats und alle resultierenden Ergebnisse wurden auf standardisierten Spermioigrammbögen der WHO vermerkt. Nach Aufbereitung mit einer der oben genannten Methoden, wurden erneut die Dichte und die Motilität bestimmt.

3.3.1 Anfertigung von Spermienausstrichen

Die in dieser Studie verwendeten Spermienausstriche wurden jeweils aus der frischen, liquefizierten Ejakulatprobe (Nativpräparat) und nach der durchgeführten

Aufbereitung erstellt. Nach dem zweiten Injektionszeitpunkt am frühen Nachmittag wurden dann erneut 4 Ausstrichpräparate angefertigt.

Dazu wurde jeweils ein Ejakulattropfen auf einen Objektträger (Menzel, Braunschweig) gegeben und mit der Kante eines zweiten Objektträgers gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Ausstriche für ca. 10 min luftgetrocknet und mit Fixationsspray (Merckofix, Merck, Darmstadt) fixiert.

3.3.2 Volumenbestimmung

Zur Volumenbestimmung wurde das Ejakulat nach 20 min. Liquefizierung auf einer Wärmeplatte (37°C), in ein graduiertes Konusröhrchen gefüllt und die entsprechende Skalierung abgelesen.

3.3.3 pH-Wert Bestimmung

Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Indikatorpapierstreifen (Merck, Darmstadt) bestimmt. Dabei wird das Ejakulat auf das Indikatorpapier aufgetragen und nach 30 sec der pH-Wert anhand einer Farbskalierung abgelesen. Dabei liegt der Normalwert wie in Kapitel 2.5 angegeben zwischen 7,2 und 8,0. Werte über 8,0 lassen auf eine akute Entzündung von Prostata, Samenblasen oder Nebenhoden schließen, wohingegen Werte kleiner 7,0 bei chronischen Infektionen zu finden sind (BALS-PRATSCH et al., 1998).

3.3.4 Cyturtest

Der Cyturtest dient dem Nachweis einer Leukozytospemie, die auf eine Infektion der ableitenden Samenwege (BALS-PRATSCH et al., 1998) hinweisen kann. Dieser Test weist die Esterasenaktivität von polymorphkernigen Leukozyten nach (NAHOUM und CARDOZO, 1980). Die Esterasen spalten dabei den Indoxylester des Teststreifens (Combur² -Test LN, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zu freiem Indoxyl, welches mit einem Diazoniumsalz zu einem violetten Farbstoff reagiert. Es werden semiquantitativ intakte und bereits lysierte Leukozyten erfasst. Der Teststreifen muss

dazu ins Ejakulat eingetaucht und nach 2 min abgelesen werden. Anhand einer Skala lässt sich anschließend eruieren, ob eine pathologische Leukozytenzahl im Sperma vorliegt.

3.3.5 MAR-Test

Um Spermienantikörper als Sterilitätsursache auszuschließen, verwendet man den sogenannten MAR-Test (mixed-antiglobulin-reaction-Test). Der dabei verwendete Test (SpermMar IgG Test, FertiPro, Beernem, Belgien) besteht aus 2 Reagenzien. Zum Einen aus einer Suspension aus Latexpartikeln, die mit humanem IgG bedeckt sind, zum Anderen aus einem monospezifischen Antiserum, welches sich gegen das Fc-Fragment von humanem IgG richtet. Über diese im Antiserum enthaltene Anti-IgG-Antikörper werden die Latexpartikel mit den Antikörpern der Spermien (sofern vorhanden) verbunden und bilden Agglutinate aus.

Zur Durchführung des Tests werden 10 µl des verflüssigten Spermas auf einem Objektträger mit 10 µl der Latex-Suspension vermischt. Danach fügt man 10 µl IgG-Antiserum hinzu und legt ein Deckgläschen darauf. Anschließend werden die Objektträger nach 3 bzw. 7 min unter einem Lichtmikroskop betrachtet und 100 Spermien ausgewertet.

Antikörperfreie Spermien bewegen sich frei zwischen den agglutinierten Latexpartikeln. Antikörperbehaftete Spermien werden an die Latexpartikel gebunden (Abb. 3). Sind mehr als 10% der Spermien mit adhärenen Partikeln versehen, gilt dies als pathologisch. Die Diagnose der immunologischen Infertilität kann jedoch erst ab einer Agglutination von mehr als 50% der Spermien gestellt werden (WHO 1993).

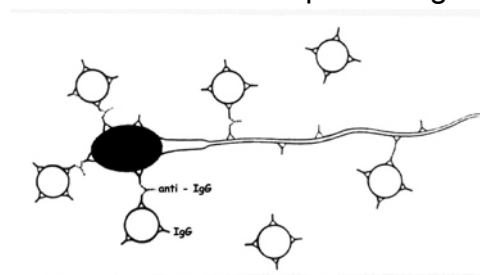


Abb.5: MAR-Test: Bei positivem Testergebnis werden die Latexpartikel über die im Antiserum enthaltenen Antikörper (Anti-IgG), an die Spermien gebunden.

(modifiziert nach W. Weidner, Urologische Klinik, Universität Gießen)

3.3.6 Supravitalfärbung mit Eosin

Die Färbung mit Eosin ermöglicht eine Unterscheidung zwischen toten und vitalen Spermien (ELIASSON und TREICHL, 1971), da tote Spermien eine defekte Plasmamembran besitzen, die in der Lage ist, den Eosinfarbstoff aufzunehmen.

Zur Durchführung wurden 10 µl frisches Ejakulat mit einem Tropfen 1%iger Eosinlösung auf einem Objektträger vermischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach 1-2 min erfolgte die Auswertung unter dem Mikroskop, bei der 100 Spermien ausgezählt und in vitale, farblose Spermien und tote, rot gefärbte Spermien klassifiziert wurden.

3.3.7 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)

Auch der Hypoosmotische Schwelltest ist eine Methode, um zwischen dem Anteil toter und vitaler Spermien zu differenzieren.

Der HOS-Test (JEYENDRAN et al., 1986, 1984) macht sich die Tatsache zunutze, dass intakte Spermatozoenmembranen die Eigenschaft der Semipermeabilität besitzen. Daher kommt es unter hypoosmotischen Bedingungen zu einem Hydrops der Spermienzelle, so dass eine Änderung der Schwanzform erkennbar wird.

Zur Durchführung wurde 1 ml der eingefrorenen Schwelllösung auf 37°C erwärmt, mit 100 µl Ejakulat vermischt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurde 10 µl auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Nun wurden 2 mal 100 Spermien ausgezählt und der Anteil der Spermien mit geschwollenem Schwanz (vitale Spermien) bestimmt. Aus beiden Ergebnissen wurde anschließend ein Mittelwert gebildet.

3.3.8 Bestimmung der Spermiendichte (Konzentration)

Zur Bestimmung der Spermienkonzentration wurden jeweils 10 µl verflüssigtes Ejakulat in die Vertiefung einer Zählkammer nach MAKLER (1980) pipettiert. Diese Maklerkammer ist in 10 x 10 Quadrate aufgeteilt. Bei 200facher Vergrößerung werden nun dreimal hintereinander jeweils 10 Quadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser gibt dann die Spermiendichte in Millionen / ml an.

3.3.9 Bestimmung der Spermienmotilität

Die Spermienmotilität wird ebenfalls mit der Maklerkammer bestimmt. Dazu wurden bei 200facher Vergrößerung nun 100 Spermien in möglichst vielen Quadraten ausgezählt und hinsichtlich ihrer Motilität (WHO-Kategorien a-d) klassifiziert.

3.4 Färbung nach Papanicolaou

Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurde eine für Spermien modifizierte Färbung nach Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942; WHO, 1993) verwendet.

Im Rahmen dieser Studie wurden pro Patient 3 Ausstriche angefertigt (Nativpräparat, aufbereitete Spermiasuspension nach früher und nach später ICSI) und beurteilt.

3.4.1 Durchführung

Da diese Färbung aus zahlreichen Einzelschritten besteht, wurde sie mit Hilfe einer Färbeapparatur (Shandon Varistain® 24-4, Cheshire, England) nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Tab.1: Modifizierte Färbung nach Papanicolaou

REAGENZIEN	ZEIT
80% Ethanol (Merck, Darmstadt)	2 x 1 min
Aqua dest. (Seromed, Berlin)	1 min
Hämatoxylin Lösung (Merck, Darmstadt)	3 min
Aqua dest. (Seromed, Berlin)	2 x 1 min
Fließend wässern	2 x 3 min
70% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	2 x 1 min
Orange II Lösung (Merck, Darmstadt)	3 min
> 99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min
> 99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min
Polychromlösung EA 50 (Merck, Darmstadt)	3 min
> 99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	2 x 1 min
95% Ethanol (Merck, Darmstadt)	1 min
> 99,8% Ethanol (Roth, Karlsruhe)	1 min
Xylol (Merck, Darmstadt)	4 x 1 min

3.4.2 Auswertung

Anschließend wurden die gefärbten Objektträger mit Entellan® (Merck, Darmstadt) und einem Deckglas eingedeckt und unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops mit einem 100fachen Ölimmersionsobjektiv (Gesamtvergrößerung 1000fach) ausgewertet. Dabei wurden mindestens 100 Spermien pro Ausstrich in Anlehnung an die Tygerberg „Strict Criteria“ (KRUGER et al., 1986) klassifiziert.

Demnach gilt ein Spermium als normomorph, wenn der Kopf zwischen 3 und 5 µm lang bzw. 2 und 3 µm breit ist. Das Akrosom soll 40-70% des Kopfes einnehmen und der Hals deutlich abgrenzbar sein, sowie keine Abweichung von der longitudinalen Kopfachse haben. Das Mittelstück hat idealerweise die 1,5 fache Länge des Kopfes und die sich daran anschließende Geißel eine Länge von 45 µm mit einer gleichmäßigen Struktur.

Alle Spermien mit einer grenzwertigen Struktur (sogenannte Borderline-Abnormitäten) werden den abnormen Formen zugerechnet. Dabei liegt der ebenfalls von KRUGER et al. (1986) gefundene Schwellenwert (Cut-off Wert) bei 14% normalen Spermienformen.

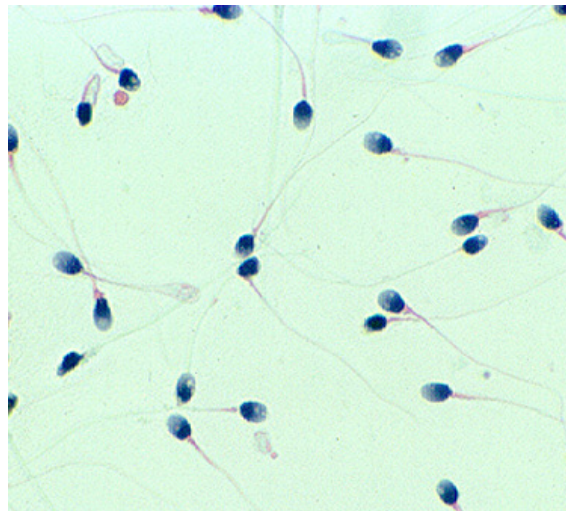


Abb.6: Papanicolaou Färbung

(in Anlehnung an: Internetpräsenz Justus-Liebig-Universität Gießen, Lernprogramm:
Das Spermogramm)

3.5 Färbung mit Anilin Blau

3.5.1 Testprinzip

Mit Hilfe der Anilin Blau Färbung kann der Kondensationsgrad des Chromatins beurteilt werden, da sie eine Unterscheidung zwischen lysinreichen Histonen und arginin-/cyteinreichen Protaminen ermöglicht (TERQUEM und DADOUNE, 1983; AUGER et al., 1990; HOFMANN und HILSCHER, 1991). Der saure Farbstoff Anilin Blau bindet selektiv an die persistierenden lysinreichen Histone, die in den Kernen unreifer Spermatozoen zu finden sind (HAIDL und SCHILL, 1994). Aufgrund des unter 2.7.2 beschriebenen Austauschs der Histone gegen Protamine im Verlauf der Reifung, verliert ein reifes Spermatozoon die Anfärbbarkeit mit Anilin Blau. Daher erscheinen gesunde, reife Spermien als ungefärbt bzw. nur leicht angefärbt, wohingegen sich unreife Spermien mit mangelnder Chromatinkondensation stark anfärben. Nach DADOUNE et al. (1988) sollten im Ejakulat mindestens 75% ungefärbte Spermien enthalten sein, um von einer normalen Chromatinkondensation ausgehen zu können. Nach HAMMADEH et al. (1996) kann die Probe eines ICSI-Patienten als gut beurteilt werden, wenn mehr als 71% ungefärbte Spermien darin enthalten sind.

Auch bei dieser Färbung wurden hier pro Patient 3 Ausstriche angefertigt (Nativpräparat, aufbereitete Spermasuspension nach früher und nach später ICSI), gefärbt und beurteilt.

3.5.2 Durchführung

Zu Beginn der Färbung wurden die Ausstrichpräparate zuerst für 30 min. in 3%iger Glutaraldehydlösung (7,5 ml Glutaraldehyd in 250 ml PBS) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger in 5%iger Anilin Blau Lösung (pH 3,5) (Morphisto GmbH, Frankfurt) für 5 min. gefärbt (TERQUEM und DADOUNE, 1983). Danach erfolgte die mehrfache Spülung der Objektträger in PBS-Lösung. Abschließend wurden die Ausstriche mit Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt und ausgewertet.

3.5.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Olympus CH-2) und Immersionsöl (Merck, Darmstadt) bei 1000facher Vergrößerung. Dabei wurden 100 Spermien pro Objektträger ausgezählt und in ungefärbte bzw. nur leicht angefärbte reife Spermien und stark gefärbte, unreife Spermien unterteilt.

3.6 Fluoreszenzfärbung mit Chromomycin A₃ (CMA₃)

3.6.1 Testprinzip

Eine weitere Möglichkeit die Chromatinkondensation der Spermatozoen zu untersuchen, ist die Fluoreszenzfärbung mit Chromomycin A₃ (CMA₃).

Bei dem von *Streptomyces griseus* gebildeten Chromomycin A₃ handelt es sich um ein Magnesium assoziiertes Dimer, das in Abwesenheit von Protaminen an die Guanin-Cytosin-reichen DNA-Sequenzen bindet (MONACO und RASCH, 1982). CMA₃ kann also bevorzugt an die DNA binden, wenn diese dekondensiert und somit unreif ist. Somit erlaubt Chromomycin A₃ eine indirekte Darstellung der Chromatinkondensation, indem es die protaminarme, teilweise dekondensierte DNA unreifer Spermien, durch grünlich-gelbe Fluoreszenz sichtbar macht (BIANCHI et al., 1993). Deshalb nimmt der Grad der Fluoreszenz während der Spermiogenese, also mit zunehmender Protaminierung, ab. Somit kann bei der Auswertung zwischen fluoreszierenden unreifen und ungefärbten, gut kondensierten Spermatozoen unterschieden werden.

Analog der anderen durchgeführten Färbungen wurden auch hier 3 Präparate pro Patient (Nativpräparat, aufbereitete Spermasuspension nach früher und nach später ICSI), gefärbt und beurteilt.

3.6.2 Durchführung

Die Ausstrichpräparate wurden zuerst in einer Lösung bestehend aus 3 Teilen Methanol (Merck, Darmstadt) und 1 Teil Eisessig (Merck, Darmstadt) mindestens 5 Minuten lang fixiert und anschließend kurz getrocknet.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 10 mg CMA₃ (Sigma, St.Louis, USA, C-

2659) in 40 ml PBS gelöst. Diese gebrauchsfertige Lösung lässt sich lichtgeschützt im Kühlschrank für ca. 4 Wochen aufbewahren.

Da es sich bei Chromomycin A₃ um einen Fluoreszenzfarbstoff handelt, muss darauf geachtet werden, dass der komplette Versuchsablauf unter Lichtausschluss erfolgt. Zur Färbung wurde jeder Objektträger für 20 min mit 100 µl der Färbelösung beschichtet. Anschließend wurden sie mit PBS gespült und mit Glycerin (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.6.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Präparate bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion (Merck, Darmstadt) unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Pro Präparat wurden 200 Spermien ausgewertet, die in grünlich-gelb fluoreszierend und nicht fluoreszierend unterteilt wurden.

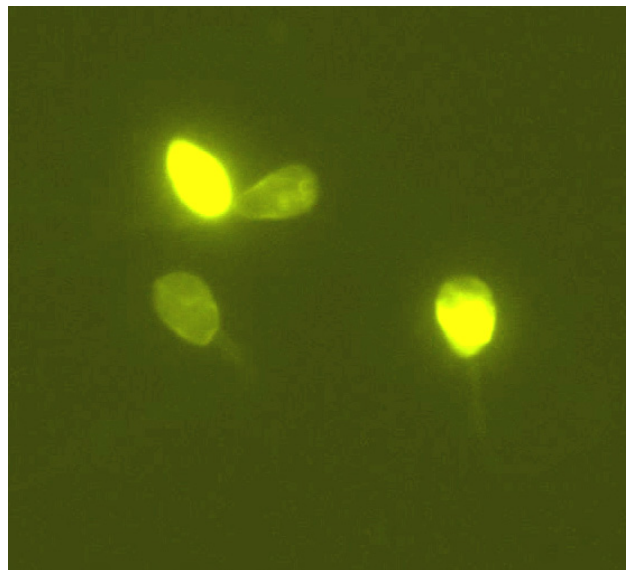


Abb.7: Chromomycin A₃ Färbung

Quelle: eigene Fotografie (im Rahmen dieser Studie entstanden)

3.7 Fluoreszenzfärbung nach dem TUNEL-Prinzip

3.7.1 Testprinzip

Durch Apoptose entstandene Einzel- und Doppelstrang DNA-Brüche können mittels der hier verwendeten TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling)-Methode detektiert werden. Dabei werden modifizierte, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) versehene Nukleotide durch eine enzymatischen Reaktion mittels TdT, an die freien 3'-OH Enden der Strangbrüche gebunden, die dann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt und quantifiziert werden können (INSTRUCTION MANUAL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

3.7.2 Durchführung

Die Ausstrichpräparate wurden für 1 h bei 15-25 °C in einer Lösung bestehend aus 4% Paraformaldehyd in PBS (pH = 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gespült und für 2 Minuten bei 2-8°C mit einer Permeabilisationslösung aus 0,1% Triton X-100 (Sigma, Stl. Louis, USA) in 0,1 % Natriumcitrat (Merck, Darmstadt) beschichtet. Zur Herstellung der Tunel Färbelösung (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), wurden für 10 Proben, 450 µl der im Kit enthaltenen Label Solution mit 50 µl Enzyme Solution vermischt. Nun wurden die Proben 2 x in PBS gespült und mit 50 µl Tunel Färbelösung beschichtet und in einer feuchten Kammer bei 37°C im Dunkeln für 60 Minuten inkubiert. Die Objektträger wurden danach 3 x in PBS gespült und mit Glycerin (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.7.3 Auswertung

Die fertig gefärbten Ausstriche werden nun mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX 70) unter Verwendung eines FITC (=Fluoresceinisothiocyanat) - Filter mit einem Emissionsspektrum von 525 nm bei 1000-facher Vergrößerung mit einer Öl-Immersionlinse ausgezählt und teilweise mit Hilfe einer Digitalkamera (Hamamatsu Digital Camera C 4742-95) dokumentiert. Es wurden positive

apoptotische, grün fluoreszierende Spermien von negativen, nicht fluoreszierenden Spermien unterschieden.

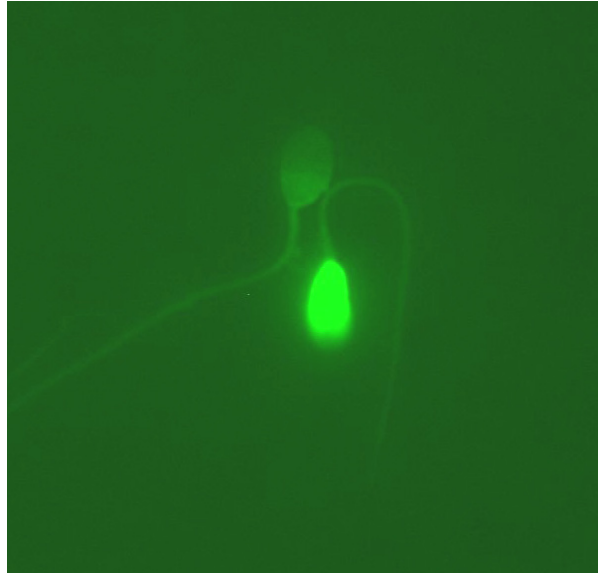


Abb.8: Zwei Spermien gefärbt nach dem TUNEL-Prinzip

Quelle: eigene Fotografie (im Rahmen dieser Studie entstanden)

3.8 Zeitversetzte Fertilisation mittels Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)

Bei der in dieser Studie angewandten zeitversetzten intrazytoplasmatischen Spermieninjektion wurde analog der herkömmlichen Methode vorgegangen. Die einzige Besonderheit bestand darin, dass die Anzahl der gewonnenen Oozyten halbiert und jeweils zu 2 unterschiedlichen Zeitpunkten der ICSI-Methode zugeführt wurden. Dabei lag der erste Zeitpunkt am Vormittag der Follikelpunktion und der zweite Zeitpunkt am frühen Nachmittag mit einer durchschnittlichen Latenz von 4,56 h. An jedem Injektionszeitpunkt wurde dabei wie nachfolgend beschrieben vorgegangen.

3.8.1 Durchführung

Nach erfolgter Inkubation der Oozyten, wurde der Cumulus oophorus sowie die Corona radiata mit Hilfe von Hyaluronidase-Lösung entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 30 sec. lassen sich die Kumuluszellen vorsichtig mit einer Glaskapillare ablösen. Dies soll u.a. verhindern, dass maternale DNA während des Injektionsvorgangs in die Eizelle gelangen kann. Abschließend wurden die Oozyten mehrfach in HAM'S F-10 Lösung mit 10%igem Humanalbumin gespült. Bevor mit der Injektion begonnen werden konnte, wurden die Oozyten unter dem Mikroskop bezüglich ihres Reifegrads beurteilt. Eine Oozyte gilt als reif und zur Injektion bereit, wenn sie das erste Polkörperchen ausgestoßen und die Metaphase der zweiten Reifeteilung erreicht hat.



Abb.9: reife Oozyte im Metaphase II Stadium mit 1. Polkörperchen

(Quelle: Internetpräsenz, Frauenklinik, Universität Würzburg)

Ist das erste Polkörperchen noch nicht ausgestoßen (M I Oocyte) (Abb.11) oder ist sogar noch das Keimbläschen (germinal vesicle) erkennbar (Abb.10), haben die Oozyten den notwendigen Reifegrad noch nicht erreicht, können aber im Inkubator nachreifen.



Abb.10: unreife Oocyte im Germinalvesikel-Stadium (GV)

(Quelle: Internetpräsenz, Frauenklinik, Universität Würzburg)



Abb.11: unreife Oocyte im Metaphase I Stadium

(Quelle: Internetpräsenz, Frauenklinik, Universität Würzburg)

Zur Durchführung der ICSI-Behandlung wurde folgendes Instrumentarium verwendet:

- Ein Interphase Differentialmikroskop mit integrierter Wärmeplatte (Nikon/Narishige, Modell IM-69, Japan)
- 2 Mikromanipulator-Sets (elektrisch und hydraulisch) mit einem Injektor (Nikon/Narishige, Modell MM-188, Japan)
- Eine Haltepipette (MPH-MED-35, Holding Micropipets, Humagen, Charlottesville, USA)
- Eine Injektionspipette (MIC-50-35, ICSI Micropipets, Humagen, Charlottesville, USA)

Zu Beginn der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion wird eine Reihe von jeweils 3 µl enthaltende Tropfen einer 10%igen PVP-Lösung (Polyvinylpyrrolidon) (PVP-Medium, MediCult, Jylinge, Dänemark) in die Mitte einer Petrischale (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) aufgetragen. PVP verlangsamt die Eigenmotilität der Spermatozoen und verhindert das Anhaften an der Injektionspipette. In jeden dieser PVP-Tropfen wird nun 1 µl aufbereitetes Ejakulat pipettiert.

Beidseits der zentralen Spermienreihe werden die zu injizierenden Oozyten in jeweils 5 µl Kulturmedium angeordnet. Abschließend wird die Petrischale nun mit Mineralöl (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, Santa Ana, Californien, USA) überschichtet.

Unter dem Mikroskop wird nun ein morphologisch normales und bewegliches Spermatozoon ausgewählt und durch Manipulation an der Schwanzregion mit Hilfe der Injektionspipette immobilisiert. Dieses wird dann in das erste Drittel der mit PVP gefüllten Injektionskapillare aspiriert. Die Eizelle wird nun so mit der Haltepipette fixiert, dass das Polkörperchen bei 6 oder bei 12 Uhr zu liegen kommt, da man dort die nicht sichtbare Meiosespindel der Oozyte vermutet, die man bei der Injektion nicht verletzen möchte. Nun wird die das Spermium enthaltende Injektionspipette in 3 Uhr Position durch die Plasmamembran der Oozyte eingeführt, etwas Ooplasma aspiriert und zusammen mit dem Spermatozoon reinjiziert. Die Injektionspipette wird jetzt vorsichtig zurückgezogen.

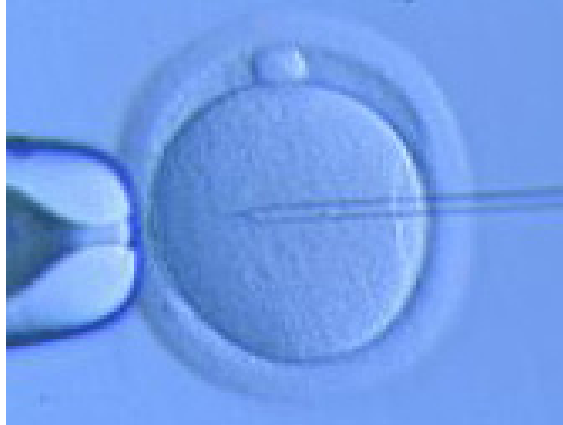


Abb.12: ICSI mit Polkörperchen in 12 Uhr Position

(modifiziert nach Dr. Fehr, Schaffhausen, Schweiz)

Die Oozyten werden anschließend für 24 Stunden in G-FERT Plus (Vitrolife, Kungsbacka, Schweden) inkubiert. Danach werden die Eizellen auf Zeichen der Fertilisation überprüft. Dabei gilt die Eizelle als befruchtet, wenn zwei Vorkerne (Pronuklei, PN) sichtbar sind und sie das 2. Polkörperchen ausgestoßen hat. Wurden nun mehr als 3 Oozyten befruchtet, können die übrigen je nach Wunsch des Paares kryokonserviert werden. In Deutschland dürfen nur max. 3 Embryonen weiterkultiviert und in den Uterus der Frau transferiert werden.



Abb.13: Befruchtete Oocyte im Vorkernstadium

(Quelle: Internetpräsenz, Frauenklinik, Universität Würzburg)

3.8.2 Embryotransfer

Die zum Transfer bestimmten Oozyten werden für weitere 24 h in G-1 v3 PLUS Medium (Vitrolife, Kungsbacka, Schweden) inkubiert, so dass sie am Tag des Transfers das Zwei- bzw. Vierzellstadium erreicht haben. Die Eizellen werden nun mit Hilfe eines atraumatischen sterilen Einmalkatheters (Embryo Transfer Katheter Set, Labotect GmbH, Göttingen) in den Gebärmutterfundus appliziert.



Abb.14: Embryo im Vierzellstadium am 2. Tag nach ICSI

(modifiziert nach Dr. Fehr, Schaffhausen, Schweiz)

3.8.3 Schwangerschaftsnachweis

Zur Feststellung einer möglichen Schwangerschaft der Patientinnen wird am 12. und am 14. Tag nach dem Embryotransfer eine quantitative HCG-Bestimmung vorgenommen. Zusätzlich erfolgte eine sonografische Kontrolle des Schwangerschaftsverlaufs.

3.9 Fluoreszenzfärbung der Oozyten mit Hoechst 33342

Zur Untersuchung der nicht fertilisierten Oozyten, wurde eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es dabei, mögliche Gründe für eine Fehlbefruchtung, sowohl auf Seiten der Eizelle als auch auf Seiten des Spermatozoons zu eruieren.

3.9.1 Testprinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 gehört zu den Bisbenzimidazol Fluorochromen, die reversibel an A-T reiche Sequenzen doppelsträngiger DNA binden (LATT und STETTEN, 1976; ARNDT-JOVIN und JOVIN, 1977). Schon O'RAND et al. (1986) und GWATKIN et al. (1989) setzen diesen Farbstoff zur Untersuchung an menschlichen Oozyten ein. Somit können schnell und zuverlässig Aussagen über die Organisation und Verteilung der DNA innerhalb der Oozyte gemacht werden. Ebenso ist es möglich, den in dieser Studie besonders interessanten Chromatinkondensationsgrad der Spermatozoen-DNA zu bestimmen und zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Spermien Qualität und dem Ausbleiben der Befruchtung besteht.

3.9.2 Durchführung

In Anlehnung an URNER et al. (1993) und Sakkas et al. (1996) wurde bei der Färbung wie folgt vorgegangen.

Vor Beginn der Färbung wurden die nicht befruchteten und nicht degenerierten Eizellen für 30 min bei Raumtemperatur in 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Eizellen 3-mal in PBS gewaschen und für 30 min in 1µg/ml Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schelldorf) im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Eizellen erneut 3-mal in PBS gewaschen und mit jeweils einem Tropfen einzeln auf einen Objektträger aufgetragen. Abschließend wurden sie von einem Deckgläschen, auf dessen Kanten Vaseline aufgetragen wurde abgedeckt, um das Austrocknen und Zerquetschen der Oozyte zu verhindern.

3.9.3 Auswertung

Die gefärbten Oozyten wurden nun mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX 70) unter Verwendung eines DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) - Filter mit einem Emissionsspektrum von 460 nm ausgewertet und teilweise mit Hilfe einer Digitalkamera (Hamamatsu Digital Camera C 4742-95) dokumentiert.

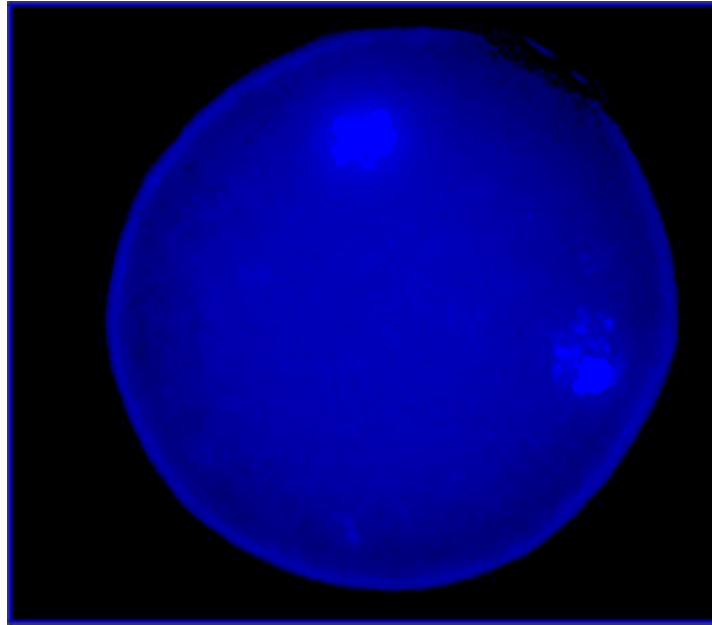


Abb.15: partiell dekondensierter Spermatozoenkopf und maternales Chromatin in nicht fertilisierter Oozyte nach ICSI

Quelle: eigene Fotografie (im Rahmen dieser Studie entstanden)

3.10 Verwendete Standardlösungen

3.10.1 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Zur Herstellung der in den oben aufgeführten Färbungen verwendeten PBS-Lösung, werden folgende Reagenzien benötigt:

Tab.2: PBS-Lösung nach Dulbecco

REAGENZ	MENGE	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck, Darmstadt)	1,32 g	Lösung A
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck, Darmstadt)	1,21 g	Lösung B
NaCl (Merck, Darmstadt)	80,00 g	
KCl (Merck, Darmstadt)	2,00 g	
Na ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt)	11,50 g	
KH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt)	2,00 g	
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) (Sigma, St.Louis, USA)	10,00 g	
Streptomycinsulfat (Sigma, St.Louis, USA)	0,50 g	
Sodium pyruvate (Sigma, St.Louis, USA)	0,36 g	
Penicillin G sodium salt (Sigma, St.Louis, USA)	0,50 g	

Das zur Lösung A benötigte Kalziumchlorid wird in 100 ml Aqua dest. (Seromed, Berlin) sowie die Chemikalien der Lösung B in 900 ml Aqua dest. gelöst.

Jeweils 10 ml der Lösung A und 90 ml der Lösung B werden mit 900 ml Aqua dest. aufgefüllt und ergeben somit 1 Liter gebrauchsfertige PBS-Lösung.

3.10.2 HAM'S F-10 Lösung

Zur Herstellung der zur Spermienaufbereitung verwendeten HAM'S F-10 Lösung werden folgende Reagenzien benötigt:

Tab.3: HAM`S F-10 Lösung

REAGENZ	MENGE
Calciumlactat ($C_6H_{10}CaO_6 \times 5 H_2O$) (Merck, Darmstadt)	0,308 g
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) (Merck, Darmstadt)	2,108 g
Streptomycin (Sigma, St.Louis, USA)	0,075 g
Penicillin G sodium salt (Sigma, St.Louis, USA)	0,030 - 0,070 g
HAM`S F-10 (Seromed, Biochrom AG, Berlin)	9,88 g

Die aufgelisteten Chemikalien werden in 1 Liter Aqua dest. (Seromed, Berlin) gelöst.

Für die Spermienaufbereitung werden 45 ml der fertigen HAM`S F-10 Gebrauchslösung mit 5 ml Humanalbumin (20%, Immuno, Baxter, Unterschleißheim) vermischt.

3.10.3 PureSperm-Lösungen

Tab.4: PureSperm-Lösungen

HERSTELLUNG PURESPERM LÖSUNG (80%)	MENGE
PureSperm Grundlösung (100%)	8 ml
HAM`S F-10 mit Humanalbumin	2 ml
HERSTELLUNG PURESPERM LÖSUNG (40%)	MENGE
PureSperm Grundlösung (100%)	4 ml
HAM`S F-10 mit Humanalbumin	6 ml

3.10.4 Schwelllösung für HOS-Test

Die Schwelllösung wird aus den unten genannten Substanzen hergestellt und anschließend in Gefäßen (500 PP-Microcentrifuge tube 1,5 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) á 1 ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

Tab.5: Lösung für HOS-Test

HERSTELLUNG DER SCHWELLÖSUNG	MENGE
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ (Trinatriumzitat) (Merck, Darmstadt)	1,47 g
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Fructose) (Merck, Darmstadt)	2,75 g
Aqua dest. (Seromed, Berlin)	200 ml

3.10.5 Hyaluronidase-Lösung

Bei der Herstellung wird erst eine Stammlösung angesetzt, die bei -20°C auf Aliquots verteilt eingefroren wird. Diese können dann zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung benutzt werden.

Tab.6: Herstellung von Hyaluronidase-Lösung

HERSTELLUNG DER STAMMLÖSUNG	MENGE
Hyaluronidase (H-4272, Sigma, St.Louis, USA)	30,0 mg
HAM'S F-10 Medium (s.o.)	10,0 ml
HERSTELLUNG DER GEBRAUCHSLÖSUNG	MENGE
Albumin (20% , Immuno, Baxter, Unterschleißheim)	135,0 mg
HEPES (H-6147, Sigma, St.Louis, USA)	38,7 mg
HAM'S F-10 Medium (s.o.)	42,2 ml
Stammlösung (s.o.)	1,0 ml

3.11 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen und Berechnungen wurden mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 14.0 für Windows durchgeführt.

Die **Befruchtungsrate (Fertilisationsrate)** berechnete sich für die an dieser Studie teilnehmenden ICSI-Patienten wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl der Oozyten mit gebildeten Vorkernen}}{\text{Anzahl der injizierten Oozyten}} \times 100$$

Die **Schwangerschaftsrate** berechnete sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{Anzahl der schwangeren Patientinnen}}{\text{Gesamtzahl der Patientinnen}} \times 100$$

Bei allen Variablen wurde im Rahmen der deskriptiven Statistik der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. In Tabelle 7 und 8 ist zusätzlich noch der Median, sowie Minimum und Maximum dargestellt. Den Berechnungen der Tabellen 9, 10 und 11 liegt der T-Test für verbundenen Stichproben zugrunde. Der Vergleich der Mittelwerte der Befruchtungsrate zwischen dem 1. und 2. Injektionszeitpunkt aus Tabelle 9 wurde zusätzlich mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test überprüft, der jedoch zum selben Ergebnis kam. Die Korrelationen aus Tabelle 12, 13, 14, 17 und 18 wurden mittels Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson berechnet. Lediglich der Zusammenhang zwischen der Spermiendiagnostik und dem Eintritt der Schwangerschaft in Tabelle 14, wurde mit Hilfe der punktbiserialen Korrelation, die zum Vergleich eines dichotomen Merkmals mit metrischen Merkmalen verwendet wird, überprüft. Grundlage der Ergebnisse aus Tabelle 15 ist eine schrittweise multiple Regressionsanalyse. Die Ergebnisse der Tabellen 19, 20 und 21 sind mit Hilfe des T-Tests für unverbundene Stichproben entstanden. Da hier nicht bei allen Parametern unabwendbar von der Erfüllung der Normalverteilungsvoraussetzung ausgegangen werden konnte, wurden diese Ergebnisse mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test überprüft, der jedoch prinzipiell zum selben Ergebnis kam.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt festgelegt:

- Irrtumswahrscheinlichkeit $p \geq 0,05$ bedeutet nicht signifikant
- $p < 0,05$ wird als signifikant betrachtet
- $p < 0,01$ als sehr signifikant und
- $p < 0,001$ als hoch signifikant

Die in SPSS mit 0,000 ausgewiesenen p-Werte werden in den nachfolgenden Tabellen durch $< 0,001$ ersetzt.

Der Korrelationskoeffizient r wurde wie folgt interpretiert:

- bis 0,2: schwach
- 0,2 - 0,4: niedrig
- 0,4 - 0,7: mäßig
- 0,7 - 0,9: stark
- über 0,9: sehr stark

4 Ergebnisse

4.1 Gesamtübersicht

4.1.1 Spermogrammparameter und ICSI-Ergebnisse

In den nachfolgenden Tabellen 7 und 8, sind sowohl die Spermogrammparameter als auch die Ergebnisse der ICSI-Behandlung zusammengefasst.

Tab.7: Gesamtübersicht Spermogrammparameter nach WHO (1999)

n=40	MW ± SD	Median	Min.	Max.
Alter ♂ in Jahren	35,93 ± 4,25	35,16	25,71	45,63
Volumen (ml)	3,46 ± 1,71	3,00	1,00	9,50
pH – Wert	8,68 ± 0,33	8,70	8,00	9,50
Dichte (Mio/ml)	44,35 ± 35,34	33,00	1,00	100,00
Globalmotilität (%)	21,30 ± 14,53	18,00	1,00	70,00
Eosin (vitale) (%)	30,88 ± 20,00	30,00	10,00	75,00
HOS (vitale) (%)	51,63 ± 22,29	55,00	10,00	80,00
Morphologie normal (%)	5,23 ± 3,58	4,50	0,00	18,00
Dichte (Mio/ml) nach Aufbereitung	31,65 ± 25,69	26,50	0,20	100,00
Globalmotilität (%) nach Aufbereitung	34,90 ± 25,55	25,00	1,00	100,00

Tab.8: Zusammenfassende ICSI-Ergebnisse

n=40	MW ± SD	Median	Min.	Max.
Alter ♀ in Jahren	33,46 ± 4,24	33,51	23,54	42,72
Gewonnene Eizellen gesamt	559			
Gew. Eizellen / Paar	13,98 ± 4,19	13,00	8,00	25,00
Injizierte Eizellen gesamt	493			
Injiz. EZ / Paar	12,33 ± 3,28	12,00	7,00	22,00
Befruchtete Eizellen gesamt	324			
Befr. - Rate gesamt (%)	65,72			
Befr. Eizellen / Paar	8,10 ± 2,84	8,00	2,00	16,00
Befruchtungsrate/Paar (%)	66,36 ± 18,37	65,48	16,67	100,00
Transferierte Eizellen gesamt	77			
Transf. Eizellen / Paar	1,93 ± 0,66	2,00	0,00	3,00
Schwangerschaften gesamt	14			
SS - Rate (%) gesamt	35			
Geburten gesamt	8			
Baby-take-home-rate (%) gesamt	20			

Die Ergebnisse in Tabelle 8 stellen die zusammengefassten ICSI-Ergebnisse des Gesamtkollektivs dar. In unserer Studie jedoch ist die Anzahl der zu injizierenden Eizellen auf zwei unterschiedliche Zeitpunkte aufgeteilt worden. Dabei beschreibt der 1. Injektionszeitpunkt die Durchführung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion direkt nach durchgeführter Punktion und Entnahme der Eizellen. Die Bezeichnung 2. Injektionszeitpunkt beschreibt hingegen den Zeitpunkt der Injektion mit einer Verzögerung von durchschnittlich 4,56 h nach durchgeführter Punktion. In Tabelle 9 sind die ICSI Ergebnisse in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt dargestellt.

Tab.9: ICSI Ergebnisse in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt

	1. Zeitpunkt	2. Zeitpunkt	Differenz (MW ± SD)	p – Wert
Injizierte Eizellen	253	240		
Injizierte Eizellen / Paar	6,33 ± 1,79	6,00 ± 1,75		
Befruchtete Eizellen	158	166		
Befr. - Rate Gesamt (%)	62,45	69,17		
Befruchtete Eizellen/Paar	3,95 ± 1,85	4,15 ± 1,75		
Befruchtungsrate/Paar (%)	62,41 ± 26,34	68,44 ± 23,29	6,03 ± 31,24	0,230

Dabei zeigt sich eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Erhöhung der Befruchtungsrate vom 1. Injektionszeitpunkt mit $62,41 \pm 26,34\%$ um durchschnittlich $6,03 \pm 31,24$ Prozentpunkte auf $68,44 \pm 23,29\%$ am 2. Injektionszeitpunkt.

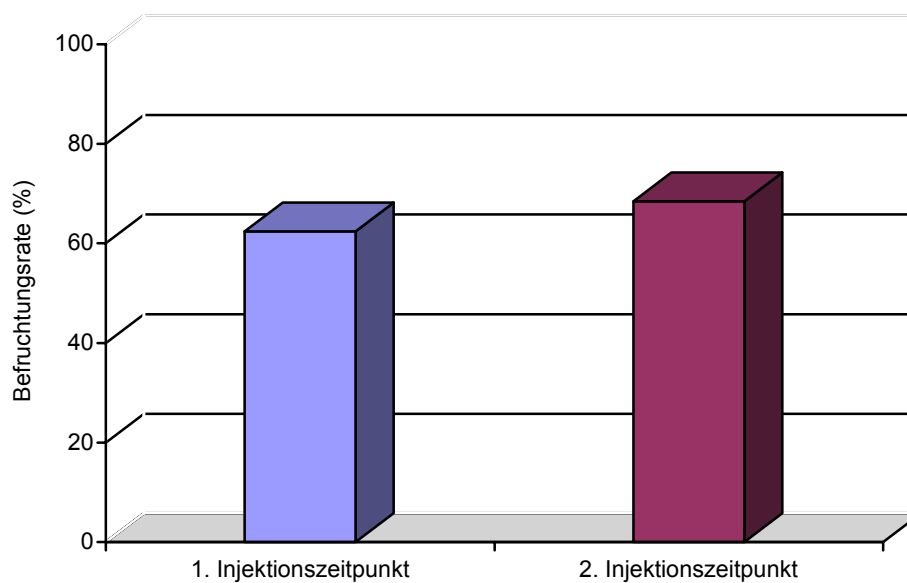


Abb.16: Durchschnittliche Befruchtungsrate am 1. und 2. Injektionszeitpunkt

4.1.2 Ergebnisse der Spermienfärbungen in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt

Im Folgenden werden die durchgeführten Spermienfärbungen hinsichtlich der unterschiedlichen Zeitpunkte verglichen. Tabelle 10 vergleicht dabei die Ergebnisse zwischen dem Nativpräparat vor der Aufbereitung und den Ergebnissen am 1. Injektionszeitpunkt (nach durchgeführter Spermienaufbereitung). In Tabelle 11 dagegen werden die Ergebnisse zwischen den beiden Injektionszeitpunkten verglichen, zwischen denen eine durchschnittliche Zeit von 4,56 h liegt, in der die Spermienproben im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt wurden.

Tab.10: Vergleich der Spermienfärbungen vor und nach Aufbereitung

	Nativ	1. Zeitpunkt	Differenz (MW ± SD)	p - Wert
Morphologie normal (%)	5,23 ± 3,58	5,80 ± 3,81	0,58 ± 4,25	0,397
Anilin Blau (gut kondensiert) (%)	68,80 ± 10,39	72,25 ± 10,54	3,45 ± 3,76	< 0,001
Chromomycin (gut kondensiert) (%)	69,88 ± 12,89	73,92 ± 12,70	4,05 ± 4,21	< 0,001
Tunel positiv (Strangbrüche) (%)	13,73 ± 9,60	11,15 ± 8,67	2,58 ± 4,94	0,002

Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, kommt es durch die angewandten Aufbereitungsmethoden zu einer hoch signifikanten Erhöhung der nicht angefärbten und somit gut kondensierten Spermien sowohl in der Anilin Blau, als auch in der Chromomycin A₃ Färbung. Bei den mit Tunel gefärbten Ausstrichen konnte ein sehr signifikanter Rückgang an DNA-Strangbrüchen nach der Aufbereitung verzeichnet werden. Lediglich im Hinblick auf die Morphologie konnte es durch die Spermienaufbereitung zu keiner signifikanten Veränderung des normalen Spermienanteils kommen.

Tab.11: Vergleich der Spermienfärbungen am 1. und 2. Injektionszeitpunkt

	1. Zeitpunkt	2. Zeitpunkt	Differenz (MW ± SD)	p - Wert
Morphologie normal (%)	5,80 ± 3,81	7,10 ± 3,85	1,30 ± 2,94	0,008
Anilin Blau (gut kondensiert) (%)	72,25 ± 10,54	76,25 ± 10,12	4,00 ± 4,12	< 0,001
Chromomycin (gut kondensiert) (%)	73,92 ± 12,70	81,13 ± 10,31	7,20 ± 6,08	< 0,001
Tunel positiv (Strangbrüche) (%)	11,15 ± 8,67	16,30 ± 11,12	5,15 ± 6,74	< 0,001

Beim Vergleich der Spermienfärbungen am 1. und 2. Injektionszeitpunkt wurde bei jeder der vier Spermienfärbungen eine signifikante Änderung verzeichnet. Der Anteil morphologisch normaler Spermien war am 2. Injektionszeitpunkt sehr signifikant erhöht. Hinsichtlich der ungefärbten und gut kondensierten Spermien in der Anilin Blau und in der Chromomycin A₃ Färbung, konnte zwischen den jeweiligen Injektionszeitpunkten eine hoch signifikante Zunahme verzeichnet werden. Aber auch der prozentuale Anteil der DNA-Strangbrüche stieg hoch signifikant an.

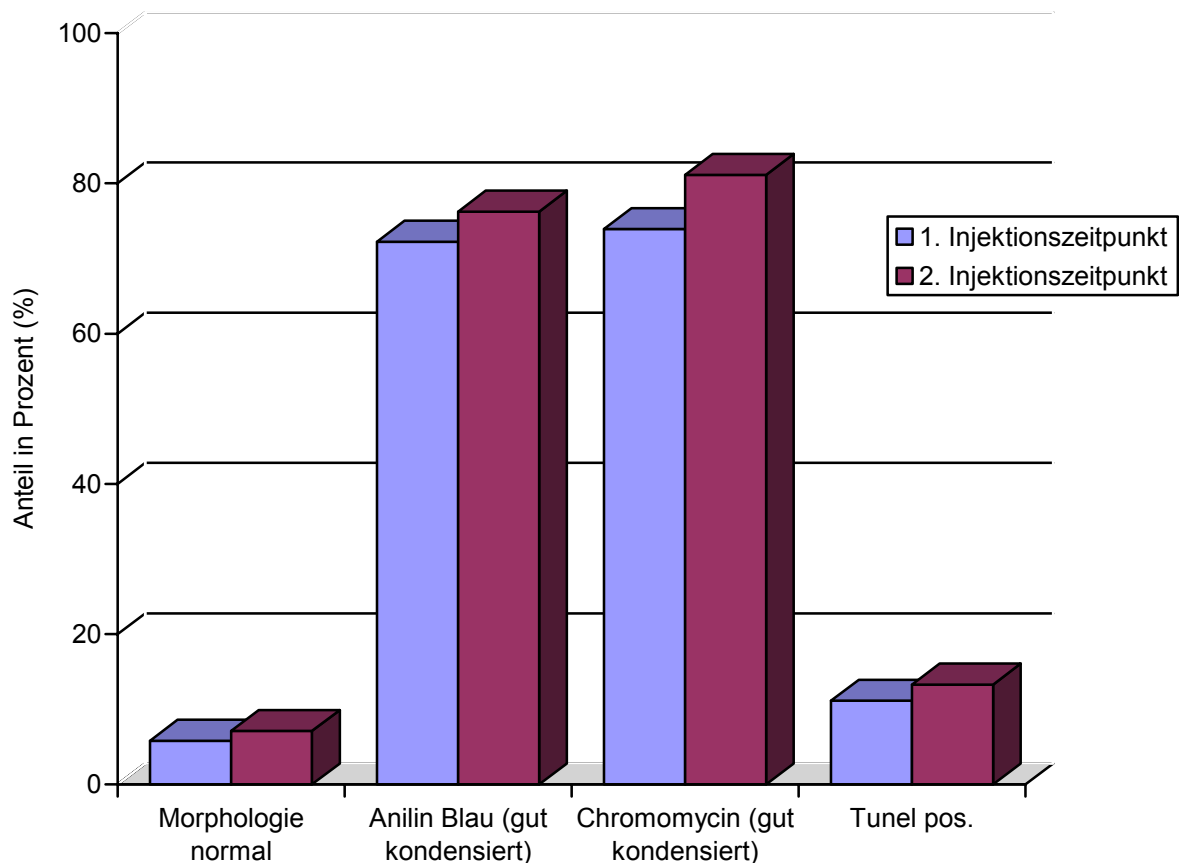


Abb.17: Vergleich der Ergebnisse der Spermiefärbungen am 1. und 2. Injektionszeitpunkt

4.2 Zusammenhang zwischen der Spermiendiagnostik und den ICSI Ergebnissen

In diesem Kapitel wurde die mögliche Korrelation zwischen den einzelnen Färbemethoden mit der Befruchtungsrate, genau wie die Korrelation der einzelnen Färbemethoden untereinander untersucht. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse vom 1. Injektionszeitpunkt und Tabelle 13 die vom 2. Injektionszeitpunkt. In Tabelle 14 werden schließlich die Ergebnisse des Gesamtkollektivs untereinander verglichen.

Tab.12: Zusammenhang zwischen den Methoden der Spermiendiagnostik untereinander und der Befruchtungsrate am 1. Injektionszeitpunkt

	Morphologie normal	Anilin Blau (gut kondensiert)	Chromomycin (gut kondensiert)	Tunel pos. (Strangbrüche)
Befruchtungsrate (%)	r = 0,302 p = 0,029	r = 0,563 p = < 0,001	r = 0,651 p = < 0,001	r = - 0,613 p = < 0,001
Morphologie normal		r = 0,213 p = 0,094	r = 0,252 p = 0,058	r = - 0,174 p = 0,142
Anilin Blau (gut kondensiert)			r = 0,857 p = < 0,001	r = - 0,647 p = < 0,001
Chromomycin (gut kondensiert)				r = - 0,684 p = < 0,001

Wie Tabelle 12 zeigt, wurde zwischen allen vier Färbemethoden und der Befruchtungsrate am 1. Injektionszeitpunkt eine statistisch signifikante Korrelation gefunden. Dabei findet sich eine hoch signifikante, wenn auch mäßige Korrelation zwischen der Befruchtungsrate und dem gut kondensierten Spermienanteil sowohl in der Anilin Blau als auch in der Chromomycin A₃ Färbung. Eine ebenfalls hoch signifikant und mäßige, jedoch negative Korrelation konnte zwischen dem Anteil an DNA-Strangbrüchen und der Befruchtungsrate gefunden werden. Zwischen dem Anteil morphologisch normaler Spermien und der Befruchtungsrate besteht wie gesagt auch eine statistisch signifikante, jedoch lediglich niedrige Korrelation. Hinsichtlich der Spermienfärbungen untereinander ergaben sich folgende Ergebnisse: Zwischen der Morphologie Färbung und der Anilin Blau, Chromomycin A₃ und Tunel Färbung konnte keine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden. Die Ergebnisse der Anilin Blau Färbungen zeigten eine statistisch hoch signifikante und starke Korrelation mit der Chromomycin A₃ Färbung und eine hoch signifikante, aber negative mäßige Korrelation mit der Tunel Färbung. Zwischen der Chromomycin A₃ Färbung und der Tunel Färbung konnte eine ebenfalls hoch signifikante, aber negative mäßige Korrelation gefunden werden.

Tab.13: Zusammenhang zwischen den Methoden der Spermiendiagnostik untereinander und der Befruchtungsrate am 2. Injektionszeitpunkt

	Morphologie normal	Anilin Blau (gut kondensiert)	Chromomycin (gut kondensiert)	Tunel pos. (Strangbrüche)
Befruchtungsrate (%)	r = 0,109 p = 0,251	r = 0,629 p = < 0,001	r = 0,609 p = < 0,001	r = - 0,641 p = < 0,001
Morphologie normal		r = 0,271 p = 0,045	r = 0,022 p = 0,447	r = - 0,405 p = 0,005
Anilin Blau (gut kondensiert)			r = 0,786 p = < 0,001	r = - 0,744 p = < 0,001
Chromomycin (gut kondensiert)				r = - 0,650 p = < 0,001

Am 2. Injektionszeitpunkt zeigten sich mit Ausnahme der Beziehung zwischen der Morphologie und der Befruchtungsrate, sowie der Morphologie und der Chromomycin A₃ Färbung ebenfalls einige statistisch signifikante Korrelationen. Eine starker Zusammenhang wurde sowohl zwischen der Anilin Blau Färbung und der Chromomycin A₃ Färbung, als auch zwischen der Anilin Blau Färbung und der Tunel Färbung gefunden (starke negative Korrelation). Eine hoch signifikante und negative mäßige Korrelation wurde zwischen der Chromomycin A₃ Färbung und der Tunel Färbung gefunden. Weiterhin hoch signifikante mäßige Korrelationen wurden zwischen der Befruchtungsrate und der Anilin Blau Färbung bzw. der Chromomycin Färbung gefunden. Zwischen der Befruchtungsrate und der Tunel-Färbung ergab sich ein negativer mäßiger Zusammenhang, der ebenfalls hoch signifikant war.

Zwischen der Morphologie und der Anilin Blau Färbung wurde ein niedriger Zusammenhang gefunden, der sich jedoch als signifikant darstellte. Die Berechnungen im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen der Morphologie und der Tunelfärbung ergaben eine hoch signifikante, negative mäßige Korrelation.

Im Nachfolgen werden die Gesamtergebnisse der Spermiendiagnostik (1. + 2. Injektionszeitpunkt) mit den Gesamtergebnissen nach ICSI (1. + 2.

Injektionszeitpunkt) verglichen.

Tab.14: Zusammenhang zwischen den Gesamtergebnissen der Methoden der Spermendiagnostik untereinander und dem ICSI - Ergebnis

	Morphologie normal	Anilin Blau (gut kondensiert)	Chromomycin (gut kondensiert)	Tunel pos. (Strangbrüche)
Befruchtungsrate (%)	r = 0,251 p = 0,059	r = 0,818 p = < 0,001	r = 0,846 p = < 0,001	r = - 0,802 p = < 0,001
Eintritt Schwangerschaft	r _{pbis} = 0,020 p = 0,905	r _{pbis} = 0,079 p = 0,630	r _{pbis} = 0,037 p = 0,819	r _{pbis} = 0,078 p = 0,631
Morphologie normal		r = 0,279 p = 0,041	r = 0,168 p = 0,150	r = - 0,314 p = 0,024
Anilin Blau (gut kondensiert)			r = 0,853 p = < 0,001	r = - 0,778 p = < 0,001
Chromomycin (gut kondensiert)				r = - 0,752 p = < 0,001

Im Gesamtkollektiv ergeben sich wie aus Tabelle 14 ersichtlich, somit ähnliche Konstellationen. Auch hier konnte zwischen der Morphologie Färbung und der Befruchtungsrate bzw. der Chromomycin A₃ Färbung, kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Starke und dabei hoch signifikante Korrelationen ergaben sich zwischen der Befruchtungsrate und der Anilin Blau Färbung, der Chromomycin A₃ Färbung sowie der Tunel Färbung (starke negative Korrelation), genauso wie zwischen der Anilin Blau und der Chromomycin A₃ Färbung. Ebenfalls starke, aber negative und gleichzeitig hoch signifikante Zusammenhänge konnten zwischen der Tunel Färbung und sowohl der Anilin Blau als auch der Chromomycin A₃ Färbung gefunden werden. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen der Morphologie und der Anilin Blau Färbung ergab einen signifikanten, niedrigen Zusammenhang. Auch die niedrige negative Korrelation zwischen der Morphologie und der Tunel Färbung stellte sich als signifikant dar. Bei den im Gesamtkollektiv zusätzlich betrachteten Ergebnissen in Bezug auf die Färbemethoden und die

Schwangerschaftsrate, konnte dagegen kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

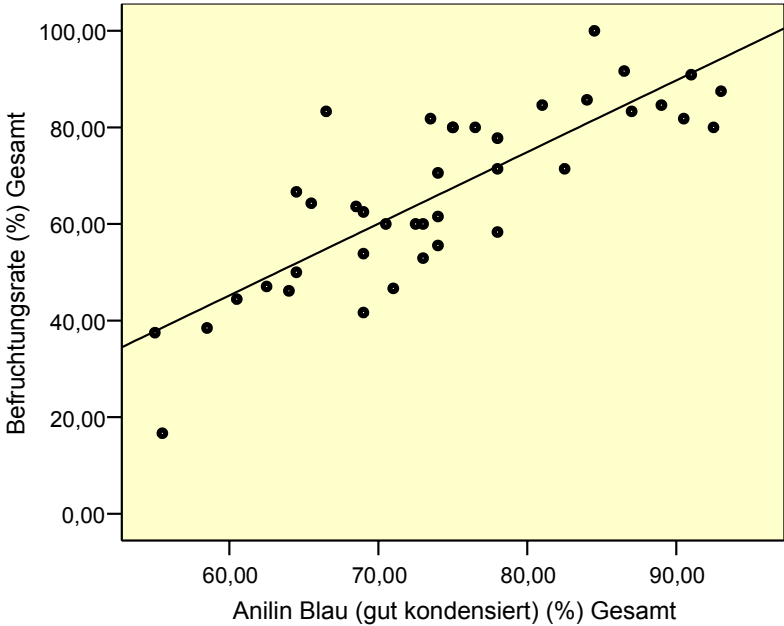


Abb.18: Streudiagramm zur Beziehung zwischen Anilin Blau und der Befruchtungsrate

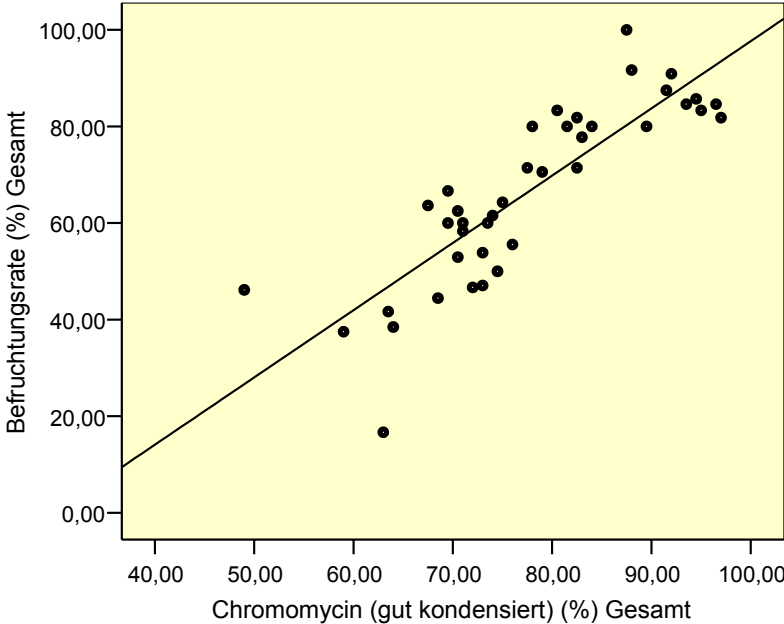


Abb.19: Streudiagramm zur Beziehung zwischen Chromomycin und der Befruchtungsrate

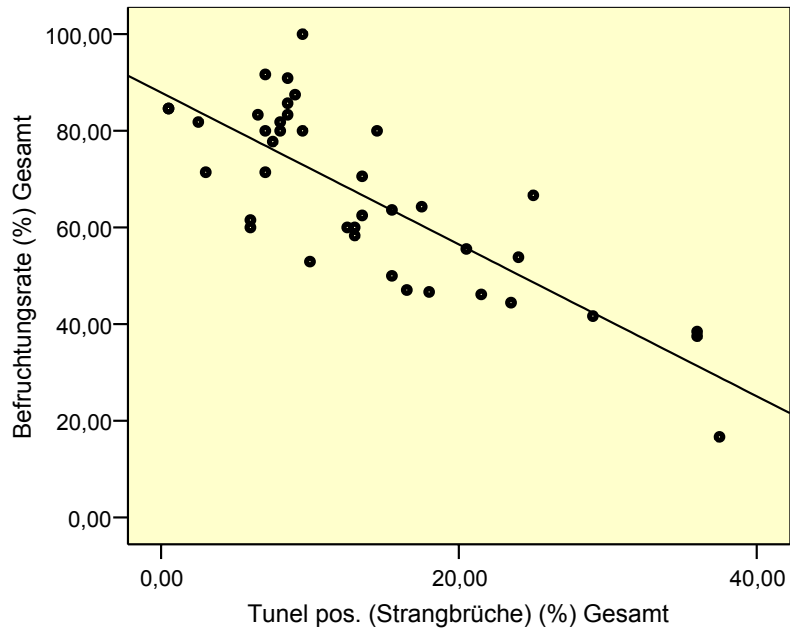


Abb.20: Streudiagramm zur Beziehung zwischen TUNEL und der Befruchtungsrate

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Färbemethoden am besten die Befruchtungsrate vorhersagen bzw. welche Färbungen keine zusätzliche Aussagekraft besitzen, wurde eine sogenannte „schrittweise multiple Regressionsanalyse“ durchgeführt. Diese ergab wie Tab.15 zeigt, dass lediglich die Kombination aus Chromomycin A₃ und Tunel einen signifikanten Beitrag zur Vorhersage der Befruchtungsrate leisten. Die zusätzliche Durchführung von Anilin Blau bzw. Morphologie Färbung konnte zu keiner besseren Vorhersage der Befruchtungsrate führen.

Tab.15: „schrittweise multiple Regressionsanalyse“ für den Zusammenhang zwischen der gesamten Befruchtungsrate und den Färbemethoden

Schritt 1:	p-Wert
Chromomycin Gesamt	0,000
Ausgeschlossene Variablen:	
Anilin Blau Gesamt	0,030
Morphologie Gesamt	0,205
Tunel Gesamt	0,002
Schritt 2:	p-Wert
Chromomycin Gesamt	0,000
Tunel Gesamt	0,002
Ausgeschlossene Variablen:	
Anilin Blau Gesamt	0,231
Morphologie Gesamt	0,616

4.3 Ergebnisse der mit Hoechst 33342 gefärbten nicht fertilisierten Oozyten

Im Folgenden finden sich die Ergebnisse der 127 nicht fertilisierten und ausgewerteten Oozyten der Patientinnen. Dabei wurden die Eizellen einerseits hinsichtlich des sich in ihnen befindlichen Spermienchromatins und andererseits bezüglich ihres eigenen Zustands beurteilt.

Tab.16: Auswertung der nicht fertilisierten Oozyten

n=127	Metaphase II Eizellen	Aktivierte Eizellen	Gesamt
Intakter Spermienkopf / Kondensiertes Chromatin	35 (27,56%)	9 (7,09%)	44 (34,65%)
Teil- / Dekondensiertes Chromatin	71 (55,91%)	3 (2,36%)	74 (58,27%)
Kein Spermienchromatin	8 (6,29%)	1 (0,79%)	9 (7,08%)
Gesamt	114 (89,76%)	13 (10,24%)	

Der mit 55,91% größte Anteil der unbefruchteten Eizellen befand sich noch im Metaphase II Stadium und enthielt dekondensiertes oder auch nur teildekondensiertes Spermienchromatin. Die mit 27,56% zweitgrößte Gruppe bilden die in Metaphase II arretierten Eizellen, in denen ein noch intakter Spermienkopf mit kondensiertem Chromatin nachgewiesen wurde. 9 der 127 untersuchten Eizellen wurden aktiviert und hatten somit ihre 2. Reifeteilung vollendet, enthielten jedoch einen intakten Spermienkopf mit kondensiertem Chromatin. Eine weitere Gruppe bilden mit 6,29% in der Metaphase II befindliche Eizellen, in denen jedoch kein Spermienchromatin mehr nachweisbar war. 3 Eizellen befanden sich im aktivierten Zustand und enthielten dekondensiertes oder teildekondensiertes Spermienchromatin. In lediglich einer Eizelle konnte trotz ihrer Aktivierung kein Spermienchromatin nachgewiesen werden.

Betrachtet man nun Spermien- und Eizellchromatin von einander getrennt, finden sich folgende Ergebnisse. 89,76% der nicht befruchteten Eizellen, sind im Metaphase II Stadium geblieben. Nur in 10,24% der Fälle, hat eine Aktivierung

stattgefunden. Betrachtet man nur das Spermienchromatin, so ergibt sich, dass mit 58,27% am häufigsten dekondensiertes oder teildekondensiertes Spermienchromatin in den unbefruchteten Eizellen gefunden wurde. In 34,65% der nicht fertilisierten Oozyten wurde ein intakter Spermienkopf und noch kondensiertes Chromatin gefunden. In 7,08% der untersuchten Eizellen, konnte überhaupt kein Spermienchromatin nachgewiesen werden.

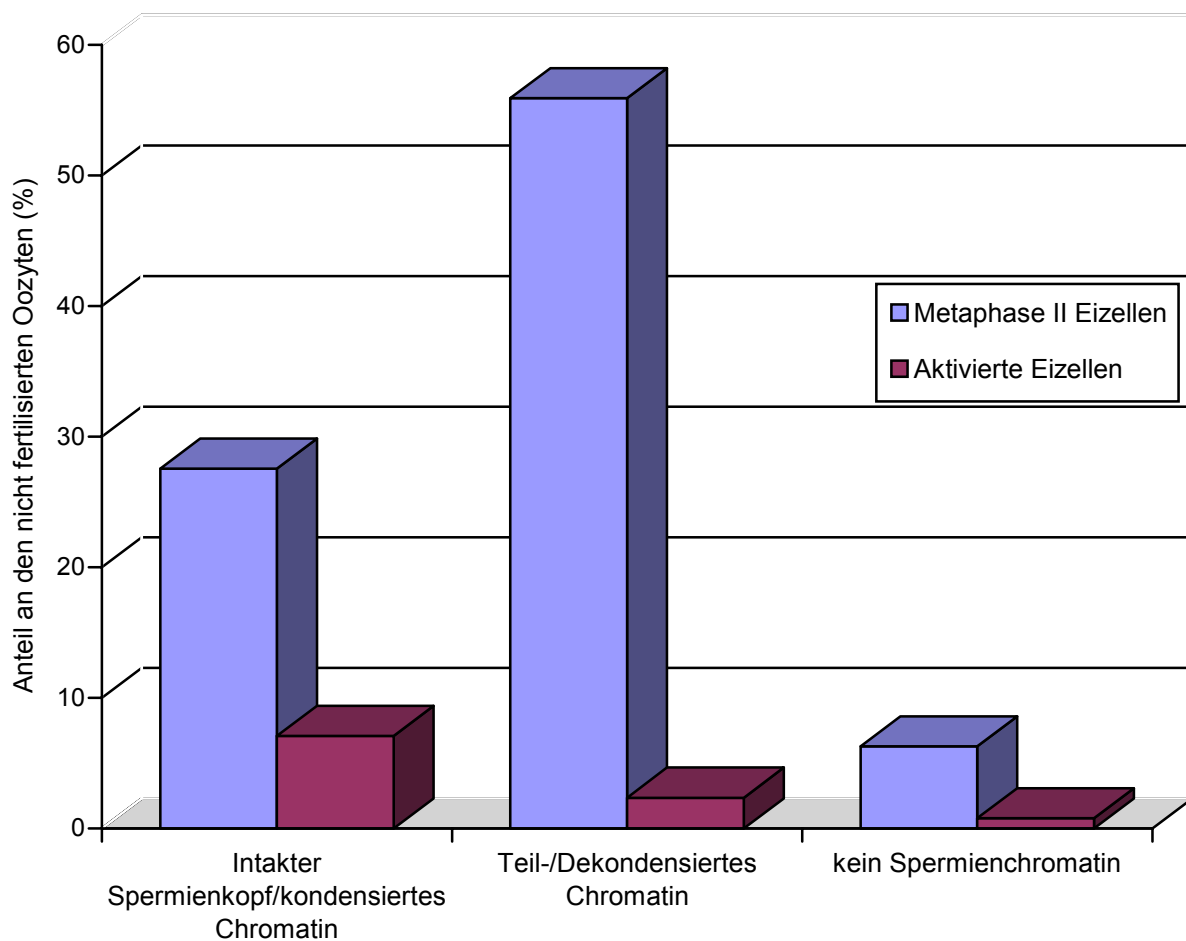


Abb.21: Auswertung der nicht fertilisierten Oozyten

4.4 Zusammenhang zwischen dem Gesamtergebnis der Spermiendiagnostik und den nicht fertilisierten Oozyten

4.4.1 Zusammenhang zwischen dem Spermienchromatin der nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den Spermienfärbungen und dem Spermienchromatin der nicht fertilisierten Oozyten ausfindig zu machen, wurden auch hier die jeweiligen Korrelationskoeffizienten gebildet.

Tab.17: Zusammenhang zwischen dem Spermienchromatin der nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik

	Intakter Spermienkopf / kondensiertes Chromatin	Teil- / Dekondensiertes Chromatin	Kein Spermien- chromatin
Morphologie normal	r = -0,052 p = 0,778	r = 0,203 p = 0,265	r = -0,354 p = 0,047
Anilin Blau (gut kondensiert)	r = 0,100 p = 0,587	r = 0,026 p = 0,886	r = -0,281 p = 0,119
Chromomycin (gut kondensiert)	r = - 0,021 p = 0,908	r = 0,153 p = 0,405	r = - 0,304 p = 0,090
Tunel pos. (Strangbrüche)	r = - 0,170 p = 0,351	r = - 0,021 p = 0,909	r = 0,424 p = 0,016

Dabei fand sich lediglich eine negative, niedrige und signifikante Korrelation zwischen der Morphologie und den Eizellen ohne Spermienchromatin. Die Anzahl positiver Strangbrüche korrelierte ebenfalls signifikant, jedoch mäßig mit den Eizellen ohne Spermienchromatin. Zwischen allen weiteren Spermienfärbungen und Spermiechromatinzuständen der nicht fertilisierten Oozyten konnte keine statistisch signifikanten Zusammenhänge gefunden werden.

4.4.2 Zusammenhang zwischen den nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik

Tab.18: Zusammenhang zwischen den nicht fertilisierten Oozyten und den Gesamtergebnissen der Spermiendiagnostik

	Metaphase II Eizellen	Aktivierte Eizellen
Morphologie normal	r = 0,151 p = 0,409	r = - 0,151 p = 0,409
Anilin Blau (gut kondensiert)	r = 0,126 p = 0,491	r = - 0,126 p = 0,491
Chromomycin (gut kondensiert)	r = 0,221 p = 0,225	r = - 0,221 p = 0,225
Tunel pos. (Strangbrüche)	r = - 0,124 p = 0,500	r = 0,124 p = 0,500

Auch der Vergleich zwischen den Spermiefärbungen und dem Zustand der unbefruchteten Eizellen, ergab keine signifikanten Korrelationen.

4.5 Ergebnisse der SpermioGrammparameter, der ausgewerteten Eizellen und die ICSI-Ergebnisse in Bezug auf das Erfolgskriterium „Schwangerschaft“

In diesem Kapitel wird verglichen, ob zwischen der Patientengruppe, in der es zu einer Schwangerschaft und der Patientengruppe, in der es zu keiner Schwangerschaft gekommen ist, grundlegende Unterschiede im Hinblick auf die SpermioGrammparameter oder die ICSI-Ergebnisse zu beobachten sind. Weiterhin wurden die Ergebnisse der ausgewerteten nicht fertilisierten Oozyten hinsichtlich dieser beiden Patientengruppen untersucht.

Tab.19: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium „Schwangerschaft“ und den SpermioGRAMMparametern

	schwanger	nicht schwanger	p-Wert
Anzahl der Patienten	14	26	
Alter ♂ in Jahren	34,67 ± 4,71	36,60 ± 3,90	0,172
pH-Wert	8,63 ± 0,31	8,70 ± 0,34	0,522
Dichte (Mio/ml)	32,29 ± 26,17	31,30 ± 25,94	0,910
Globalmotilität (%)	39,64 ± 27,14	32,24 ± 24,78	0,393
Eosin (vitale) (%)	36,07 ± 19,92	28,08 ± 19,85	0,232
HOS (vitale) (%)	50,36 ± 21,97	52,31 ± 22,86	0,796
Morphologie normal (%) Gesamt	6,36 ± 4,31	6,50 ± 3,14	0,905
Anilin Blau (gut kondensiert) (%) Gesamt	73,18 ± 10,92	74,83 ± 9,84	0,630
Chromomycin (gut kondensiert) (%) Gesamt	76,96 ± 9,32	77,83 ± 12,20	0,819
Tunel positiv (%) Gesamt	14,71 ± 10,40	13,19 ± 8,95	0,631

Tab.20: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium "Schwangerschaft" und den ICSI-Ergebnissen

	schwanger	nicht schwanger	p-Wert
Anzahl der Patienten	14	26	
Alter ♀ in Jahren	32,93 ± 3,56	33,74 ± 4,61	0,573
Anzahl gewonnener Eizellen / Paar	12,79 ± 3,62	14,62 ± 4,40	0,191
Injizierte Eizellen / Paar	11,29 ± 3,02	12,88 ± 3,33	0,143
Befruchtete Eizellen / Paar	7,21 ± 2,75	8,58 ± 2,82	0,150
Befruchtungsrate / Paar	65,01 ± 22,24	67,09 ± 16,36	0,737
Transferierte Eizelle / Paar	2,14 ± 0,36	1,81 ± 0,75	0,125

Tab.21: Zusammenhang zwischen dem Erfolgskriterium "Schwangerschaft" und den Ergebnissen der nicht fertilisierten Oozyten

	schwanger	nicht schwanger	p-Wert
Anzahl der Patienten mit ausgewerteten Eizellen	10	22	
Intakter Spermienkopf / kondensiertes Chromatin (%)	29,05 ± 21,90	34,05 ± 26,83	0,610
Teil- / Dekondensiertes Chromatin (%)	63,00 ± 22,67	61,23 ± 28,25	0,863
Kein Spermienchromatin (%)	8,00 ± 10,33	4,73 ± 11,96	0,461
Aktivierte Eizellen (%)	6,70 ± 11,72	10,00 ± 15,04	0,545
Metaphase II Eizellen (%)	93,30 ± 11,72	90,00 ± 15,04	0,545

Weder bei den Spermioigrammparametern noch bei den ICSI-Ergebnissen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der schwangeren und nicht schwangeren Patientenpaaren nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich der ausgewerteten Oozyten fanden sich keine statistisch bedeutsamen Unterschiede.

5 Diskussion

5.1 Vorbemerkung zur Diskussion

Unter Berücksichtigung der Komplexität der Ergebnisse und in Anlehnung an die unter 2.8 erläuterte Fragestellung, werden in der Diskussion der Reihe nach die Ergebnisse der einzelnen Färbemethoden, die ICSI-Ergebnisse und schließlich die Auswertung der nicht fertilisierten Oozyten erörtert.

5.2 Bedeutung der Spermiemorphologie

Die Spermienmorphologie ist, wie unter 2.7.1 dargestellt, ein etablierter und wichtiger Parameter im Rahmen der heutigen Infertilitätsdiagnostik, da sie u.a. Hinweise auf die für die Patienten am ehesten erfolgversprechende Behandlung geben kann, und somit eine individuelle Auswahl unter den vielen Verfahren der assistierten Reproduktion ermöglicht.

In der vorliegenden Studie, wiesen 97,5% der Patienten im Nativejakulat einen Anteil von weniger als 14% normal geformter Spermien auf und lagen somit unter dem nach den strict criteria geltenden Normalbereich. Auch mit Hilfe der Aufbereitungsmethoden konnte sich der Anteil morphologisch normaler Spermien nicht signifikant verbessern. Erstaunlicher Weise zeigte sich jedoch nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 4,56 h zwischen den jeweiligen Injektionszeitpunkten, eine statistisch signifikante Erhöhung der normal geformten Spermien.

Hinsichtlich des Zusammenhangs der Morphologie mit der Befruchtungsrate, stimmten unsere Ergebnisse weitestgehend mit denen von NAGY et al. (1998), HAMMADEH et al. (1996) sowie SAKKAS et al. (1996) überein, die keinen Einfluss der Morphologie auf die Befruchtungsrate nach ICSI finden konnten. Denn auch in unseren Untersuchungen vom 2. Injektionszeitpunkt und im Gesamtkollektiv, konnte kein Einfluss der Morphologie sowohl auf die Befruchtungsrate, als auch auf den Eintritt einer Schwangerschaft nachgewiesen werden. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass bei der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion im

Gegensatz zur In-vitro-Fertilisation, ein Spermium soweit mikroskopisch möglich, nach morphologischen Gesichtspunkten selektiert wird. Lediglich bei der Untersuchung am 1. Injektionszeitpunkt bestand eine niedrige Korrelation zwischen der Morphologie und der Befruchtungsrate. Insgesamt muss man jedoch sagen, dass nach den hier vorgestellten Daten, sich die Morphologie nicht als besonders geeigneter Parameter zur Fertilitätsprognose erwiesen hat.

Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Morphologie und den übrigen Färbemethoden wurde errechnet. Es zeigte sich eine wenn auch niedrige, aber signifikante Korrelation im Gesamtkollektiv zwischen dem Anteil morphologisch normaler Spermien und dem Anteil gut kondensierter Spermien in der Anilin Blau Färbung. Dieser Zusammenhang zwischen der Chromatinkondensation und der Morphologie bestätigt somit die bereits von ESTERHUIZEN et al. (2000a) und BIANCHI et al. (1996a) gefundenen Ergebnisse. Allerdings ist in diesen Studien die Chromatinkondensation mit Chromomycin A₃ untersucht worden. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil morphologisch normalen Spermien und einer guten Chromatinkondensation (in der Färbung mit Chromomycin A₃) gefunden werden. Bezüglich der DNA-Strangbrüche stellte sich die Situation wie folgt dar: Hier konnte eine negative Korrelation zwischen einer normalen Morphologie und den DNA-Strangbrüchen gefunden werden. Je schlechter sich also die morphologische Struktur der Spermien darstellte, desto mehr DNA-Strangbrüche konnten gefunden werden. Diese Beziehung fanden auch PIASECKA et al. (2006), SAKKAS et al. (2002) und LOPES et al. (1998).

5.3 Bedeutung des Chromatinkondensationsstatus

Der in dieser Studie im Mittelpunkt stehende Chromatinkondensationsstatus der Spermien, ist mit Hilfe der Färbungen Anilin Blau und Chromomycin A₃ dargestellt worden.

Dabei zeigte sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine hoch signifikante, starke Korrelation zwischen diesen beiden Färbungen. Der Vergleich der Chromatinkondensation vor und nach Aufbereitung, zeigte sowohl in der Anilin Blau, als auch in der Chromomycin A₃ Färbung hoch signifikante Unterschiede. Auch die

Gegenüberstellung der Ergebnisse vom 1. und 2. Injektionszeitpunkt, konnte in beiden Färbungen hoch signifikante Unterschiede zeigen. Somit kann die vorliegende Untersuchung vermuten lassen, dass eine verlängerte Spermieninkubationszeit offenbar zu einer vermehrten Chromatinkondensation bzw. einer Chromatinhyperkondensation führt. Zu dieser Annahme kamen bereits MOLINA et al. (1995) und KVIST (1980a), die ebenfalls eine Zunahme der Chromatinstabilität durch längere Inkubationszeiten postulierten. Dies liegt möglicherweise im Zinkgehalt des Inkubationsmediums begründet, der sich an die freien Thiol-Gruppen der Protamine bindet und darüber eine verstärkte Chromatinkondensation bewirkt (KVIST et al., 1987). Grundlage dieser Vermutung ist die Tatsache, dass im Seminalplasma enthaltenes Zink während der Aufbereitung ins Medium überdiffundiert (BJÖRNDAHL et al., 2005). Jedoch muss man auch sagen, dass diese Theorie nicht in allen Studien gehalten werden konnte. So zeigten z.B. Untersuchungen von CALAMERA et al. (2001) sowie von HURET und COURTOT (1984), keinen beträchtlichen Unterschied im Kondensationsgrad der DNA nach verlängerter Spermieninkubation.

Welche Bedeutung hat nun die Chromatinkondensation auf die Erfolgsraten nach ICSI? Unseren Ergebnissen zufolge, kommt es nach verlängerter Inkubationszeit zu keiner signifikanten Veränderung der Befruchtungsrate ($p=0,230$), obwohl die Befruchtungsrate zum Zweiten und somit späteren Injektionszeitpunkt, sogar um durchschnittlich 6,03 Prozentpunkte höher lag. Insofern können wir die Hypothese einiger Autoren (u.a. HAMAMAH et al., 1990), dass eine verstärkte Chromatinkondensation möglicherweise zu einem vermehrten Auftreten von Fehlbefruchtungen führt, nicht uneingeschränkt teilen. Diese Annahme stützte sich auf die Vermutung, dass die während des Befruchtungsvorgangs notwendige Entspiralisierung des Chromatins, bei hyperkondensiertem Chromatin erschwert ist. Demzufolge erwarteten HURET und MIQUEREAU (1984b), dass hyperkondensiertes Chromatin innerhalb der Eizelle nicht adäquat dekondensieren kann und somit einen nachteiligen Effekt auf die Fertilisationsraten haben könnte. Entgegen dieser Theorie konnte in unserer Untersuchung jedoch kein Zusammenhang zwischen der Spermienchromatinstruktur vor der Injektion, auf die Chromatindekondensation im Eizellzytoplasma nach der Injektion gefunden werden. Eine verstärkte Chromatinkondensation führte laut unseren Analysen also nicht zu gehäuften

Problemen bei der Dekondensation oder zu einem höheren Anteil intakter bzw. kondensierter Spermienköpfe.

Das aber ein genereller Zusammenhang zwischen dem Chromatinkondensationsgrad und der Befruchtungsrate besteht, wird in unseren Daten besonders deutlich. Sowohl der Anteil gut kondensierter Spermien in der Anilin Blau als auch in der Färbung mit Chromomycin A₃, weisen eine hoch signifikante, mäßige bis starke Korrelation mit der Befruchtungsrate auf. Ähnliche Ergebnisse von zahlreichen anderen Studien sind in diesem Zusammenhang bereits publiziert worden. So fanden auch NASR-ESFAHANI et al. 2004b, RAZAVI et al. 2003 und LOLIS et al. 1996 Hinweise darauf, dass eine schlechte Chromatinkondensation in der Chromomycin A₃ Färbung mit niedrigeren Befruchtungsraten einhergeht. Daneben stehen allerdings die Resultate einer Arbeit von KARYDIS et al. (2005) und HAMMADEH et al. (1996), die keinen Einfluss einer unzureichenden Chromatinkondensation auf die Ergebnisse nach ICSI fanden. Dies können wir allerdings nur insofern bestätigen, dass auch bei unseren Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen der Chromatinkondensation und dem Eintritt einer Schwangerschaft, wohl aber, wie bereits oben erläutert, mit der Befruchtungsrate besteht. Denn unseren Berechnungen zufolge, leisten die Färbungen mit Chromomycin A₃ und TUNEL zusammen, einen signifikanten Beitrag zur Vorhersagemöglichkeit der Befruchtungsrate.

5.4 Bedeutung der DNA-Strangbrüche in der Färbung mit TUNEL

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Chromatinkondensation aus der Färbung mit Anilin Blau und Chromomycin A₃ mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche (TUNEL Färbung), wird deutlich, dass eine unzureichende oder nur geringgradige Chromatinkondensation mit einer hohen Anzahl an Strangbrüchen einhergeht. Auch MANICARDI et al. (1995), konnten dies in ihren Untersuchungen zeigen. Möglicherweise ist eine schlecht kondensierte DNA anfälliger und empfindlicher gegenüber oxidativem Stress. Diese sogenannten ROS (Reactive oxygen species) führen, wie AGARWAL et al. (2006) und MOUSTAFA et al. (2004) zeigen konnten, zu einem Anstieg der DNA-Schäden in Spermien.

Zwar kann mit Hilfe der verwendeten Aufbereitungsmethoden, die Zahl der DNA-

Strangbrüche gegenüber dem Nativejakulat signifikant verringert werden, jedoch zeigen unsere Ergebnisse auch, dass am 2. Injektionszeitpunkt und somit nach einer zusätzlichen Inkubationszeit von durchschnittlich 4,56 h, die Zahl der Strangbrüche wieder statistisch bedeutsam ansteigt. DALZELL et al. (2004) konnten nach einer verlängerten Inkubationszeit von im Hoden entnommenen Spermien ebenfalls eine erhöhte DNA-Fragmentation finden. Auch MURATORI et al. (2003) kamen zu dem Entschluss, dass oxidativer Stress ein Grund für DNA-Strangbrüche darstellt und dass die Spermieninkubation in vitro die Entstehung von Strangbrüchen begünstigt.

Betrachtet man nun den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Strangbrüchen und der Befruchtungsrate, so ist zu beobachten, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten, eine hoch signifikante und mäßige bis starke negative Korrelation zwischen diesen beiden Parametern besteht. Unseren Ergebnissen zufolge, wirkt sich eine hohe Anzahl an Strangbrüchen im Ejakulat, also negativ auf den Befruchtungserfolg der Eizellen aus. Zu diesem Entschluss gelangten auch BENCHAIIB et al. (2003), LOPES et al. (1998) und SAKKAS et al. (1996), die ebenfalls eine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von Spermien mit DNA-Strangbrüchen und der Befruchtungsrate nach ICSI finden konnten.

Bezüglich des Eintritts einer Schwangerschaft konnte innerhalb unseres Patientenkollektivs kein Zusammenhang mit der Anzahl der DNA-Fragmente gefunden werden. Die Aussage von HENKEL et al. (2003), dass ein hoher Anteil von Spermien mit Strangbrüchen zu einer niedrigeren Schwangerschaftsrate führe, konnten wir somit also nicht bestätigen. HENKEL et al. (2003) vermuteten folglich, dass auch Spermien mit DNA-Strangbrüchen anscheinend in der Lage sind, eine Eizelle zu befruchten, es jedoch später zu Problemen in der Embryonalentwicklung kommt, die schließlich in einem Schwangerschaftsmisserfolg enden. Doch wie bereits erwähnt, können wir diese Vermutung aufgrund unserer Ergebnisse nicht vollstens unterstützen.

5.5 Die ICSI-Ergebnisse der beiden Injektionszeitpunkte

Im Hinblick auf die Befruchtungsraten an beiden von uns untersuchten Zeitpunkten, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Somit ergibt sich also, dass eine durchschnittliche längere Inkubationszeit von 4,56 h zu keiner statistisch bedeutsamen Veränderung der Befruchtungsrate führt. Zwar steigt der Chromatinkondensationsgrad mit verlängerter Inkubationszeit an, jedoch scheint dies keine direkte Auswirkung auf die Befruchtungsrate zu haben. Insofern können wir die Befürchtung anderer Autoren, dass eine Hyperkondensation des Chromatins zu Problemen beim Befruchtungsvorgang führen kann, nicht belegen. Entweder scheint es auch bei einer Hyperstabilität der DNA keine Komplikationen im Dekondensationsablauf zu geben, oder es konnten sich durch die ebenfalls längere Inkubationszeit der Oozyten, vermehrt Faktoren zur Dekondensation (wie Nukleoplasmin oder Glutathion) im Ooplasma bilden oder weiter ausreifen. Durch die Zunahme von Dekondensationsfaktoren ist die Eizelle möglicherweise in der Lage, trotz Chromatinhyperkondensation des Spermatozoons, die Disulfidbrücken abzubauen und die Protamine wieder gegen Histone auszutauschen, so dass es zur Dekondensation und schließlich zur Vorkernbildung kommen kann.

In unserer Studie ist die verlängerte Inkubationszeit ausschließlich im Hinblick auf Veränderungen im Bereich der Spermatozoen untersucht worden. Zahlreiche Autoren haben jedoch erforscht, inwieweit eine Langzeitinkubation der Eizellen, einen Einfluss oder Effekt auf die Befruchtungsrate hat. Hintergrund dieser Untersuchungen war die Vermutung (GROSS et al., 1996 und KUBIAK, 1989), dass Metaphase II Eizellen, zwar ihre nukleäre Reife, jedoch möglicherweise noch nicht den notwendigen zytoplasmatischen Reifegrad erreicht haben („zytoplasmic immaturity“). Zugleich können auch Eizellen, die selbst die nukleäre Reife noch nicht erlangt haben, durch verlängerte Inkubationszeiten das Metaphase II Stadium noch erreichen.

Bezüglich der Oozyteninkubation vor ICSI, ergeben sich ambivalente Ergebnisse. ISIKLAR et al. (2004), HO et al. (2003) und RIENZI et al. (1998) demonstrierten in ihren Studien, dass eine verlängerte Eizellen-Inkubation zu einer erhöhten Befruchtungsrate nach ICSI führt. Auch WILDING et al. (2006) berichten von einer verbesserten Befruchtungsrate nach 3-stündiger Inkubation in Follikelflüssigkeit.

Führt man die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) innerhalb eines Zeitfensters von 2-6 h nach der Punktion durch, so ergeben sich nach DOZORTSEV et al. (2004) die höchsten Schwangerschaftsraten.

Demgegenüber stehen die Resultate von ANDREWS et al. (2001), JACOBS et al. (2001), VAN DE VELDE (1998) und YANAGIDA et al. (1998), die keinen positiven Aspekt eines zeitversetzten ICSI ausmachen konnten. Gleichzeitig gibt es durchaus Hinweise darauf, dass eine außerordentlich lange Inkubationszeit für Oozyten sogar Nachteile mit sich bringen kann. Untersuchungen von EICHENLAUB-RITTER et al. (1986) an Mäusen zeigten in gealterten Eizellen Veränderungen des Zytoskeletts, eine Schrumpfung des Spindelapparats und zunehmende Probleme bei der Anordnung der Chromosomen, sowie ein Prädisposition für Aneuploidien und ein vermindertes Entwicklungspotential. Bei den von TARIN et al. (1999) beobachteten gealterten Mäuse-Eizellen, konnte eine vermehrte Anzahl von wachstumsretardiertem Nachwuchs gefunden werden. FUKUDA et al. (1992) berichteten nach verlängerter Inkubationszeit u.a. von einer Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung.

Berücksichtigt man all diese publizierten Studien sowie unsere Resultate, muss man abschließend sagen, dass wohl ein optimaler Inkubationszeitpunkt sowohl vom Ejakulat als auch der Oozyten bisher noch nicht eindeutig gefunden wurde.

5.6 Ergebnisse der nicht fertilisierten Oozyten

Die mit Hoechst 33342 gefärbten unbefruchteten Oozyten wurden einerseits bezüglich des Zustands der Eizelle und andererseits im Hinblick auf das Spermienchromatin untersucht.

Dabei zeigte sich in unseren Ergebnissen, dass 89,76% der unbefruchteten Eizellen im Metaphase II Stadium arretiert waren und lediglich 10,24% sich im aktivierten Stadium befanden. Daher sind anscheinend überwiegend Probleme bei der Aktivierung der Eizelle mitverantwortlich für Fehlbefruchtungen. Die Ausbleibende Aktivierung der Eizelle ist auch für TESARIK und SOUSA (1995) und FLAHERTY et al. (1995a) mit ein Hauptgrund für das Auftreten nicht befruchteter Eizellen nach ICSI. Dem von DUBEY et al. (1998) veröffentlichten Ergebnis, dass 84% der

analysierten Eizellen in der Metaphase II arretiert blieben, können wir also weitestgehend zustimmen. Auch bei NEUBER et al. (1994), befanden sich die meisten der nicht fertilisierten Oozyten im Metaphase II Stadium. FLAHERTY et al. (1998) konnten einen Anteil von 82% nicht aktivierter Oozyten finden.

Eine erfolglose Aktivierung beruht laut DOZORTSEV et al. (1995a) möglicherweise darauf, dass der SAOAF den Spermatozoen fehlt, ein Mangel herrscht oder das Spermium nicht in der Lage ist, diesen Faktor aus seinem Zytoplasma freizusetzen. Die Freisetzung dieses Faktors ist anscheinend jedoch erst möglich, nachdem der SNDF der Oozyte den Spermienkopf erreicht, seine Schwellung induziert und dadurch die Ruptur der Plasmamembran und Freisetzung des SAOAF ermöglicht (DOZORTSEV et al. 1997).

Betrachtet man nun das Spermienchromatin im Gesamtkollektiv der nicht fertilisierten Oozyten, so befindet sich in der Mehrzahl der Eizellen teildekondensiertes oder dekondensiertes Spermienchromatin (58,27%). Die mit 34,65% zweitgrößte Gruppe bilden die Eizellen, in denen ein noch intakter Spermienkopf bzw. kondensiertes Spermienchromatin vorhanden war. In lediglich 7,08% der Eizellen, konnte zum Untersuchungszeitpunkt kein Spermienchromatin mehr nachgewiesen werden. Zu nahezu identischen Ergebnissen kamen auch FLAHERTY et al. (1998), GOOK et al. (1998), SAKKAS et al. (1996) und DOZORTSEV et al. (1994) die ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle ein dekondensiertes bzw. teildekondensiertes Spermienchromatin beobachten konnte. Dem gegenüber steht eine zytogenetische Analyse von KUNATHIKOM et al. (2001), die mit 57,1% überwiegend kondensiertes Spermienchromatin in den untersuchten Eizellen nachweisen konnten.

Innerhalb der Gruppe der Eizellen mit kondensiert gebliebenem Spermium fehlte es demnach entweder am SNDF oder dieser konnte seiner Aufgabe aus strukturellen Gründen nicht nachgehen. Denn bei einer unzureichenden Membrandestabilisierung des Spermiums vor Injektion, können die für die Dekondensation verantwortlichen Faktoren des Ooplasmas, den Spermienkern nicht erreichen.

Weiterhin ist denkbar, dass das Spermium aufgrund eines intrinsischen Defektes nicht in der Lage ist, zu dekondensieren.

Bei den Oozyten mit dekondensiertem oder teildekondensiertem Spermienchromatin, dass sich vorwiegend in Metaphase II Oozyten findet, scheint zwar der SNDF des Ooplasma seine Wirkung begonnen zu haben, aber möglicherweise ist es noch nicht zu Freisetzung des SAOAF und somit auch nicht zur Aktivierung der Eizelle gekommen. Die fehlende Aktivierung könnte also ein entscheidender Grund für das Ausbleiben der Befruchtung sein.

In 9 der 127 untersuchten Eizellen, konnte kein Spermienchromatin nachgewiesen werden. Wie FLAHERTY et al. (1995) vermuten, kann das Spermium durch die Injektionsstelle der ICSI - Pipette zurück in den perivitellinen Spalt gelangen, wohingegen sie eine fehlerhafte Injektion eher für unwahrscheinlich halten.

Wie das bisher dargestellte zeigt, ist der Befruchtungsvorgang ein äußerst komplexer Vorgang, so dass es entsprechend viele Gründe für Fehlbefruchtungen zu geben scheint. Neben den bereits erwähnten und von uns vermuteten Gründen, haben einige Forschergruppen aufgrund von anderen Analysemethoden, weitere in Frage kommende Ursachen gefunden.

Nicht nur die Strangbrüche der Spermien-DNA scheinen wie aus unseren Ergebnissen ersichtlich, einen negativen Einfluss auf die Befruchtungsrate zu verursachen. Laut BOSCO et al. (2005), kann auch die DNA-Fragmentation der Eizelle mit dem Befruchtungsversagen nach ICSI korrelieren.

Genetische Analysen von KUNATHIKOM et al. (2001) ergaben, dass rund 1/3 der nicht fertilisierten Oozyten chromosomale Anomalien aufwiesen.

Für NASR-ESFAHANI et al. (2004b) sind Aneuploidien und die vorzeitige Chromatinkondensation der Spermien (PCC), die beiden Hauptgründe für das Ausbleiben der Befruchtung. Es gibt viele Hinweise darauf, dass neben der zytoplasmatischen Unreife auch Chromatinveränderungen wie das Fehlen der Protamine zur vorzeitigen Chromatinkondensation der Spermien (PCC) führen und somit den Befruchtungsvorgang nach ICSI negativ beeinflussen können (NASR-ESFAHANI et al., 2006).

Bevor allerdings Methoden entwickelt werden können um die Befruchtungsrate und somit auch die Erfolgsrate nach ICSI zu erhöhen, müssen die verursachenden Mechanismen in Zukunft noch detaillierter aufgeklärt werden.

Um jedoch Probleme bei der Spermiendekondensation und der Aktivierung der

Eizelle zu umgehen, führten RHO et al. (1998) Untersuchungen mit Rinder-Oozyten durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine Vorbehandlung der Spermien mit DTT (Dithiothreitol) und eine Aktivierung der Eizelle mit Ionomycin und DMAP (6-Dimethylaminopurin) nützlich sind, um die Spermiendekondensation und die anschließende Bildung der Vorkerne nach ICSI zu fördern. Dies wiederum führt jedoch möglicherweise zu befruchteten Eizellen mit einem eingeschränkten Entwicklungspotential.

5.7 Schlussfolgerung

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Spermieninkubationszeit auf den Chromatinkondensationsgrad und auf die Ergebnisse nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) zu untersuchen. Bezüglich dieser Hauptthematik lässt sich abschließend folgendes feststellen: Zwar führt eine verlängerte Spermieninkubationszeit von durchschnittlich 4,56 h in unserem Fall, zu einer hoch signifikant stärkeren Chromatinkondensation in der Färbung mit Anilin Blau und Chromomycin A₃ und bestätigt damit die Hypothese, dass eine verlängerte Inkubationszeit zu einer Hyperkondensation der Spermien-DNA führt, jedoch scheint diese Hyperkondensation nicht wie befürchtet Auswirkungen auch die Befruchtungsrates zu haben. Auch nach der verlängerten Inkubationszeit ist die Befruchtungsrates der injizierten Eizellen mindestens genauso hoch. Insgesamt können wir somit postulieren, dass eine verlängerte Inkubationszeit der Spermien, wie sie beispielsweise bei hohem Arbeitsanfall im Labor auftreten kann, zwar zu strukturellen Veränderungen an den Spermien führt, jedoch keinen nachteiligen Effekt auf die Ergebnisse nach ICSI zu haben scheint.

6 Literaturverzeichnis

Agarwal A, Gupta S, Sikka S (2006) The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 18:325-32

Andrews MM, Fishel SB, Rowe PH, Berry JA, Lisi F, Rinaldi L (2001). Analysis of intracytoplasmic sperm injection procedures related to delayed insemination and ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2:89-97

Arndt-Jovin DJ, Jovin TM (1977) Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem.* 25:585-9

Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP (1990) Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 13:452-62

Balhorn R (1982) A model for the structure of chromatin in Mammalian Sperm. *J Cell Biol.* 93:298-305

Bals-Pratsch, Schill T, Diedrich K (1998) Der andrologische Patient in der gynäkologischen Praxis. In: Diedrich K (ed): Weibliche Sterilität. Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 437-490

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y (2003). Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 80:1413-9

Belva F (2006). ICSI children are developing well at the age of eight. Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology 2006 in Prague. Press releases ESHRE 2006. Abstract no:0-014

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 18:1023-1028

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B (2005) The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod.* 20:185-90

Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod.* 49:1083-8

Bianchi PG, Manicardi G, Bizzaro D, Campana A, Bianchi U, Sakkas D (1996). Use of guanosin (GC) specific fluorochrome, chromomycine A₃, as an Indicator of poor sperm morphology. *J Assist Reprod Genet.* 13:246-250

Bielsa MA, Andolz P, Gris JM, Martinez P, Egozcue J (1994) Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples? *Hum Reprod.* 9:1887-90

Björndahl L, Mohammadi M, Pourian M, Söderlund I, Kvist U (2005). Contamination by Seminal Plasma Factors during sperm selection. *J Androl.* 26:170-3

Bosco L, Ruvolo G, Morici G, Manno M, Cittadini E, Roccheri MC (2005) Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 84:1417-23

Bundesärztekammer (2006). (Muster-) Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion. *Deutsches Ärzteblatt.* 20:A1392-1403

Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF (2001). Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Androl.* 33:79-86

Cha KY, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, Choi DH, Yoon TK (2005) Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 83:1461-5

Cran DG, Esper CR (1990). Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J Reprod Fert Suppl.* 42:177-188

Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML (1988) Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 20:211-7

D'Agata, Vicari E, Moncada ML, Sidoti G, Calogero AE, Fornito MC, Minacapilli G, Mongioi A, Polosa P (1990) Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. *Int J Androl*. 13:344-51

Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE (2004). Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril*. 82:1443-5

De Geyter CH (1997) ICSI Möglichkeiten und Grenzen. Fortbildungsveranstaltung Andrologie, Dr. Fehr, Schaffhausen, Schweiz vom 25.10.1997

Diedrich K, Weiss JM, Felberbaum R (1998) In-vitro-fertilisation. In: Diedrich K (ed.) *Weibliche Sterilität*. Springer, Heidelberg

Diedrich K, Griesinger G, Behre HM, Felberbaum R, Montag M, van der Ven HH, Strowitzki T, von Sören O (2005) Neue Entwicklungen in der Reproduktionsmedizin. *Deutsches Ärzteblatt* 26:C-461

D.I.R.: Jahrbuch des Deutschen IVF Registers (2004). Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Hrsg.). D.I.R. Bundesgeschäftsstelle Ärztekammer Schleswig-Holstein

Dozortsev D, De Sutter P, Dhont M (1994). Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 9:2139-2144

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M (1995). Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod*. 10:403-407

Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M (1997). Sperm-associated oocyte-activation factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod*. 12:2792-2796

Dozortsev D, Nagy P, Abdelmassih S, Oliveira F, Brasil A, Abdelmassih V, Diamond M, Abdelmassih R (2004) The optimal time for intracytoplasmic sperm injection in the human is from 37 to 41 hours after administration of human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril.* 82:1492-6

Dubey AK, Penzias AS, Reindollar RH, Ducibella T (1998) Technical and physiological aspects associated with the lower fertilization following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human. *Theriogenology.* 49:33-41

Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B (1996). Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod.* 11:139-146

Eichenlaub-Ritter U, Chandley AC, Gosden RG (1986) Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. *Chromosoma.* 94:337-45

Eliasson R, Hellinga F, Lübcke F, Meyhöfer W, Niermann H, Steeno O, Schirren C (1970) Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia.* 2:1257

Eliasson R, Treichl L (1971) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 22:134

Emiliani S, Delbaere A, Vannin AS, Biramane J, Verdoodt M, Englert Y, Devreker F (2003) Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. *Hum Reprod.* 18:2145-50

Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A (2006) Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 8:11-29

Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Prinsloo E, van Rooyen LH (2000a) Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. *Hum Reprod.* 15:657-61

Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Zyl C, Muller II, van Rooyen LH (2000b) Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. *J Assist Reprod Genet.* 17:508-14

Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JGH, Müller II, van Rooyen LH (2002). Defective sperm decondensation: a cause for fertilization failure. *Androl.* 34:1-7

Felberbaum R, Diedrich K (1999). Ovarian stimulation for in-vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection with gonadotrophin-releasing hormone analogues: agonists and antagonists. *Hum Reprod.* 14:Suppl.1:207-221

Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD (1995). Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 10:2623-2629

Flaherty SP, Payne D, Matthews CD (1998). Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13:Suppl.1:155-164

Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A (1992) Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl.* 15:330-7

Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA, Baxendale RW, Gibbons R (2006) Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci.* 11:1636-45

Fukuda A, Roudebush WE, Thatcher SS (1992) Influences of in vitro oocyte aging on microfertilization in the mouse with reference to zona hardening. *J Assist Reprod Genet.* 9:378-83

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB (1998) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril.* 69:84-8

Gook D, Osborn SM, Bourne H, Edgar DH, Speirs AL (1998). Fluorescent study of chromatin and tubulin in apparently unfertilized human oocytes following ICSI. *Mol Hum Reprod.* 4:1130-1135

Gorczyca W, Traganos E, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z (1993) 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.* 207:202-5

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J (2005) Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl.* 26:349-53

Grimes SR Jr (1986) Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol B.* 83:495-500

Gross V, Dubey A, Renzias AS, Layman L, Reindollar R, Ducibella T (1996) Biochemical study of individual zonae from human oocytes that failed to undergo fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod.* 2:959-65

Gwatkin RBL, Conover JC, Collins RL, Quigley MM (1989). Failed fertilization in human in vitro fertilization analyzed with the deoxyribonucleic acid-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Am J Obstet Gynecol.* 160:31-5

Haidl G, Schill WB (1994). Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome. *Arch Androl.* 32:263-6

Hamamah S, Royere D, Nicolle JC, Paquignon M, Lansac J (1990) Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod Nutr Dev.* 30:59-64

Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, Schmidt W (1996). The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilisation, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 11:2468-2471

Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W (1998) Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia*. 30:29-35

Hammadeh ME, Kühnen A, Amer AS, Rosenbaum P, Schmidt W (2001). Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *Int J Androl*. 24:360-368

Heikinheimo O, Gibbons WE (1998) The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod*. 4:745-56

Henkel E, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 7:477-84

Ho JY, Chen MJ, Yi YC, Guu HF, Ho ES (2003). The effect of preincubation period of oocytes on nuclear maturity, fertilization rate, embryo quality, and pregnancy outcome in IVF and ICSI. *J Assist Reprod Genet*. 20:358-64

Hofmann H, Hilscher B (1991) Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod*. 6:979-82

Hofmann H (2003). *Andrologie*. In: Jung G, Moll I (eds). *Dermatologie*. Thieme, Stuttgart:467-470

Homa ST, Swann K (1994) A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod*. 9:2356-61

Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F (1999) DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 78:622-5

Huret JL, Courtot AM (1984a). Effect of migration and capacitation on the nuclear stability of human sperm. *Arch Androl*. 13:147-52

Huret JL, Miquereau MA (1984b) Nuclear chromatin decondensation abilities of human sperm. Arch Androl. 12:19-22

Imbar T, Tsafirir A, Lev-Sagie A, Hurwitz A, Laufer N, Holzer H (2006) Assisted reproduction technologies and the risk of fetal, chromosomal and genetic malformations. Harefuah 145:223-8, 234-4

Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B (2004). Impact of oocyte pre-incubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. Reprod Biomed Online. 8:682-686

Jacobs M, Stolwijk AM, Wetzels AMM (2001). The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. Hum Reprod. 16:1708-1713

Jager S (1990) Sperm nuclear stability and male infertility. Arch Androl. 25:253-9

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil. 70:219-28

Jeyendran RS, Zaneveld LJD (1986). Human sperm Hypoosmotic Swelling Test. Fertil Steril. 46:151-152

Kleinsteijn J (2005) Efficacy and tolerability of vaginal progesterone capsules (Utrogest 200) compared with progesterone gel (Crinone 8%) for luteal phase support during assisted reproduction. Fertil Steril. 83:1641-9

Karydis S, Asimakopoulos B, Papadopoulos N, Vakalopoulos I, Al-Hasani S, Nikolettos N (2005). ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. In Vivo. 19:921-5

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril. 46:1118-1123

Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K (1998) Physiologie der Befruchtung. In: Diedrich K (ed.) Weibliche Sterilität Ursachen, Diagnostik und Therapie. Springer Berlin Heidelberg. pp. 356-379

Kunathikom S, Makemaharn O, Sukksompong S, Laokirkkiat P (2001) Chromosomal analysis of "failed-fertilized" human oocytes resulting from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. J Med Assoc Thai. 84:532-8

Kubiak JZ (1989) Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. Dev Biol. 136:537-45

Kvist U (1980a). Rapid post-ejaculatory inhibitory effect of seminal plasma on sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. Acta Physiol Scand. 109:69-72

Kvist U (1980b). Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. Acta Physiol Scand. 109:79-84

Kvist U, Björndahl L, Kjellberg S (1987). Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. Scanning Microsc. 1:1241-7

Laskey RA, Mills AD, Philpott A, Leno GH, Dilworth SM, Dingwall C (1993) The role of nucleoplasmin in chromatin assembly and disassembly. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 339:263-9

Latt SA, Stetten G (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. J Histochem Cytochem. 24:24-33

Lee J, Richburg JH, Yoounkin SC, Boekelheide K (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology 138:2081-8

Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I (1996). Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. Int J Androl. 19:23-7

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 69:528-532

Ludwig M (2002). Techniken der Reproduktionsmedizin – Aktueller Stand und Zukunft. *Gynäkologe.* 35:1253-1266

Maeda Y, Yanagimachi H, Tateno H, Usui N, Yanagimachi R (1998) Decondensation of the mouse sperm nucleus within the interphase nucleus. *Zygote.* 6:39-45

Makler A (1980) The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril.* 33:337-8

Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 52:864-7

Matsuda Y, Yamada T, Tobar I (1985). Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. *Mutat Res.* 148:113-7

Menezo Y, Chouteau J, Veiga A (2001) In vitro fertilization and blastocyst transfer for carriers of chromosomal translocation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 96:193-5

Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 30:346-52

Mochtar MH, Van Wely M, Van der Feen F (2006) Timing luteal phase support in GnRH agonist down-regulated IVF/embryo transfer cycles. *Hum Reprod.* 21:905-8

Molina J, Castilla JA, Gil T, Hortas ML, Vergara F, Herruzo A (1995). DNA and chromatin structure: Influence of incubation on the chromatin condensation and nuclear stability of human spermatozoa by flow cytometry. *Hum Reprod.* 10:1280-6

Molina J, Castilla JA, Castano JL, Fontes J, Mendoza N, Martinzes L (2001) Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameters. *Hum Reprod.* 16:534-9

Monaco PJ, Rasch EM (1982) Differences in staining with DNA specific fluorochromes during spermiogenesis. *Histochemistry*. 30:585

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 19:129-138

Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E (2003). Spontaneous DNA Fragmentation in Swim-Up selected Human Spermatozoa during long term incubation. *J Androl*. 24:253-262

Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E (2006) Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci*. 11:1491-9

Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC (1998) Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Preprod*. 13:143-54

Nahoum CRD, Cardozo D (1980) Staining for volumetric count of leucocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertil Steril* 34:68-69

Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F (2004a). Effect of protamin-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online*. 9: 652-8.

Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H (2004b). Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 36:95-100

Nasr-Esfahani HM, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, Shahvardi H (2006) Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? *Andrologia*. 38:92-8

Neuber E, Witmyer J, Oskowitz SP, Powers RD (1994). Improvements in assessment of human failed fertilization oocytes using the supravital dye Hoechst 33342. *J Ass Reprod Gen.* 11:428-432

Nosarka S, Kruger T, Siebert I, Grove D (2006) Luteal phase support in in vitro fertilization: meta-analysis of randomized trials. *Gynecol Obstet Invest.* 60:67-74

Ohl DA, Menge AC (1996) Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm function. *Front Biosci.* 1:96-108

Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 12:417-435

Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G (2005) How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol.* 207(2 Suppl):521-31

O'Rand MG, Herman B, Diquiseppi J, Halme J, Hammond MG, Talbert ML (1986) Analysis of deoxyribonucleic acid distribution in noncleaving oocytes from patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46:452-60

Paine PL, Yassin R, Paine TM, Vancuroval I, George C, Sahay N (1995) Intranuclear binding of nucleoplasmin. *J Cell Biochem.* 58:105-14

Palermo G, Joris H, Devroey P (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 340:17-8

Papanicolaou GN (1942) A new procedure for staining vaginal smears. *Science.* 95:438-439

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature.* 379:364-8

Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 101:160-7

Perreault SD, Barbee RR, Slott VL (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 125:181-6

Philpott A, Leno GH, Laskey RA (1991) Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell*. 65:569-78

Piasecka M, Gaczarzewicz D, Laszczynska M (2006) Evaluation of sperm genomic integrity of normozoospermic men: a prospective study. *Folia Histochem Cytobiol*. 44:117-22

Ponjaert-Kristoffersen I, Bonduelle M, Barnes J, Nekkebroeck J, Loft A, Wennerholm UB, Tarlatzis BC, Peters C, Hagberg BS, Berner A, Sutcliffe AG (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, in vitro fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments. *Pediatrics* 115:283-9

Proctor A, Hurst BS, Marshburn PB, Matthews ML (2006) Effect of progesterone supplementation in early pregnancy on the pregnancy outcome after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 85:1550-2

Ramos I, Prado A, Finn RM, Muga A, Ausio J (2005) Nucleoplasmin-mediated unfolding of chromatin involves the displacement of linker-associated chromatin proteins. *Biochemistry* 44:8274-81

Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A (2003). Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia* 35:238-43

Rho GJ, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ (1998) Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod*. 59:918-924

Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greco E (1998). Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 13:1014-9

Rosenbusch BE (2000). Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *J. ass. Reprod. and genetics*. 17:253-259

Rybouchkin A, Dozortsev D, De Sutter P, Qian C, Dhont M (1995) Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 10:1130-5

Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995) 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.* 16:80-7

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 11:837-843

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U (1999a) Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 4:31-7

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC (1999b) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res.* 251:350-5

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 66:1061-7

Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC (2003) Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 7:428-32

Sanocka D, Krupisz M (2004) Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:12

Sathananthan AH, Ratnam SS, Ng SC, Tarin JJ, Gianaroli L, Trounson A (1996) The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod.* 11:345-356

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (eds) (1999). *Anatomie.* Springer, Berlin

- Schmiady H, Schulze W, Scheiber I, Pfüller B (2005) High rate of premature chromosome condensation in human oocytes following microinjection with round-headed sperm: Case report. *Hum Reprod.* 20:1319-1323
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G (2005) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male infertility. *Hum Reprod.* 20:3446-51
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.* 17:1266-73
- Stauber M (2001) Sterilität und Infertilität. In: Stauber M, Weyerstahl T (eds). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Thieme, Stuttgart
- Stepoe PC, Edward RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 2:366
- Stowitzki T (2000) Indikationsbereiche IVF vs. ICSI. *Der Gynäkologe.* 33:777-781
- Sun F, Ko E, Martin RH (2006) Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol.* 4:1
- Sutovsky P, Schatten G (1997) Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod.* 56:1503-12
- Swann K, Parrington J, Jones KT (2001) Potential role of a sperm-derived phospholipase C in triggering the egg-activating Ca^{2+} signal at fertilization. *Reproduction.* 122:839-46
- Tarin JJ, Perez-Albala S, Aguilar A, Minarro J, Hermenegildo C, Cano A (1999) Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod.* 61:1347-55
- Taubert HD (1998) Sterilität und Infertilität. In: Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (eds). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Schattauer, Stuttgart New York:117-132

Terquem A, Dadoune JP (1983) Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: evaluation of nuclear maturation. In: André J (ed) The sperm cell. Martinus Nijhoff Publishers, London. pp. 249-252

Tesarik J, Sousa M, Tesart J (1994a) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 9:511-518

Tesarik J, Sousa M (1994b). Comparison of Ca^{2+} responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 62:1197-1204

Tesarik J, Sousa M (1995) More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. Fertil Steril. 63:343-9

Teschner, von Zumbusch-Weyerstahl (2001) Sexuelle Differenzierung und Störungen. In: Stauber M, Weyerstahl T (eds). Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart

Thiel W, Gunther E, Schreiber G (1983) Fertility prognosis of the male. Zentralbl Gynäkol. 105:1174-80

Urner F, Bianchi PG, Campana A, Sakkas D (1993). Evidence of sperm entry into assumed unfertilized human oocytes after sub-zonal sperm microinjection. Hum Reprod. 8:2167-2173

Usui N, Yanagimachi R (1976) Behavior of sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. The appearance and disappearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in egg cytoplasm. J Ultrastruc Res. 57:276-88

Van de Velde H, De Vos A, Joris H, Nagy ZP, Van Steirteghem AC (1998). Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 13:3160-4

Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr (1983) Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 39:594-602

Ward WS (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48:1193-1201

Wilding M, Singer M, Fehr P, Haeberlin F, Roth F, Lachat R, Di Matteo L, Capobianco C, Dale B (2006). The effect of extended culture of cumulus-oocyte complexes in follicular fluid during in vitro fertilization cycles. *J Ass Reprod Genet.* 23:129-36

World Health Organization (1993): Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion, 3. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York

Wykes SM, Krawetz SA (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 278:29471-7

Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Suzuki K, Hoshi K, Sato A (1998). Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13:2223-6

Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD (2003) Glutathione (GSH) concentrations vary with cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 64:106-12

7 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Mohamad Eid Hammadeh für die Vergabe dieses interessanten Themas und sein Vertrauen in meine Arbeit. Er war in allen Phasen meiner Dissertation ein überaus freundlicher, hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Werner Schmidt, Direktor der Universitätsfrauenklinik des Saarlandes, für die uneingeschränkte Nutzungsmöglichkeit der Laborräume, Gerätschaften und Materialien.

Weiterhin gebührt ein großes Dankeschön den medizinisch-technischen Assistentinnen des IVF-Labors, Frau Seyfried, Frau Maurer, Frau Wiesberger, Frau Kunz und Frau Linxweiler für ihr Engagement und Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie für die netten Gesprächsrunden bei Kaffee und Tee.

Herrn Dr. König vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik möchte ich für seine Beratung zur statistischen Auswertung des Datenmaterials danken.

Ferner danke ich dem Institut für Humangenetik und seinen Mitarbeitern für die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops und der Hilfestellung bei technischen Fragen.

Mein besonderer und herzlichster Dank gilt jedoch meinen Eltern und auch Großeltern, für ihre unermüdliche Unterstützung und Liebe während meiner gesamten Studienzzeit. Ihr habt es mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen und mich immer wieder auf's Neue in meiner Arbeit bestärkt. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Meinem Freund und Lebensgefährten Thomas Frey danke ich von tiefstem Herzen für seine Unterstützung und Geduld bei PC-Problemen und besonders für das unnachgiebige Drängen auf einen zügigen Fortgang dieser Arbeit. Gleichzeitig danke ich dir für das Ertragen meines immerwährenden Schreibtischchaos. Ich gelobe Besserung! Auch dir danke ich für deine Liebe und besonders für dein Verständnis für meine außergewöhnliche Teddybären-Leidenschaft.

Meiner langjährigen und besten Freundin Elke Hoff danke ich für ihre emotionale Unterstützung und innige Verbundenheit. Auch du hast mit deiner fröhlichen, aufmunternden und hilfsbereiten Art sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herzlichen Dank dafür! Du bist die beste Freundin, die man sich wünschen kann!

8 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname	Dostert, Tanja
Adresse	Ohmstraße 68 60486 Frankfurt am Main
Geburtsdatum	22.02.1980
Geburtsort	Gerolstein
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule, Hillesheim
1990 – 1996	Augustiner Realschule, Hillesheim
1996 – 1999	Sankt Matthias Gymnasium, Gerolstein
26.06.1999	Abitur

Studium

1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes/ Medizinische Fakultät Homburg/Saar
08/2001	Ärztliche Vorprüfung

03/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 – 03/2006	Praktisches Jahr mit Wahlfach Neurochirurgie
28.04.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2006 – 10/2006	Fertigstellung der Dissertation

Beruflicher Werdegang

seit 01.11.2006	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Neurochirurgie an den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main-Höchst
-----------------	---