

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Etablierung eines Protokolls zur Kryokonsevirung von
humanen Ejakulatproben mittels des IceCube-11XS-
Systems für den routinemäßigen Gebrauch im Rahmen
der Fertilitätssicherung bei onkologischen Patienten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Haase, Pauline Lucia Christa**

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Rausch

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Henes

Tag der Disputation: 18.05.2026

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Grundlagen zur Kryokonservierung.....	9
1.1.1 Kryokonservierung humaner Spermienzellen	9
1.1.2 Anwendungen der Kryokonservierung humaner Spermienzellen	11
1.1.2.1 Fertilitätssicherung bei onkologischen Patienten	11
1.1.2.2 Fertilitätssicherung bei nicht-onkologischen Patienten	13
1.1.2.3 Kinderwunschdiagnostik und -therapie	14
1.1.2.4 Weitere Anwendungsbereiche	14
1.2 Technik der Kryokonservierung.....	15
1.2.1 Kryoptotektiva.....	15
1.2.2 Einfriermethode	16
1.2.3 Abkühlungsgeschwindigkeit	17
1.2.4 Auftauprozess	18
1.3 Vorgaben zur Kryokonservierung.....	18
1.3.1 Vorgaben aus WHO-Laborhandbuch	19
1.4 Fragestellung	20
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Studienaufbau	20
2.2 Patientenkollektiv.....	22
2.3 Spermigrammdiagnostik.....	22
2.4 Aufbereitung	24
2.4.1 Allgemeiner Ablauf der Aufbereitung.....	24
2.4.2 Verschlussmethoden der Straws.....	25
2.4.2.1 Konventionelle Verschlussmethode mittels Verschlusskugeln	25
2.4.2.2 Wärmeversiegelung mittels CryoSealer	26
2.4.2.3 Dichtigkeitsprüfung des CryoSealers	27

2.4.2.4	Vergleichende Testung der Verschlussmethoden	27
2.5	Durchführung der Kryokonservierung.....	28
2.5.1	Einfrierprozess mit Einfriergerät Nicool LM 10	28
2.5.2	Einfrierprozess mit Einfriergerät IceCube 11XS.....	29
2.5.2.1	Entwicklung eines neuen Einfrierprotokolls.....	32
2.5.2.2	Validierung des neuen Einfrierprotokolls.....	49
2.6	Qualitätskontrolle der Kryokonservierung.....	49
2.6.1	Auftauprozess	49
2.6.2	Diagnostik der Auftaukontrollen	50
2.6.2.1	Bestimmung der Motilität.....	50
2.6.2.2	Bestimmung der Vitalität (Eosintest)	50
2.6.3	Abschluss des Kryokonservierungsprozesses	50
2.7	Datenerfassung und Datenauswertung	51
3	Ergebnisse	51
3.1	Spermiendiagnostik im Nativejakulat.....	51
3.2	Vergleich der Verschlussmethoden.....	52
3.3	Spermienmotilität nach Kryokonservierung mit Nicool-Einfriergerät ..	55
3.4	Spermienmotilität nach Kryokonservierung mit IceCube-Einfriergerät55	
3.5	Vergleich der Kryokonservierungsergebnisse zwischen Nicool- und IceCube-Einfriergerät.....	56
4	Diskussion	61
4.1	Verschlussmethode	62
4.1.1	Einordnung in die Studienlage	62
4.1.2	Interpretation der Ergebnisse	64
4.1.3	Klinische Relevanz der Wärmeversiegelung.....	64
4.2	Kryokonservierungsprotokoll für IceCube 11XS.....	65
4.2.1	Einordnung in die Studienlage	65
4.2.2	Interpretation der Ergebnisse	66
4.2.3	Klinische Relevanz	67
4.3	Limitationen	68
4.4	Schlussfolgerung und klinische Implikationen	69

5	Zusammenfassung.....	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang.....	76
7.1	Formblatt Spermigrammdiagnostik.....	76
7.2	Arbeitsanweisung und Protokoll zur Kryokonservierung	77
7.3	Dokumentationsblatt Kryokonservierung Humansperma	78
8	Erklärung zum Eigenanteil	79
9	Veröffentlichungen	80
10	Danksagung	81
11	Lebenslauf.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plastikstraws (oben) und Lagerkassette (unten).....	25
Abbildung 2: CryoSealer	26
Abbildung 3: Wasserbehälter mit Methylenblau gefärbten Straws	27
Abbildung 4: IceCube 11XS.....	30
Abbildung 5: IceCube 11XS: Gefrierkammer und Temperatursensor für die Probentemperatur	31
Abbildung 6: IceCube 11XS: Probenhalter für bis zu 10 Straws.....	31
Abbildung 7: Einfrierprogramm 01 für IceCube 11XS.....	33
Abbildung 8: Gefrierkurve 01 zu Einfrierprogramm 01.....	33
Abbildung 9: Einfrierprogramm 02 für IceCube 11XS.....	34
Abbildung 10: Einfrierkurve 02 zu Einfrierprogramm 02	34
Abbildung 11: Einfrierprogramm 04 für IceCube 11XS.....	35
Abbildung 12: Gefrierkurve 04 zu Gefrierprogramm 04	35
Abbildung 13: Einfrierprogramm 09 für IceCube 11XS.....	36
Abbildung 14: Einfrierkurve 09 zu Einfrierprogramm 09	36
Abbildung 15: Einfrierprogramm 10 für IceCube 11XS.....	37
Abbildung 16: Einfrierkurve 10 zu Einfrierprogramm 10	37
Abbildung 17: Einfrierprogramm 11 für IceCube 11XS.....	38
Abbildung 18: Einfrierkurve 11 zu Einfrierprogramm 11	38
Abbildung 19: Einfrierprogramm 13 für IceCube 11XS.....	39
Abbildung 20: Einfrierkurve 13 zu Einfrierprogramm 13	40
Abbildung 21: Einfrierprogramm 14 für IceCube 11XS.....	40
Abbildung 22: Einfrierkurve 14 zu Einfrierprogramm 14	41
Abbildung 23: Einfrierprogramm 17 für IceCube 11 XS.....	41
Abbildung 24: Einfrierkurve 17 zu Einfrierprogramm 17	42
Abbildung 25: Einfrierprogramm 20 für IceCube 11XS.....	43
Abbildung 26: Einfrierkurve 20 zu Einfrierprogramm 20	43
Abbildung 27: Einfrierprogramm 21 für IceCube 11 XS.....	44
Abbildung 28: Einfrierkurve 21 zu Einfrierprogramm 21	44
Abbildung 29: Einfrierprogramm 22 für IceCube 11XS.....	45
Abbildung 30: Einfrierkurve 22 zu Einfrierprogramm 22	45

Abbildung 31: Einfrierprogramm 24 für IceCube 11 XS.....	46
Abbildung 32: Einfrierkurve 24 zu Einfrierprogramm 24	46
Abbildung 33: Einfrierprogramm 25 für IceCube 11XS.....	47
Abbildung 34: Einfrierkurve 25 zu Einfrierprogramm 25	47
Abbildung 35: Einfrierprogramm 27 für IceCube 11 XS.....	48
Abbildung 36: Einfrierkurve 27 für Einfrierprogramm 27	48
Abbildung 37: Darstellung der Vitalität und Überlebensrate aller beweglichen sowie progressiv beweglichen Spermien nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit der verwendeten Verschlussmethode	54
Abbildung 38: Darstellung der Gesamtmotilität vor dem Einfrieren (nativ) sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicoool, IceCube).....	57
Abbildung 39: Darstellung der Progressivmotilität vor dem Einfrieren (nativ) sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicoool, IceCube).....	58
Abbildung 40: Darstellung der Überlebensrate der Gesamtmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicoool, IceCube)	58
Abbildung 41: Darstellung der Überlebensrate der Progressivmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicoool, IceCube)	59
Abbildung 42: Darstellung der Gesamt- und Progressivmotilität im Nativejakulat sowie nach Einfrier- und Auftauprozess mit je Nicoool- und IceCube- Einfriergerät, Werte der einzelnen Probanden.....	60
Abbildung 43: Darstellung der Überlebensraten hinsichtlich der Gesamt- und Progressivmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess mit je Nicoool- und IceCube-Einfriergerät, Werte der einzelnen Probanden	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der untersuchten Parameter im Nativejakulat, angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand).....	52
Tabelle 2: Parameter der Spermienanalyse nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels Nicool-Einfriergerät in Abhängigkeit der verwendeten Verschlussmethode; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen	53
Tabelle 3: Parameter der Spermienanalyse im Nativejakulat sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels Nicool-Einfriergerät; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen.....	55
Tabelle 4: Parameter der Spermienanalyse im Nativejakulat sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels IceCube-Einfriergerät; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen.....	56
Tabelle 5: Parameter der Spermienanalyse nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube); angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen.....	56

Abkürzungsverzeichnis

ART	Assistierte reproduktionsmedizinische Behandlung
°C	Grad Celsius
CPA	Cryoprotective Agents, Kryoprotektiva
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IM	Immotilität
IQR	Interquartilsabstand
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-Vitro-Fertilisation
M	Mittelwert
MESA	Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration
mTESE	Mikrochirurgische testikuläre Spermienextraktion
NP	Nichtprogressive Motilität
PR	Progressivmotilität
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
SD	Standardabweichung
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Grundlagen zur Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ist ein Verfahren zur Konservierung biologischer Zellen oder Gewebe durch Einfrieren bei extrem niedrigen Temperaturen, typischerweise bei -196 °C in flüssigem Stickstoff (Di Santo et al., 2012, Hungerford et al., 2023). Ziel der Kryokonservierung ist die Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der Zellen über einen unbegrenzten Zeitraum, indem die Stoffwechselaktivität nahezu vollständig zum Stillstand gebracht wird und biochemische Abbauprozesse sowie Alterungsvorgänge verhindert werden (Tamburrino et al., 2023).

1.1.1 Kryokonservierung humaner Spermienzellen

Die Kryokonservierung wird in zahlreichen Bereichen der Biologie, Veterinärmedizin und Humanmedizin eingesetzt, beispielsweise zur Langzeitlagerung von Geweben, Stammzellen, Oozyten oder Embryonen. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch auf der Anwendung der Kryokonservierung von humanen Spermienzellen.

Historische Entwicklung der Kryokonservierung von Spermienzellen

Die Entwicklung der Kryokonservierung von Spermienzellen ist eng mit den Fortschritten der Kryobiologie in der Mitte des 20. Jahrhunderts verknüpft. Einen entscheidenden Meilenstein stellte 1949 die Entdeckung von Polge, Smith und Parkes dar, dass Glycerol als Kryoprotektivum die Überlebensfähigkeit von Spermien nach dem Einfrieren erheblich verbessert (Polge et al., 1949, Sztein et al., 2018). In den folgenden Jahrzehnten wurde die Methode zunächst in der Tierzucht etabliert und führte dort zur erfolgreichen Lagerung und Nutzung von Tierkeimzellen (Benson et al., 2012). Mit der Einführung von flüssigem Stickstoff als Kältemedium in den 1960er- und 1970er-Jahren konnte die Temperaturführung während Einfrierprozesses sowie der Lagerung verbessert werden. Im Verlauf wurde die Kryokonservierung schließlich auch in der Humanmedizin eingesetzt. Der erste erfolgreiche Einsatz kryokonservierter Spermien zur Erzielung einer Schwangerschaft wurde 1953 von Bunge und Sherman dokumentiert (Bunge and Sherman (1953)). In den

folgenden Jahrzehnten wurden die Methoden der Kryokonservierung durch die verbesserte Zusammensetzung von Kryoprotektiva, die präzise Steuerung der Abkühl- und Auftauraten sowie die Einführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen kontinuierlich weiterentwickelt (Hungerford et al., 2023). Heute ist die Kryokonservierung fester Bestandteil zahlreicher biomedizinischer Disziplinen und gilt in der Reproduktionsmedizin als unverzichtbares Standardverfahren (AWMF, 2019).

Physikalisch-biologische Grundlagen der Kryokonservierung

Das Grundprinzip der Kryokonservierung von Spermienzellen beruht auf der Induktion eines Stoffwechselstillstands durch Absenkung der Temperatur auf -196 °C , wodurch alle enzymatischen und metabolischen Prozesse gestoppt werden (Paoli et al., 2019). Ziel ist hierbei die reversible Stabilisierung der Zellorganellen und -membranen, sodass diese nach der Lagerung und dem Auftauen wieder lebensfähig und funktionstüchtig sind. Die Stabilisierung erfolgt durch die gezielte Kontrolle der Wasserbewegung und die Vermeidung schädlicher Eisbildung. Während des Abkühlens einer wässrigen Zellumgebung beginnt das Wasser zunächst extrazellulär zu gefrieren. Durch die extrazelluläre Eiskristallbildung erhöht sich die Konzentration der gelösten Stoffe in der verbleibenden Flüssigkeit, was zu einem osmotisch bedingten Wasserentzug aus der Zelle führt (Sieme et al., 2015). Durch diese Dehydratation kann die Bildung von intrazellulären Eiskristallen vermieden werden (Pegg, 2015).

Diese Prozesse werden durch den Einsatz von Kryoprotektiva wie Glycerol, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethylenglykol unterstützt, indem sie die Bildung von Eiskristallen hemmen, die Lösungsviskosität erhöhen, die Osmolarität regulieren und die Wasserverfügbarkeit für die Kristallisation reduzieren, wodurch zellschädigenden Prozesse reduziert werden können (Hungerford et al., 2023, Sieme et al., 2016).

Die Lagerung der eingefrorenen Lösungen erfolgt bei Temperaturen unter -130 °C , zumeist in flüssigem oder gasförmigem Stickstoff bei -196 °C . In diesem Temperaturbereich kommen sämtliche biochemischen Reaktionen zum Erliegen, da enzymatische und metabolische Prozesse bei diesen

Temperaturen nicht mehr ablaufen können. Dadurch werden Zellmembranen, Organellen und die DNA über lange Zeiträume stabil gehalten, ohne dass relevante strukturelle oder funktionelle Veränderungen auftreten (Sieme et al., 2015).

1.1.2 Anwendungen der Kryokonservierung humaner Spermienzellen

Die Kryokonservierung findet in der Humanmedizin breite Anwendung. Ein Schwerpunkt liegt auf der Nutzung zum Fertilitätserhalt bei onkologischen Patienten, deren Keimzellen durch die Erkrankung selbst oder durch therapeutische Maßnahmen geschädigt werden können. In der Reproduktionsmedizin stellt sie ein zentrales Verfahren sowohl zur Fertilitätssicherung als auch im Rahmen assistierter Reproduktionstechnologien dar.

1.1.2.1 Fertilitätssicherung bei onkologischen Patienten

Bei männlichen onkologischen Patienten kann die Fertilität sowohl durch die onkologische Grunderkrankung selbst als auch durch die therapeutischen Maßnahmen beeinträchtigt werden.

Auswirkungen onkologischer Erkrankungen auf die Keimzellfunktion

Onkologische Erkrankungen können bereits vor Diagnosestellung und Therapiebeginn die männliche Fertilität beeinträchtigen. Sowohl systemische als auch lokal begrenzte Tumorerkrankungen können zu einer funktionellen Störung der Keimzellreifung und zu Veränderungen der Spermatogenese führen. Dies ist auf komplexe pathophysiologische Mechanismen zurückzuführen, zu denen entzündliche Prozesse, endokrine Dysregulationen der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse sowie lokale testikuläre Veränderungen zählen (Knopman et al., 2010).

Diese krankheitsbedingten Veränderungen können die Ausgangssituation für eine Fertilitätssicherung zusätzlich erschweren, da die Qualität und Quantität der Spermien bereits vor Beginn einer onkologischen Therapie eingeschränkt sein kann. Daher ist eine frühzeitige Abklärung und Einleitung von Maßnahmen zur Fertilitätssicherung entscheidend, um die Chancen auf eine spätere biologische Vaterschaft zu erhalten (Su et al., 2025).

Keimzellschädigende Effekte onkologischer Therapien

Zytotoxische Chemotherapeutika, insbesondere Alkylantien, sind nicht tumorspezifisch und schädigen alle schnell proliferierenden Zelltypen, einschließlich der Keimzellen im Hoden. Die Spermatogenese ist daher besonders empfindlich gegenüber diesen Substanzen. Die keimzellschädigenden Effekte führen zu einer Oligospermie oder Azoospermie, welche je nach chemotherapeutischer Substanz und verabreichter kumulativer Dosis transient bis dauerhaft sein können (Meistrich, 2013, Tournaye et al., 2014).

Radiotherapie, die bei verschiedenen malignen Erkrankungen zum Einsatz kommt, wirkt bereits in niedrigen Dosen toxisch auf die Spermatogenese. Abhängig von der kumulativen Dosis der Strahlenbelastung besteht das Risiko für eine irreversible Azoospermie (Fukunaga et al., 2022). Insbesondere hochdosierte Beckenbestrahlungen, wie sie bei der Behandlung von Prostata-, Rektum- oder Hodentumoren eingesetzt werden, können die testikuläre Funktion dauerhaft und irreversibel schädigen und zusätzlich zu einer erektilen Dysfunktion beitragen (Tournaye et al., 2014).

Auch therapeutische operative Eingriffe im Bereich des Beckens im Rahmen einer Malignombehandlung bergen ein Risiko für die Ejakulationsfähigkeit (Kliesch et al., 2023).

Die Kryokonservierung von Ejakulat- oder testikulären Spermienzellen vor Beginn der Therapie ist daher eine etablierte Maßnahme zur prätherapeutischen Fertilitätssicherung, da dadurch betroffenen Patienten die Nutzung des kryokonservierten Materials zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen assistierter Reproduktionsverfahren ermöglicht wird (Su et al., 2025). Hierbei ist hervorzuheben, dass seit dem 01. Juli 2021 die Kosten der Kryokonservierung und der damit einhergehenden medizinischen Maßnahmen durch die Krankenkassen übernommen werden, sofern diese aufgrund einer Erkrankung oder keimzellschädigenden Therapie notwendig sind (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2022).

1.1.2.2 Fertilitätssicherung bei nicht-onkologischen Patienten

Auch bei nicht-malignen Erkrankungen kann die männliche Fertilität teilweise oder gänzlich eingeschränkt sein. Die Ursachen für männliche Infertilität sind vielfältig und lassen sich in kongenitale, erworbene und idiopathische Faktoren unterteilen (Agarwal et al., 2021).

Kongenitale Ursachen umfassen genetische, anatomische und endokrinologische Fehlentwicklungen, die die Spermatogenese oder den Transport der Spermien beeinträchtigen. Zu den häufigsten genetischen Ursachen zählen die kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD), das Klinefelter-Syndrom (47, XXY), das Kallmann-Syndrom und andere chromosomale Aberrationen, welche die testikuläre Funktion und Spermatogenese beeinträchtigen (Agarwal et al., 2021).

Erworbene Ursachen sind deutlich häufiger und schließen eine Vielzahl urologischer, endokriner und systemischer Erkrankungen ein:

Das Vorliegen einer Varikozele ist hierbei die häufigste behandelbare Ursache (Anawalt, 2013). Infektionen des Urogenitaltrakts wie Urethritis, Epididymitis, Orchitis oder Prostatitis können über inflammatorische Prozesse zu narbigen Obstruktionen oder oxidativem Stress (aufgrund eines Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies) führen (Sharma et al., 2021). Auch systemische Erkrankungen, beispielsweise Autoimmun- oder Stoffwechselerkrankungen, können die Keimzellfunktion durch chronische Entzündungsprozesse oder endokrine Fehlregulation beeinträchtigen (Anawalt, 2013).

Darüber hinaus können traumatisch bedingte Verletzungen wie Rückenmarksverletzungen, Becken- oder Schädel-Hirn-Traumata oder andere neurologische Läsionen (z.B. Erkrankungen des peripheren Nervensystems) zu einer Beeinträchtigung der Fertilität führen, indem sie zum einen durch direkte physiologische Schäden und zum anderen durch sekundäre Effekte wie Erektions- und Ejakulationsstörungen die Spermienqualität, den hormonellen Regelkreis und die Sexualfunktion einschränken (Cohen et al., 2025).

Lebensstilfaktoren wie Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, Übergewicht, chronischer Stress und Bewegungsmangel sind häufig unterschätzte

Risikofaktoren, da sie über oxidativen Stress und hormonelle Dysregulation die Funktion der Spermien negativ beeinflussen (Sharma et al., 2021, Tesarik, 2025).

Eine frühzeitige Fertilitätsdiagnostik (Spermiendiagnostik, Hormonstatus, genetische Tests) und die präventive Kryokonservierung von Spermien stellen somit eine Möglichkeit zur Sicherung der Fertilität vor fortschreitender Erkrankung dar.

1.1.2.3 Kinderwunschdiagnostik und -therapie

Die Kryokonservierung von Spermien ist von großer Wichtigkeit im Bereich der Kinderwunschdiagnostik und -therapie. Da etwa 50 % der Fälle ungewollter Kinderlosigkeit auf männliche Faktoren zurückzuführen sind (Agarwal et al., 2021), stellt die Möglichkeit der langfristigen Lagerung einen wesentlichen Bestandteil der Fertilitätsmedizin dar. Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache der männlichen Infertilität ermöglicht die Kryokonservierung die flexible und wiederholte Nutzung von Spermienproben für assistierte Reproduktionsverfahren wie intrauterine Insemination (IUI), In-vitro-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (Kliesch et al., 2023). Darüber hinaus dient sie der diagnostischen Sicherung bei der Gewinnung testikulärer oder epididymaler Spermienproben, beispielsweise nach testikulärer Spermienextraktion (TESE, mTESE) oder epididymaler Spermienaspiration (MESA). Die durch Kryokonservierung ermöglichte Lagerung dieser Proben erlaubt eine wiederholte Verwendung des Materials (z.B. für spätere ART-Zyklen) ohne erneute invasive Eingriffe und trägt somit zur Optimierung der Therapieabläufe bei (WHO, 2021, AWMF, 2019). Als Mindestanforderung gilt hierbei das Vorhandensein einer geringen Zahl vitaler Spermien, unabhängig von deren Herkunft aus Hoden, Nebenhoden oder Ejakulat (Kliesch et al., 2023).

1.1.2.4 Weitere Anwendungsbereiche

Neben den beschriebenen Standardindikationen bestehen weitere Anwendungsbereiche der Kryokonservierung humaner Spermienzellen. So besteht für Männer nahezu zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit, aus präventiven

Gründen eine Fertilitätsreserve anzulegen, beispielsweise vor der Durchführung einer Vasektomie. Abhängig von den rechtlichen Rahmenbedingungen einzelner Länder kann zudem eine präventive Fertilitätssicherung auch im Hinblick auf eine mögliche posthume Verwendung erfolgen, etwa bei Männern, die einer gefährdungsintensiven beruflichen Tätigkeit (z.B. dem Militärdienst) nachgehen (Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2018). Das Anlegen einer Fertilitätsreserve gewinnt auch unter dem Begriff des „Social Freezing“ an Bedeutung. Dies beschreibt das nicht-medizinisch indizierte Einfrieren und Lagern von Spermienzellen, wenn die betroffenen Männer ihre Familienplanung aus sozialen, beruflichen oder anderen privaten Gründen aufschieben möchten und auf diesem Weg den altersabhängigen Anstieg genetischer Risiken verhindern wollen (Pennings et al., 2021). Weitere Anwendungsfelder betreffen die Fertilitätssicherung bei Transfrauen vor geschlechtsangleichender Hormontherapie oder operativen Eingriffen (Gromoll et al., 2016, Yan et al., 2021) sowie die Kryokonservierung von Spendersamen im Rahmen heterologer Reproduktionsbehandlungen (Flasbarth, 2023).

1.2 Technik der Kryokonservierung

Die erfolgreiche Durchführung der Kryokonservierung erfordert ein genaues Verständnis der physikalischen und biologischen Prozesse, die während des Einfrierens und Auftauens ablaufen. Ziel ist es, die strukturelle und funktionelle Integrität der Spermien trotz extremer Temperaturbedingungen zu bewahren. Dabei spielen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle, welche im Folgenden erläutert werden.

1.2.1 Kryoptotektiva

Eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Ablauf der Kryokonservierung ist der Einsatz geeigneter Kryoprotektiva (Cryoprotective Agents, CPAs). Dabei handelt es sich um chemische Verbindungen, die während des Einfrier- und Auftauprozesses die Zellen vor strukturellen und funktionellen Schäden, die durch Kälteeinwirkung, Eisbildung und osmotische Belastungen entstehen können (Sieme et al., 2016). Sie lassen sich einteilen in

permeable Substanzen wie Glycerol, Ethylenglykol oder Dimethylsulfoxid sowie in nicht permeable Substanzen wie Zuckern (z.B. Trehalose) (Sieme et al., 2016). Kryoprotektiva wirken den zellschädigen kryogenen Effekten entgegen, indem sie den Gefrierpunkt der Lösung herabsetzen, die Konzentration von Salzen und gelösten Stoffen in der flüssigen Phase der Probe verringern und die Eisbildung innerhalb der Spermatozoen reduzieren (Di Santo et al., 2012). Es gilt jedoch zu beachten, dass Kryoprotektive in hohen Konzentrationen selbst toxische Effekte auf die Zellen haben können (Sieme et al., 2016). Die Wahl des geeigneten Kryoprotektivums hängt von verschiedenen Parametern ab, darunter Zelltyp, Membranpermeabilität, Kühlrate, Einfrieremethode sowie geplantes Auftauverfahren (Whaley et al., 2021).

1.2.2 Einfrieremethode

In der Kryokonservierung humaner Spermienzellen kommen unterschiedliche Einfrierverfahren zur Anwendung, die sich insbesondere in der Abkühlrate unterscheiden. Ziel aller Methoden ist es, Zell- und Membranschädigungen während des Gefrierprozesses zu minimieren und eine möglichst hohe Überlebensrate nach dem Auftauen zu gewährleisten. Grundsätzlich werden zwei konventionelle Verfahren unterschieden: das langsame Einfrieren (slow freezing) und das schnelle Einfrieren (rapid freezing), daneben existiert mit der Vitrifikation ein alternatives Verfahren (Ozmic et al., 2023, Di Santo et al., 2012).

Das schnelle Einfrieren stellt eine vereinfachte und zeitlich verkürzte Variante dar. Hierbei werden die Proben nach einer kurzen Vorabkühlung unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt. Das Verfahren reduziert die Gesamtdauer erheblich, setzt jedoch eine exakte Abstimmung der Kryoprotektiva voraus, um unkontrollierte Eisbildung zu vermeiden. (Liu et al., 2022, Li et al., 2019).

Beim langsamen Einfrieren erfolgt die Abkühlung der Proben schrittweise über einen Zeitraum in bis zu vier Stunden, in mehreren definierten Temperaturstufen. Diese kontrollierte Abkühlung ermöglicht eine sukzessive Dehydratation der Spermien und verringert damit das Risiko intrazellulärer Eisbildung sowie osmotischer Belastung (Huang et al., 2022). Die Durchführung

kann manuell, halbautomatisiert oder vollautomatisiert erfolgen.

Halbautomatisierte Einfriergeräte, wie der Nicool LM 10 (Air Liquide/Minitüb), arbeiten mit einer gasbasierten Stickstoffkühlung. Die Abkühlung wird durch das Gerät ausgeführt, die Steuerung erfolgt manuell. Bei den vollautomatisierte Verfahren des langsamen Einfrierens werden computergesteuerte Geräte (z.B. IceCube (SY-LAB)) genutzt, die präzise, programmierbare Temperaturprofile und digitale Dokumentation bieten. Die gesamte Abkühlung, inklusive aller Temperaturplateaus und Übergänge, wird automatisch gesteuert.

Die Vitrifikation stellt eine moderne Methode der Kryokonservierung dar, bei der durch extrem schnelle Abkühlung die einzufrierende Lösung in einen glasartigen Zustand überführt wird, ohne dass es zur intrazellulären Eiskristallbildung kommt, wodurch die kryogenen Zellschäden verringert werden (Zhou et al., 2021). Obwohl die Vitrifikation bislang vor allem bei der Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen etabliert ist, zeigen neuere Studien, dass sie auch für Spermienproben eine vielversprechende Alternative darstellen kann (Aizpurua et al., 2017).

1.2.3 Abkühlungsgeschwindigkeit

Die Abkühlungsgeschwindigkeit stellt einen der entscheidenden Faktoren im Kryokonservierungsprozess dar, da sie maßgeblich das Ausmaß der Zellschädigung und die Überlebensrate der Spermatozoen nach dem Auftauen bestimmt. Die Hauptursache kryogener Zellschäden ist die Bildung von intra- oder extrazellulären Eiskristallen während des Gefrierprozesses (Di Santo et al., 2012).

Eine zu langsame Abkühlung bewirkt einen übermäßigen Wasserentzug aus dem Zellinneren. Es kommt zur extrazellulären Bildung von Eiskristallen, während sich intrazellulär die Konzentration gelöster Stoffe stark erhöht. Dies führt zu einem osmotischen Ungleichgewicht und dadurch zu möglichen Beeinträchtigungen der zytoplasmatischen Komponenten (Ozmic et al., 2023).

Bei zu schneller Abkühlung bleibt den Spermienzellen nicht genügend Zeit, Wasser über die Zellmembran nach außen abzugeben. In der Folge kommt es

zur intrazellulären Eisbildung, wodurch die Funktion intrazellulärer Organellen beeinträchtigt werden kann (Mazur, 1963).

Eine zu schnelle oder zu langsame Temperaturabsenkung führt in beiden Fällen zu kryogenen Schäden. Die optimale Abkühlungsgeschwindigkeit liegt somit in einem Bereich, der ein Gleichgewicht zwischen kontrollierter Wasserabgabe und Minimierung von Eisbildung ermöglicht (Hai et al., 2024).

1.2.4 Auftauprozess

Der Auftauprozess stellt die abschließende Phase der Kryokonservierung dar. Wie auch während des Einfrierens ist hierbei die Entstehung kryogener Schädigungen der Spermienzellen möglich. Während die Probe die Temperaturbereiche von -196 °C bis ca. 20 °C (Raumtemperatur) durchläuft, kann es zur Rekristallisation kommen. Dies führt zu Bildung und Wachstum von Eiskristallen während des Temperaturanstiegs, was mechanische Schäden an der Plasmamembran und den Organellen verursacht. Dies beeinträchtigt die Membranintegrität und erhöht die Permeabilität, was zu einer verminderten Vitalität und Motilität der Spermien führt (Sieme et al., 2015, Ozkavukcu et al., 2008). Darüber hinaus können weitere schädigende Prozesse ablaufen, darunter thermischer Stress, osmotischer Stress sowie oxidativer Stress. Diese Faktoren können zu strukturellen Veränderungen an der Plasmamembran, dem Akrosom und der DNA führen, was die Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Spermien erheblich beeinträchtigen kann (Martínez-Soto et al., 2011). Eine sorgfältige Abstimmung von Auftaugeschwindigkeit und -temperatur auf die Einfrieremethode und Kryoprotektiva wird empfohlen (Calamera et al., 2010).

1.3 Vorgaben zur Kryokonservierung

Hinsichtlich der Kryokonservierung von Spermien gelten in Deutschland die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes (Genehmigung § 20b AMG) sowie die Vorgaben der „Richtlinie zur Entnahme und Übertragung von menschlichen Keimzellen und Keimzellgewebe im Rahmen der assistierten Reproduktion“ der Bundesärztekammer (Bundesärztekammer, 2022). Diese Bestimmungen erläutern die rechtlichen, organisatorischen und qualitätssichernden Vorgaben hinsichtlich der Kryokonservierung, enthalten

hierbei jedoch keine Vorgaben hinsichtlich der technischen und methodischen Durchführung. Auch in der S2k-Leitlinie zum Fertilitätserhalt bei onkologischen Erkrankungen (AWMF, 2025) werden keine spezifischen Angaben zum Prozess der Kryokonservierung gemacht. Somit ist das „WHO- zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulats“ (aktuelle deutsche Fassung in der 5. Auflage von 2010 (WHO, 2010), aktuelle englische Fassung in der 6. Auflage von 2021 (WHO, 2021)) von zentraler Bedeutung für die praktische Durchführung der Kryokonservierung. Die in diesem Handbuch beschriebenen Angaben stellen die Richtwerte für die Verwendung von Kryoprotektiva, die Einfriermethode, die Abkühlgeschwindigkeit und die Auftaumethode dar. In der praktischen Anwendung bestehen jedoch zahlreiche Variablen, etwa hinsichtlich der Wahl des Kryoprotektivums, der exakten Kühlraten oder der Auftaumethode, wodurch sich zwischen Laboren methodische Unterschiede ergeben können.

1.3.1 Vorgaben aus WHO-Laborhandbuch

Es folgt eine Erläuterung der Vorgaben des WHO-Laborhandbuchs zur praktischen Durchführung der Kryokonservierung humaner Spermienzellen. Bezogen wurde sich während der Durchführung der vorliegenden Arbeit auf die zu diesem Zeitpunkt aktuellste Fassung in deutscher Sprache (5. Auflage, (WHO, 2010):

- Gemäß des WHO-Laborhandbuchs wird die Verwendung eines GEYC-Kryoprotektivums (definierte Mischung aus Glycerol, Eigelb und Citrat) oder eines dem GEYC ähnlichen Kryoprotektivum empfohlen.
- Nach dem Befüllen der Straws sollen diese mittels Wärmeversiegelung verschweißt werden.
- Es wird die Verwendung eines programmierbaren Einfriergeräts empfohlen.
- Hinsichtlich der Abkühlgeschwindigkeit wird zunächst eine Kühlung um 1,5 °C pro Minute von 20 °C bis -6 °C, danach um 6°C pro Minute bis Erreichen von -100 °C angegeben. Anschließend sollen die Straws in den Kryokassetten in flüssigen Stickstoff transferiert werden.

- Für den Auftauprozess wird die Lagerung der Kryostraws für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur empfohlen.

1.4 Fragestellung

Aufgrund der nur richtungsweisenden Vorgaben hinsichtlich der Durchführung der Kryokonservierung bestehen in der Praxis mehrere Variablen bei dem Prozess der Kryokonservierung, welche sich auf Spermienqualität nach dem Auftauen auswirken können. Eine Optimierung des Einfrierprozesses ist daher entscheidend, um auf standardisierte Weise stabile und gute Erfolgsraten hinsichtlich der Vitalität und Motilität der Spermien nach dem Auftauen gewährleisten zu können.

Vor dem Hintergrund dieser beschriebenen Aspekte wies die vorliegende Arbeit folgende Zielstellungen auf:

- Optimierung der Aufbereitung durch Entwicklung eines standardisierten Vorgehens zum Verschließen der Straws mittels Wärmeversiegelung
- Validierung der Verschlussmethode durch Wärmeversiegelung im Vergleich zur herkömmlichen Methode mit Kugelverschlüssen
- Entwicklung eines standardisierten und reproduzierbaren Kryokonservierungsprotokolls unter Verwendung des computergestützten vollautomatisierten Einfriergerät IceCube X-11-Systems
- Evaluierung und Validierung des neu entwickelten Protokolls durch den Vergleich mit der herkömmlichen Methode des Nicool-Systems (halbautomatisiertes Einfriergerät) hinsichtlich des möglichen Einsatzes in der klinischen Routine

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Studie wurde nach Erlassen eines positiven Ethikvotums (Ethikantrag Nr. 609/2018B02) durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt. Die Durchführung des

experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit erfolgte im Zeitraum zwischen Juli 2021 und Dezember 2021.

30 Probanden wurden gebeten, ihr Ejakulat für die Spermioqrammdiagnostik und Kryokonservierung abzugeben. Die Abgabe des Ejakulats erfolgte nach einer sexuellen Karenzzeit von mindestens drei Tagen durch Masturbation. Dank eines speziellen Abgaberaums in der Klinik für Urologie Tübingen war dies direkt vor Ort möglich. Nach Abgabe des Ejakulats erfolgte nach einer Liquifizierungszeit von 30 Minuten die Spermioqrammdiagnostik nach den Vorgaben der World Health Organization (WHO, 2010).

Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen die Aufbereitung des Ejakulats durchgeführt. Nach Versetzung des Ejakulats mit einem Kryoprotektivum (Konservierungsmedium) wurden die Proben in spezielle Plastikstraws abgefüllt. Die befüllten Straws wurden luftdicht verschlossen. An dieser Stelle erfolgte nun der erste Teil der Fragestellung dieser Arbeit: Herkömmlicherweise wurden die Straws mittels speziellen Verschlusskugeln aus Metall verschlossen. Wir untersuchten, ob die neue, von der WHO empfohlene Methode der Wärmeversiegelung mittels eines Ultraschall-Handverschweißgeräts (CryoSealer) zu besseren Ergebnisse führt. Diesbezüglich erfolgte für die Temperatur und Dauer des Schweißprozesses eine eigenständige Validierung. Zur Überprüfung der Dichtigkeit erfolgte eine Testung mittels mit Methylenblau-gefärbten Proben im Wasser.

Im Anschluss erfolgte die Entwicklung eines Protokolls zur Kryokonservierung mittels IceCube 11XS. Die Optimierung des Einfrierprozesses erfolgte in mehreren Schritten, wobei unterschiedliche Kühlraten, Haltezeiten und Abkühlungsprofile getestet wurden. Nach der Etablierung des Einfrierprotokolls am IceCube-Einfriergerät erfolgte im Rahmen des Validierungsprozesses der direkte Vergleich mit dem konventionellen Nicool-System.

2.2 Patientenkollektiv

Die Untersuchung erfolgte an 30 gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 18 und 35 Jahren. Die Rekrutierung der Probanden wurde im Bereich von Studierenden der Universität Tübingen unternommen. Eine Teilnahme von Minderjährigen oder Nichteinwilligungsfähigen war ausgeschlossen. Die Probanden wurden vor Teilnahme mündlich sowie schriftlich über den Ablauf der Studie sowie über mögliche Risiken und Folgen aufgeklärt. Die Teilnehmer gaben eine schriftliche Einwilligung zur Verwendung ihrer Ejakulatproben. Die Zurücknahme der Einverständniserklärung war jederzeit möglich.

Folgende Einschlusskriterien lagen vor:

- Männliches Geschlecht
- Alter ≥ 18 Jahre und ≤ 35 Jahre
- Unterschriebene Einwilligungserklärung

Folgende Ausschlusskriterien lagen vor:

- Vorbekannte Einschränkung der Fertilität
- Nikotinabusus

2.3 Spermioqrammagnostik

Im ersten Schritt der praktischen Arbeit erfolgte die Durchführung einer Spermioqrammagnostik, um die Spermien standardisiert hinsichtlich unterschiedlicher Parameter zu analysieren. Die Spermioqrammagnostik erfolgte gemäß den Empfehlungen des WHO-Laborhandbuchs zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates (WHO, 2010) und erfasste folgende Parameter:

- Makroskopische Untersuchung:
 - o Volumen
 - o pH-Wert
 - o Farbe
 - o Viskosität
- Mikroskopische Untersuchung:
 - o Spermiengesamtzahl

- Spermienkonzentration
- Motilität
- Leukozytennachweis
- Erythrozytennachweis

Nach der Ejakulatabgabe (in einem sterilen 100 ml Urinbecher, Firma Sarstedt) erfolgte zunächst eine 30-minütige Verflüssigung im Brutschrank (Firma Memmert) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Im Anschluss wurden die makroskopischen Parameter bestimmt: Das Volumen wurde unter Zuhilfenahme einer sterilen Einmalspritze (Injekt[®], 5 ml bzw. 10 ml, B. Braun) ermittelt. Die Farbe des Ejakulats wurde visuell beurteilt. Die Viskosität wurde durch Beobachtung des Fadenziehens beim Pipettieren eingeschätzt. Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier (pH 6,4–8,0) unmittelbar nach der Verflüssigung gemessen.

Die anschließende mikroskopische Analyse erfolgte mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Carl Zeiss, Produktnummer: 473011 9901) bei 400-facher Vergrößerung. Die Spermienkonzentration und die Gesamtzahl wurden nach Verfahrensanleitung der WHO (WHO, 2010) mit einem Neubauer-improved-Hämozytometer bestimmt. Für die Motilitätsbeurteilung wurde ein Tropfen Ejakulat auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Es wurden anschließend mindestens fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Probe ausgewertet und die Spermien entsprechend der WHO-Klassifikation in progressiv bewegliche (PR), nicht-progressiv bewegliche (NP) und immobile (IM) Spermien unterteilt. Die Auswertung wurde zu Beginn der Arbeit unter Hilfe einer erfahrenen Labormitarbeiterin und im weiteren Verlauf nach ausführlicher Einarbeitung eigenständig durchgeführt. Die Beurteilung der Motilität erfolgte unter Zuhilfenahme eines elektronischen Zählgeräts (Assistent Differenziergerät Counter AC-8, Karl Hecht KG). Zur Detektion von Leukozyten und Erythrozyten im Ejakulat wurde eine Peroxidasefärbung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung. Leukozyten wurden als peroxidasepositive Zellen

identifiziert und gezählt; das Vorhandensein von Erythrozyten wurde anhand ihrer charakteristischen Morphologie beurteilt.

Die erhobenen Parameter wurden gemäß den Referenzwerten des WHO-Handbuchs (WHO, 2010) dokumentiert und zur weiteren Analyse herangezogen.

2.4 Aufbereitung

2.4.1 Allgemeiner Ablauf der Aufbereitung

Die Aufbereitung der Ejakulatproben stellte einen zentralen Schritt im Rahmen der Kryokonservierung dar und beinhaltete den Prozess, die Spermien optimal für den Einfrierprozess vorzubereiten und vor kryogenen Schäden zu schützen. Im sofortigen Anschluss an die makro- und mikroskopische Diagnostik wurde die Aufbereitung unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank der Firma UnityLab Services (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Die Ejakulatproben wurden im Verhältnis 1:1 mit einem kryoprotektiven Konservierungsmedium versetzt. Verwendet wurde hierfür das gebrauchsfertige Quinn's Advantage™ Sperm Freezing Medium (ART-8022; SAGE In Vitro Fertilization, CooperSurgical Company, Trumbull, USA). Dabei handelte es sich um eine HEPES-gepufferte Salzlösung, der 10 mg/ml Humanserumalbumin, Glycerol sowie Gentamicin zugesetzt waren. Glycerol wirkt dabei als Kryoprotektivum zum Schutz der Spermienmembran, während Gentamicin die Funktion eines Breitspektrum-Antibiotikums übernimmt. Die mit dem Konservierungsmedium versetzten Ejakulatsproben wurden in Plastiktraws aus dem Humansperma-Verpackungsset der Firma Minitüb GmbH (Artikelnummer 13490/0036, Tiefenbach, Deutschland) abgefüllt. Die Plastikstraws hatten ein Fassungsvermögen von je 250 µl und konnten zur weiteren Handhabung in speziellen Lagerkassetten eingelegt werden.

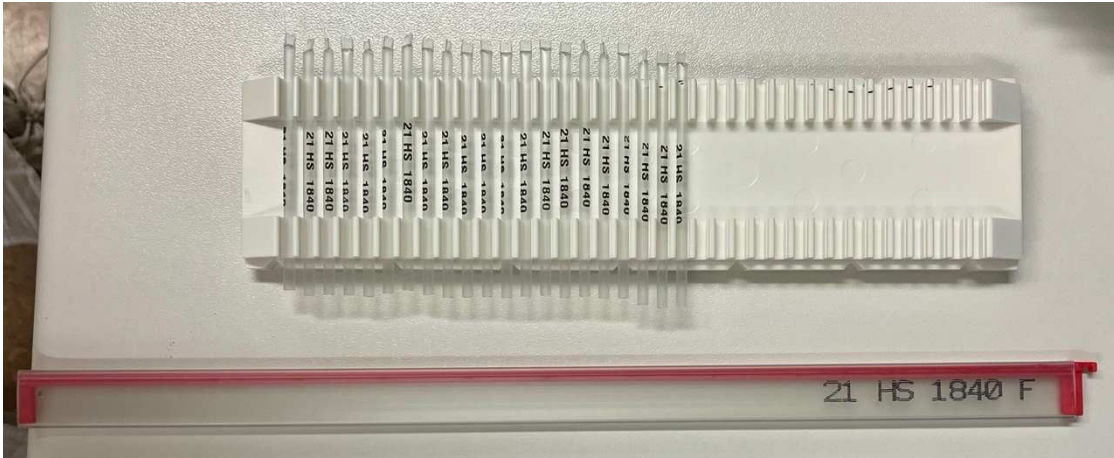


Abbildung 1: Plastikstraws (oben) und Lagerkassette (unten)

2.4.2 Verschlussmethoden der Straws

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zum Verschließen der Straws etabliert und validiert. Ziel war es, eine hygienisch sichere, reproduzierbare und zeiteffiziente Verschlussmethode zu entwickeln, die den aktuellen Anforderungen an Qualitätssicherung und biologischer Sicherheit in der Kryokonservierung entspricht. Im Folgenden werden sowohl die bislang etablierte Methode mittels Verschlusskugeln als auch der durchgeführte Prozess der Implementierung der neuen Verschlussmethode mittels Wärmeversiegelung mit dem CryoSealer beschrieben.

2.4.2.1 Konventionelle Verschlussmethode mittels Verschlusskugeln

Bis zur Durchführung dieser Arbeit erfolgte der standardmäßige Verschluss der Straws im Labor für Uroonkologie der Universitätsklinik Tübingen mittels spezieller Metallkugeln aus dem Humansperma-Verpackungsset (Artikelnummer 13490/0036; Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland). Nach dem Befüllen des Straws mit dem Flüssigkeitsgemisch aus Ejakulat und Konservierungsmedium wurde unter sterilen Bedingungen jeweils eine Verschlusskugel manuell in das offene Ende des Straws eingeführt und mit Druck fixiert, um einen möglichst dichten Verschluss zu erzielen. Diese Methode diente als Referenzstandard für den Vergleich mit der neuen Verschlussmethode.

2.4.2.2 Wärmeversiegelung mittels CryoSealer

Entsprechend den Empfehlungen aktueller Richtlinien (WHO, 2021) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Verschlussmethode mittels Wärmeversiegelung eingeführt, die das Risiko von Kontaminationen minimiert und eine höhere Standardisierung ermöglicht. Hierzu wurde das Ultraschall-Handverschweißgerät CryoSealer (Ref.: 13135/0000, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) verwendet. Das Gerät erzeugt hochfrequente Ultraschallschwingungen, welche zu einer lokalen Wärmeerzeugung führen und damit das Verschweißen der Straws ermöglicht.

Nach abgeschlossener Aufbereitung (siehe Abschnitt 5.4.1) wurden die Straws mit einer Pipette befüllt, wobei gemäß Herstellerangabe 18 mm vom offenen Ende freigelassen wurden. Anschließend erfolgte der Verschluss mittels Ultraschallwärmeversiegelung mit dem CryoSealer. Der Hersteller empfiehlt für die verwendeten Straws eine Verschweißdauer von 4,9 Sekunden. Da diese Dauer im klinischen Alltag eine erhebliche zeitliche Belastung darstellen kann, wurde zusätzlich untersucht, ob eine Verkürzung der Verschweißzeit auf 2,5 Sekunden zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich Dichtigkeit, Vitalität und Motilität der Spermien führt.

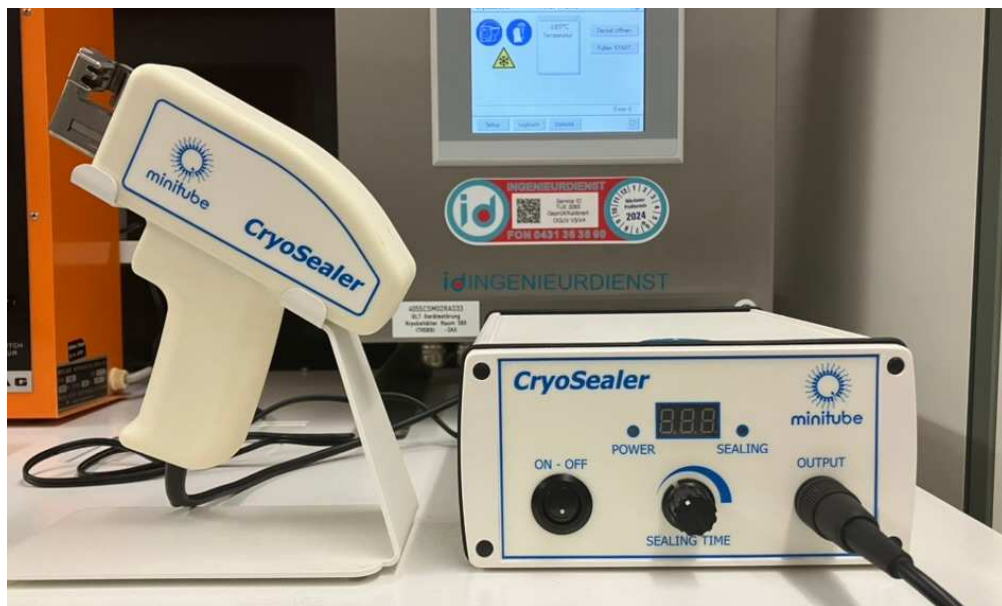


Abbildung 2: CryoSealer

Das Gerät besteht aus einer Handpistole (links) und einer Steuereinheit (rechts), an der die Verschweißdauer in Sekunden präzise eingestellt werden kann.

2.4.2.3 Dichtigkeitsprüfung des CryoSealers

Um die Dichtigkeit der mittels CryoSealer verschweißten Straws zu überprüfen, wurden Tests mit mit Methylenblau gefärbten Proben durchgeführt. Hierzu befüllten wir unter Einhaltung des empfohlenen Abstands von Flüssigkeit und Ende des Straws vier Straws mit Methylenblau. Je zwei dieser befüllten Straws wurden mit dem Handschweißgerät (CryoSealer) mit einer Verschweißdauer von 2,5 Sekunden und 4,9 Sekunden verschweißt. Alle Straws wurden anschließend über Nacht in einem Wasserbehälter gelagert. Am folgenden Tag wurde kontrolliert, ob Methylenblau ausgetreten war.

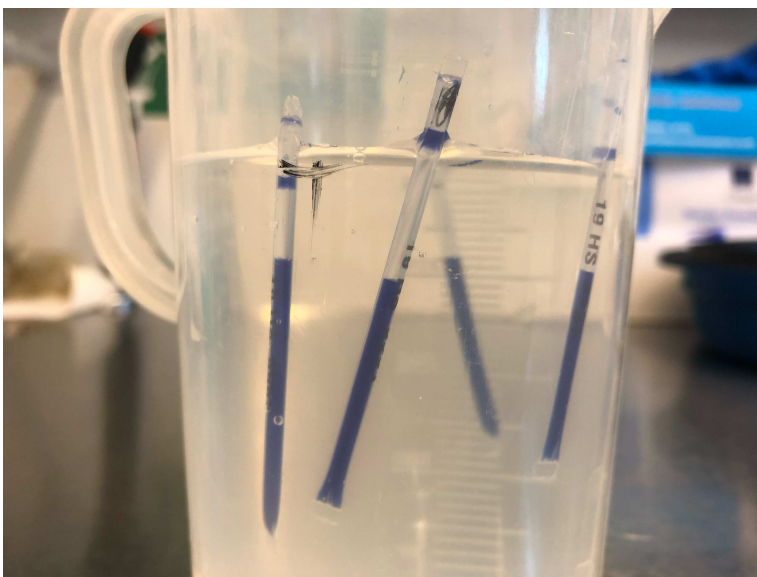


Abbildung 3: Wasserbehälter mit Methylenblau gefärbten Straws

Wie in der Abbildung erkennbar war kein Methylenblau ausgetreten, sodass wir bei der Verschlussmethode mittels Wärmeversiegelung von einer vollständigen Dichtigkeit der Straws ausgehen konnten, unabhängig von der Schweißdauer (2,5 Sekunden versus 4,9 Sekunden).

2.4.2.4 Vergleichende Testung der Verschlussmethoden

Nachdem die grundlegende Dichtigkeit der Verschlussmethode mittels Wärmeversiegelung (CryoSealer) bestätigt wurde, erfolgte eine vergleichende Testung der drei Verschlussmethoden, um ihre Auswirkungen auf die Spermienqualität nach Kryokonservierung zu evaluieren. Die folgenden Verschlussmethoden wurden verglichen:

1. Konventionelle Methode: Verschluss der Straws mittels Metallkugerverschluss (Referenzstandard)
2. Wärmeversiegelung mit CryoSealer: Verschweißdauer 4,9 Sekunden (Herstellerempfehlung)
3. Wärmeversiegelung mit CryoSealer: Verschweißdauer 2,5 Sekunden (verkürzte Dauer)

Zur Durchführung dieser vergleichenden Analyse wurde jede Ejakulatprobe nach erfolgter Spermioigrammdiagnostik und Aufbereitung in drei gleichwertige Aliquote unterteilt. Aus jedem Aliquot wurden drei Straws befüllt, die jeweils einer der drei Verschlussmethoden zugeordnet wurden (n=3 pro Methode und Ejakulatprobe). Die befüllten und verschlossenen Straws wurden anschließend dem standardisierten Kryokonservierungsprozess mittels konventioneller Methode (Nicoool-Einfriergerät) unterzogen (siehe Abschnitt 2.5.1). Als primäre Endpunkte für den Vergleich wurden die Vitalität und Motilität der Spermien in der Auftaukontrolle (nach erfolgter Kryokonservierung) herangezogen.

2.5 Durchführung der Kryokonservierung

2.5.1 Einfrierprozess mit Einfriergerät Nicoool LM 10

Bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde im Labor für Uroonkologie der Universitätsklinik Tübingen zur Kryokonservierung von Spermienproben das halbautomatisierte Einfriergerät Nicoool LM 10 (Geräte-ID 10019032) der Firma Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, eingesetzt. Bei diesem System handelt es sich um einen Ventilationsgefrierapparat, dessen Gefrierfunktion auf der indirekten Kühlung der eingesetzten Proben durch verdampfenden Stickstoff basiert.

Die Kryokonservierung erfolgte, indem ein mit verschlossenen Straws bestückter Einsatz in die Kältekammer des Geräts über einem mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) befüllten Behälter positioniert wurde. Ein integrierter Ventilator sorgte für eine gleichmäßige Verteilung des verdampfenden Stickstoffs im Kühlraum, wodurch die möglichst gleichmäßige Abkühlung der Proben erzielt wurde. Die Stärke der Luftzirkulation – und damit die

Kühlgeschwindigkeit – konnte über neun einstellbare Ventilatorstufen reguliert werden. Gemäß hausinternem Standardprotokoll (siehe Anhang 7.2) wurden die Ventilatorstufen 1 bis 9 jeweils für drei Minuten durchlaufen. Anschließend wurde das Gerät auf Stufe 9 (stärkste Stufe) belassen, bis die Zieltemperatur von -130 °C erreicht war. Die gemessene Temperatur bezog sich hierbei auf die Temperatur innerhalb der Kühlkammer, die Messung der exakten Proben temperatur war nicht möglich. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde der mit den Straws besetzte Einsatz unmittelbar in den flüssigen Stickstoff (- 196 °C) überführt. Der Kühlungsvorgang war damit abgeschlossen. Im abschließenden Schritt wurden die einzelnen Straws mit einer Pinzette in die dafür vorgesehenen Lagerungskassetten (siehe Abbildung 1) gesteckt, welche zur langfristigen Lagerung in einem Langzeitlagergefäß mit Flüssigstickstoff bei -196 °C überführt wurden.

Die Durchführung dieses Prozesses erfolgte gemäß einem klinikinternen Protokoll und wurde dementsprechend dokumentiert (siehe Anhang 7.3).

2.5.2 Einfrierprozess mit Einfriergerät IceCube 11XS

Für die Entwicklung und Etablierung eines neuen, standardisierten Kryokonservierungsprotokolls für die klinische Praxis in der Uroonkologie der Universitätsklinik Tübingen kam das computergesteuerte, vollautomatisierte Einfriergerät IceCube 11XS der Firma SY-LAB Geräte GmbH (Neupurkersdorf, Österreich) zum Einsatz. Dieses Einfriergerät ermöglichte eine kontrollierte programmgesteuerte Kühlung der Proben. Über einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Behälter gelang die Flüssigphase des Kältemittels in das Einfriergerät, mittels eines programmgesteuerten Magnetventils konnte dabei die genaue Menge dosiert werden. Innerhalb der Kühlkammer des Einfriergeräts wurde mithilfe eines Ventilators eine gleichmäßige Verteilung des eingeströmten Stickstoffs und damit eine gleichmäßige Temperaturverteilung erzielt. Die einzufrierenden Straws oder Ampullen konnten durch einen speziellen Probenhalter vertikal in der Gefrierkammer des Einfriergeräts platziert werden. Die genaue Temperatur innerhalb der Gefrierkammer konnte mithilfe eines Temperaturfühlers überwacht werden. Durch das Einführen eines Proben temperaturfühlers in einen am oberen Ende offen gelassenen Straw

konnte die exakte Temperatur innerhalb der Probe in Echtzeit erfasst werden. Der korrekte Ablauf des Einfrierprogramms sowie die präzise Steuerung der Kühl- und Wärmeabgabe in die Gefrierkammer wurden durch einen im Gerät integrierten Mikrocontroller geregelt. Die Bedienung des Geräts sowie die grafische Darstellung des Temperaturverlaufs erfolgten über ein extern angeschlossenes Tablet-Computer-System.



Abbildung 4: IceCube 11XS

IceCube 11XS mit angeschlossenem externen Tablet zur Steuerung des Einfrierprogramms und Darstellung des Temperaturverlaufs. Im Deckel der Gefrierkammer sind vier Probenhalter und der eingeführte Proben­temperaturfühler zu erkennen.

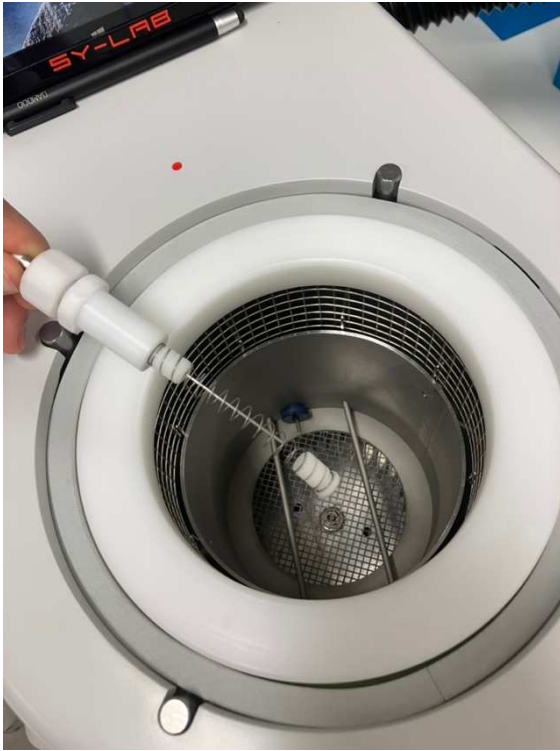


Abbildung 5: IceCube 11XS: Gefrierkammer und Temperatursensor für die Proben temperatur



Abbildung 6: IceCube 11XS: Probenhalter für bis zu 10 Straws

2.5.2.1 Entwicklung eines neuen Einfrierprotokolls

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines optimierten Einfrierprotokolls für die Verwendung des IceCube-Einfriergeräts mit dem Ziel, eine kontrollierte und zellschonende Abkühlung der Proben zu erreichen.

Hierbei wurde sich an den Vorgaben des WHO-Laborhandbuchs (WHO, 2010) sowie an den Herstellerangaben (Bedienungsanleitung IceCube Freezer 11XS, SY-LAB Geräte GmbH) orientiert. Von besonderer Relevanz war die Vermeidung unkontrollierter Wärmespitzen im Bereich des Kristallisationspunkts: Beim Übergang der wässrigen Lösung (wie der verwendeten aufbereiteten Ejakulatssuspension) vom flüssigen in den festen Zustand stellt der Moment der Bildung der ersten Eiskristalle (= Kristallisationspunkt) einen kritischen Moment dar. Dieser Prozess verläuft exotherm und führt zu einer kurzfristigen Freisetzung von Kristallisationswärme, was bei fehlenden Gegenmaßnahmen zu Temperaturschwankungen führt. Bei der Entwicklung des Einfrierprotokolls war es somit das Ziel, die Wärmefreisetzung am Kristallisationspunkt durch eine gezielt angepasste Einfrierkurve auszugleichen, um eine gleichmäßige und kontrollierte Kühlung ohne Temperatursprünge zu gewährleisten.

Im Folgenden ist die anhand von mehreren aufeinander aufbauenden, iterativen Versuchsdurchgängen durchgeführte Entwicklung des Einfrierprotokolls mittels IceCube 11XS dargestellt.

Nach Installation und Inbetriebnahme des IceCube 11XS durch Mitarbeitende der Herstellerfirma erfolgte die Durchführung von Vorversuchen, um ein Verständnis für die korrekte Funktionsweise des neuen Einfriergeräts zu erlangen. Zunächst wurde im Einfrierprogramm 01 eine beispielhaft gewählte lineare Abkühlrate festgelegt.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	14,37	00:00:00				
1	-140,12	00:20:36	-154,49	00:20:36	-7,50	
2	-150,00	00:24:59	-9,88	00:04:23	-2,25	

Abbildung 7: Einfrierprogramm 01 für IceCube 11XS

Nach Erreichen der Ausgangstemperatur von 14,37 °C erfolgte eine lineare Abkühlung mit einer Abkühlrate von -7,5 °C/min (Segment 1). Nach Erreichen von -150 °C betrug die Abkühlrate -2,25 °C/min (Segment 2).

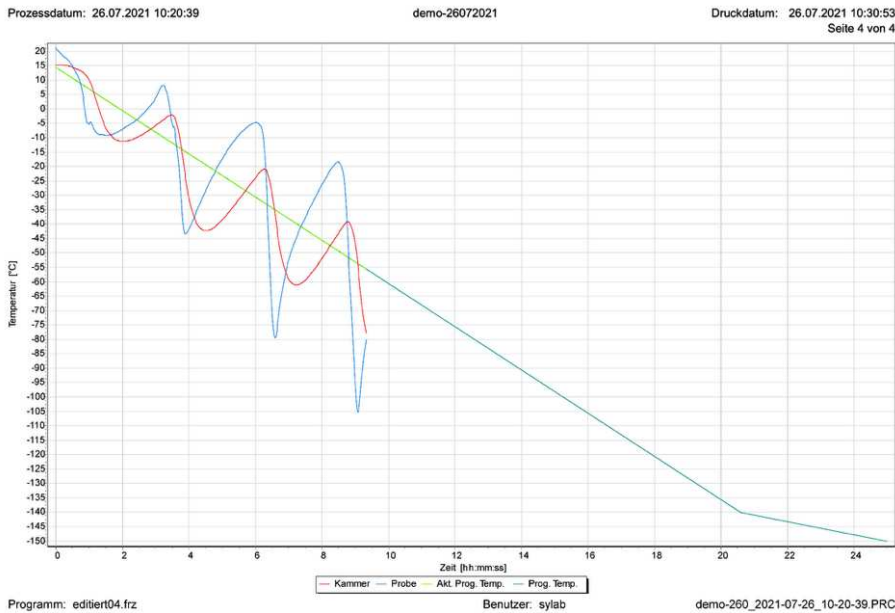


Abbildung 8: Gefrierkurve 01 zu Einfrierprogramm 01

Die grüne Kurve stellt die Soll-Kurve des Einfrierprogramms und damit den vom Programm vorgegebenen Temperaturverlauf dar. Die rote Kurve stellt den Temperaturverlauf der in der Kühlkammer gemessenen Temperatur dar. Die blaue Kurve entspricht dem Temperaturverlauf der in der Probe gemessenen Temperatur.

Abbildung 8 zeigt starke Temperaturschwankungen im Kurvenverlauf der gemessenen Kammer- und Probentemperatur. Da diese ausgeprägte Temperaturschwankungen hinsichtlich einer Kryokonservierung nicht zu tolerieren waren, wurde der Einfrierprozess frühzeitig beendet.

Im darauffolgenden Vorversuch erfolgte eine gestaffelte Abkühlung mit unterschiedlichen Abkühlraten (Einfrierprogramm 02).

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	14,37	00:00:00				
1	0,00	00:11:14	-14,37	00:11:14	-1,28	
2	0,00	00:16:07	0,00	00:04:53	0,00	
3	-23,87	00:21:36	-23,87	00:05:29	-4,35	
4	-48,84	00:26:19	-24,97	00:04:43	-5,29	
5	-71,64	00:31:52	-22,80	00:05:33	-4,11	
6	-97,02	00:38:08	-25,38	00:06:16	-4,05	
7	-119,60	00:45:38	-22,58	00:07:30	-3,01	
8	-136,38	00:52:09	-16,78	00:06:31	-2,57	
9	-150,00	01:02:09	-13,62	00:10:00	-1,36	

Abbildung 9: Einfrierprogramm 02 für IceCube 11XS

Im Sinne des Vorversuchs wurden die Abkühlraten exemplarisch gewählt.

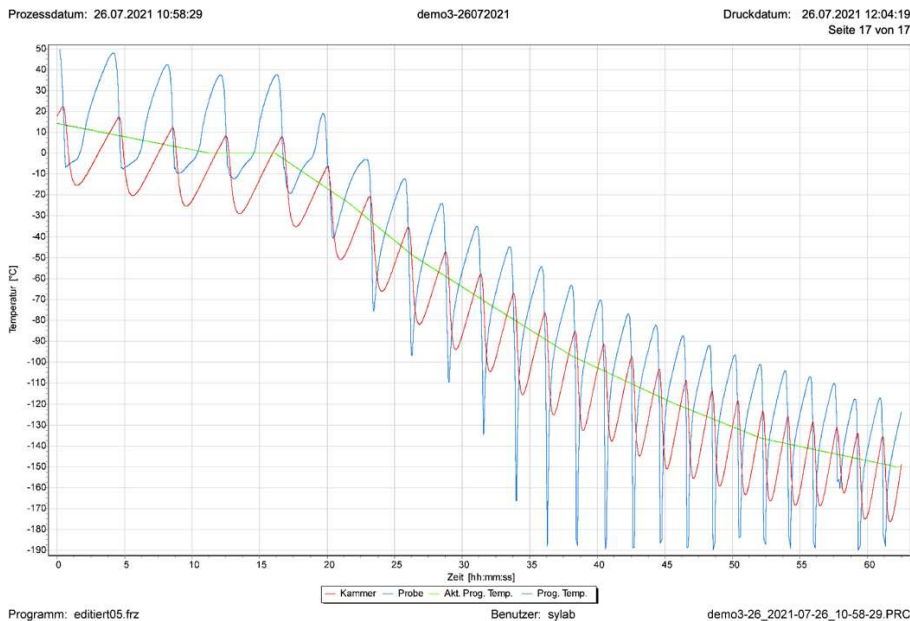


Abbildung 10: Einfrierkurve 02 zu Einfrierprogramm 02

Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass es auch bei dem Einfrierprogramm 02 zu ausgeprägten, nicht tolerierbaren Temperaturschwankungen kam. Auch der nächsten Versuch mit Einfrierprogramm 03, ebenfalls beispielhaft gewählte Abkühlraten, resultierte in einer ähnlichen Temperaturkurve. Als Ursache hierfür kam eine fehlerhafte Temperaturmessung der Sensoren in Betracht. Aufgrund dessen erfolgte eine ausführliche Überprüfung der Temperatursensoren in Kammer und Probe sowie eine Rücksprache mit den Mitarbeitenden der Herstellerfirma des Geräts. Im Folgeschritt wurde auf Empfehlung des

Herstellers das von ihnen empfohlene Einfrierprogramm installiert und durchgeführt (Einfrierprogramm 04).

Prozessdatum: 26.07.2021 14:54:16

demo1-26072021

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	20,00	00:00:00				
1	0,00	00:06:40	-20,00	00:06:40	-3,00	
2	0,00	00:11:40	0,00	00:05:00	0,00	
3	-7,00	00:18:40	-7,00	00:07:00	-1,00	
4	-45,00	00:22:28	-38,00	00:03:48	-10,00	
5	-20,00	00:27:28	25,00	00:05:00	5,00	
6	-17,00	00:28:58	3,00	00:01:30	2,00	
7	-30,00	00:41:58	-13,00	00:13:00	-1,00	
8	-90,00	00:51:58	-60,00	00:10:00	-6,00	
9	-150,00	00:57:58	-60,00	00:06:00	-10,00	

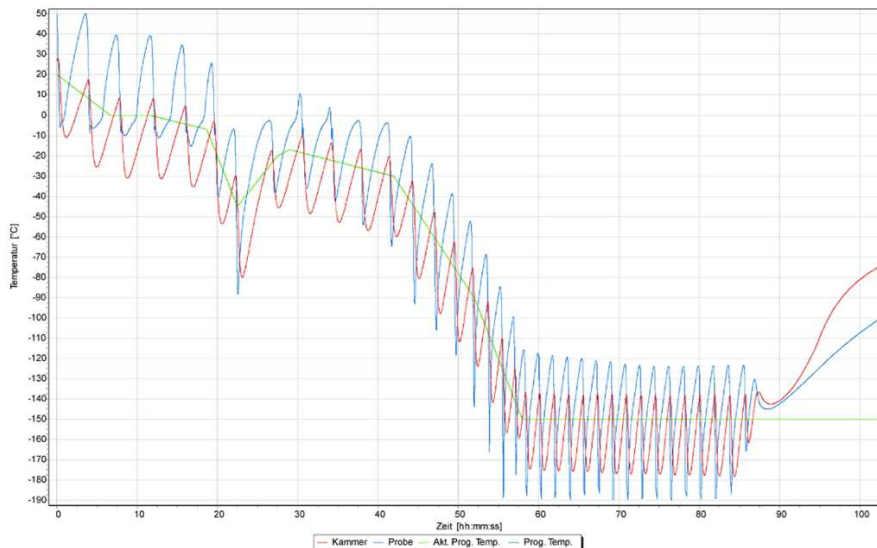
Abbildung 11: Einfrierprogramm 04 für IceCube 11XS

Einfrierprogramm 04 entspricht der Herstellerempfehlung. Sobald die Probe die Ausgangstemperatur von 20 °C erreicht hatte (Ermittlung der Proben temperatur erfolgte mittels Probensensor), begann die primäre Abkühlung mit einer Abkühlrate von -3 °C/min (Segment 1). Anschließend erfolgte eine fünfminütige Haltephase bei 0 °C (Segment 2) und weitere Abkühlung mit einer Abkühlrate von -1 °C/min auf -7 °C (Segment 3). Da laut Hersteller der Kristallisationspunkt in dem Bereich zwischen -7 °C und -10 °C zu erwarten ist, erfolgte dann eine Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -10 °C/min (Segment 4) mit anschließender Erwärmung mit einer Erwärmungsrate von 5 °C/min (Segment 5). Ziel der beschriebenen Sturzkühlung war die Kompensation der Kristallationswärme. Anschließend wurde die Abkühlung mit unterschiedlichen Abkühlraten fortgeführt, zunächst mit einer Rate von -1 °C/min (Segment 7), anschließend mit einer Abkühlrate von -6 °C/min (Segment 8). Abschließend erfolgte eine Abkühlung mit einer Abkühlrate von -10 °C/min auf -150 °C, was die Zieltemperatur vor der Überführung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) darstellte.

Prozessdatum: 26.07.2021 14:54:16

demo1-26072021

Druckdatum: 26.07.2021 16:37:47
Seite 21 von 21



Programm: demo1.frz

Benutzer: sylab

demo1-26_2021-07-26_14-54-16.PRC

Abbildung 12: Gefrierkurve 04 zu Gefrierprogramm 04

Die grüne Kurve stellt die Soll-Kurve des Einfrierprogramms und damit den vom Programm vorgegebenen Temperaturverlauf dar. Die rote Kurve stellt den Temperaturverlauf der in der Kühlkammer gemessenen

Temperatur dar. Die blaue Kurve entspricht dem Temperaturverlauf der in der Probe gemessenen Temperatur.

Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass es auch unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Einfrierprogramms zu den kurvenartigen Temperaturschwankungen kam. Erneut hielten wir enge Rücksprache mit den Mitarbeitenden der Herstellerfirma, es folgten eine Neuinstallation der Sensoren zur Temperaturmessung in Kammer und Probe sowie ein erneute Inbetriebnahme des unterstützenden Computersystems des IceCube 11XS. In den anschließend durchgeführten Vorversuchen (Einfrierprogramm 05 bis 09) konnte ein adäquater Temperaturverlauf in Kammer und Probe nachgewiesen werden.

Prozessdatum: 10.08.2021 13:05:49

demo3-10082021

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	0,00	00:09:00	-18,00	00:09:00	-2,00	
2	-14,50	00:16:45	-14,50	00:07:45	-1,87	
3	-40,00	00:17:24	-25,50	00:00:39	-39,23	
4	-40,00	00:18:24	0,00	00:01:00	0,00	
5	-30,00	00:19:54	10,00	00:01:30	6,67	
6	-28,00	00:20:54	2,00	00:01:00	2,00	
7	-150,00	01:23:24	-122,00	01:02:30	-1,95	

Abbildung 13: Einfrierprogramm 09 für IceCube 11XS

Prozessdatum: 10.08.2021 13:05:49

demo3-10082021

Druckdatum: 10.08.2021 13:40:24

Seite 3 von 3

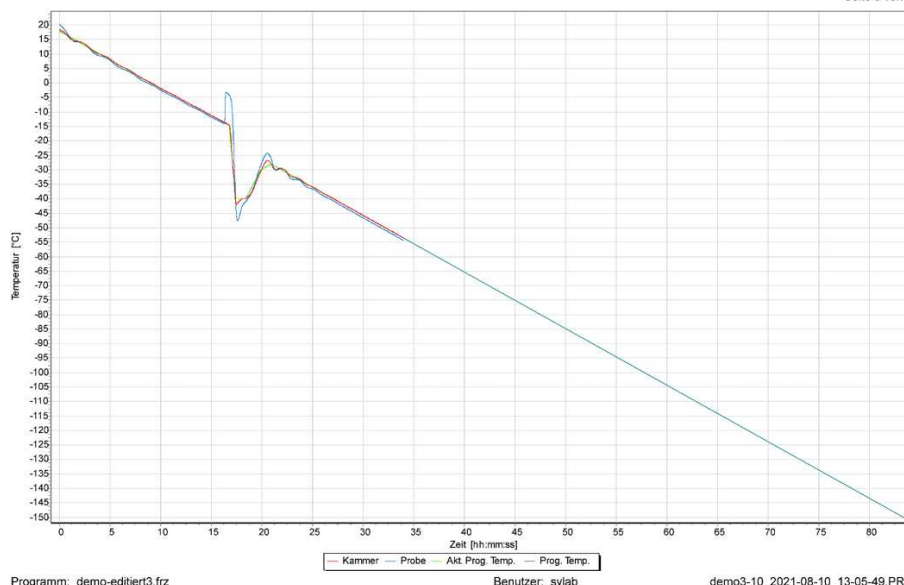


Abbildung 14: Einfrierkurve 09 zu Einfrierprogramm 09

In Abbildung 14 ist zu sehen, dass bei Durchführung des Einfrierprogramms 09 die Ist-Kurven der gemessenen Temperatur in Kammer und Probe entsprechend der Soll-Kurve des Einfrierprogramms verlaufen, es kommt zu keinen ausgeprägten Temperaturschwankungen mehr. Somit konnte nun von einer adäquaten Temperaturmessung ausgegangen werden.

Nach der somit erfolgreichen Inbetriebnahme des Geräts fokussierten wir uns auf die Feststellung des Kristallisationspunkts des flüssigen Probenmediums (bestehend aus Ejakulat und zugesetztem Kryoprotektivum). Hierzu wurde eine lineare Abkühlung mit einer Abkühlrate von -2 °C pro Minute gewählt. Um die Kristallisationswärme der gesamten Probe miteinzubeziehen und um damit unter den in der klinischen Routine bestehenden Bedingungen zu arbeiten, wurden von nun an alle Probenhalter mit der Maximalanzahl der Straws besetzt (40 Straws pro Einfriervorgang).

Prozessdatum: 10.08.2021 14:06:43

demo4-10082021

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-150,00	01:24:00	-168,00	01:24:00	-2,00	

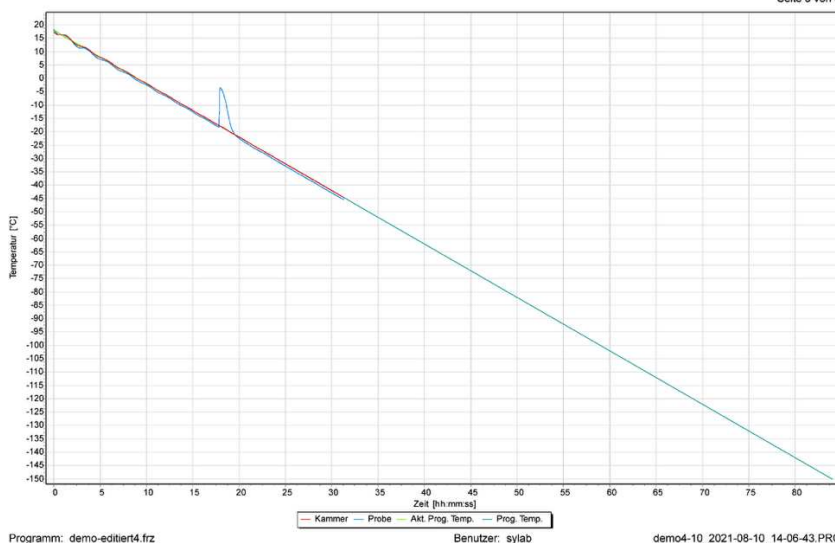
Abbildung 15: Einfrierprogramm 10 für IceCube 11XS

Die Abkühlung erfolgte linear mit einer Abkühlrate von -2 °C/min .

Prozessdatum: 10.08.2021 14:06:43

demo4-10082021

Druckdatum: 10.08.2021 14:38:50
Seite 3 von 3



Programm: demo-editiert4.frz

Benutzer: sylab

demo4-10_2021-08-10_14-06-43.PRC

Abbildung 16: Einfrierkurve 10 zu Einfrierprogramm 10

Abbildung 16 zeigt den Verlauf der in der Kammer und in der Probe gemessenen Temperatur bei linearer Abkühlung. Der aufgezeichnete plötzlich einsetzende Temperaturanstieg in der Probe bei ca. -18 °C (siehe blaue Kurve in Abbildung 16) führte zu der Annahme, dass der Kristallisationspunkt bei ca. -18 °C lag. Im Folgenden wurde nun durch iteratives Anpassen des Einfrierprogramms versucht, durch eine zuvor einsetzende Sturzkühlung den durch die Kristallisationswärme entstehenden Temperaturanstieg auszugleichen.

Prozessdatum: 10.08.2021 14:58:57

demo5-10082021

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-15,00	00:17:15	-33,00	00:17:15	-1,91	
2	-17,00	00:17:21	-2,00	00:00:06	-20,00	
3	-32,00	00:17:44	-15,00	00:00:23	-39,13	
4	-30,00	00:21:14	2,00	00:03:30	0,57	
5	-150,00	01:23:43	-120,00	01:02:29	-1,92	

Abbildung 17: Einfrierprogramm 11 für IceCube 11XS

Die Basis des Einfrierprogramms 11 war eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von ca. -2 °C/min (Segment 1, Segment 5). Bei -15 °C setzte eine Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von zunächst -20 °C/min (Segment 2) und dann $-39,13\text{ °C/min}$ (Segment 3) ein. Nach einer anschließenden 3,5-minütigen Phase mit einer leichten Erwärmung mit einer Erwärmungsrate von $0,57\text{ °C/min}$ (Segment 4) setzte erneut die kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von $-1,92\text{ °C/min}$ ein (Segment 5).

Prozessdatum: 10.08.2021 14:58:57

demo5-10082021

Druckdatum: 10.08.2021 15:27:47
Seite 3 von 3

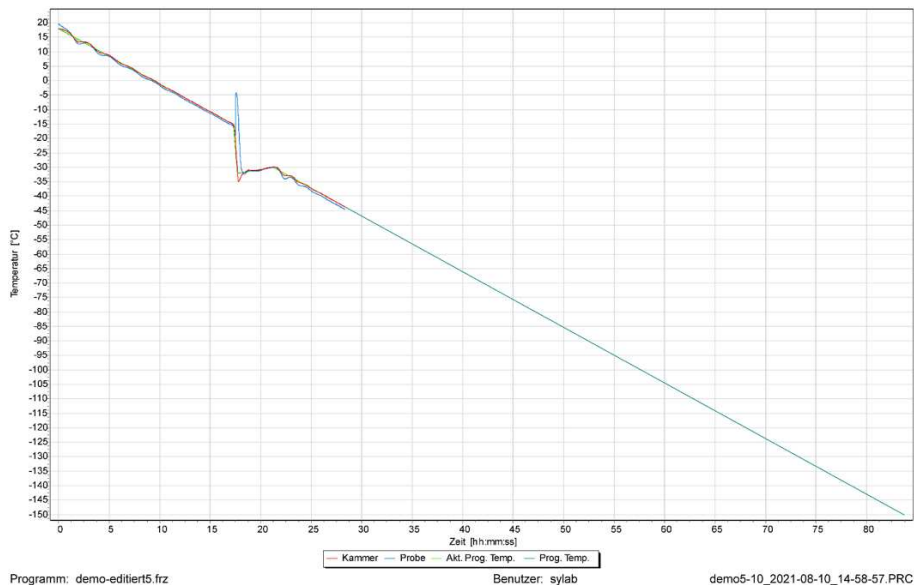


Abbildung 18: Einfrierkurve 11 zu Einfrierprogramm 11

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass es trotz der bei -17 °C einsetzenden Sturzkühlung infolge der Kristallisationswärme zu einem deutlichen Temperaturanstieg von ca. 10 °C gefolgt von einem sofortigen Temperaturabfall von ca. -27 °C kommt (ca. bei Minute 17). Dieser ausgeprägte und kurzfristige Temperaturabfall konnte nicht toleriert werden, sodass kleine Anpassungen hinsichtlich der Dauer der Sturzkühlung und der anschließenden Erwärmungsphase gemacht wurden. Das angepasste Einfrierprogramm zeigte jedoch keine Verbesserungen hinsichtlich des Temperaturverlaufs. Daraufhin hielten wir erneut Rücksprache mit der Herstellerfirma. Nach deren Empfehlung ließen wir im Einfrierprogramm 13 die Sturzkühlung deutlich früher bei -10 °C beginnen.

Prozessdatum: 12.08.2021 09:58:45

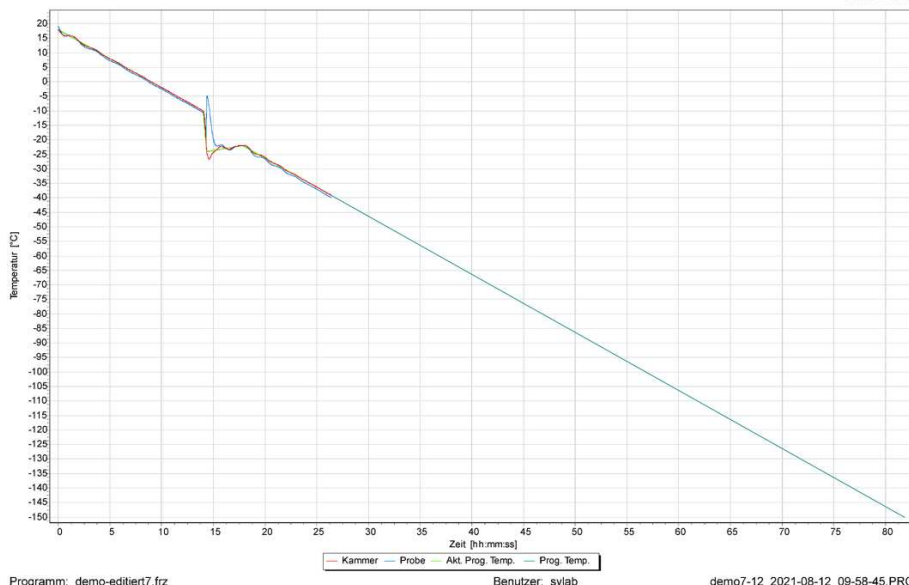
demo7-12082021

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-10,00	00:14:00	-28,00	00:14:00	-2,00	
2	-24,00	00:14:21	-14,00	00:00:21	-40,00	
3	-22,00	00:17:51	2,00	00:03:30	0,57	
4	-150,00	01:21:51	-128,00	01:04:00	-2,00	

Abbildung 19: Einfrierprogramm 13 für IceCube 11XS

Es erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von -2 °C/min (Segment 1, Segment 4), unterbrochen wurde die kontinuierliche Abkühlung von einer bei -10 °C einsetzenden Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -40 °C/min (Segment 2) und einer anschließenden 3,5-minütigen leichten Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 0,57 °C/min (Segment 3).



Programm: demo-editiert7.frz

Benutzer: sylab

demo7-12_2021-08-12_09-58-45.PRC

Abbildung 20: Einfrierkurve 13 zu Einfrierprogramm 13

Das Einfrierprogramm wurde nach ca. 26 Minuten abgebrochen.

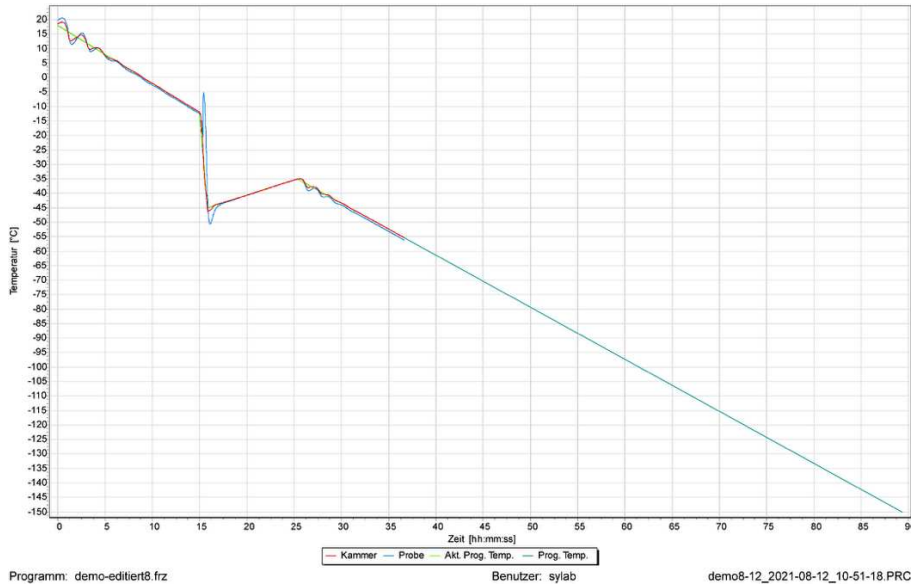
Aus Abbildung 20 ist abzulesen, dass die bei -10 °C einsetzende Sturzkühlung bewirkte, dass auch die in der Probe gemessene Temperatur plötzlich abfiel. Anschließend wurde für Einfrierprogramm 14 die Sturzkühlung (späterer Beginn bei -12 °C) sowie die leichte Erwärmungsphase nach der Sturzkühlung angepasst (längere Dauer, höhere Erwärmungsrate).

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-12,00	00:15:00	-30,00	00:15:00	-2,00	
2	-45,00	00:15:50	-33,00	00:00:50	-39,60	
3	-35,00	00:25:20	10,00	00:09:30	1,05	
4	-150,00	01:29:20	-115,00	01:04:00	-1,80	

Abbildung 21: Einfrierprogramm 14 für IceCube 11XS

Es erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von -2 °C/min (Segment 1), nach Erreichen von -12 °C setzte eine Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -39,6 °C/min ein (Segment 2). Es folgten eine 9,5-minütige Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 1,05 °C/min (Segment 3) und eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlungsrate von -1,8 °C/min (Segment 4).



Programm: demo-editiert8.frz

Benutzer: sylab

demo8-12_2021-08-12_10-51-18.PRC

Abbildung 22: Einfrierkurve 14 zu Einfrierprogramm 14

Die in Abbildung 22 dargestellte Einfrierkurve zeigte kein zufriedenstellendes Ergebnis, da es nach dem Eintreten des Kristallisationspunktes und der daraus resultierender Kristallisationswärme innerhalb sehr kurzer Zeit (einige Sekunden) zu einem starken Temperaturabfall innerhalb der Probe gekommen ist (ca. -45 °C). Um dieser starken Abkühlung entgegenzuwirken, wurden im weiteren Verlauf für die Einfrierprogramme 15 und 16 unterschiedliche Anpassungen der Variablen (Sturzkühlung, Erwärmungsphase nach Sturzkühlung) durchgeführt. Jedoch resultierte keine der Anpassungen in einem verbesserten Temperaturverlauf der Proben temperatur. Daraufhin wurde für Einfrierprogramm 17 die Erwärmungsphase nach der Sturzkühlung entfernt und stattdessen eine Haltephase eingefügt.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-13,00	00:15:23	-31,00	00:15:23	-2,02	
2	-30,00	00:15:49	-17,00	00:00:26	-39,23	
3	-30,00	00:23:19	0,00	00:07:30	0,00	
4	-150,00	01:25:48	-120,00	01:02:29	-1,92	

Abbildung 23: Einfrierprogramm 17 für IceCube 11 XS

Es erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von $-2,02 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Segment 1), nach der bei $-13 \text{ }^{\circ}\text{C}$ einsetzenden Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von $-39,23 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Segment 2) wurde eine 7,5-minütige Haltephase eingefügt. Abschließend erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von $-1,92 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

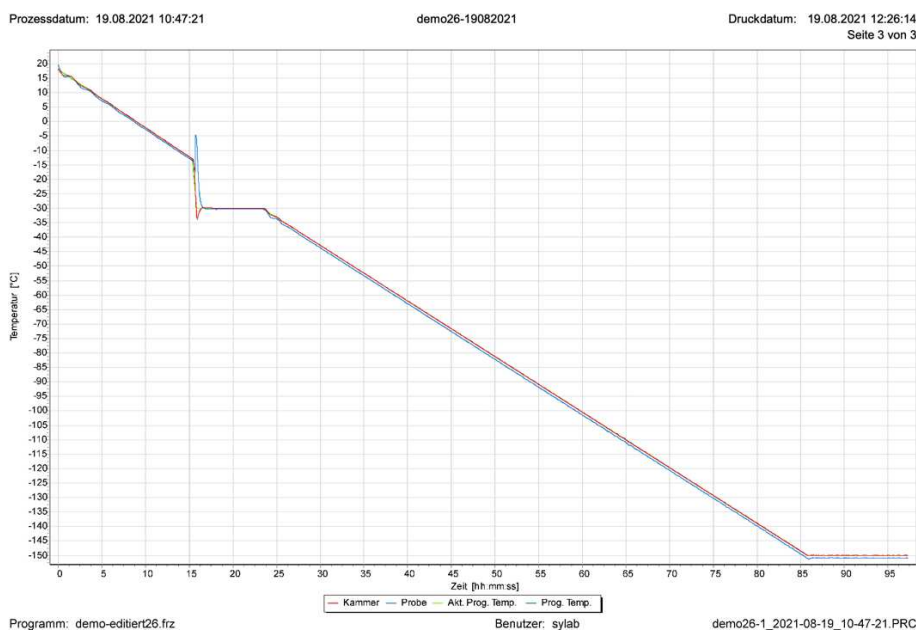


Abbildung 24: Einfrierkurve 17 zu Einfrierprogramm 17

Abbildung 24 zeigt, dass es weiterhin infolge der Sturzkühlung zu einem starken Temperaturabfall von ca. $-25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nach dem durch die Kristallisationswärme bedingten Temperaturanstieg kam. Im weiteren Verlauf wurden für die Einfrierprogramme 18 und 19 erneute Anpassungen der variablen Parameter durchgeführt. Um den Einfrierprozess hinsichtlich des Einflusses auf die Spermienqualität beurteilen zu können, wurden von den mittels Einfrierprogramm 17, 18 und 19 kryokonservierten Proben jeweils Auftaukontrollen durchgeführt. Die Ergebnisse der Auftaukontrollen zeigten schlechte Werte hinsichtlich der relevanten Parameter (Motilität nach dem Auftauprozess, Vitalität nach dem Auftauprozess). Aufgrund dieser schlechten Ergebnisse wurde sich gegen eine Weiterentwicklung des aktuellen Einfrierprogramms (Einfrierprogramm 18) entschieden. Stattdessen wurde als neuer Ausgangswert auf das Einfrierprogramm 10 mit linearer Abkühlung zurückgegriffen (siehe Abb. 15, 16). Als Ergänzung wurde für Einfrierprogramm 20 eine Sturzkühlung eingefügt.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-14,00	00:16:00	-32,00	00:16:00	-2,00	
2	-29,00	00:16:23	-15,00	00:00:23	-39,13	
3	-150,00	01:24:23	-121,00	01:08:00	-1,78	

Abbildung 25: Einfrierprogramm 20 für IceCube 11XS

Kontinuierliche Abkühlung mit Abkühlungsrate von ca. 2 °C/min (Segment 1), anschließend erfolgte eine Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -39,13 °C/min (einsetzend bei -14 °C; Segment 2). Es folgte eine kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von -1,78 °C/min.

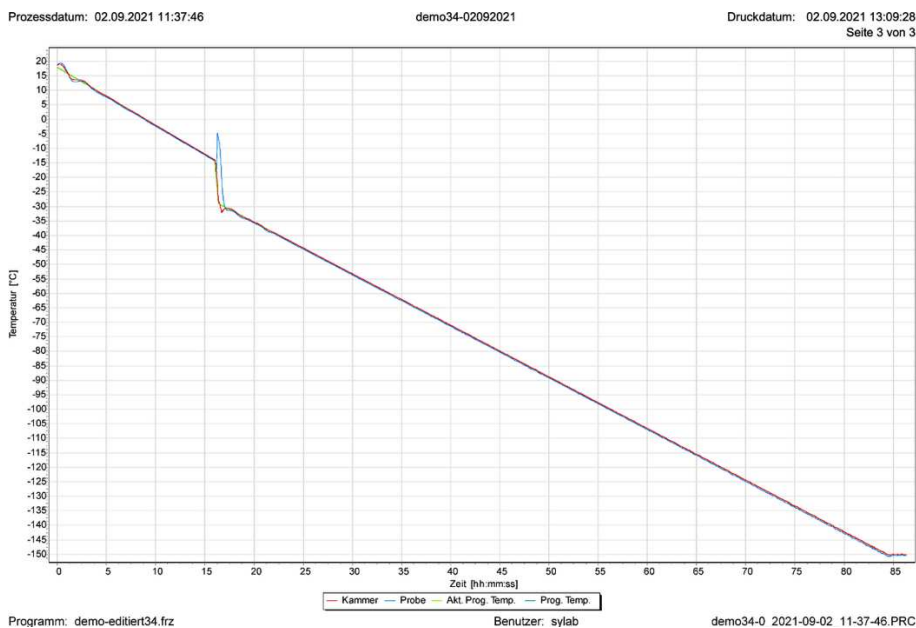


Abbildung 26: Einfrierkurve 20 zu Einfrierprogramm 20

Aus Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass auch unter den neuen Gegebenheiten nach dem durch den Kristallisationspunkt bedingten Temperaturanstieg ein zu starker Temperaturabfall von ca. – 25 °C eintrat. In Einfrierprogramm 21 wurde versucht, dem Temperaturabfall entgegenzuwirken, indem nach der Sturzkühlung eine Erwärmungsphase eingefügt wurde. Zudem wurde aus experimentellem Zweck die Abkühlrate auf -3 °C/min erhöht.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	18,00	00:00:00				
1	-15,00	00:11:00	-33,00	00:11:00	-3,00	
2	-30,00	00:11:23	-15,00	00:00:23	-39,13	
3	-20,00	00:12:23	10,00	00:01:00	10,00	
4	-150,00	00:55:43	-130,00	00:43:20	-3,00	

Abbildung 27: Einfrierprogramm 21 für IceCube 11 XS

Kontinuierliche Abkühlung mit Abkühlungsrate von -3,0 °C/min (Segment 1), anschließend erfolgte eine Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -39,13 °C/min (einsetzend bei -15 °C; Segment 2). Anschließend wurde eine Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 10 °C/min hinzugefügt. Es folgte eine kontinuierliche Abkühlung mit Abkühlrate von -3 °C.



Abbildung 28: Einfrierkurve 21 zu Einfrierprogramm 21

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass der Temperaturabfall nach der durch die Kristallisationswärme bedingte Temperaturspitze im Vergleich zu Einfrierkurve 20 (siehe Abb. 27) mit ca. -18° C geringer ausgeprägt war. Jedoch zeigte sich nach dem Temperaturabfall ein erneuter Anstieg der Proben temperatur infolge der programmierte Erwärmungsphase nach der Sturzkühlung. Um dies zu verhindern, fügten wir im neuen Einfrierprogramm (Einfrierprogramm 22) eine Haltephase nach der verkürzten Erwärmungsphase ein. Außerdem ließen wir danach die Abkühlung zunächst für eine kurze Zeit mit einer geringeren Abkühlrate beginnen. Zusätzlich ließen wir die Sturzkühlung zu einem späteren Zeitpunkt (bei -16 °C) einsetzen.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	20,00	00:00:00				
1	-16,00	00:12:00	-36,00	00:12:00	-3,00	
2	-29,00	00:12:20	-13,00	00:00:20	-39,00	
3	-26,00	00:12:38	3,00	00:00:18	10,00	
4	-26,00	00:13:38	0,00	00:01:00	0,00	
5	-27,00	00:14:38	-1,00	00:01:00	-1,00	
6	-150,00	00:55:38	-123,00	00:41:00	-3,00	

Abbildung 29: Einfrierprogramm 22 für IceCube 11XS

Zunächst erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit Abkühlungsrate von -3 °C/min (Segment 1), bei -16°C setzte Sturzkühlung mit Abkühlrate von -39 °C/min ein (Segment 2). Anschließend kam eine 18-sekündige Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 10 °C/min, worauf eine einminütige Haltephase folgte. Danach wurde die Abkühlung zunächst mit einer Abkühlrate von -1 °C/min und anschließend mit -3 °C/min fortgesetzt.

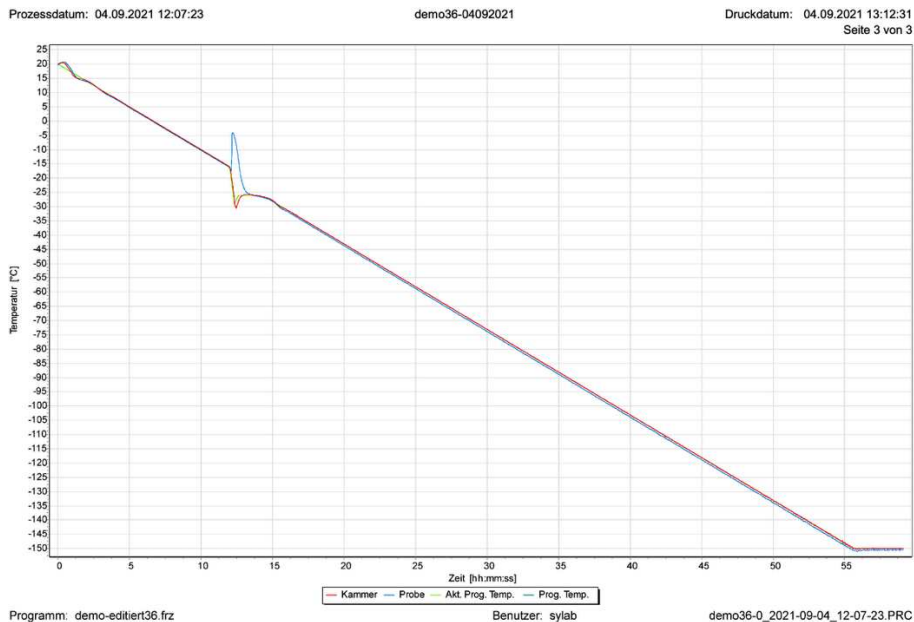


Abbildung 30: Einfrierkurve 22 zu Einfrierprogramm 22

Abbildung 30 zeigte erstmalig einen annähernd zufriedenstellenden Temperaturverlauf der Proben temperatur. Dies ermöglichte uns, uns im nächsten Schritt darauf zu fokussieren, die von der WHO empfohlenen Angaben (WHO, 2010) hinsichtlich der Abkühlraten umzusetzen: Gemäß der WHO-Empfehlungen war bis zum Erreichen des Kristallisationskomplexes eine Abkühlrate von -1,5 °C/min vorgesehen, nach dem Kristallisationskomplex eine schnellere Abkühlung mit einer Abkühlrate von -6 °C/min. Dies ergänzten wir mit einer schnelleren Abkühlrate von -10 °C/min ab -130 °C.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	20,00	00:00:00				
1	-16,00	00:24:00	-36,00	00:24:00	-1,50	
2	-29,00	00:24:20	-13,00	00:00:20	-39,00	
3	-26,00	00:24:38	3,00	00:00:18	10,00	
4	-26,00	00:25:38	0,00	00:01:00	0,00	
5	-27,00	00:26:38	-1,00	00:01:00	-1,00	
6	-130,00	00:43:48	-103,00	00:17:10	-6,00	
7	-150,00	00:44:18	-20,00	00:00:30	-40,00	

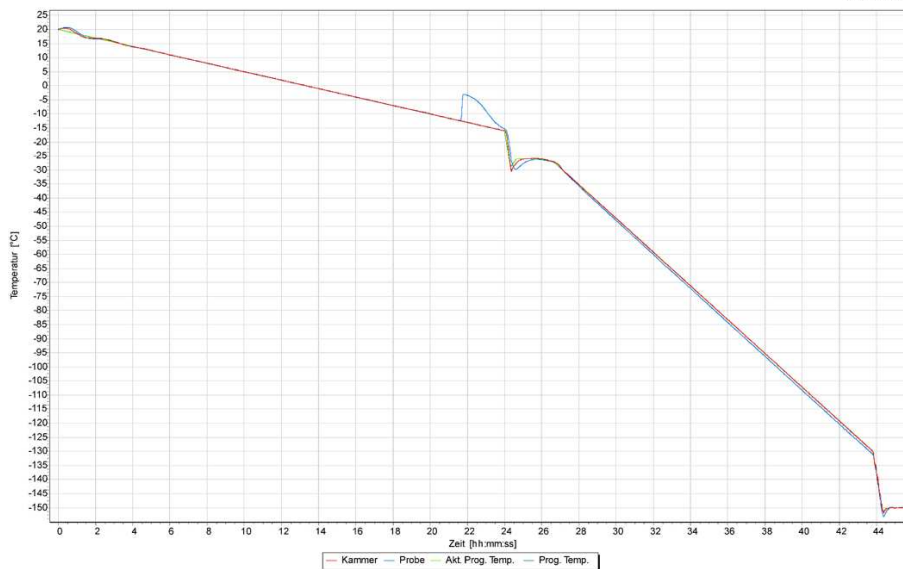
Abbildung 31: Einfrierprogramm 24 für IceCube 11 XS

Es erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung mit Abkühlungsrate von -3 °C/min (Segment 1), bei -16°C setzte Sturzkühlung mit Abkühlrate von -39 °C ein (Segment 2). Anschließend kam eine 18-sekündige Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 10 °C/min (Segment 3), worauf eine einminütige Haltephase folgte (Segment 4). Danach kam ein einminütige Abkühlungsphase mit einer geringen Abkühlrate von -1 °C/min (Segment 5). Die abschließende Abkühlung erfolgte mit Abkühlrate von -6 °C/min (Segment 6) und -40 °C/min.

Prozessdatum: 19.11.2021 10:54:16

kryo21+22-19-11-21

Druckdatum: 19.11.2021 11:41:54
Seite 3 von 3



Programm: 1-Kryosperrm-test2.frz

Benutzer: sylab

kryo21+2_2021-11-19_10-54-16.PRC

Abbildung 32: Einfrierkurve 24 zu Einfrierprogramm 24

In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass der Kristallisationskomplex bereits vor Beginn der Sturzkühlung einsetzte (nach ca. 21 Minuten). Um der Kristallisationswärme weiterhin entgegenzuwirken, ließen wir im neuen Einfrierprogramm (Einfrierprogramm 25) die Sturzkühlung früher (bei -10,5 °C) beginnen, ansonsten führten wir keine weiteren Anpassungen aus.

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	20,00	00:00:00				
1	-10,50	00:20:20	-30,50	00:20:20	-1,50	
2	-23,50	00:20:40	-13,00	00:00:20	-39,00	
3	-20,50	00:20:58	3,00	00:00:18	10,00	
4	-20,50	00:21:58	0,00	00:01:00	0,00	
5	-22,00	00:22:58	-1,50	00:01:00	-1,50	
6	-130,00	00:40:58	-108,00	00:18:00	-6,00	
7	-150,00	00:41:28	-20,00	00:00:30	-40,00	

Abbildung 33: Einfrierprogramm 25 für IceCube 11XS

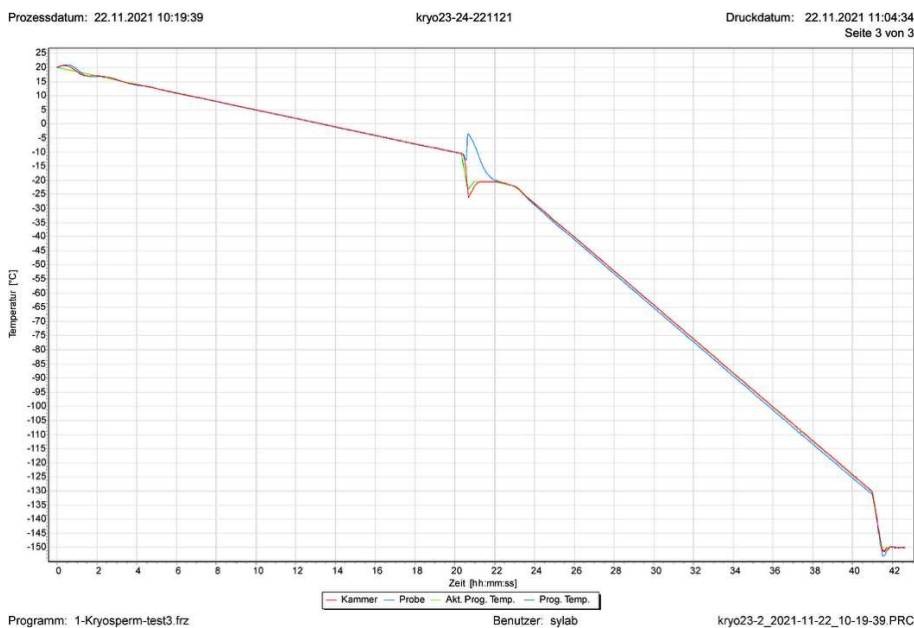


Abbildung 34: Einfrierkurve 25 zu Einfrierprogramm 25

Abbildung 34 zeigt einen akzeptablen Temperaturverlauf: Die Sturzkühlung setzte kurz vor dem Eintreten des Kristallisationskomplexes ein. Dadurch konnte den Auswirkungen der Kristallisationswärme in geeignetem Maß gegengesteuert werden, das Ausmaß des Temperaturanstiegs lag mit ca. 7-8 °C in einem akzeptablen Bereich. Der darauf anschließende Temperaturabfall konnte durch die kurze Erwärmungsphase und Haltephase gut gesteuert werden: Über den Verlauf von ca. 1,5 Minuten sank die Temperatur kontrolliert um ca. -16 °C. Zur weiteren Optimierung des Einfrierprogramms nahmen wir kleine Anpassungen an der Haltephase (Verkürzung der Dauer auf 50 Sekunden), der Abkühlrate der Sturzkühlung (Steigerung auf -40 °C/min)

und der abschließenden Abkühlung nach der Sturzkühlung (kontinuierliche Abkühlung mit einer Rate von -6 °C/min) vor (Einfrierprogramm 26 und 27).

Prozessdatum: 28.11.2021 16:20:47

kryo27-28-281121

Einfrierprogramm-Liste

Segm	Endtemp. [°C]	Abs.Zeit [hh:mm:ss]	Rel.Temp [°C]	Rel.Zeit [hh:mm:ss]	Rampe [°C/min]	Getrigger von
0	20,00	00:00:00				
1	-11,50	00:21:00	-31,50	00:21:00	-1,50	
2	-23,50	00:21:18	-12,00	00:00:18	-40,00	
3	-20,50	00:21:36	3,00	00:00:18	10,00	
4	-20,50	00:22:26	0,00	00:00:50	0,00	
5	-130,00	00:40:41	-109,50	00:18:15	-6,00	
6	-150,00	00:41:11	-20,00	00:00:30	-40,00	

Abbildung 35: Einfrierprogramm 27 für IceCube 11 XS

Nach Erreichen der Starttemperatur von 20 °C begann die kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlrate von $-1,5\text{ °C/min}$ (Segment 1). Bei -12 °C setzte die Sturzkühlung mit einer Abkühlrate von -40 °C/min ein (Segment 2), darauf folgten eine 18 Sekunden andauernde Erwärmungsphase mit einer Erwärmungsrate von 10 °C/min (Segment 3) und eine 50 Sekunden andauernde Haltephase (Segment 4). Anschließend erfolgte die kontinuierliche Abkühlung mit einer Abkühlungsrate von -6 °C/min (Segment 6), ab -130 °C betrug die Abkühlungsrate -40 °C/min .

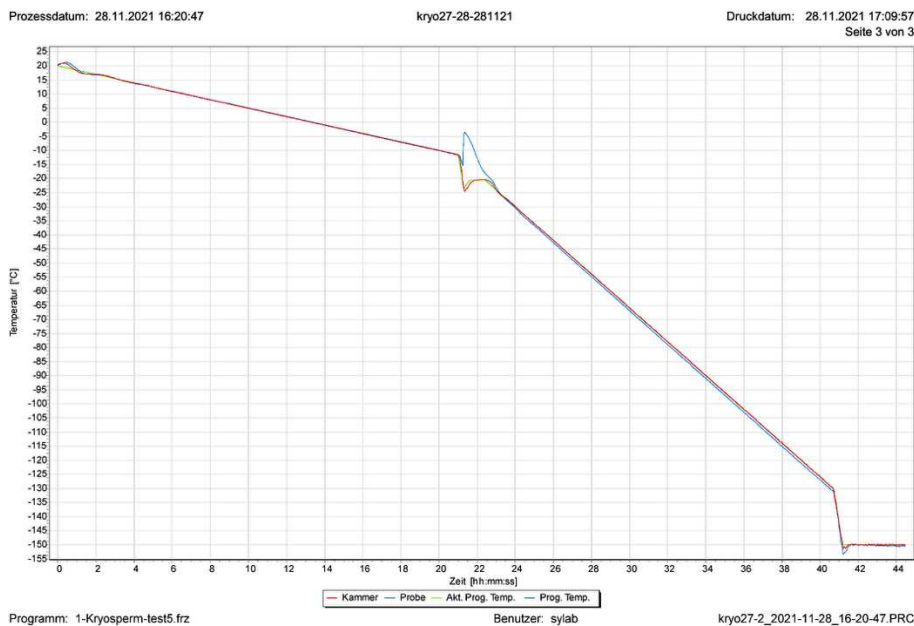


Abbildung 36: Einfrierkurve 27 für Einfrierprogramm 27

Abbildung 36 zeigt den optimierten Temperaturverlauf infolge des Einfrierprogramms 27: Durch die adaptierte Sturzkühlung konnte die Kristallisationswärme gut abgefangen werden, der anschließende Temperaturabfall verlief kontrolliert. Die Empfehlungen der WHO konnten umgesetzt werden. Somit stellte das Einfrierprogramm 27 das optimierte

Protokoll für den Einfrierprozess mittels IceCube-Einfriergerät dar, welches in der Folge zur Validierung genutzt wurde.

2.5.2.2 Validierung des neuen Einfrierprotokolls

Zur abschließenden Validierung des in dieser Arbeit entwickelten Einfrierprotokolls für die Kryokonservierung mittels IceCube 11XS erfolgte die Durchführung von 11 Kryokonservierungen im direkten Vergleich mit dem Nicool-Einfriergerät: Das Ejakulat von 11 Probanden wurde nach erfolgter Spermioqrammagnostik und Aufbereitung jeweils in zwei Teilmengen geteilt, ein Teil hiervon wurde mittels Nicool LM 10 kryokonserviert, der andere Teil wurde mittels IceCube 11XS kryokonserviert. Beide Einfriergeräte wurden nach ihrem jeweiligen Protokoll betrieben: das IceCube-Einfriergerät mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll und das Nicool-Einfriergerät nach dem etablierten Laborstandard (siehe Anhang 7.2, 7.3). Nach anschließender Lagerung der eingefrorenen Proben in flüssigem Stickstoff bei -196 °C für mindestens 24 Stunden erfolgte die Auftaukontrolle, um in der Folge die Ergebnisse der beiden Methoden im direkten Vergleich analysieren zu können.

2.6 Qualitätskontrolle der Kryokonservierung

2.6.1 Auftauprozess

Nach dem Prozess der Kryokonservierung und anschließender Lagerung der Straws in den dafür vorgesehenen Lagergefäßen bei -196 °C für mindestens 24 Stunden erfolgte die Qualitätskontrolle (Auftaukontrolle) der Proben. Pro Teilprobe wurden jeweils zwei Straws entnommen. Der Auftauprozess wurde gemäß des laborinternen Standardprotokolls (siehe Anhang 7.2.) durchgeführt, welches sich an den WHO-Vorgaben orientierte: Nach Entnahme der Straws aus dem Lagerungsbehälter wurden diese zunächst für 3 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, eine anschließende weitere Erwärmung erfolgte durch Lagerung der Straws in einem Wasserbad im Wärmeschrank bei $35\text{-}37\text{ °C}$ für 20 Minuten. Für die mikroskopische Untersuchung wurde der jeweilige Straw mit einer Schere aufgeschnitten und ein Tropfen des Probeninhalts durch manuellen Druck auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Motilität und Vitalität.

2.6.2 Diagnostik der Auftaukontrollen

Die nachfolgenden Untersuchungen orientierten sich methodisch an der Spermioigrammdiagnostik des Nativejakulats, um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

2.6.2.1 Bestimmung der Motilität

Die Spermien wurden unter einem Durchlichtmikroskop (400-fache Vergrößerung) hinsichtlich ihrer Beweglichkeit klassifiziert. Es erfolgte die Bewertung und Einteilung gemäß den WHO-Kriterien (WHO, 2010) in:

- Progressiv bewegliche Spermien (PR)
- Nicht-progressiv bewegliche Spermien (NP)
- Immobilie Spermien (IM)

Pro Teilprobe wurden zwei Straws zur Auftaukontrolle verwendet, aus deren Ergebnissen dann der Mittelwert berechnet wurde. Es wurden mindestens fünf zufällige Sichtfelder (entsprechend ≥ 200 Spermien) ausgewertet und die prozentualen Anteile der jeweiligen Kategorie berechnet.

2.6.2.2 Bestimmung der Vitalität (Eosintest)

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mittels Eosin-Färbung. Hierfür wurde dem frisch auf den Objektträger auftragenen Probeninhalt 10 μ l einer 0,5 %igen Eosinlösung beigefügt und kurz homogenisiert. Nach einer 30 Sekunden andauernden Inkubation wurden die Zellen erneut unter 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet. Intakte Spermienmembranen verhinderten die Farbstoffaufnahme und blieben farblos, während tote Spermien Eosin aufnahmen und rot erschienen. Diese Prozesse ermöglichten die Erfassung der vitalen und nicht vitalen Spermien.

2.6.3 Abschluss des Kryokonservierungsprozesses

Alle Schritte des Einfrier- und Auftauprozesses wurden vollständig auf dem Formular „Arbeitsanweisung und Protokoll – Kryokonservierung von Humansperma“ protokolliert (siehe Anhang 7.2). Die Durchführung wurde

jeweils mit Zeitangabe, Angabe der durchführenden Person sowie deren Unterschrift bestätigt.

2.7 Datenerfassung und Datenauswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der erhobenen Daten wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 10.4.2) durchgeführt. Zur deskriptiven Aufbereitung wurden der Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) sowie der Median mit Interquartilsabstand (IQR) berechnet und in tabellarischer Form sowie mittels Boxplot-Diagrammen dargestellt. Für den Vergleich der Gruppen wurden nicht-parametrische Tests angewendet, da hinsichtlich der erhobenen Daten keine Normalverteilung vorlag. Beim Vergleich der Verschlussmethoden wurde der Friedman-Test für den Vergleich von drei gepaarte Stichproben eingesetzt. Hinsichtlich der Kryokonservierungsergebnisse erfolgte der Vergleich von zwei verbundenen Stichproben mittels Wilcoxon-Test. Ein p-Wert unter dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet ($p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Spermendiagnostik im Nativejakulat

Die Studie umfasste insgesamt 30 Probanden. Der überwiegende Anteil der erfassten Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen im Nativejakulat lag im Referenzbereich. Zur Determinierung dieses Referenzbereichs wurde sich auf die von der WHO festgelegten Richtlinien bezogen (WHO, 2010). Da zum Zeitpunkt der Datenerhebung die aktualisierte Fassung des Laborhandbuchs (6. Auflage) noch nicht veröffentlicht war, wurden zur Beurteilung der Ergebnisse die Werte der 5. Auflage herangezogen.

Bei zwei Probanden (6,67 %) lag die Volumenmenge des Ejakulats unter der Grenze des Referenzbereichs (Norm $\geq 1,5$ ml). Hinsichtlich der Spermienkonzentration zeigten sich bei drei Probanden (10 %) pathologische Auffälligkeiten. Bei jeweils einem Probanden (je 3,33 %) lag eine leichte Oligozoospermie, mäßige Oligozoospermie und eine Azoospermie vor. Die Spermiengesamtzahl war bei zwei Probanden (6,67 %) unterhalb des

Referenzbereichs (≥ 39 Millionen Spermien pro Ejakulat). Die Gesamtmotilität (PR + NP) der Spermien war bei einem Probanden (3,33 %) erniedrigt (Norm ≥ 40 %). Die progressive Motilität (PR) lag bei vier Probanden (13,33 %) unterhalb des Referenzwerts (Norm ≥ 32 %).

Tabelle 1: Ergebnisse der untersuchten Parameter im Nativejakulat, angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand)

n = 30	Mittelwert \pm SD	Median (IQR)
Volumen (in ml)	3,28 \pm 1,51	3,0 (2,0 – 4,48)
pH-Wert	7,6 \pm 0,18	7,7 (7,5 – 7,7)
Spermiendichte (in Mio./ml)	89,67 \pm 81,71	66,0 (46,75 – 114,5)
Spermiengesamtzahl (in Mio.)	245,74 \pm 154,52	246,1 (139,88 – 309,23)
Gesamtmotilität (in %)	62,37 \pm 15,31	63,5 (57,5 – 70,5)
Progressive Motilität (in %)	43,83 \pm 14,91	44,0 (33,0 – 52,5)
Nicht-progressive Motilität (in %)	18,53 \pm 7,93	15,5 (13,75 – 25,25)

3.2 Vergleich der Verschlussmethoden

Bei dem Vergleich der drei unterschiedlichen Verschlussmethoden der Straws wurden die Vitalität der Spermien und die Überlebensrate bezogen auf die Gesamtmotilität (PR + NP) und die progressive Motilität (PR) der Spermien nach dem Einfrieren und Auftauen beurteilt. Die Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil der Motilität nach Auftauen im Verhältnis zur Motilität im Nativejakulat berechnet:

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{Motilität nach Auftauen}}{\text{Motilität Nativejakulat}} \times 100 \%$$

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine sehr kleine Stichprobe von nur 4 Probanden verwendet. Aufgrund der geringen Stichprobengröße kann von keiner Normalverteilung ausgegangen werden. Aufgrund dessen wurden die deskriptiven Kennwerte wie der Median der Daten verwendet, um die Verteilung der Daten zu beurteilen und graphisch darzustellen.

Tabelle 2: Parameter der Spermienanalyse nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels Nicool-Einfriergerät in Abhängigkeit der verwendeten Verschlussmethode; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen

n = 4	Kugerverschluss		CryoSealer (2,5 s)		CryoSealer (4,9 s)		p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median (IQR)	Mittelwert \pm SD	Median (IQR)	Mittelwert \pm SD	Median (IQR)	
Vitalität (in %)	46,68 \pm 8,0	45,35 (40,0 – 54,68)	45,65 \pm 4,52	46,65 (41,0 – 49,30)	48,85 \pm 10,07	50,85 (38,43 – 57,28)	0,982
Überlebensrate der Gesamtmotilität (in %)	17,86 \pm 11,77	13,95 (9,31 – 30,31)	20,67 \pm 9,47	18,60 (12,9 – 30,51)	21, 23 \pm 17,77	15,81 (8,05 – 39,84)	0,931
Überlebensrate der Progressivmotilität (in %)	14,66 \pm 15,42	9,77 (3,45 – 30,75)	9,54 \pm 8,32	9,29 (1,61 – 17,71)	11,44 \pm 14,63	4,74 (3,03 – 26,56)	0,241

Zwischen den drei untersuchten Gruppen zeigten sich hinsichtlich der gemessenen Parameter keine statistisch signifikanten Unterschiede (alle $p > 0,05$). Der größte Anteil an vitalen Spermien zeigte sich bei der Verschlussmethode mit Wärmeversiegelung mit dem CryoSealer mit der Verschweißdauer von 4,9 Sekunden. Hinsichtlich der Überlebensrate aller beweglichen Spermien (Gesamtmotilität) ergaben sich die höchsten Werte bei der Wärmeversiegelung mittels CryoSealer mit der Verschweißdauer von 2,5 Sekunden. Die Werte der Überlebensrate der progressiv beweglichen Spermien (Progressivmotilität) waren bei der konventionellen Kugerverschlussmethode am höchsten.

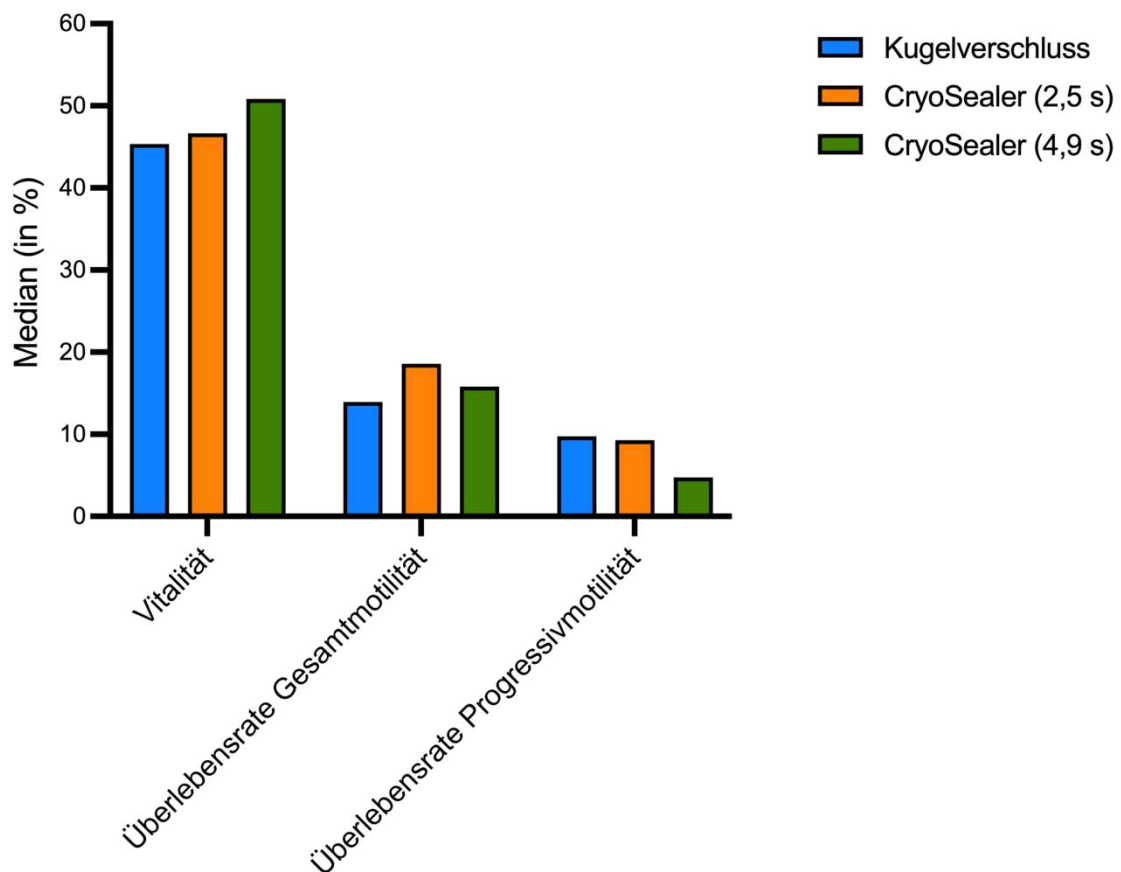


Abbildung 37: Darstellung der Vitalität und Überlebensrate aller beweglichen sowie progressiv beweglichen Spermien nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit der verwendeten Verschlussmethode

Die grafische Darstellung in Abbildung 37 verdeutlicht, dass zwischen den drei getesteten Verschlussmethoden keine ausgeprägten Unterschiede hinsichtlich der Vitalität und Motilität der Spermien nach Kryokonservierung bestehen. Die Wärmeversiegelung mittels CryoSealer liefert unabhängig von der Verschweißdauer vergleichbare Ergebnisse im Vergleich zur konventionellen Kugelverschlussmethode.

Die Unterschiede in den Medianwerten sind gering und statistisch nicht signifikant. Die CryoSealer-Methode mit längerer Verschweißdauer (4,9 s) erzielt tendenziell die höchsten Vitalitätswerte, während die Methode mit der verkürzten Verschweißdauer (2,5 s) bei der Gesamtmotilität leicht im Vorteil ist. Hinsichtlich der Überlebensrate der progressiv beweglichen Spermien bleibt die konventionelle Methode mittels Kugelverschluss minimal führend.

3.3 Spermienmotilität nach Kryokonservierung mit Nicool-Einfriergerät

Bei den folgenden Analysen wurden die Daten berücksichtigt, welche nach Entwicklung des endgültigen Einfrierprotokolls (Einfrierprogramm 27, siehe Abb. 35) am IceCube-Einfriergerät im Rahmen der Validierung (siehe Abschnitt 2.5.2.2) erhoben wurden. Grundlage für die Datenerhebung bildeten die Ejakulatproben, bei denen hinsichtlich der Spermienanalyse im Nativejakulat physiologische Referenzwerte vorlagen.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Spermienanalyse im nativen Ejakulat sowie nach Kryokonservierung mittels Nicool-Einfriergerät und anschließendem Auftauen dargestellt. Sowohl die Gesamtmotilität (PR + NP) als auch die Progressivmotilität (PR) der Spermien zeigen nach dem Einfrier- und Auftauprozess einen statistisch signifikanten Rückgang im Vergleich zum Nativzustand ($p = 0,001$).

Tabelle 3: Parameter der Spermienanalyse im Nativejakulat sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels Nicool-Einfriergerät; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen

n = 11	Nativ		Nicool		p-Wert
	M \pm SD	Median (IQR)	M \pm SD	Median (IQR)	
Gesamtmotilität (in %)	64,82 \pm 8,13	67,0 (62,0 - 70,0)	22,0 \pm 9,72	19,50 (14,50 – 27,0)	0,001
Progressivmotilität (in %)	48,55 \pm 10,19	52,0 (41,0 – 54,0)	10,77 \pm 6,31	9,0 (5,50 – 15,0)	0,001

3.4 Spermienmotilität nach Kryokonservierung mit IceCube-Einfriergerät

Im Vergleich zum nativen Ejakulat zeigt sich nach Kryokonservierung mittels des IceCube-Einfriergeräts und anschließendem Auftauprozess bei der Gesamtmotilität (PR + NP) und Progressivmotilität (PR) ein statistisch signifikanter Rückgang ($p = 0,001$; vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Parameter der Spermienanalyse im Nativejakulat sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels IceCube-Einfriergerät; angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen

n = 11	Nativ		IceCube		p-Wert
	M \pm SD	Median (IQR)	M \pm SD	Median (IQR)	
Gesamtmotilität (in %)	64,82 \pm 8,13	67,0 (62,0 - 70,0)	22,73 \pm 10,79	20,0 (17,0 - 24,0)	0,001
Progressivmotilität (in %)	48,55 \pm 10,19	52,0 (41,0 - 54,0)	11,82 \pm 7,46	9,50 (7,0 - 15,0)	0,001

3.5 Vergleich der Kryokonservierungsergebnisse zwischen Nicool- und IceCube-Einfriergerät

Tabelle 5: Parameter der Spermienanalyse nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube); angegeben in Mittelwert (\pm Standardabweichung) und Median (Interquartilsabstand), jeweilige Signifikanzen

n = 11	Nicool		IceCube		p-Wert
	M \pm SD	Median (IQR)	M \pm SD	Median (IQR)	
Gesamtmotilität (in %)	22,0 \pm 9,72	19,50 (14,50 - 27,0)	22,73 \pm 10,79	20,0 (17,0 - 24,0)	0,757
Progressivmotilität (in %)	10,77 \pm 6,31	9,0 (5,50 - 15,0)	11,82 \pm 7,46	9,50 (7,0 - 15,0)	0,409
Vitalität (in %)	49,27 \pm 11,44	48,50 (40,0 - 62,0)	54,82 \pm 9,42	56,0 (47,0 - 61,0)	0,026*
Überlebensrate der Gesamtmotilität (in %)	33,08 \pm 11,70	30,0 (23,39 - 39,13)	34,16 \pm 13,26	31,25 (25,0 - 35,83)	0,831
Überlebensrate der Progressivmotilität (in %)	21,50 \pm 9,99	21,95 (10,58 - 31,52)	23,20 \pm 10,50	20,20 (15,0 - 27,78)	0,520

*p < 0,05

In Tabelle 5 sind die Parameter der Spermienanalyse nach dem Einfrier- und Auftauprozess mittels der beiden untersuchten Einfriergeräte (Nicool, IceCube) gegenübergestellt. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) sowie die Mediane (Interquartilsabstand) zeigen, dass sich die Werte für Gesamtmotilität, Progressivmotilität, Vitalität sowie die Überlebensraten der Gesamt- und Progressivmotilität zwischen beiden Systemen unterscheiden.

Für die Gesamtmotilität und Progressivmotilität zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,757$ bzw. $p = 0,409$). Dennoch ist bei beiden Parametern ein numerisch leicht höherer Mittelwert und Median im IceCube-System zu beobachten. Auch bei den Überlebensraten der Gesamtmotilität ($p = 0,831$) sowie der Progressivmotilität ($p = 0,520$) bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die mittleren Überlebensraten liegen jedoch ebenfalls geringfügig höher beim IceCube-System. Ein statistisch signifikanter Unterschied wird bei der Vitalität festgestellt. Hier zeigt das IceCube-System im Vergleich zum Nicool-System einen höheren Mittelwert sowie Median, wobei der Unterschied statistisch signifikant ist ($p = 0,026$; vgl. Tabelle 5).

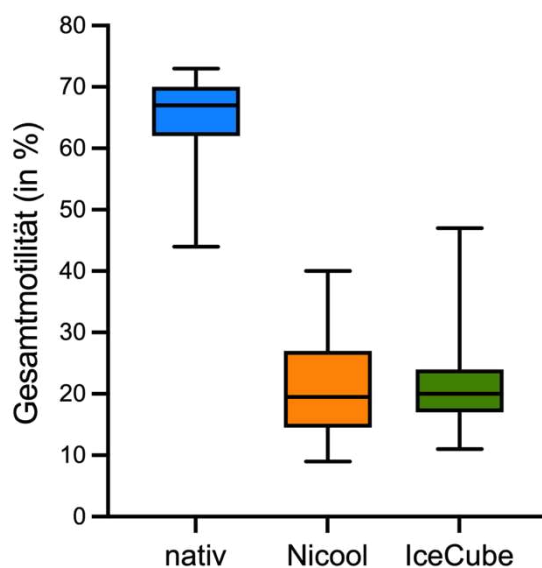


Abbildung 38: Darstellung der Gesamtmotilität vor dem Einfrieren (nativ) sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube)

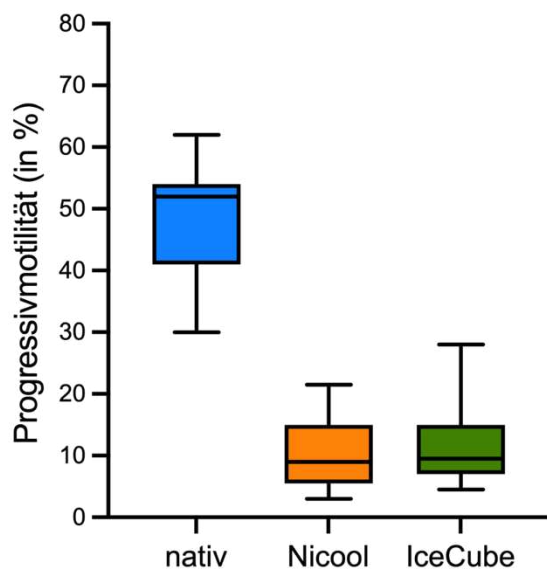


Abbildung 39: Darstellung der Progressivmotilität vor dem Einfrieren (nativ) sowie nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube)

Die in Abbildung 38 und 39 gezeigten Boxplots veranschaulichen einen deutlichen Rückgang der Gesamtmotilität sowie der Progressivmotilität nach Kryokonservierung und Auftauprozess im Vergleich zum Nativejakulat. Zwischen den beiden verwendeten Einfriergeräten ist kein ausgeprägter Unterschied erkennen, wobei jedoch mittels IceCube bei der Gesamtmotilität sowie Progressivmotilität tendenziell leicht bessere Werte erzielt werden.

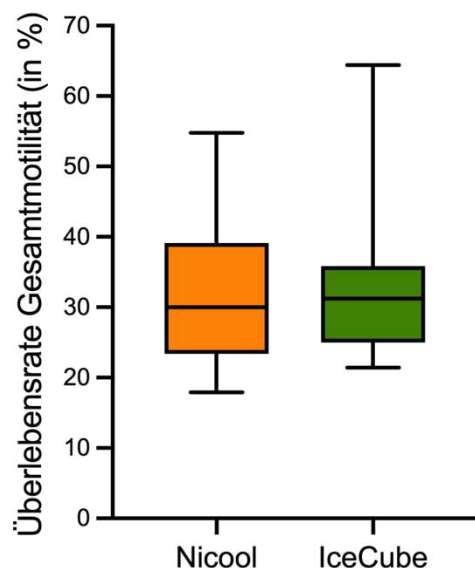


Abbildung 40: Darstellung der Überlebensrate der Gesamtmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube)

Abbildung 40 zeigt, dass bei der Überlebensrate der Gesamtmotilität kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Einfriersystemen vorliegt ($p = 0,831$). Die Medianwerte beider Gruppen liegen mit 30,0 % (Nicool) bzw. 31,25 % (IceCube) nahezu gleichauf. Auch der Interquartilsabstand zeigt eine vergleichbare Verteilung. Während die IceCube-Gruppe tendenziell etwas höhere Maximalwerte aufweist, ist die Gesamtstreuung der Daten in beiden Gruppen ähnlich

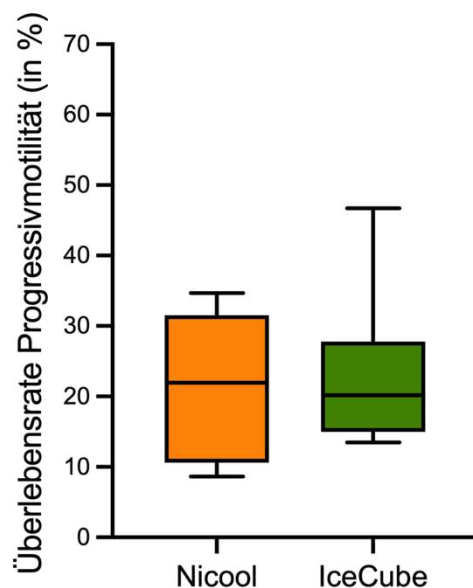


Abbildung 41: Darstellung der Überlebensrate der Progressivmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess in Abhängigkeit vom verwendeten Einfriergerät (Nicool, IceCube)

Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Überlebensrate der Progressivmotilität (siehe Abbildung 41). Die Überlebensrate der Progressivmotilität unterscheidet sich zwischen dem Nicool- und dem IceCube-Einfriergerät nicht signifikant ($p = 0,520$). Die Medianwerte liegen mit 21,95 % (Nicool) bzw. 20,20 % (IceCube) nahezu gleichauf. Auch der Interquartilsabstand und die Gesamtstreuung der Werte zeigen eine weitgehende Überlappung. Das IceCube-Einfriergerät weist zwar einzelne höhere Maximalwerte auf, jedoch ohne statistische Relevanz.

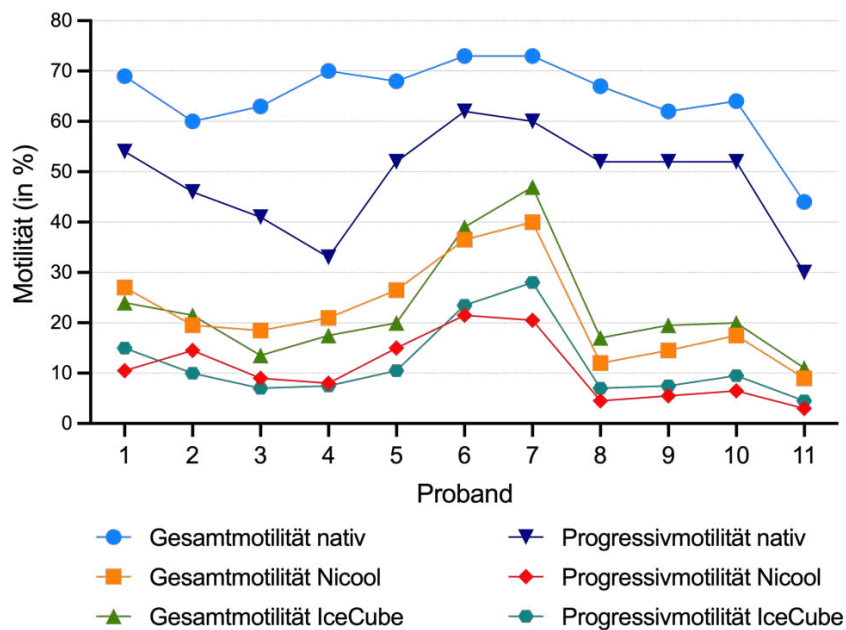


Abbildung 42: Darstellung der Gesamt- und Progressivmotilität im Nativejakulat sowie nach Einfrier- und Auftauprozess mit je Nicool- und IceCube-Einfriergerät, Werte der einzelnen Probanden

Abbildung 42 zeigt die Gesamt- und Progressivmotilität der Spermien im Nativejakulat sowie nach Einfrier- und Auftauprozess mit dem Nicool- und dem IceCube-Einfriergerät, jeweils getrennt für die einzelnen Probanden (n = 11). Native Proben zeigen die höchsten Werte sowohl für die Gesamt- als auch für die Progressivmotilität (meist zwischen 60–75 % bzw. 40–60 %), mit erwartungsgemäß individuellen Schwankungen zwischen den Probanden. Nach Kryokonservierung ist bei beiden Geräten ein deutlicher Abfall der Motilitätswerte zu erkennen. Die Werte für Gesamt- und Progressivmotilität liegen nun überwiegend im Bereich von 10–35 %. Die Motilitätswerte nach Kryokonservierung mit dem IceCube-Einfriergerät sind tendenziell höher als nach Kryokonservierung mit dem Nicool-Einfriergerät, sowohl für die Gesamt- als auch für die Progressivmotilität.

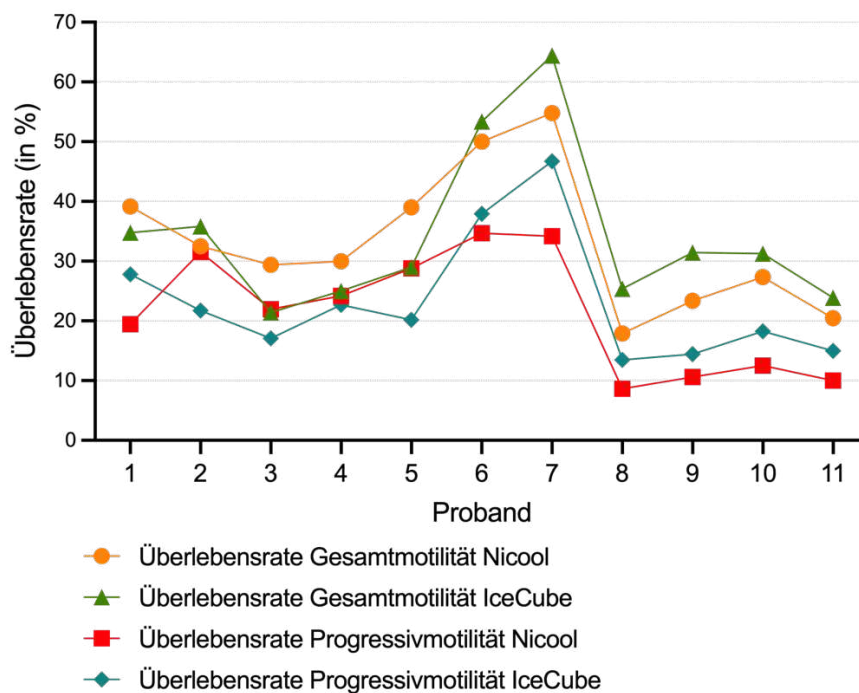


Abbildung 43: Darstellung der Überlebensraten hinsichtlich der Gesamt- und Progressivmotilität nach dem Einfrier- und Auftauprozess mit je Nicool- und IceCube-Einfriergerät, Werte der einzelnen Probanden

Abbildung 43 kann entnommen werden, dass die Überlebensrate der Gesamtmotilität nach Kryokonservierung mit dem IceCube-Einfriergerät bei fast allen Probanden höher ist als mit dem Nicool-Einfriergerät. Die Werte liegen überwiegend zwischen 20 % und 65 %, wobei der Unterschied zwischen den beiden Geräten bei einigen Probanden besonders deutlich ausfällt (z.B. Proband 7). Auch bei der Progressivmotilität zeigt sich eine tendenziell höhere Überlebensrate nach Verwendung des IceCube-Einfriergeräts im Vergleich zum Nicool-Einfriergerät. Die Werte liegen meist zwischen 10 % und 40 %, wobei die IceCube-Kurve fast durchgehend über der Nicool-Kurve verläuft. Es bestehen deutliche interindividuelle Unterschiede in den Überlebensraten zwischen den einzelnen Probanden, sowohl für die Gesamt- als auch für die Progressivmotilität. Bei einem Großteil der Probanden lässt sich die Tendenz erkennen, dass die IceCube-Kurven die Nicool-Kurven übersteigen.

4 Diskussion

Der Fertilitätserhalt hat in den vergangenen Jahren insbesondere im Kontext onkologischer Erkrankungen an Bedeutung gewonnen. Durch Fortschritte in der

onkologischen Therapie überleben heute zunehmend mehr Patienten ihre Grunderkrankung langfristig, sodass die Sicherung der reproduktiven Zukunft zu einem zentralen Bestandteil der klinischen Versorgung geworden ist (Tournaye et al., 2014, Pacey and Eiser, 2014). Da chemo- und radiotherapeutische Behandlungen zu irreversiblen Schäden der Keimzellen führen können, stellt die Kryokonservierung von Spermien vor Beginn der Therapie die wichtigste und oftmals einzige Möglichkeit dar, die Zeugungsfähigkeit zu sichern (Su et al., 2025).

Die Kryokonservierung humaner Spermienzellen bietet die Möglichkeit, auch nach Abschluss der onkologischen Therapie biologische Nachkommen zu zeugen, selbst wenn die natürliche Fertilität dauerhaft beschädigt wurde. Dies kann zur Lebensqualität und psychischen Gesundheit der Patienten beitragen, da dies einen positiven Einfluss auf die Lebensplanung und das Wohlbefinden der Patienten haben kann (Kimelman et al., 2023, Schmidt et al., 2016).

Vor diesem Hintergrund kommt der Optimierung der Kryokonservierung humaner Spermienzellen eine hohe Relevanz zu. Da die Ausgangsqualität des Ejakulats vieler onkologischer Patienten aufgrund der Grunderkrankung oder begleitender Faktoren häufig bereits vor Therapiebeginn eingeschränkt ist, kann eine möglichst schonende Kryokonservierung entscheidend dafür sein, ob das Material später für assistierte Reproduktionsverfahren verwendbar ist.

4.1 Verschlussmethode

4.1.1 Einordnung in die Studienlage

Der Verschluss von Kryostraws stellt einen zentralen Verfahrensschritt im Rahmen der Kryokonservierung dar, da die Funktionsweise und insbesondere die Dichtigkeit des Verschlusses maßgeblich die Sicherheit und Qualität der Proben beeinflussen können. So konnten Bajerski et al. (2021) aufzeigen, dass in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks, welche zur Lagerung von kryokonservierten Proben genutzt werden, das Risiko einer mikrobiellen Kontamination besteht. Es ist bekannt, dass bereits geringfügige Leckagen den Kontakt der Proben mit flüssigem Stickstoff oder kontaminierten Dämpfen ermöglichen können, was die Übertragung von potenziellen Pathogenen

begünstigt (Bielanski and Vajta, 2009). Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos sind geschlossene Systeme wie thermisch versiegelte Straws geeignet (Joaquim et al., 2017, Bielanski, 2012).

Die konventionelle Kugelverschlussmethode, die bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit im uroonkologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen etabliert war, erfüllt diese Anforderungen nur eingeschränkt. So ist die Dichtigkeit des Verschlusses abhängig vom manuellen Einsetzen der Metallkugel in das offene Ende des Kryostraws. Variationen in Kraft, Positionierung oder Materialbeschaffenheit können zu geringfügigen Leckagen führen. Die daraus ebenfalls resultierende Anwenderabhängigkeit bedingt eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit und erschwert die Standardisierbarkeit des Prozesses. Da die Verschlusskugel mechanisch in den Straw eingepresst wird, besteht das Risiko eines nicht vollständig hermetischen Verschlusses. Dies resultiert in einem Risiko für ungleiche Druckverhältnisse innerhalb des Straws, was negative Auswirkungen auf das Ergebnis des Einfrier- als auch Auftauprozesses haben kann. Darüber hinaus macht der gegebenenfalls unvollständig abgedichtete Verschluss das System anfällig für mikrobiologische oder virale Kontaminationen, da das Eindringen von Stickstoffflüssigkeit oder -dämpfen nicht sicher verhindert wird.

Seitens des WHO-Laborhandbuchs (WHO, 2021) wird die Verwendung von geschlossenen Gefäßsysteme ausdrücklich empfohlen, um die genannten Risiken zu minimieren. Nationale Vorgaben wie die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Bundesärztekammer, 2023) betonen die Notwendigkeit standardisierter, reproduzierbarer Prozesse im Bereich der Ejakalutuntersuchung, welche sich auch auf die Verfahren der Kryokonservierung übertragen lassen.

Dementsprechend war die Entwicklung und Etablierung einer neuen Verschlussmethode mittels Wärmeversiegelung für die klinische Routine Ziel der vorliegenden Arbeit, um dadurch die Umsetzung der aktuellen Anforderungen gewährleisten zu können.

4.1.2 Interpretation der Ergebnisse

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Analyse der Verschlussmethoden konnten wir zeigen, dass die Wärmeversiegelung mittels CryoSealer sowohl mit einer Verschweißdauer von 2,5 Sekunden als auch 4,9 Sekunden eine mindestens gleichwertige, teilweise sogar überlegene Alternative zur herkömmlichen Methode mittels Kugelverschluss darstellt. Hinsichtlich der nach dem Einfrier- und Auftauprozess erhobenen Parameter (Vitalität, Gesamtmotilität und Progressivmotilität der Spermien) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Methoden. Die Wärmeversiegelung erzielte Werte, die denen des Kugelverschlusses entsprechen oder diese leicht übertreffen. Im direkten Vergleich der beiden getesteten Verschweißdauern zeigte sich, dass die Methode mit der kürzeren Verschweißdauer (2,5 Sekunden) in Bezug auf die Überlebensrate der progressiv motilen und der insgesamt motilen Spermien zu tendenziell besseren Ergebnissen führte. Zusätzlich ergaben unsere Untersuchungen, dass alle mittels CryoSealer verschweißten Straws in den Dichtigkeitsprüfungen eine vollständige Abdichtung ohne Austritt von Flüssigkeit zeigten, unabhängig von der Schweißdauer.

4.1.3 Klinische Relevanz der Wärmeversiegelung

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Wärmeversiegelung den bisherigen Standard des Kugelverschlusses hinsichtlich der untersuchten Parameter erreicht oder übertrifft. Durch das thermische Verschließen entsteht ein geschlossenes System, das den Vorgaben des WHO-Laborhandbuchs entspricht. Dadurch wird das Risiko einer Kontamination oder eines unbeabsichtigten Kontakts der Proben mit flüssigem Stickstoff effektiv reduziert und es zeigen sich deutliche Vorteile hinsichtlich Prozesssicherheit und Hygiene.

Darüber hinaus weist die Wärmeversiegelung eine bessere Standardisierbarkeit und ein geringeres Fehlerpotenzial auf, da der Verschlussprozess nicht mehr von manueller Kraft und individueller Technik abhängt. Aus der neuen Methode mit einer Verschweißdauer von 2,5 Sekunden

ergeben sich zudem Vorteile hinsichtlich der Arbeitsorganisation, da die verkürzte Schweißdauer eine effiziente Durchführung und optimierten Arbeitsablauf ermöglichen, ohne die Probenqualität zu beeinträchtigen.

Auf Basis dieser Befunde und der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Validierung konnte die Wärmeversiegelung mittels CryoSealer mit einer Verschweißdauer von 2,5 Sekunden als neuer Standard im uroonkologischen Labor des Universitätsklinikums Tübingen etabliert werden.

4.2 Kryokonservierungsprotokoll für IceCube 11XS

Im Rahmen der Protokollentwicklung wurden mehr als 20 Einfrierprogramme mit unterschiedlichen Abkühlraten getestet. Dabei traten wiederholt kurvenartige Temperaturschwankungen in den aufgezeichneten Temperaturverläufen auf, die sich im weiteren Verlauf als Folge eines technischen Defekts erwiesen. Erst nach einer Neuinstallation der Sensoren zur Temperaturmessung in Kammer und Probe sowie einer erneuten Inbetriebnahme des unterstützenden Computersystems des IceCube 11XS war eine zielgerichtete Entwicklung und Optimierung des Einfrierprotokolls möglich.

4.2.1 Einordnung in die Studienlage

Trotz der großen klinischen Bedeutung der Kryokonservierung existieren bislang nahezu keine wissenschaftlich fundierte Daten zu Einfrierprotokollen für humane Spermienzellen. Der überwiegende Teil der verfügbaren Literatur beschreibt die unterschiedlichen Methoden der Kryokonservierung, ohne dabei konkrete Angabe zu den Einfrierprotokollen zu machen. So nennen zum Beispiel Mangoli et al. (2025) die möglichen Bereiche der Abkühlraten der verschiedenen Kryokonservierungsmethoden, spezifische anwendungsbezogene Angaben fehlen jedoch.

Bei der Entwicklung von Kryokonservierungsprotokollen, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, kann daher im Wesentlichen auf die theoretischen Grundlagen der Kryobiologie zurückgegriffen werden, die zentrale Prinzipien der kontrollierten Abkühlung, Dehydratation und Eiskristallbildung beschreiben. Diese Konzepte dienen somit als wichtige Orientierung, enthalten jedoch keine

spezifische Informationen zu praxisrelevanten Parametern wie den genauen Abkühlraten oder Temperaturverläufen.

So stellt das WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates (WHO, 2021) die einzige etablierte Quelle dar, die Angaben zur praktischen Durchführung der Kryokonservierung enthält. Allerdings handelt es hierbei ausschließlich um allgemeine Richtwerte, gerätespezifische Besonderheiten werden nicht berücksichtigt.

Vor diesem Hintergrund war das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Lücke zu adressieren und ein optimiertes Einfrierprotokoll für das Einfriergerät IceCube 11XS zu entwickeln.

4.2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zunächst, dass sowohl unter Verwendung des Nicool- als auch des IceCube-Einfriergeräts der erwartbare, in der Literatur gut beschriebene Rückgang der Spermienmotilität (Gesamtmotilität sowie Progressivmotilität) nach Kryokonservierung auftritt. Sowohl Gesamtmotilität als auch Progressivmotilität nahmen bei beiden Geräten im Vergleich zum nativen Ejakulat signifikant ab ($p = 0,001$).

Beim Vergleich der beiden Einfriersysteme zeigen sich hinsichtlich Gesamt- und Progressivmotilität nach dem Auftauen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dennoch lässt sich aus den deskriptiven Daten ein leichtes, aber konsistentes Muster erkennen: Die Motilitätswerte und Überlebensraten liegen bei der Kryokonservierung mittels IceCube-Einfriergerät durchweg etwas höher als beim Nicool-Einfriergerät. Auch wenn diese Unterschiede aufgrund der begrenzten Stichprobengröße statistisch nicht abgesichert werden können, ist aufgrund der Tendenz der Effekte anzunehmen, dass das IceCube-Protokoll möglicherweise günstiger auf die funktionelle Integrität der Spermienzellen wirkt.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Vitalität, die im IceCube-System mit einem Median von 56,0 % deutlich höher lag als im Nicool-System (48,5 %, $p = 0,026$). Dieser Befund könnte durch die präzisere

Temperaturführung des IceCube erklärt werden. Das IceCube-Gerät erlaubt eine präzisere und kontinuierlich überwachte Steuerung der Abkühlraten sowie eine direkte Messung der Proben temperatur. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Einfrierprogramm führt zu einem stabileren Temperaturverlauf. Insbesondere im Bereich des Kristallisationskomplexes werden dadurch unkontrollierte Temperaturschwankungen und damit abrupte osmotische Veränderungen vermieden. Dies könnte erklären, warum die Vitalität als membranabhängiger Parameter bei der Kryokonservierung mittels IceCube-Einfriergerät besser erhalten bleibt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Kryokonservierung mittels IceCube-Protokoll mindestens gleichwertige, tendenziell jedoch stabilere und vitalere Ergebnisse liefert als mit dem konventionellen Nicool-Einfrierprotokoll. Auch wenn sich dieser Vorteil in der vorliegenden Stichprobe primär in der Vitalität und weniger in der Motilität widerspiegelt, deutet das Gesamtbild auf eine grundsätzlich günstigere Zellschonung bei der Kryokonservierung mittels IceCube 11XS hin.

4.2.3 Klinische Relevanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das neue IceCube-Kryokonservierungsprotokoll im Vergleich mit dem bisherigen Standardverfahren mittels Nicool-Einfriergerät gleichwertige Ergebnisse liefert. Im direkten Vergleich mit dem herkömmlichen Einfriergerät (Nicool) konnten gleich stabile bzw. sogar bessere Erfolgsraten bezüglich der Motilität erzielt werden. Gleichzeitig konnten während des Validierungsprozesses keine neuen kritischen Einflussfaktoren identifiziert werden.

Ein wesentlicher Vorteil des neuen Verfahrens liegt in der vollständigen Automatisierung des Einfrierprozesses. Durch die programm-basierte Steuerung der Kühlraten und die simultane Dokumentation des Einfriervorgangs entsteht ein reproduzierbarer Ablauf, der weitgehend unabhängig von der individuellen Erfahrung der durchführenden Person ist. Diese Reduktion der Anwenderabhängigkeit ermöglicht eine höhere Prozesssicherheit und minimiert potenzielle Fehlerquellen. Zudem erlaubt die automatisierte Funktionsweise,

dass der Einfrierprozess ohne die kontinuierliche Anwesenheit von Fachpersonal abläuft, was eine Erleichterung der Arbeitsabläufe in der klinischen Routine mit sich bringt.

Relevant ist zudem, dass durch das neue Einfrierprotokoll für den IceCube 11XS die von der WHO geforderten Kriterien zur Kryokonservierung umgesetzt und erfüllt werden. Zusammenfassend ist der Einsatz des Einfriergeräts IceCube 11XS als neuer Standard für die Kryokonservierung im uroonkologischen Labor des Universitätsklinikums Tübingen gerechtfertigt und wurde entsprechend implementiert.

4.3 Limitationen

Durch die geringe Anzahl der Probanden muss die Aussagekraft der Studie als limitiert angesehen werden. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ejakulatproben von gesunden Probanden, bei denen eine Normospermie vorlag, stammten. Es ist nicht auszuschließen, dass eine vorab bestehende Einschränkung der Spermienqualität das Ergebnis des entwickelten Einfrierprotokolls beeinflusst. Da onkologische Erkrankungen bereits vor Beginn einer gonadotoxischen Therapie zu einer reduzierten Spermienqualität führen können (Calamai et al., 2023), ist somit eine Übertragung der Ergebnisse auf die eigentliche Patientengruppe (onkologische Patienten) nur mit möglichen Einschränkungen zu machen. Aus ethischen Gründen wurde bei der Durchführung dieser Arbeit bewusst darauf verzichtet, Ejakulatproben onkologischer Patienten zu verwenden, um keine potenziell für den Fertilitätserhalt benötigten Proben zu verbrauchen.

Ein weiterer limitierender Faktor betrifft die Auswahl der untersuchten Parameter bei der Qualitätskontrolle der Auftaukontrollen. Die Bewertung der Spermienqualität erfolgte anhand der Vitalität und Motilität sowie den spezifischen Überlebensraten, die Spermienmorphologie oder funktionelle Marker (wie zum Beispiel DNA-Integrität, reaktive Sauerstoffradikale (ROS)) wurden nicht berücksichtigt. Diese Parameter hätten eine umfassendere Beurteilung der Spermienqualität und dadurch gegebenenfalls mehr

Rückschlüsse hinsichtlich der Effekte des Kryokonservierungsprotokolls auf die Spermienqualität ermöglicht.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der Entwicklung des Kryokonservierungsprotokolls primär die Variable der Abkühlgeschwindigkeit untersucht. Weitere potenziell relevante Faktoren wie die Wahl und Konzentration des Kryoprotektivums, der Prozess der Aufbereitung und insbesondere die Durchführung des Auftauprozesses wurden hierbei nicht berücksichtigt. Es ist anzunehmen, dass diese Variablen ebenfalls einen Einfluss auf die Ergebnisse der Kryokonservierung haben. Somit ist nicht auszuschließen, dass in diesen Bereichen weiteres Potenzial zur Optimierung des Kryokonservierungsprotokolls besteht.

4.4 Schlussfolgerung und klinische Implikationen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das entwickelte Einfrierprotokoll des IceCube 11XS zuverlässig funktioniert und hinsichtlich der Vitalität und Motilität der Spermien nach erfolgter Kryokonservierung mindestens gleichwertige Ergebnisse wie das Nicool-Einfriergerät erzielt. Insbesondere die höhere Vitalität der Spermien nach dem Auftauen spricht für einen Vorteil des IceCube-Einfriergeräts und deutet darauf hin, dass die präzise Temperaturkontrolle im Bereich des Kristallisationskomplexes einen positiven Einfluss auf die Membranintegrität hat.

Zur genauen Überprüfung der Anwendbarkeit sollte das entwickelte Einfrierprotokoll an der klinisch relevanten Patientengruppe, onkologische Patienten mit oft bereits eingeschränkter Ausgangsqualität des Ejakulats, überprüft werden. Dadurch ließe sich klären, in welchem Ausmaß die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auch unter pathologischen Bedingungen bestehen und ob gegebenenfalls spezifische Anpassungen notwendig sind.

Trotz der erfolgreichen Entwicklung eines standardisierten Einfrierprotokolls bleiben nach dieser Studie weiterhin zentrale Variablen des Kryokonservierungsprozesses offen, deren Einfluss auf das Kryokonservierungsergebnis bislang nicht abschließend geklärt ist. Dazu zählen insbesondere die Auswahl und Konzentration des eingesetzten

Kryoprotektivums sowie die spezifischen Bedingungen des Auftauprozesses. Somit könnten Anpassungen und eine gezielte Optimierung dieser Faktoren den Prozess der Kryokonservierung gegebenenfalls weiter verbessern.

Darüber hinaus besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Frage, in welchem Ausmaß bestehende Parameter im Ausgangsejakulat wie Spermiedichte, Motilität, Osmolalität, pH-Wert, Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Membraneigenschaften den Vorgang der Kryokonservierung sowie das Ergebnis nach dem Auftauen beeinflussen. Diese Faktoren könnten erklären, warum trotz identischer technischer Bedingungen deutliche interindividuelle Unterschiede in den Überlebensraten nach Kryokonservierung bestehen.

Ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Optimierungen liegt in der bislang ungenutzten Seeding-Option des IceCube 11XS. Seeding beschreibt die kontrollierte Auslösung der Eisnukleation (= Entstehung der ersten Eiskristalle). Hierdurch könnte die Kristallisationsphase gezielter gesteuert und unkontrollierte Temperaturspitzen vermieden werden, was potenziell zu einer geringeren Membranschädigung führen könnte. Ob diese Funktion tatsächlich zu besseren Ergebnissen nach dem Auftauen führt und ob es in der klinischen Routine umsetzbar ist, ist bisher nicht untersucht und sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Für die Fertilitätssicherung bei onkologischen Patienten ist die Kryokonservierung humaner Spermien von zentraler Bedeutung. Trotz der hohen klinischen Relevanz existieren in der Literatur mit Ausnahme der richtungsweisenden Empfehlungen aus dem WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulats keine spezifischen Angaben zur Durchführung der Kryokonservierung. Ziel dieser Arbeit war es, zentrale Schritte der Kryokonservierung, insbesondere die Verschlussmethode der Kryostraws sowie das Einfrierprotokoll, zu optimieren.

Untersucht wurden Ejakulatproben von 30 gesunden Probanden. Nach standardisierter Diagnostik wurden drei Verschlussmethoden (Kugerverschluss, Wärmeversiegelung 2,5 s und 4,9 s) hinsichtlich Dichtigkeit und Einfluss auf die Spermienqualität miteinander verglichen. Außerdem erfolgte unter Berücksichtigung der geforderten Kriterien des WHO-Laborhandbuchs die Entwicklung und anschließende Validierung eines Kryokonservierungsprotokolls mittels des vollautomatisierten Einfriergeräts IceCube 11XS.

Die Wärmeversiegelung mittels CryoSealer und einer Verschweißdauer von 2,5 Sekunden erwies sich als vollständig dicht und ergab hinsichtlich Motilität und Vitalität Ergebnisse, die der konventionellen Verschlussmethode mittels Verschlusskugeln gleichwertig waren. Zwischen Nicool- und IceCube-System zeigten sich hinsichtlich Gesamt- und Progressivmotilität nach dem Auftauen keine signifikanten Unterschiede. Die Vitalität war jedoch im IceCube-System signifikant höher (56,0 % vs. 48,5 %; $p = 0,026$). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Kryokonservierung mittels IceCube 11XS im Vergleich zum herkömmlichen Einfriergerät gleich stabile und tendenziell bessere Überlebensraten bezüglich der Motilität erzielt und Vorteile hinsichtlich der Vitalität bietet.

Die vorliegende Arbeit ermöglichte die Implementierung des neu entwickelten Einfrierprotokolls als neuen Standard bei der Kryokonservierung im uroonkologischen Labor des Universitätsklinikums Tübingen. Mittels zukünftiger Studien sollten die weiter bestehenden Variablen im Rahmen der Kryokonservierung wie die Auswahl und Konzentration des Kryoprotektivums sowie das Auftauprotokoll analysiert werden, um dadurch eine weitere Optimierung des Kryokonservierungsprozesses zu ermöglichen. Ergänzend sollte zur weiteren Analyse und für ein besseres Verständnis hinsichtlich potenzieller Anpassungsmöglichkeiten gemessen werden, in welchem Ausmaß bestehende Parameter im Ausgangsejakulat wie Spermiedichte, Motilität, Osmolalität, pH-Wert, Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Membraneigenschaften den Vorgang der Kryokonservierung sowie das Ergebnis nach dem Auftauen beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

- AGARWAL, A., BASKARAN, S., PAREKH, N., CHO, C.-L., HENKEL, R., VIJ, S., ARAFA, M., PANNER SELVAM, M. K. & SHAH, R. 2021. Male infertility. *The Lancet*, 397, 319-333.
- AIZPURUA, J., MEDRANO, L., ENCISO, M., SARASA, J., ROMERO, A., FERNÁNDEZ, M. A. & GÓMEZ-TORRES, M. J. 2017. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction*, 32, 2007-2015.
- ANAWALT, B. D. 2013. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 98, 3532-42.
- AWMF 2019. Diagnostic and therapy before assisted reproductive treatments. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2K-Level, AWMF Registry No. 015/085, 02/2019). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-085.html>.
- AWMF 2025. Fertility preservation for patients with malignant disease. Guideline of the DGGG, DGU and DGRM (S2k-Level, AWMF Registry No.015/082, May 2025). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-082.html>.
- BAJERSKI, F., NAGEL, M. & OVERMANN, J. 2021. Microbial occurrence in liquid nitrogen storage tanks: a challenge for cryobanking? *Appl Microbiol Biotechnol*, 105, 7635-7650.
- BENSON, J. D., WOODS, E. J., WALTERS, E. M. & CRITSER, J. K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78, 1682-1699.
- BIELANSKI, A. 2012. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*, 77, 467-482.
- BIELANSKI, A. & VAJTA, G. 2009. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, 24, 2457-2467.
- BUNDESÄRZTEKAMMER 2022. Richtlinie zur Entnahme und Übertragung menschlicher Keimzellen und Keimzellgewebe im Rahmen der assistierten Reproduktion, umschriebene Fortschreibung 2022. Dtsch Arztebl 119:A1–A31, DOI: 10.3238/arztebl.2022.Rili_assReproduktion_2022.
- BUNDESÄRZTEKAMMER 2023. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Deutsches Ärzteblatt, DOI: 10.3238/arztebl.2023.rili_baek_QS_Labor.
- BUNGE, R. G. & SHERMAN, J. K. 1953. Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature*, 172, 767-768.
- CALAMAI, C., AMMAR, O., ROSTA, V., FARNETANI, G., ZIMMITTI, S., GIOVANNELLI, L., VIGNOZZI, L., KRAUSZ, C. & MURATORI, M. 2023. Testicular and Haematological Cancer Induce Very High Levels of Sperm Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 12.
- CALAMERA, J. C., BUFFONE, M. G., DONCEL, G. F., BRUGO-OLMEDO, S., DE VICENTIIS, S., CALAMERA, M. M., STOREY, B. T. & ALVAREZ, J.

- G. 2010. Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 93, 789-794.
- COHEN, N., SHOSHANY, O., OFRAN, Y., ESH BRODER, E., SCHRIER, I. & KARAVANI, G. 2025. Fertility preservation in males with spinal cord, pelvic, and other injuries potentially impacting male fertility. *Injury*, 56, 112819.
- DI SANTO, M., TAROZZI, N., NADALINI, M. & BORINI, A. 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*, 2012, 854837.
- ETHICS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE 2018. Posthumous retrieval and use of gametes or embryos: an Ethics Committee opinion. *Fertil Steril*, 110, 45-49.
- FLASBARTH, R. 2023. Rechtliche Fragen der Reproduktionsmedizin. In: AMRANI, M. & SEUFERT, R. (eds.) *Gynäkologische Endokrinologie und Kinderwunschtherapie: Prinzipien und Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- FUKUNAGA, H., YOKOYA, A. & PRISE, K. M. 2022. A Brief Overview of Radiation-Induced Effects on Spermatogenesis and Oncofertility. *Cancers (Basel)*, 14.
- GEMEINSAMER BUNDESAUSCHUSS 2022. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses zur Kryokonservierung von Ei- oder Samenzellen oder Keimzellgewebe sowie entsprechende medizinische Maßnahmen wegen keimzellschädigender Therapie (Kryo-RL). *Bundesanzeiger (BAnz AT 19.02.2021 B7)*.
- GROMOLL, J., TÜTTELMANN, F. & KLIESCH, S. 2016. [Social freezing - the male perspective]. *Urologe A*, 55, 58-62.
- HAI, E., LI, B., ZHANG, J. & ZHANG, J. 2024. Sperm freezing damage: the role of regulated cell death. *Cell Death Discovery*, 10, 239.
- HUANG, C., TANG, Y.-L., HU, J.-L., ZHOU, W.-J., HUANG, Z.-H., LUO, X.-F., LI, Z. & ZHU, W.-B. 2022. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 24.
- HUNGERFORD, A., BAKOS, H. W. & AITKEN, R. J. 2023. Sperm cryopreservation: current status and future developments. *Reproduction, Fertility and Development*, 35, 265-281.
- JOAQUIM, D. C., BORGES, E. D., VIANA, I. G. R., NAVARRO, P. A. & VIREQUE, A. A. 2017. Risk of Contamination of Gametes and Embryos during Cryopreservation and Measures to Prevent Cross-Contamination. *Biomed Res Int*, 2017, 1840417.
- KIMELMAN, D., TORRENS, A., BONELLI, C. & SAPIRO, R. 2023. Fertility preservation in male cancer patients. Counseling and reproductive outcomes. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1240152.
- KLIESCH, S., NEUHAUS, N. & SCHLATT, S. 2023. Kryokonservierung menschlicher Spermien und von Keimzellgewebe des Hodens zur Zeugungsreserve. In: NIESCHLAG, E., BEHRE, H. M., KLIESCH, S. & NIESCHLAG, S. (eds.) *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- KNOPMAN, J. M., PAPADOPOULOS, E. B., GRIFO, J. A., FINO, M. E. & NOYES, N. 2010. Surviving childhood and reproductive-age malignancy: effects on fertility and future parenthood. *The Lancet Oncology*, 11, 490-498.
- LI, Y.-X., ZHOU, L., LV, M.-Q., GE, P., LIU, Y.-C. & ZHOU, D.-X. 2019. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 233, 84-92.
- LIU, S., LIU, B., ZHAO, W., LIU, X., XIAN, Y., CHENG, Q., JIANG, M., YUE, H. & LI, F. 2022. Rapid cryopreservation of small quantities of human spermatozoa by a self-prepared cryoprotectant without animal component. *Andrologia*, 54, e14318.
- MANGOLI, V., EVGENI, E. & WYNS, C. 2025. Sperm cryopreservation protocol for micro-TESE-retrieved sperm. *Asian Journal of Andrology*, 27.
- MARTÍNEZ-SOTO, J. C., GARCÍA-VAZQUEZ, F. A., GUMBAO, D., LANDERAS, J. & GADEA, J. 2011. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. *Cryobiology*, 63, 131-136.
- MAZUR, P. 1963. KINETICS OF WATER LOSS FROM CELLS AT SUBZERO TEMPERATURES AND THE LIKELIHOOD OF INTRACELLULAR FREEZING. *J Gen Physiol*, 47, 347-69.
- MEISTRICH, M. L. 2013. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and Sterility*, 100, 1180-1186.
- OZIMIC, S., BAN-FRANGEZ, H. & STIMPFEL, M. 2023. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Curr Issues Mol Biol*, 45, 4716-4734.
- OZKAVUKCU, S., ERDEMLI, E., ISIK, A., OZTUNA, D. & KARAHUSEYINOGLU, S. 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25, 403-411.
- PACEY, A. A. & EISER, C. 2014. The importance of fertility preservation in cancer patients. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 14, 487-489.
- PAOLI, D., PELLONI, M., LENZI, A. & LOMBARDO, F. 2019. Cryopreservation of Sperm: Effects on Chromatin and Strategies to Prevent Them. In: BALDI, E. & MURATORI, M. (eds.) *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. Cham: Springer International Publishing.
- PEGG, D. E. 2015. Principles of Cryopreservation. In: WOLKERS, W. F. & OLDENHOF, H. (eds.) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- PENNINGS, G., COUTURE, V. & OMBELET, W. 2021. Social sperm freezing. *Human Reproduction*, 36, 833-839.
- POLGE, C., SMITH, A. U. & PARKES, A. S. 1949. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164, 666-666.
- SCHMIDT, R., RICHTER, D., SENDER, A. & GEUE, K. 2016. Motivations for having children after cancer--a systematic review of the literature. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 25, 6-17.

- SHARMA, A., MINHAS, S., DHILLO, W. S. & JAYASENA, C. N. 2021. Male infertility due to testicular disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 106, e442-e459.
- SIEME, H., OLDENHOF, H. & WOLKERS, W. F. 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, 50 Suppl 3, 20-6.
- SIEME, H., OLDENHOF, H. & WOLKERS, W. F. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, 169, 2-5.
- SU, H. I., LACCHETTI, C., LETOURNEAU, J., PARTRIDGE, A. H., QAMAR, R., QUINN, G. P., REINECKE, J., SMITH, J. F., TESCH, M., WALLACE, W. H., WANG, E. T. & LOREN, A. W. 2025. Fertility Preservation in People With Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 43, 1488-1515.
- SZTEIN, J. M., TAKEO, T. & NAKAGATA, N. 2018. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 82, 57-63.
- TAMBURRINO, L., TRAINI, G., MARCELLINI, A., VIGNOZZI, L., BALDI, E. & MARCHIANI, S. 2023. Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*, 24.
- TESARIK, J. 2025. Lifestyle and Environmental Factors Affecting Male Fertility, Individual Predisposition, Prevention, and Intervention. *Int J Mol Sci*, 26.
- TOURNAYE, H., DOHLE, G. R. & BARRATT, C. L. R. 2014. Fertility preservation in men with cancer. *The Lancet*, 384, 1295-1301.
- WHALEY, D., DAMYAR, K., WITEK, R. P., MENDOZA, A., ALEXANDER, M. & LAKEY, J. R. 2021. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*, 30, 963689721999617.
- WHO 2010. *WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- WHO 2021. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition*. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- YAN, M., BUSTOS, S. S., KURUOGLU, D., CIUDAD, P., FORTE, A. J., KIM, E. A., DEL CORRAL, G. & MANRIQUE, O. J. 2021. Systematic review of fertility preservation options in transgender patients: a guide for plastic surgeons. *Ann Transl Med*, 9, 613.
- ZHOU, D., WANG, X.-M., LI, R.-X., WANG, Y.-Z., CHAO, Y.-C., LIU, Z.-Z., HUANG, Z.-H., NIE, H.-C., ZHU, W.-B., TAN, Y.-Q. & FAN, L.-Q. 2021. Improving native human sperm freezing protection by using a modified vitrification method. *Asian Journal of Andrology*, 23.

7 Anhang

7.1 Formblatt Spermigrammagnostik

Analyt	Analytergebnis	Referenzbereich / Einheit
Spermogramm		
Klinische Angaben		
Material		
Sex-Karenz	2	- 7 Tage
Makroskopische Untersuchung		
Volumen		> 1.5 ml
pH		> 7.2
Farbe	grau-weiß	- gelblich
Verflüssigungszeit		Min
Viskosität		
Mikroskopische Untersuchung		
Spermiendichte		> 15 Mill/ml
Spermien-Gesamtzahl		> 39 Mill
Gesamtmotilität der Spermien		> 40 %
progressiv beweglich (WHO A+B)		> 32 %
lokal beweglich (WHO C)		%
nicht beweglich (WHO D)		%
Leukozyten / Ründzellen		/Gesichtsfeld
Erythrozyten		/Gesichtsfeld
Eosintest		
Gesamt-Vitalität der Spermien		> 58 %
Vitalität der unbeweglichen Spermien		%

verantwortlich: Prof. Dr. med. A. Stenzl

Universitätsklinikum Tübingen **Aufsichtsrat**
 Anstalt des öffentlichen Rechts Ulrich Steinbach
 Sitz Tübingen (Vorsitzender)
 Geissweg 3 - 72076 Tübingen
 Telefon (07071) 29-0
 www.medizin.uni-tuebingen.de
 Steuer-Nr. 86156/09402
 USt-ID: DE 146 889 674

Banken

Baden-Württembergische Bank Stuttgart
 (BLZ 600 501 01) Konto-Nr. 7477 5037 93
 IBAN: DE 41 6005 0101 7477 5037 93
 BIC (SWIFT-Code): SOLADEST600


Kreissparkasse Tübingen
 (BLZ 641 500 20) Konto-Nr. 14 144
 IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44
 BIC (SWIFT-Code): SOLADES1TUB

Fettes Resultat = Ergebnis außerhalb des Referenzbereichs

Wert

printed with SWISSLAB®

7.2 Arbeitsanweisung und Protokoll zur Kryokonservierung

Arbeitsanweisung und Protokoll - Kryokonservierung von Humansperma		 Universitätsklinikum Tübingen	
Primärer Gültigkeitsbereich: Urologie	Formular	ID: 27320	Stand: 002/04.2021

Adressette
hier einkleben

Spermogramm	Vorgänge bitte abhaken
Verflüssigen der Probe im Wärmeschrank	<input type="checkbox"/>
Bestimmung von Volumen, Dichte und Motilität der Probe	<input type="checkbox"/>
Bei Motilität < 50% erfolgt Eosintest	<input type="checkbox"/>
Vorbereitung des Differentialspermigramms	<input type="checkbox"/>

..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Kryokonservierung	Vorgänge bitte abhaken
Zugabe von Quinn's Advantage Sperm Freezing Medium	<input type="checkbox"/>
Gut vermischen und 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen	<input type="checkbox"/>
Befüllen der Straws und 10 min im Kühlschrank stellen	<input type="checkbox"/>
Einfriervorgang mit NICOOL LM 10 (Stufe 1 bis 9 jeweils 3 min, dann Eintauchen in Flüssigstickstoff bis -130°C erreicht wird)	<input type="checkbox"/>
Straws in die Kassetten füllen	<input type="checkbox"/>
Lagerung im Flüssigstickstoff	<input type="checkbox"/>

..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Kontrolle: Zuordnung Patient – Kassettennummer HS-Set korrekt
--

..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Auftaukontrolle	Vorgänge bitte abhaken
Straw 3 min bei Raumtemperatur lagern	<input type="checkbox"/>
Für 10-30 min in Wärmeschrank bei 35-37°C legen	<input type="checkbox"/>
Mikroskopische Bestimmung der Motilität und des Eosintest	<input type="checkbox"/>

..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Versandvorbereitung und Verschicken (+Kontrolle)


..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Kontrolle

..... Datum / Uhrzeit Geprüft und Durchgeführt von

Freigabe: Stenzl, Arnulf - 26.04.2021 09:49:51 Gültig seit: 26.04.2021
 Ansprechpartner: Jörg Hennenlotter, Andrea Hohneder Prüfer: Bastian Amend Seite 1 von 1

7.3 Dokumentationsblatt Kryokonservierung Humansperma

Dokumentationsblatt Kryokonservierung Humansperma		 Universitätsklinikum Tübingen	
Primärer Gültigkeitsbereich: Urologie	Formular	ID: 30271	Stand: 002/04.2021

Patientendaten

Auftragsnummer Spermogramm

Datum

Temperaturverlauf °C

Kassettennummer HS-Set

Anzahl Straws

RT

Stufe 1

Stufe 2

Stufe 3

Stufe 4

Stufe 5

Verwendetes Medium: Quinn's Advantage Sperm Freezing Medium, Sage Media

Stufe 6

Lot-Nummer:

Haltbar bis:

Stufe 7

Verwendetes HS-Set, MTG

Stufe 8

Lot-Nummer:

Haltbar bis:

Stufe 9

nach

-130°C

Auftaukontrolle

Datum:

Beweglichkeit:

Eosintest:

Freigabe: Stenzl, Arnulf - 26.04.2021 09:52:25

Gültig seit: 26.04.2021

Ansprechpartner: Jörg Hennenlotter, Andrea Hohneder

Prüfer: Bastian Amend

Seite 1 von 1

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie Tübingen, Labor für Uroonkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Steffen Rausch durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Rausch und Jörg Hennenlotter (Dipl.-Biol., ehemalige Laborleitung).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Jörg Hennenlotter und Carmen Wandel von mir eigenständig und zum Teil mit Unterstützung durch Carmen Wandel durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Steffen Rausch und nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie durch mich.

Zur Überprüfung von Rechtschreibung und Grammatik wurde das Programm ChatGPT (Versionen GPT-4 und GPT-5) verwendet. Ich versichere, dass ich den Output des KI-Tools sorgfältig geprüft und bei Bedarf angepasst habe, bevor ich Änderungen in das Manuskript aufgenommen habe.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Pauline Haase

9 Veröffentlichungen

Zur Veröffentlichung akzeptierter Artikel:

HAASE, P. *, RAUSCH, S. *, MAAS, M., WALZ, S., HENNENLOTTER, J., BARCENA, M. L., STENZL, A., TSAUR, I. & STÜHLER, V. 2026. Optimize Human Sperm Cryopreservation: Influence of Vial Sealing Methods and Automated Freezing Protocols on Preserved Sperm Quality. *Translational Andrology and Urology* [accepted for publication].

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner medizinischen Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Steffen Rausch, der mir mit großer fachlicher Expertise, Geduld und Wohlwollen zur Seite stand und mir wertvolle wissenschaftliche Orientierung gegeben hat.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem dem gesamten Team des uroonkologischen Labors des Universitätsklinikums Tübingen für die hilfreiche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Kryokonservierungen. Alle Mitarbeitende haben mich engagiert in die praktischen Abläufe eingearbeitet und standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung.

Ich danke meinen Eltern und meinem Bruder für ihre stetige Unterstützung und ihren Rückhalt. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden für ihre bestärkende Begleitung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch den Probanden dieser Studie, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

11 Lebenslauf