



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg



VITROMED
Germany

Fakultät Life Sciences

Einrichtung eines CASA-Systems zur Entwicklung und Optimierung von Medien zur Spermabearbeitung

Bachelorarbeit

Studiengang: Biotechnologie

Eingereicht von:

Student: Stefan Kieser

Matrikelnummer: [REDACTED]

Wesel, den 24. November 2025

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Dipl.-Biol Denis Flügge (Vitromed GmbH)

Diese Arbeit wurde betreut und unterstützt von der Firma Vitromed GmbH

I. Vorwort

Die vorliegende Bachelorarbeit wurde bei der Firma Vitromed GmbH in Langenfeld im Bereich Design und Development durchgeführt und durch den Diplombiologen Denis Flügge betreut. Ihm möchte ich herzlich danken für seinen kontinuierlichen Antrieb und seine inspirierenden Ratschläge während der Bearbeitungszeit und der Themenfindung dieser Arbeit. Der Firma Vitromed GmbH möchte ich für das Ermöglichen dieser Bachelorarbeit danken.

Des Weiteren bedanke ich mich beim gesamten Team von Vitromed GmbH, die mir täglich mit Hilfe, aber auch mit vielen guten Gesprächen und guter Laune, die Arbeit sehr erleichtert haben. Hervorzuheben sind da der Leiter des QC-Labors, Dimitrios Laloussis, in dessen Labor die Experimente stattfanden und der mir auch bei der Verfeinerung der Methoden hilfreiche Tipps gab, und Alina Mohr, eine gute Freundin aus der Ausbildung zum BTA, durch die ich von Vitromed erfuhr und die mich ermutigte mich für das Praxissemester zu bewerben, aus dem dann diese Bachelorarbeit als Fortführung entstand.

Mein größter Dank geht an meine Mutter, die mir in all der Zeit meines Studiums immer wieder Mut zugesprochen hat und mich immer unterstützt hat.

Wesel, der 24. November 2025

Stefan Kieser

II. Inhaltsverzeichnis

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
I. Vorwort	2
II. Inhaltsverzeichnis	3 f.
III. Abkürzungsverzeichnis	5
IV. Abbildungsverzeichnis	6
V. Tabellenverzeichnis	7 ff.
1. Zusammenfassung	11
2. Einleitung	12 ff.
3. Material und Methoden	17 ff.
3.1. Material	17 f
3.2. Methoden	18 ff.
3.2.1. Hergestellte Lösungen	18 f.
3.2.2. Durchgeführte Methoden	20 ff.
3.2.2.1. Probenvorbereitung	20 f.
3.2.2.2. Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)	21
3.2.2.3. Eosin-Test	21
3.2.2.4. Manuelle Zählung	22
3.2.2.5. CASA-Methode	22 f.
3.2.2.6. Methodenänderung	24
3.2.2.7. Testreihe Methodenetablierung	24
3.2.2.8 Testreihe Probemedien (ATT & WCT)	25 f.
3.2.2.9 Grundlegende Informationen zur Methodenauswertung	26 ff.
4. Ergebnisse	29 ff.
4.1. Test mit saurer, viskoser und HSA-freien Lösung	29
4.2. Testreihe Methodenetablierung	29 ff.
4.3. Testreihe Probemedien	34 ff.
4.4. Einzelne Proben im Vergleich	30 ff.
4.5. HOS und Eosin-Test	42 ff.
4.6. Probenqualität der Testreihe Probemedien	46 f.

5. Diskussion	47 ff.
6. Quellen	50 ff.
6.1. Quellenliste	50 ff.
6.2. Rohdaten	53 ff.
6.3. Eidestattliche Erklärung	61

III. Abkürzungsverzeichnis

ATT – Auftau-Testlösung

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis

CatSper – Cation Channel of Sperm

ENT – Eosin-Nigrosin-Testlösung

HCl – Salzsäure

H+HPC – V-HEPES PLUS mit 1% HPC (für Rohdaten)

H-HSA – V-HEPES PLUS ohne HSA (für Rohdaten)

HOS – Hypoosmotischer Schwelltest

HPC – Hydroxypropylcellulose

HSA – Humanes Serum Albumin

HTF – Human Tubular Fluid

H69 – V-HEPES PLUS mit einem pH-Wert von 6,9

H73 – V-HEPES PLUS mit einem pH-Wert von 7,3

ICSI – Intrazelluläre Spermieninjektion

IVF – In-vitro Fertilisation

K – Kontrolle (für Rohdaten)

Na⁺/K⁺-ATPase – Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase

pH_i – intrazellulärer pH-Wert

ROS – Radikale Sauerstoffspezies

rpm – Umdrehungen pro Minute

T₀ – Startzeitpunkt der Messungen (T = 0 Minuten)

T_n – Messung zum Zeitpunkt T_n (n = Zeit in Minuten; T₂₀ = Messung nach 20 Minuten)

WCT – Worstcase-Testlösung

WHO – World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

IV. Abbildungsverzeichnis

<u>Name</u>	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Darstellung von Spermien nach dem hypoosmotischen Schwelltest. 1: Uncoiled Spermienzelle. 2 und 3: Unterschiedliche coiled Spermienzellen.	15
Abbildung 2: Unterschied einer durch den Eosin-Test gefärbten Zelle (links) und einer ungefärbten Zelle (rechts).	15
Abbildung 3: Diese Abbildung zeigt das aufgenommene Video (links) und das Endergebnis nach Tracking der motilen Spermien, deren Bewegung als gelbe (moderate Geschwindigkeit) bis rote (schnelle Bewegung) Linie dargestellt wird.	23
Abbildung 4: Veränderungen mit und ohne Normalisierung der einzelnen Messpunkte der methodenetablierenden Testreihe.	34
Abbildung 5: Veränderungen mit und ohne Normalisierung der Testreihe mit der Kontrolle und den Probemedien (ATT und WCT) ohne Differenzierung der Probemedien.	39
Abbildung 6: Veränderung der einzelnen Messpunkte der Kontrolle und der beiden Probemedien (ATT und WCT) der manuellen Zählung zur Referenz T0.	41
Abbildung 7: Normalisierte Veränderung der einzelnen Messpunkte der CASA-Zählung zur Referenz T0.	42
Abbildung 8: Veränderung der einzelnen Messpunkte des HOS zur Referenz T0.	45
Abbildung 9: Veränderung der einzelnen Messpunkte des Eosin-Tests zur Referenz T0.	45

V. Tabellenverzeichnis

<u>Name</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Übersicht der Kriterien zur Beurteilung der Spermaqualität.	12
Tabelle 2: Übersicht wichtiger Inhaltsstoffe von Kulturmedien.	13
Tabelle 3: Geräte- und Materialübersicht mit Hersteller und Typ.	16
Tabelle 4: Chemikalienliste mit Hersteller und Charge.	17
Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methoden- etablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 1.	30
Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methoden- etablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 2.	31
Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methoden- etablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 3.	32

<u>Name</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methoden-etablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 4.	33
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 1.	35
Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 2.	36

<u>Name</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 3.	37
Tabelle 12: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 4.	38
Tabelle 13: Übersicht des HOS und des Eosin-Tests mit den jeweiligen prozentualen Parametern der Messung. Es wird die aus den Rohdaten berechnete prozentuale Rate der Zellen, die beim HOS als coiled (Membran funktionell) gewertet wurden und die beim Eosin-Test als weiß (Membran unbeschädigt, Zelle lebendig) bewertet wurden. Zudem wird die Veränderung der einzelnen dreistündig inkubierten Proben von der Referenz berechnet. Ein – bedeutet einen nicht gemessenen Wert bei der letzten Probe. Teil 1.	43
Tabelle 14: Übersicht des HOS und des Eosin-Tests mit den jeweiligen prozentualen Parametern der Messung. Es wird die aus den Rohdaten berechnete prozentuale Rate der Zellen, die beim HOS als coiled (Membran funktionell) gewertet wurden und die beim Eosin-Test als weiß (Membran unbeschädigt, Zelle lebendig) bewertet wurden. Zudem wird die Veränderung der einzelnen dreistündig inkubierten Proben von der Referenz berechnet. Ein – bedeutet einen nicht gemessenen Wert bei der letzten Probe. Teil 2.	44

<u>Name</u>	<u>Seite</u>
Tabelle 15: Volumen, Konzentration und Gesamtzellzahl der einzelnen Proben der Testreihe Probemedien und die dazugehörige Vitalität der Eosin-Nigrosin-Färbung.	46
Tabelle 16: Rohdaten der Spermazählungen vor der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 1.	53
Tabelle 17: Rohdaten der Spermazählungen vor der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 2.	54
Tabelle 18: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 1.	54
Tabelle 19: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 2.	55
Tabelle 20: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 3.	56
Tabelle 21: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 4.	57
Tabelle 22: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 5.	58
Tabelle 23: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 1.	58
Tabelle 24: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 2.	59
Tabelle 25: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 3.	60

1. Zusammenfassung

Bei der Entwicklung von Kulturmedien, die mit Spermien in Kontakt kommen, wird deren Einfluss auf das biologische Material nach einer definierten Kontaktzeit mittels Parameter wie z.B. Spermienmotilität getestet. In dieser Bachelorarbeit wird zunächst eine neue Zählmethode für Spermien eingerichtet, da es Fehleranfälligkeiten bei der manuellen Zählung gibt und diese verringert werden sollen. Diese Methode nennt sich CASA-Methode (Computer Assisted Sperm Analysis). Im Anschluss wird überprüft, ob mit CASA der Einfluss mittels Literaturrecherche ausgewählter Faktoren (pH-Wert, Antioxidantien und Viskosität) auf die Qualität von Spermaproben ermittelt werden kann. Dafür werden praxisnahe Methoden (HOS- und Eosin-Test) und manuelle Grundparameter (Motilität, Volumen und Zellzahl) genutzt, die den Einfluss abbilden können. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die ausgewählte CASA-Software (ImageJ (Version: 1.54p) und TrackMate von Fiji) ein OpenSource-Programm ist, weshalb aufgrund fehlender Versionssicherheit nur zeitgleich prozessierte Kontroll-Test-Kombinationen verwendet werden.

Durch eine quantitative Studie mit 16 Proben, von denen 5 zur Methodenethablierung und 8 zum Test zweier Probemedien genutzt wurden, wurde festgestellt, dass sich durch die CASA-Methode Proben analysieren lassen. 3 Proben wurden aufgrund abgeänderter Methodik nicht in die Auswertung einbezogen. So lagen normalisiert 77,94 % der Messwerte im Toleranzbereich ($\pm 15\%$) und 88,89 % der 13 getesteten Proben zeigten bei manueller Zählung und CASA eine ähnliche Motilitätsveränderung durch die ausgewählten Probemedien. CASA ist im Vergleich zur manuellen Zählung mit mehr Zeitaufwand verbunden.

2. Einleitung

In der Reproduktionsbiologie ist die Qualität von Spermien ein entscheidender Faktor und wird durch eine Vielzahl an Methoden bestimmt. Sie ist fundamental, um die korrekte Behandlung für jeden Patienten zu finden. So bestimmt die Qualität von Spermien die beste künstliche Befruchtungsmethode (ICSI oder IVF), um die Chancen auf einen vitalen Embryo zu maximieren. Auch deshalb, weil die Eierstockpunktion für die Frau Stress und Schmerzen bedeutet, ist es wichtig, diesen Vorgang nur einmal durchführen zu müssen.

Die Qualität von Spermien wird anhand einiger, von der WHO festgelegter, Kriterien beurteilt. Diese Kriterien wurden anhand einer langjährigen, quantitativen Studie^[1] entwickelt und 2021 das letzte Mal reevaluiert. Sie dienen als untere Referenzgrenze, die als das 5. Perzentil aller Studienteilnehmer definiert ist. Anders ausgedrückt liegen 95% der fruchtbaren Probanden oberhalb dieser Werte und alles unterhalb dieser Schwellwerte liegt unterhalb der Norm und kann auf eine eingeschränkte Fertilität hinweisen.

Tabelle 1: Übersicht der Kriterien zur Beurteilung der Spermaqualität.

Einflussfaktor	Schwellwert
Ejakulatvolumen	$\geq 1,4$ mL
Spermienkonzentration	$\geq 16 \cdot 10^6$ /mL Spermien
Gesamtspermienzahl	$\geq 39 \cdot 10^6$ Spermien
Motilität	≥ 42 % motil, davon ≥ 30 % progressiv beweglich (vorwärtsbeweglich)
Morphologie	≥ 4 % nach Krüger-Kriterium normal geformt (also keine Deformationen an Kopf, Mittelstück und Schwanzteil)*
Vitalität	≥ 54 % lebensfähig

Um die Qualität der zum Zwecke der künstlichen Befruchtung ejakulierten Spermien zu erhalten, gibt es in der Reproduktionsbiologie eine Vielzahl an Kulturmedien. Eine Anwendung außerhalb ihren biologischen Milieus ist ein Einfriermedium, das den Einfriervorgang einer Samenspende unterstützt, die ein Proband beispielsweise vor einer Sterilisation abgibt, um im Zweifelsfall doch noch die Möglichkeit zu besitzen zu einem späteren Zeitpunkt Kinder zu zeugen. Um die Spermien für einen Befruchtungsprozess vorzubereiten, müssen die Spermien möglichst bald nach dem Auftauen vom Seminalplasma, dem Einfriermedium und den darin enthaltenen Kryoprotektiva isoliert werden. Diese Kryoprotektiva unterstützen bei kurzer Einwirkzeit den Einfriervorgang durch fehlende Eiskristallbildung, sind jedoch bei längerer Einwirkzeit nach dem Auftauen und einer erhöhten Temperatur toxisch. Bei frischen Proben ist es ebenfalls notwendig das Seminalplasma aufgrund seines negativen Einflusses auf Spermien von diesen zu trennen^[2-5]. Dies geschieht durch Wasch- oder Haltemedien. Diese Kulturmedien^[6] haben bestimmte Inhaltsstoffe und physikochemische Eigenschaften, die möglichst die physiologischen Bedingungen nachbilden sollen, die in weiblichen Geschlechtsorganen vorliegt.

Tabelle 2: Übersicht wichtiger Inhaltsstoffe von Kulturmedien.

Inhaltsstoff/Eigenschaft	Konzentration	Nachbildungsbedingung
pH-Wert	7,2 - 7,4	Zervixflüssigkeit
Osmolarität	270 – 290 mOsm/kg	Plasma
Temperatur	37 °C	Körpertemperatur
Bikarbonat	20 – 25 mM	Löst Kapazitationssignale aus
Kalzium	1,8 – 2,5 mM	Flagellenbewegung und Akrosomreaktion
Natrium	Physiologische Konzentration	Elektrolytgleichgewicht
Kalium	Physiologische Konzentration	Elektrolytgleichgewicht
Chlorid	Physiologische Konzentration	Elektrolytgleichgewicht
Glukose, Pyruvat, Laktat	Energiequelle, vers. Konzentrationen	Analoge Eileiterflüssigkeitssubstrate
Antioxidantien (HSA)	3 – 10 mg/mL	Schutz vor oxidativem Stress

Es wurde sich auf den Einfluss der Viskosität, des pH-Werts und von Antioxidantien konzentriert, indem diese in normalem HEPES-Puffer, einem auf HTF basierenden Puffer, der aber CO₂-unabhängig ist, verändert wurden. Diese Veränderungen traten in zwei Lösungen auf, um zu erörtern, ob beide Zählmethoden diese erkennen können.

- pH-Wert: Ein saurer pH-Wert (> 6,2) hat einen deutlichen negativen Einfluss auf die Motilität, die Kapazitation (also die strukturelle Veränderung der Spermien, die zur Befruchtung der Eizelle nötig sind) und die Hyperaktivierung (die Erhöhung der Flagellenbewegung um in die Eizelle einzudringen) aufgrund von Inhibierung von CatSper, einem Kalziumionenkanal, der die Hyperaktivierung durch einströmendes Kalzium ermöglicht, und Na⁺/K⁺-ATPase, die den Ionengradienten dafür und den pH_i erhält^[7-10]. Ist der pH-Wert oberhalb von 8, so wurde eine erhöhte Hyperaktivität beobachtet^[11], diese scheint den Energiehaushalt jedoch zu überfordern, woraus eine erhöhte Immotilität resultiert, die sich aber nicht auf die Vitalität auswirkt^[12, 13].
- Antioxidantien: Sie schützen vor ROS, die in größeren Konzentrationen oxidativen Stress, DNA-Schäden und Bewegungseinschränkungen hervorrufen können, für die Zellen in geringem Maße für Kapazitation aber wichtig sind^[14, 15]. Oxidativer Stress führt zu Membranschädigung durch Lipidperoxidation, da diese einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren besitzt, welche schnell mit Sauerstoff reagieren^[16]. In definierten Konzentrationen können Antioxidantien die Reduktion der Motilität auch längerfristig (> 24 Stunden) verringern^[17]. Eine zu hohe Konzentration an Antioxidantien kann jedoch zu „reduktivem Stress“ führen, der wiederum ROS generiert und dadurch den oxidativen Stress erhöht^[18].
- Viskosität: Die Viskosität beeinflusst die Beweglichkeit der Spermien abhängig davon, ob eine newtonsche (bspw. Wasser) oder eine nicht-newtonsche Flüssigkeit vorliegt^[19] und wie viskos das Medium grundsätzlich ist^[20]. Zusätzlich entscheidend ist, in welchem Stadium (vor oder nach der Kapazitation) sich das Spermium befindet und welche Motilität es in erhöht

viskosen Medien besitzt^[21]. Auch hier gilt, dass eine erhöhte Viskosität einen erhöhten Energieverbrauch bedeutet und dieser wiederum eine geringere Motilität zur Folge hat^[22]. Diese Betrachtung ist wichtig, da im weiblichen Genitaltrakt unterschiedlich viskose Körperflüssigkeiten vorliegen^[6, 23].

Um diese möglichen Einflüsse zu messen, werden mehrere Methoden angewendet, die unterschiedliche Parameter überprüfen.

- Eosin-Nigrosin-Färbung: Diese Färbemethode basiert auf der Farbstoffausschluss-Methode, bei der die Integrität der Zellmembran der wichtigste Faktor ist. Ist die Zellmembran beschädigt kann der rötliche Farbstoff Eosin in die Zelle eindringen und färbt sie rot. Falls die Zellmembran intakt ist, bleibt sie weiß. Um die Färbung besser erkennen zu können,

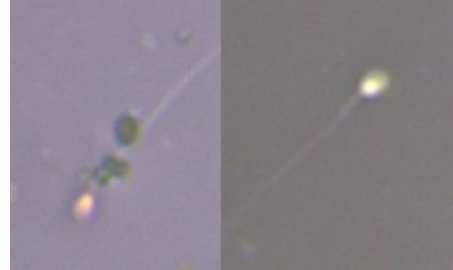


Abbildung 2: Unterschied einer durch den Eosin-Test gefärbten Zelle (links) und einer ungefärbten Zelle (rechts).
Quelle: Eigenes Foto.

wird der Farbstoff Nigrosin hinzugefügt, welcher den Hintergrund verdunkelt und somit einen besseren Kontrast herstellt. Dadurch kann man deutlicher die gefärbten und ungefärbten Spermien identifizieren^[1].

- Hypoosmotischer Schwelltest: Der hypoosmotische Schwelltest ist ein Nachweis der Membranfunktionalität^[1, 24]. Hierbei wird die Zelle in einer hypoosmotischen Lösung für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss in coiled und uncoiled differenziert. Zwar zeigt sich aufgrund der osmotischen Fähigkeiten einer intakten Membran ein Anschwellen (coiling) schon nach 5 Minuten, die Flagellenformen sind jedoch erst nach 30 Minuten stabil^[1].



Abbildung 1: Darstellung von Spermien nach dem hypoosmotischen Schwelltest. 1: Uncoiled Spermienzelle. 2 und 3: Unterschiedliche coiled Spermienzellen. Quelle: Eigenes Foto.

- Manuelle Zählung: Es werden pro Probe immer zweimal 200 Spermien gezählt, in motil und immotil unterschieden und ein Mittelwert gebildet^[1]. Dadurch werden die Qualitätskriterien der Gesamtzellzahl, Spermienkonzentration und Motilität evaluiert. Eine motile Zelle wird in dieser Bachelorarbeit als eine Zelle definiert, die sich grundsätzlich bewegt, egal wie. Es wird nicht in progressiv und nicht-progressiv unterschieden. Eine immotile bewegt sich nicht.
- CASA: CASA ist eine weitere Methode zur Evaluierung der Qualitätskriterien der Gesamtzellzahl, Spermienbeweglichkeit und Spermienkonzentration. Die Morphologie als Qualitätskriterium wird in dieser Bachelorarbeit nicht beurteilt und wurde auch als nicht korrelierend^[25] dargestellt. Ein weiterer Nachteil einiger CASA-Systeme kann das nicht Erkennen von atypischen Proben und Morphologiemustern sein^[26] oder die Anwesenheit von Zelltrümmern und der Variabilität der Spermienkonzentration^[27]. Vorteilhaft ist, dass einige CASA-Anwendungen standardisiert sind, eine bessere Reproduzierbarkeit aufweisen^[28], präziser sind und beim Personal Fehler reduzieren können^[26]. Unsere CASA-Methode bedient sich jedoch einer OpenSource- und keiner kommerziell genutzten Software zur Auswertung der Motilität. Die Motilität wird in unserer Software analysiert und dargestellt, indem die einzelnen Koordinaten der Spermien in jedem Frame zu einer Bewegung verbunden werden, um die Spermien in motil und immotil zu unterscheiden (Abbildung 3, Seite 15).

Die Zielsetzung dieser Bachelorarbeit ist es zunächst herauszufinden, ob CASA und manuelle Zählung gleichwertige Methoden sind. Des Weiteren soll im Anschluss herausgefunden werden, ob man mit CASA ein dafür entwickeltes Probemedium (ATT) und ein gewollt qualitätsverschlechterndes Probemedium (WCT) und deren Einfluss auf einige Kriterien der Spermaqualität analysieren kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 3: Geräte- und Materialübersicht mit Hersteller und Typ.

Gerät	Hersteller	Typ
CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific	Heracell 150i
Gasflasche	Messer	2029 (10,1 Liter, 200 bar)
Durchlichtmikroskop mit montierter Videokamera	Di-Li	955
pH-Meter	WTW	pH3110
pH-Elektrode	WTW	SenTix 81
Magnetrührer	IKA	RH digital
Maklerzählkammer	SEFI MEDICAL INSTRUMENTS	-
Alufolie	Carl Roth	-
Zentrifugenröhrchen 50 mL	VWR	-
Reaktionsgefäß 1,5 mL	VWR	-
Reaktionsgefäß 2 mL	Eppendorf	-
Pipetten	Eppendorf	20 µL, 100 µL, 1000 µL
Pipettenspitzen	Brand	100 µL, 1000 µL
Objektträger	Epredia	SuperFrost™ Slides
Kühlschrank	Haier	-
Probenbecher	Vitromed GmbH	-
Mikroskopobjektiv 40x	Di-Li	-
Mikroskopobjektiv 20x	Di-Li	-

Tabelle 4: Chemikalienliste mit Hersteller und Charge.

Chemikalie	Hersteller	Charge
V-HEPES PLUS 1 (H73)	Vitromed GmbH	405VM2301 (pH 7,293)
V-HEPES PLUS 2 (Kontrolle)	Vitromed GmbH	504VM2302 (pH 7,286)
V-HEPES (ohne HSA) auch H-HSA genannt	Vitromed	Probe des Produktionsteams
Hydroxypropylcellulose	Nippon Soda	NOG-0611
Natriumhydroxid	PanReac AppliChem	0001940713
Salzsäure	PanReac AppliChem	0001970694
HSA	DEMO ABEE	B03J033153
Eosin G	Roth	294356775
Nigrosin	Roth	204352731
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma Aldrich	SHBQ7646
Levulose	-	-
Technischer Puffer pH 4,01	WTW	06.28-1
Technischer Puffer pH 7,01	WTW	05.28-2
Technischer Puffer pH 10,01	WTW	05.27-1

3.2. Methode

3.2.1. Hergestellte Lösungen

Für die ENT^[1] wurde zunächst 0,066 g Eosin und 0,812 g Nigrosin in 8 mL destilliertem Wasser gelöst und für 32 Minuten bei 50 °C und 500 rpm auf einem Magnetrührer gerührt. Da sich in der Lösung Kristalle oder Ausfällungen bilden können, wurde die Lösung anschließend in ein 50 mL Falcontube filtriert, auf 10 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit Alufolie umwickelt, sodass es lichtgeschützt ist. Die Konzentrationen betragen 0,66 % Eosin und 8,12 % Nigrosin.

Da Nigrosin eine geringere Löslichkeit in Wasser aufweist und aufgrund einer vorherigen Testlösung, deren Kontrast (Grund für Nigrosin in der Lösung) auch mit einer geringeren Konzentration deutlich war, habe ich mich entschieden die nach WHO-Standards benötigte Menge von 0,100 g (10 %) zu verringern. Dieser Testlösung war ebenfalls Natriumchlorid beigefügt worden, welches eine starke Kristallbildung hervorrief, sodass in der endgültigen, hier beschriebenen ENT komplett darauf verzichtet wurde.

Für den HOS würde zunächst die dafür vorgesehene Lösung^[1] hergestellt, indem 2,697 g Levulose (= Fructose) und 1,461 g Natriumcitrat-Dihydrat in 200 mL destilliertem Wasser gelöst wurden. Die Konzentrationen betragen 74,85 mM Levulose und 25,85 mM Natriumcitrat-Dihydrat. Diese Lösung wurde im Anschluss im Kühlschrank gelagert.

Es wurden 50 mL V-HEPES PLUS 1 durch Zugabe von 1 M HCl-Lösung bei einer Temperatur von 37,1 °C auf einen pH-Wert von 6,91 eingestellt, um die Lösung H69 zu erhalten. Es wurden erneut 50 mL V-HEPES PLUS 1 ohne pH-Änderung benutzt, um 0,486 g Hydroxypropylcellulose darin zu lösen. Die Konzentration betrug 0,972 %. Der pH-Wert betrug 7,29. Diese Lösung wird H+HPC genannt.

Die Auftau-Testlösung (ATT) hatte ein Endvolumen von 50 mL, das zunächst aus 47 mL V-HEPES PLUS 2 bestand, dem dann 1,06 mL HSA (Massenkonzentration: 25 g/100 mL) und 0,496 g HPC zugefügt wurden. Im Anschluss wurde die Lösung mit 1 M NaOH bei einer Temperatur von 37 °C auf einen pH-Wert von 7,59 eingestellt und mit V-HEPES PLUS 2 auf 50 mL aufgefüllt. Die Endkonzentrationen betragen 0,992 % HPC und 10,3 mg/mL HSA.

Für die Worstcase-Testlösung wurde eine Einwaage von 0,397 g HPC in einem Becherglas in 18 mL H-HSA gelöst. Diese Lösung wurde im Anschluss bei einer Temperatur von 37 °C mit 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 8,28 eingestellt und im Anschluss auf 20 mL mit V-HEPES ohne HSA aufgefüllt. Die Konzentration von HPC betrug 1,985 %.

3.2.2. Durchgeführte Methoden

3.2.2.1. Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung für die in 3.2.2.7. beschriebene Testreihe bestand darin die zum Teil frischen Proben für mindestens 30 Minuten im CO₂-Inkubator im Probenbecher mit geschlossenem Deckel auf 37 °C zu inkubieren bis die Liquifizierung abgeschlossen war. Dies ist ein Prozess bei der das frisch ejakulierte zähflüssige Sperma durch Enzymaktivität weniger viskos wird. Im folgenden wird immer der Begriff Sperma benutzt und sollte als Sperma im liquifizierten Zustand verstanden werden. Es wurde ein CO₂-Inkubator benutzt, weil kein weiterer Inkubator bei 37 °C zur Verfügung stand. Am gleichen Tag wurden auch von den benutzten Kulturmedien und der HOS-Lösung jeweils 1 mL in Reaktionsgefäßen mit geschlossenem Deckel für 30 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C vorgewärmt, um einen Temperaturunterschied zwischen Probe und Probemedien beim Verdünnungsschritt zu minimieren. Auch die weiteren leeren, für die Verdünnungen vorgesehenen Reaktionsgefäße wurden 30 Minuten mit geschlossenem Deckel vorgewärmt, sodass an jedem Testtag zu Beginn jeweils 3 Reaktionsgefäße mit den Probemedien (ATT, WCT und V-HEPES PLUS), 3-5 leere Reaktionsgefäße und 3-5 Reaktionsgefäße mit HOS-Lösung (je nach Test-

menge) vorbereitet im Inkubator standen. Parallel dazu wurden sowohl 2 Minuten vor der ersten Probe (Referenz T0), als auch vor jeder weiteren der Proben, die nach der geplanten Inkubation, bearbeitet wurden, ein Reaktionsgefäße mit 20 µL der vor Gebrauch gevortexten ENT vorbereitet. Die Referenz dient ebenfalls als Kontrolle nach 3 stündiger Inkubation und wird deshalb im weiteren Verlauf so benannt (Kontrolle = Referenz T180), da es einen Grundwert benötigt, um die Veränderungen der benutzten Probemedien zu ermitteln.

Für die in 3.2.2.6. beschriebene Testreihe wurde nur ein Reaktionsgefäß mit V-HE-PES PLUS und ein leeres, für die Verdünnung vorgesehenes Reaktionsgefäß für 30 Minuten mit der nativen Probe bei 37 °C im CO₂-Inkubator vorgewärmt.

3.2.2.2. Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)

Beim hypoosmotischen Schwelltest wurden 0,1 mL der Probe in 1 mL HOS-Lösung überführt und für 30 Minuten bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µL der Probe in der Maklerkammer ausgezählt. Da in den verdünnten Proben oft keine 200 Spermien in 10 µL vorhanden waren, wurden alle auffindbaren Spermien gezählt. Diese wurden in coiled und uncoiled unterschieden. Hierfür wurde das 20x-Objektiv benutzt.

3.2.2.3. Eosin-Test

Bei der Eosin-Nigrosin-Färbung wurden 20 µL der ENT (die bei Raumtemperatur gelagert und nicht erwärmt wurde) mit 20 µL der 37 °C warmen Probe vermischt und nach 30 sekundiger Inkubation 10 µL dieser Mischung auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Auswertung geschah innerhalb einer Stunde nach dem Ausstrich (Zeit der Lufttrocknung bei Raumtemperatur mit inbegriffen). Die Spermien wurden anhand der Färbung unterschieden. Eine weiße Spermie wird als lebendig angesehen, eine rötlich gefärbte Spermie hat eine beschädigte Membran und wird als tot angesehen. Die Spermien wurden mit dem 40x-Objektiv gezählt.

3.2.2.4. Manuelle Zählung

Bei der manuellen Zählung wurden 10 μL einer frisch aus dem 37 °C warmen CO_2 -Inkubator entnommenen Spermaprobe auf die Maklerzählkammer pipettiert und auf dem Objektisch des Mikroskops platziert. Nach 2 Minuten wurden immer zweimal 200 Spermien gezählt und in motil und immotil unterschieden. Hierfür wurde das 20x-Objektiv benutzt. Nach jeder Auszählung wurde die Maklerzählkammer gereinigt.

3.2.2.5. CASA-Methode

Es wurden 3 Videos zufälliger Sichtfelder der Mikroskopkamera in drei unterschiedlichen Quadranten der Maklerkammer aufgenommen. Die Länge dieser Videos betrug 2 Sekunden. Diese Videos wurden im Anschluss an die Testreihen mit dem Programm ImageJ von Fiji geöffnet und die einzelnen Spermien mit dem Programm TrackMate getrackt. Hierbei wurden die motilen und immotilen Spermien gezählt und daraus die Spermienkonzentration und die Gesamtzahl der Spermien errechnet. Das 20x-Objektiv wurde hierfür benutzt.

Zuerst wurde das Programm ImageJ und darüber das gewünschte in Graustufen konvertierte Video geöffnet. Dieses wurde nun dupliziert, um ein zweites Fenster mit gleichem Inhalt zu erhalten, um in diesem das Video beziehungsweise den Framestack zu bearbeiten. Es ist notwendig das Video zu invertieren, damit das Trackingprogramm die Spermien erkennen kann. Nachdem das Video invertiert wurde, wurde das Trackingprogramm geöffnet und die Crop-Settings übernommen. Im nächsten Fenster wird der „LoG-detector“ (Laplacian of Gaussian) ausgewählt, der die Spermien im ersten Frame detektiert. Danach muss der Spermindurchmesser auf 25 Pixel und die Qualitätsschwellenwert auf 1 eingestellt werden. Im Anschluss werden die Zellen aller Frames detektiert, der Qualitätsschwellenwert auf die detektierten Spermien angewendet und die Option gegeben Filter anzuwenden. Diese Option wurde aber nicht genutzt. Im Anschluss wurde der „Simple LAP tracker“ ausgewählt und die „Linking max distance“ auf 50, die „Gap-closing max distance“ auf 70 und die „Gap-closing max frame gap“ auf 2 gesetzt. Nun wurden diese Parameter angewendet und im darauffolgenden Fenster nach „Track max speed“ gefiltert, sodass die Bewegun-

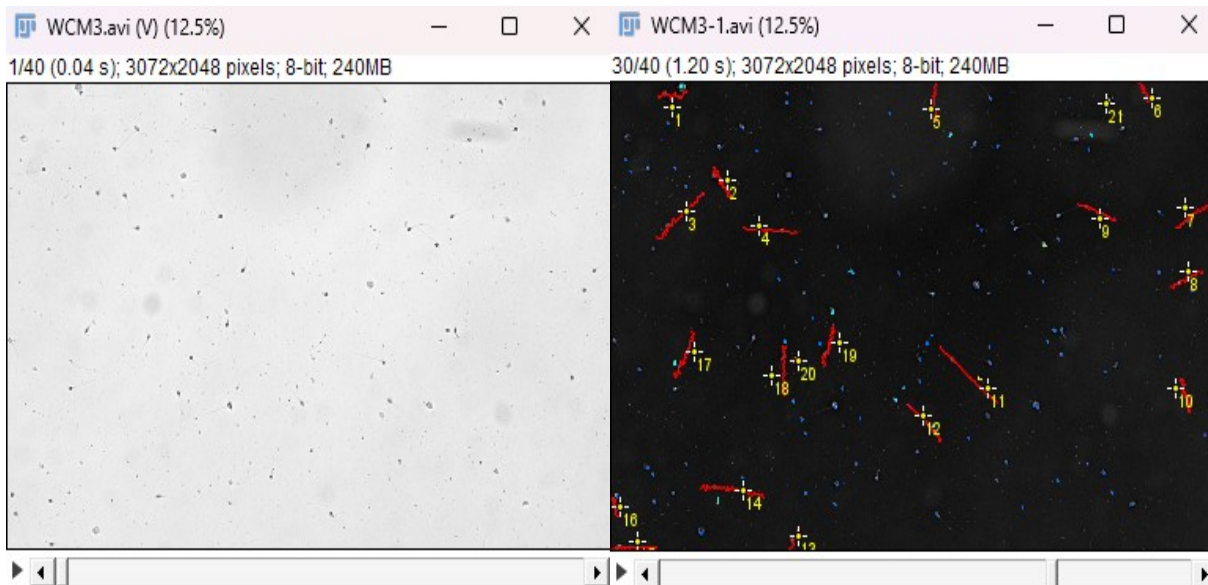


Abbildung 3: Diese Abbildung zeigt das aufgenommene Video (links) und das Endergebnis nach Tracking der motilen Spermien, deren Bewegung als gelbe (moderate Geschwindigkeit) bis rote (schnelle Bewegung) Linie dargestellt wird. Quelle: Eigenes Foto.

gen farblich von blau (langsam 0,1 Pixel pro Frame) bis rot (alles über 10 Pixel pro Frame) dargestellt werden. Dann muss das „Multi-Point-Tool“ (Zähl-Tool in ImageJ, siehe Abbildung 3) ausgewählt werden, womit sich dann die einzelnen getrackten Bahnen zählen lassen.

Für die Gesamtzellzahl werden nun noch die ganzen Zellen gezählt, die sich nicht bewegen. Dafür habe ich ein neues Graustufenduplikat geöffnet, das primäre Video laufen lassen und dann die ganzen immotilen Spermien im Duplikat über das Multi-Point-Tool gezählt.

3.2.2.6. Methodenänderung

Die Methodenänderung fand am 18.09.2025 statt und gilt für 13 Proben ab dem 19.09.2025 einschließlich und bestand darin, dass während der ersten 3 Messungen mit 14 unterschiedlichen Messpunkten die Videos für die CASA-Software direkt nach der Befüllung der Maklerzählkammer aufgenommen wurden und die manuelle Zählung ebenfalls direkt im Anschluss durchgeführt wurde. Dabei ist aufgefallen, dass die Spermien im Laufe von 2-3 Minuten nach der Befüllung eine signifikante Erhöhung der Motilität erfahren, sodass sich diese während der manuellen Zählung, die länger als 2 Minuten dauerte, auch in den Ergebnissen offenbarte. Nach dieser Erkenntnis wurde die manuelle Zählung erst nach 2 Minuten begonnen und die CASA-Videos nach der Zählung aufgenommen.

3.2.2.7. Testreihe Methodenetablierung

Die Testreihe zur Methodenetablierung bestand daraus die nativen Spermaproben je nach Spermienkonzentration mit V-HEPES PLUS so zu verdünnen, dass im Sichtfeld der Mikroskopkamera maximal 50 motile Spermien zählbar waren. Hierzu wurde die Spermaprobe aus dem CO₂-Inkubator genommen, auf die vorbereitete Maklerzählkammer pipettiert und wieder in den CO₂-Inkubator gestellt. Dieser Vorgang sollte möglichst schnell (innerhalb von 60 Sekunden) abgeschlossen sein. Diese Verdünnung ist die Probe zum Startzeitpunkt T₀ und dient als Referenz für alle weiteren Messungen. Für jeden Messpunkt zum Zeitpunkt T_n wurde die Probe aus dem CO₂-Inkubator entnommen, 10 µL der Probe auf der Maklerkammer platziert und wieder im CO₂-Inkubator platziert (innerhalb einer Minute). Die Spermien wurden nach 2 Minuten ausgezählt (2x 200 Zellen).

3.2.2.8. Testreihe Probemedien (ATT und WCT)

Die Testreihe mit den Probemedien (ATT und WCT) verlief ähnlich wie die Methodenethablierung. Zusätzlich zu den einzelnen Proben wurde hier der HOS und der Eosin-Test angewendet. Es wurden zunächst 10 µL der nativen Probe auf der Maklerzählkammer verteilt, um eine Verdünnung zu evaluieren, die maximal 50 motile Spermien im Sichtfenster des Videoprogramms übrig ließ. Diese Verdünnung galt im Anschluss für jedes an dem Tag getestete Probemedium (siehe Tabelle 15, Seite 46). Diese Verdünnung variierte von Probe zu Probe. Da hier der Ausgangspunkt für alle Verdünnungen und damit auch der Spermakonzentrationen gleich ist, wurde die Verdünnung mit V-HEPES PLUS als Referenz zum Zeitpunkt T0 genommen. Während diese Verdünnung nun für die manuelle Zählung in der Maklerzählkammer für 2 Minuten auf dem Objektisch des Mikroskops inkubierte, wurden 100 µL der nativen Probe in die vorbereitete HOS-Lösung transferiert und in den CO₂-Inkubator gestellt. Danach wurden 20 µL der Referenz in das vorbereitete Reaktionsgefäß mit ENT überführt, für 30 Sekunden inkubiert und auf einen Objektträger ausgestrichen. Die Referenz wurde nach dem Ausstrich wieder in den CO₂-Inkubator gestellt. Im Anschluss begann die manuelle Zählung, bei der zweimal 200 Zellen gezählt wurden, die in motil und immotil differenziert wurden. Nach der manuellen Zählung wurden 3 Videos à 2 Sekunden Laufzeit in 3 verschiedenen Quadranten der Maklerzählkammer aufgenommen und ausgewertet. Die weiteren Verdünnungen (ATT und WCT) wurden dann im Abstand von 10 beziehungsweise 20 Minuten hergestellt und direkt in den CO₂-Inkubator gestellt. Das ist wichtig, damit man für jede Probe nach der dreistündigen Inkubation 10 Minuten zur Motilitätsauswertung hat, sowie den HOS und den Eosin-Test. In der Zwischenzeit (also in den 30 Minuten zwischen dem Ansatz der Referenz und der Auswertung des HOS-Ansatzes) trocknete der Ausstrich und es wurden dann 200 Spermien unter dem 40x-Objektiv in rot und weiß differenziert ausgezählt. Nach der 30 minütigen Inkubation wurden 10 µL des HOS-Ansatzes in die Maklerzählkammer pipettiert und ebenfalls ausgewertet, indem 200 Spermien gezählt und in coiled und uncoiled unterschieden wurden.

Nach der dreistündigen Inkubation, wurde die Kontrolle und die vorbereitete HOS-Lösung aus dem CO₂-Inkubator geholt, erneut mit 100 µL der frisch sanft auf- und abpipettierten Kontrolle beimpft und für 30 Minuten inkubiert. Die Kontrolle ist die gleiche Lösung wie die Referenz. Sie dient als Kontrollwert der Ausgangslösung nach dreistündiger Inkubation (Kontrolle = Referenz T180). Im Anschluss wurden erneut 10 µL der Kontrolle auf die Maklerzählkammer pipettiert und für zwei Minuten auf dem Objektisch platziert. Währenddessen wurden 20 µL der vorbereiteten ENT mit 20 µL der Kontrolle vermischt, 30 Sekunden inkubiert und danach auf einem Objektträger ausgestrichen. Nun wurde die manuelle Zählung durchgeführt, 3 Videos aufgenommen und im Anschluss die Maklerzählkammer für die nächste Probe vorbereitet. Der Ablauf war identisch bei der Prozessierung der beiden weiteren Proben (ATT und WCT). Da zu Beginn die Referenz bei T0, die ATT bei T10 und die WCT bei T20 angesetzt wurden, ergibt sich für alle 3 eine Inkubationszeit von 3 Stunden, da wir die Kontrolle bei T180 aus dem CO₂-Inkubator entnommen haben, die ATT bei T190 und die WCT bei T200. Die HOS-Ansätze wurden wiederum bei T210 (Kontrolle), T220 (ATT) und T230 (WCT) ausgewertet, sodass diese auch jeweils 30 Minuten Inkubationszeit erhielten. Nach dem HOS wurde auch noch der Ausstrich der Kontrolle ausgewertet. Die weiteren Proben wurden genauso prozessiert.

Zusätzlich wurde die Reihenfolge der prozessierten Proben immer gewechselt, um zeitliche Schwankungen auszuschließen. Mal wurde zuerst die Referenz erstellt, mal die ATT und mal die WCT. Der HOS und Eosin-Test der Referenz wurde dann um 10 beziehungsweise 20 Minuten verzögert. Bei den Doppelbestimmungen hat sich der Zeitintervall auf 6 beziehungsweise 7 Minuten reduziert. Da das zu wenig Zeit war, wurde auf die Doppelbestimmung verzichtet.

3.2.2.9. Grundlegende Informationen zur Methodenauswertung

Zunächst muss geklärt werden, ob CASA und manuelle Zählung gleichwertige Methoden sind. Um das zu klären, werden zunächst die Messwerte analysiert, indem die Veränderung der inkubierten Proben von der Referenz ermittelt werden, mit Bezug auf die Gesamtzellzahl (normalisiert) und ohne. Als Veränderung soll die Veränderung der Zellzahl von der Referenz (dem Anfangswert bei T0) zur Zellzahl nach 3

Stunden Inkubation verstanden werden. Dabei wurde bei der manuellen Zählung ein Mittelwert der beiden Motilitätsmesswerte der Referenz genommen und mit den Mittelwerten der manuellen Zählungen der Kontrolle, ATT und WCT (Proben nach 3 Stunden Inkubation) verglichen. Ohne Normalisierung wurden bei CASA die motilen Zellen in den 3 Videos gezählt und gemittelt. Mit Normalisierung wurde die Gesamtzellzahl ermittelt und als Konzentrationsfaktor mit einbezogen, um die gezählten motilen Spermien an die Konzentration der Referenz anzupassen und somit eine erhöhte oder verringerte Konzentration auszugleichen und eine tatsächliche Vergleichbarkeit zu schaffen. Die manuelle Zählung ist genau genommen auch normalisiert, da immer 200 Zellen gezählt werden, sodass die Gesamtzellzahl immer 400 ist und im nachfolgenden Beispiel also ein Mittelwert von 150 motilen Spermien auch einen Mittelwert von 50 immotilen bedeutet. Beispiel der Abweichungsberechnungen:

Motilitätswerte der Referenz:	149 und 151 motile Spermien.
Mittelwert der Referenz:	150 motile Spermien
Motilitätswerte der Probe ATT bei T 180:	118 und 122 motile Spermien.
Mittelwert der Probe ATT bei T180:	120 motile Spermien
Veränderung:	$(1 - (120/150)) * 100 = 20 \%$
CASA-Zählung der Referenz:	14, 18 und 16 motile Spermien
Mittelwert der Referenz:	16 motile Spermien
Gesamtzahl:	48 motile und 52 immotile Spermien (= 100 Spermien)
CASA-Zählung der Probe ATT bei T180:	8, 9 und 13 motile Spermien
Mittelwert der Probe ATT bei T180:	10 motile Spermien
Gesamtzahl:	30 motile und 46 immotile Spermien (= 76 Spermien)
Veränderung:	$(1 - (10/16)) * 100 = 37,5 \%$
Veränderung CASA-Manuell:	$37,5 \% - 20 \% = 17,5 \%$
Konzentrationsfaktor:	$100 / 76 = 1,32$
normalisierter Mittelwert:	$10 * 1,32 = 13,2$ motile Spermien

normalisierte Veränderung: $(1 - (13,2/16)) * 100 = 17,5 \%$
normalisierte Veränderungung CASA – Manuell: $17,5 \% - 20 \% = - 2,5 \%$.

Aus dieser Beispielrechnung ergibt sich eine Veränderung von CASA zur manuellen Zählung von 17,5 % und eine normalisierte Veränderung von - 2,5 %. Dies bedeutet, dass mit CASA ohne Einbezug der Gesamtzellzahl 17,5 % mehr Motilität festgestellt wird als mit einer manuellen Zählung. Wenn die Gesamtzellzahl jedoch zusätzlich mit einbezogen wird, so ergibt sich eine geringere normalisierte Veränderung von - 2,5 %. Es wird mit CASA also eine um 2,5 % verringerte Motilität festgestellt als durch manuelle Zählung.

Um nun einzuordnen, ob diese Veränderungen tolerierbar und die Methoden damit gleichwertig sind oder nicht, benötigt es ein Akzeptanzkriterium. Hierfür wird ein Toleranzbereich um den Wert der manuellen Zählung festgelegt, indem die unterschiedlichen Messwerte liegen müssen. Bei Vitromed wird ein interner Maßstab verwendet, um die Vergleichbarkeit und Qualität der manuellen Zählung zwischen einzelnen Labormitarbeitern festzustellen. Dieser Toleranzbereich beträgt $\pm 15\%$. Dieser Maßstab wurde auf diese Arbeit ebenfalls angewendet, da die CASA-Software hier die Bewertung eines Labormitarbeiters ersetzt. In diesem Kontext wäre also die Veränderung von 17,5 % außerhalb des Toleranzbereichs und nicht akzeptabel und die normalisierte Veränderung von - 2,5 % innerhalb des Toleranzbereichs und somit akzeptabel.

4. Ergebnisse

4.1. Test mit saurer, viskoser und HSA-freien Lösung

In dieser Testreihe wurde eine Probe in V-HEPES PLUS (pH 7,3) und parallel dazu in einer leicht angesäuerten V-HEPES PLUS-Lösung (pH 6,9), einer HSA-freien V-HEPES PLUS-Lösung und einer V-HEPES PLUS-Lösung mit 1% HPC inkubiert, um zu sehen, ob sich ein Unterschied bei diesen veränderten physikochemischen Einflussfaktoren erkennen lässt, um diese Veränderungen dann auf das Probemedium ATT zu übertragen. Die saure und die HSA-freie Lösung wich stärker ab, die viskose Lösung nicht.

4.2. Testreihe Methodenetablierung

Während der Testreihe der Methodenetablierung wurde die Ausgangslösung (Sperma in V-HEPES PLUS 1) immer mit sich selbst verglichen, nur in unterschiedlichen Zeitintervallen. Ein Messpunkt beschreibt eine Messung die mit der Referenz verglichen wurde, sodass bei Messungen einer Probe zu den Zeitpunkten T20, T40, T60 und T80 insgesamt 4 Messpunkte entstehen. Jeder dieser Messpunkte besitzt eine Veränderung und eine normalisierte Veränderung, sodass also bei den 4 Messpunkten insgesamt 8 Messwerte entstehen. Es wurden vier Messpunkte einer Probe vor und 35 Messpunkte von 6 Proben nach der Methodenänderung aufgenommen. Von den vier Messpunkten liegt nur eine normalisierte Veränderung (1 von 8 Messwerte = 12,5 %) innerhalb des Toleranzbereichs. Das ergibt Sinn, da die Videos zu diesem Zeitpunkt nicht die gleiche Situation beschreiben wie die manuelle Zählung, da sich, wie bereits beschrieben, die Motilität nach 2-3 Minuten signifikant erhöht. Nach der Methodenänderung liegen 25 von 36 Messpunkten (69,44 %) und normalisiert 28 von 36 Messpunkten (77,78 %) nicht außerhalb des Toleranzbereiches. Die außerhalb des Toleranzbereich liegenden Messpunkte der normalisierten Veränderungen treten hauptsächlich in den ersten drei Proben auf. Insgesamt sind 54 von 72 Messwerten innerhalb der Toleranzgrenze, was einem prozentualen Anteil von 75 % entspricht. Wenn man sich nun die folgende Grafik anschaut wird ebenfalls erkennbar,

dass eine Normalisierung der Veränderungen sinnvoll und vorallem notwendig ist. Es gibt zwei starke Ausreißer (Messpunkt 24: 158,81 % und Messpunkt 28: 145,13 %), deren normalisierte Veränderungen jedoch nur - 5,24 % und - 3,77 % betragen und damit innerhalb des Toleranzbereiches liegen. Allerdings gibt es auch Messpunkte, die den gegenteiligen Effekt zeigen, deren Veränderungen ohne Normalisierung innerhalb des Toleranzbereiches liegen (Messpunkt 11: 1,06 % und Messpunkt 12: - 12,38 %) und normalisiert mit jeweils - 33,93 % und - 22,59 % außerhalb liegen. Insgesamt gibt es 9 Messpunkte bei denen die Normalisierung den Wert in den Toleranzbereich bringt und 5 Messpunkte, die dadurch außerhalb liegen. Hierbei ist jedoch erkennbar, dass die maximale Veränderung durch die Normalisierung bei - 33,93 % und ohne Normalisierung bei 158,81 % liegt, sie durch eine Normalisierung also auch abgeschwächt wird. Die normalisierte Veränderung über alle Messpunkte hinweg betrug $- 4,12 \pm 14,47$ % und nach Methodenänderung $- 6,40 \pm 12,29$ %. Ohne Normalisierung lagen diese Werte vor Methodenänderung bei $8,98 \pm 39,53$ % und danach bei $6,75 \pm 39,87$ %.

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methodenetablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 1.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamtzellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA – manuell in %	Norm. Veränd. CASA – manuell in %
18.09.25	T0	65	-	16,33	231	-	-	-	-
	T50	70	7,69	23	230	40,82	30,41	33,12	22,72
	T70	79	21,54	30	260	83,67	50,47	62,14	28,93
	T100	57,5	-11,54	11,33	190	-20,61	-12,21	-19,07	-10,67
	T160	71	9,23	24,33	237	48,98	33,89	39,75	24,66

Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methodenetablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 2.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamtzellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA – manuell in %	Norm. Veränd. CASA – manuell in %
19.09.25	T0	88,5	-	17,33	120	-	-	-	-
	T30	74	-16,38	16	150	-7,69	-26,15	8,69	-9,77
	T40	77,5	-12,43	18,33	166	5,77	-23,54	18,20	-11,11
	T60	70	-20,90	15	168	-13,46	-38,19	7,44	-17,28
	T80	72	-18,64	13,67	163	-21,15	-41,95	-2,51	-23,31
	T100	69	-22,03	12,33	136	-28,85	-37,22	-6,81	-15,18
	T120	59	-33,33	7,33	140	-57,69	-63,74	-24,36	-30,40
23.09.25	T0	105	-	20,67	113	-	-	-	-
	T45	100,5	-4,29	20	177	-3,23	-38,22	1,06	-33,93
	T80	65,5	-37,62	10,33	142	-50	-60,21	-12,38	-22,59
	T132	55	-47,62	11	136	-46,77	-55,78	0,85	-8,16
	T150	62	-40,95	13,67	165	-33,87	-54,71	7,08	-13,76
	T170	76,5	-27,14	20,33	218	-1,61	-49	25,53	-21,86
	T187	52	-50,48	11	136	-46,77	-55,78	3,70	-5,30
	T210	50	-42,38	10,33	155	-50	-63,55	2,38	-11,17
	T230	45,5	-56,67	73,33	131	-64,52	-69,39	-7,85	-12,73

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methodenetablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 3.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamtzellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA – manuell in %	Norm. Veränd. CASA – manuell in %
25.09.25	T0	94	-	28,33	212	-	-	-	-
	T2	94	0	25	206	-11,76	-9,19	-11,77	-9,20
	T40	80,5	-14,36	24,33	233	-14,12	-21,86	0,24	-7,50
	T60	76,5	-18,62	16	158	-43,53	-24,23	-24,91	-5,61
	T80	70	-25,53	24,33	254	-14,12	-28,32	11,41	-2,79
	T100	48	-48,94	12	150	-57,65	-40,14	-8,71	8,79
01.10.25	T0	172	-	25,67	82	-	-	-	-
	T27	187	8,72	68,67	212	167,53	3,48	158,81	-5,24
	T42	183	6,40	24,67	76	-3,90	3,69	-10,29	-2,70
	T60	176	2,33	14,67	48	-42,86	-2,38	-45,18	-4,71
	T146	170	-1,16	21,67	68	-15,58	1,80	-14,42	2,96
	T220	181,5	5,52	64,33	202	150,65	1,75	145,13	-3,77
	T240	178	3,49	41,67	132	62,34	0,85	58,85	-2,64
	T260	170,5	-0,87	22,67	70	-11,69	3,45	-10,82	4,32
02.10.25	T0	158,5	-	20,33	75	-	-	-	-
	T45	150,5	-5,05	20	69	-1,64	6,91	3,41	11,96
	T69	150	-5,36	22	77	8,20	5,39	13,56	10,75
	T87	152	-4,10	17	59	-16,39	6,28	-12,29	10,38

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der methodenetablierenden Probereihe. Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 4 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 4.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamtzellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA – manuell in %	Norm. Veränd. CASA – manuell in %
10.10.25	T0	73	-	18,33	201	-	-	-	-
	T16	55,5	-23,97	9	157	-50,91	-37,15	-26,94	-13,18
	T45	71	-2,74	18,33	229	0	-12,23	2,74	-9,49
	T60	46,5	-36,30	8,67	110	-52,73	-13,62	-16,43	22,68
	T90	65	-10,96	20,33	236	10,91	-5,54	21,87	5,42
	T115	43	-41,10	11,67	186	-26,36	-31,23	4,73	9,86
	T180	52,5	-28,08	10,67	203	-41,82	-42,39	-13,74	-14,31
	T195	66	-9,59	16	194	-12,73	-9,58	-3,14	0,01

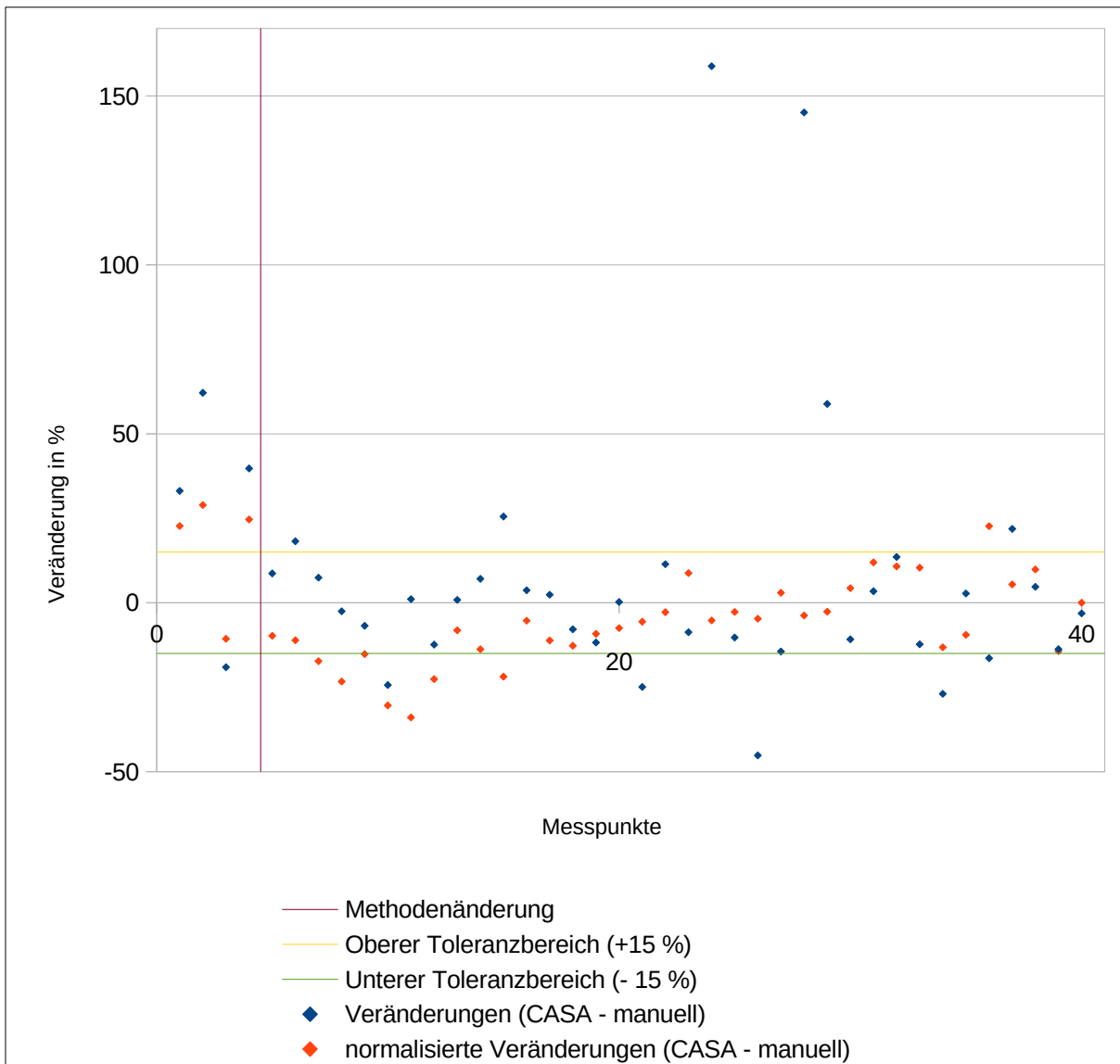


Abbildung 4: Veränderungen mit und ohne Normalisierung der einzelnen Messpunkte der methodenetablierenden Testreihe zur Referenz T0 nach beliebigen Zeitpunkten Tn.

4.3. Testreihe Probemedien

Bei der Testreihe der Probemedien wurde eine Probe mit 6 Messpunkten vor der Methodenänderung und 8 Proben mit 32 Messpunkten danach aufgenommen (Abbildung 5, Seite 37). Von diesen 6 Messpunkten mit 12 unterschiedlichen Messwerten, liegen 6 normalisierte Veränderungen und 3 nicht normalisierte Veränderungen (75 %) innerhalb des Toleranzbereichs und 3 nicht normalisierte Veränderungen (25 %) außerhalb. Ein Unterschied zum Ergebnis aus der Testreihe der Methodenetablierung ist bemerkbar.

Nach der Methodenänderung lagen 20 von 38 (52,63 %) Veränderungen und 31 von 38 normalisierte Veränderungen (81,58 %) innerhalb des Toleranzbereichs. Insgesamt sind 51 von 76 Messwerte (67,11 %) innerhalb des Toleranzbereichs. Erkennbar ist, dass im Vergleich zur vorherigen Testreihe die Streuung bei den nicht normalisierten Veränderungen deutlich stärker ist und auch hier Messpunkte auftreten, die stark abweichen und durch eine Normalisierung in den Toleranzbereich eintreten (Messpunkt 16: 135,87 % und normalisiert 0,76 %). Insgesamt werden durch die Normalisierung 15 Messpunkte in den Toleranzbereich verschoben und 5 weitere aus ihm wieder heraus, sodass auch hier eindeutig die Notwendigkeit der Normalisierung nachgewiesen wird. Der Effekt, dass die normalisierten Veränderungen weniger stark abweichen, ist hier ebenfalls erkennbar. Die normalisierte Veränderung über alle Messpunkte hinweg betrug $7,58 \pm 12,28$ % und ohne Normalisierung lagen diese Werte bei $17,78 \pm 37,47$ %.

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 1.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamt zellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA manuell in %	Norm. Veränd. CASA-manuell in %
17.09.25	T0	171,5	-	25,33	100	-	-	-	-
	T0 2	155	-9,62	27	108	6,58	-1,32	16,20	8,31
	K 1	155,5	-9,33	49,67	193	96,05	1,58	105,38	10,91
	K 2	146	-14,87	32	127	26,32	-0,54	41,18	14,33
	ATT 1	141	-17,78	19	92	-25	-18,48	-7,22	-0,69
	ATT 2	129,5	-24,49	22	103	-13,16	-15,69	11,33	8,80
	WCT	88,5	-48,40	11,33	72	-55,26	-37,87	-6,87	10,53

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 2.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamt zellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA – manuell in %	Norm. Veränd. CASA – manuell in %
22.09.25	T0	142	-	23,67	91	-	-	-	-
	K T135	141,5	-0,35	28	108	18,31	-0,31	18,66	0,04
	K T180	146	2,82	21	78	-11,27	3,52	-14,08	0,70
	ATT 1	137	-3,52	20	81	-15,49	-5,06	-11,97	-1,54
	ATT 2	105,5	-25,7	-	-	-	-	-	-
	WCT	104,5	-26,41	9,33	55	-60,56	-34,75	-34,15	-8,34
24.09.25	T0	115,5	-	34,67	202	-	-	-	-
	K	128	10,82	64,67	247	86,54	52,55	75,72	41,73
	ATT 1	117,5	1,73	39	180	12,5	26,25	10,77	24,52
	ATT 2	129	11,69	39,67	164	14,42	40,94	2,73	29,25
	WCT	95	-17,75	24,33	132	-29,81	7,42	-12,06	25,16
29.09.25	T0	127	-	13,67	55	-	-	-	-
	K	14,5	10,63	15,33	71	12,20	-13,09	1,57	-23,72
	ATT	146,5	15,35	34,33	119	51,22	16,11	135,87	0,76
	WCT	92,5	-27,17	12,67	61	-7,32	-16,43	19,85	10,73

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 3.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. manuell in %	Mittelwert CASA	Gesamt zellzahl CASA	Veränd. CASA in %	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA manuell in %	Norm. Veränd. CASA-manuell in %
02.10.25	T0	72	-	25,33	206	-	-	-	-
	K	90	25	29	188	14,47	25,43	-10,53	0,43
	ATT	83	15,28	27,67	194	9,21	15,97	-6,07	0,69
	WCT	63	-12,50	19	158	-25	-2,22	-12,50	10,28
06.10.25	T0	131	-	24,33	101	-	-	-	-
	K	144,5	10,31	25,67	88	5,48	21,06	-4,83	10,76
	ATT	142,5	8,78	30	111	23,29	12,18	14,51	3,40
	WCT	133	1,53	25,67	96	5,48	10,97	3,95	9,45
09.10.25	K T0	109	-	30,33	173	-	-	-	-
	K T180	142,5	30,73	66,67	270	119,78	40,82	89,05	10,09
	ATT T0	89,5	-17,89	20,33	161	-32,97	-27,97	-15,08	-10,08
	ATT T180	124,5	14,22	55	247	81,32	27	67,10	12,78
	WCT T0	95	-12,84	28,67	165	-5,49	-0,91	7,35	11,93
	WCT T180	108	-0,92	28	152	-7,69	5,06	-6,77	5,98

Tabelle 12: Tabellarische Übersicht der berechneten Werte der Testreihe mit den Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT). Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Veränderungen der manuellen Zählung und der Zählung mittels CASA, sowie die normalisierte Veränderung der CASA-Zählung. Die letzten beiden Spalten beschreiben die Veränderung und die normalisierte Veränderung von CASA – manuelle Zählung, die in Abbildung 5 grafisch dargestellt werden. In Spalte 1 steht das Datum der Durchführung. Teil 4.

Datum	Probenart	Mittelwert manuelle Zählung	Veränd. in % manuell	Mittelwert CASA	Gesamt zellzahl CASA	Veränd. in % CASA	Norm. Veränd. CASA in %	Veränd. CASA manuell in %	Norm. Veränd. CASA-manuell in %
13.10.25	K T0	140	-	23,67	97	-	-	-	-
	K T180	159,5	13,93	32,33	127	36,62	4,35	22,69	-9,58
	ATT T0	142,5	1,79	33	132	39,44	2,46	37,65	0,68
	ATT T180	138	-1,43	27	109	14,08	1,52	15,51	2,95
	WCT T0	141	0,71	33,33	134	40,85	1,96	40,13	1,24
	WCT T180	51	-63,57	8,33	59	-64,79	-42,11	-1,22	21,46
14.10.25	K T0	55	-	5,33	96	-	-	-	-
	K T180	68	23,64	7	91	31,25	38,46	7,61	14,83
	ATT T0	71	29,09	11	140	106,25	41,43	77,16	12,34
	ATT T180	63	14,55	7,33	93	37,50	41,94	22,95	27,39
	WCT T0	62,5	13,64	5,33	81	0	18,52	-13,64	4,88
	WCT T180	17	-69,09	1	70	-81,25	-74,29	-12,16	-5,19

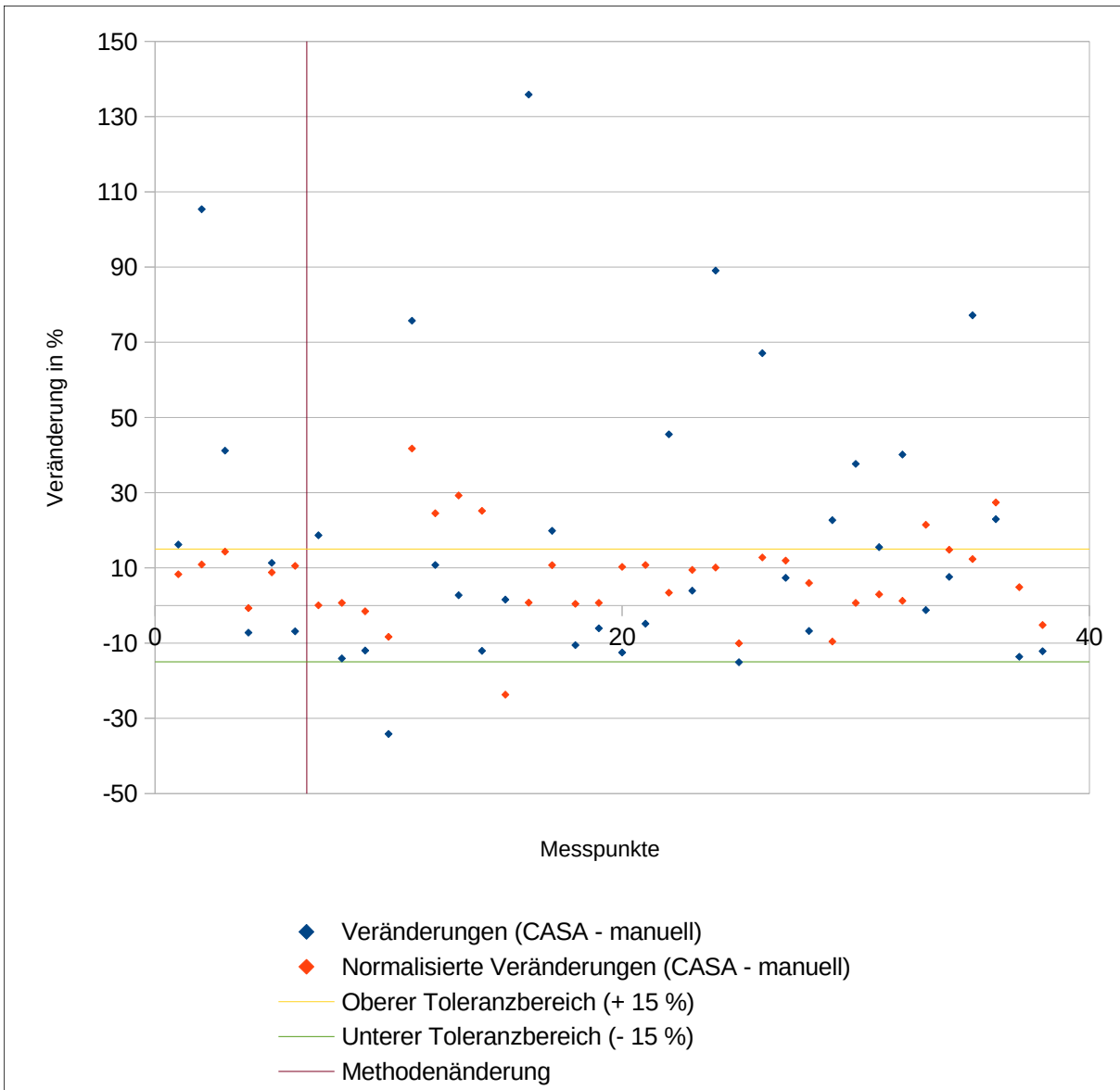


Abbildung 5: Veränderungen mit und ohne Normalisierung der Testreihe mit der Kontrolle und den Probemedien (ATT und WCT) ohne Differenzierung der Probemedien zur Referenz T0 nach dreistündiger Inkubation.

4.4. Einzelne Probemedien im Vergleich

Die einzelnen Probemedien (Kontrolle, ATT und WCT) und vor allem ihre Wirkung nach dreistündiger Inkubation auf die Spermien im Vergleich zur Referenz (Anfangswert bei T0) sind in der manuellen Zählung (Abbildung 6, Seite 41) sichtbar. Die beiden folgenden Diagramme zeigen die Veränderungen der einzelnen Methoden zu den gleichen Proben. Das heißt, dass Abbildung 6 die Veränderung der manuellen Zählung der Proben in Prozent zur manuellen Zählung der Referenz darstellen. Wenn die Referenz im Mittel 150 Spermien gezählt hat und die Kontrolle 135 Spermien gezählt hat, so liegt die Veränderung bei - 10 %. Bei der normalisierten Veränderung wurden nur die Veränderungen der CASA-Zählungen mit Bezug auf die Gesamtzellzahl zur Referenz verglichen (Abbildung 7, Seite 42).

So zeichnet sich deutlich ab, dass das WCT am meisten Spermien in ihrer Motilität hemmt, da die Veränderungen der manuellen Zählung bei jedem Messpunkt den deutlich schlechtesten Wert besitzen, beziehungsweise die Veränderungen entweder die geringste positive Veränderung (Abbildung 6, Messpunkt 6) oder die stärkste negative Veränderung (Abbildung 6, Messpunkt 9) besitzen. Normalisiert ist dieses Ergebnis ebenfalls erkennbar (Abbildung 7, Messpunkt 3 und Messpunkt 9). Die Reihenfolge der einzelnen Probemedien ist bei 8 von 9 Messpunkten unabhängig von manueller oder CASA-Zählung gleich, nur bei Messpunkt 9 haben die Kontrolle und die ATT die Position vertauscht. In 8 von 9 Messpunkten besitzt die Kontrolle die höchste Abweichung bei der manuellen Zählung und in 7 von 9 Messpunkten bei der CASA-Zählung. Bei den restlichen 3 Messpunkten wird die Kontrolle nur von der ATT übertroffen.

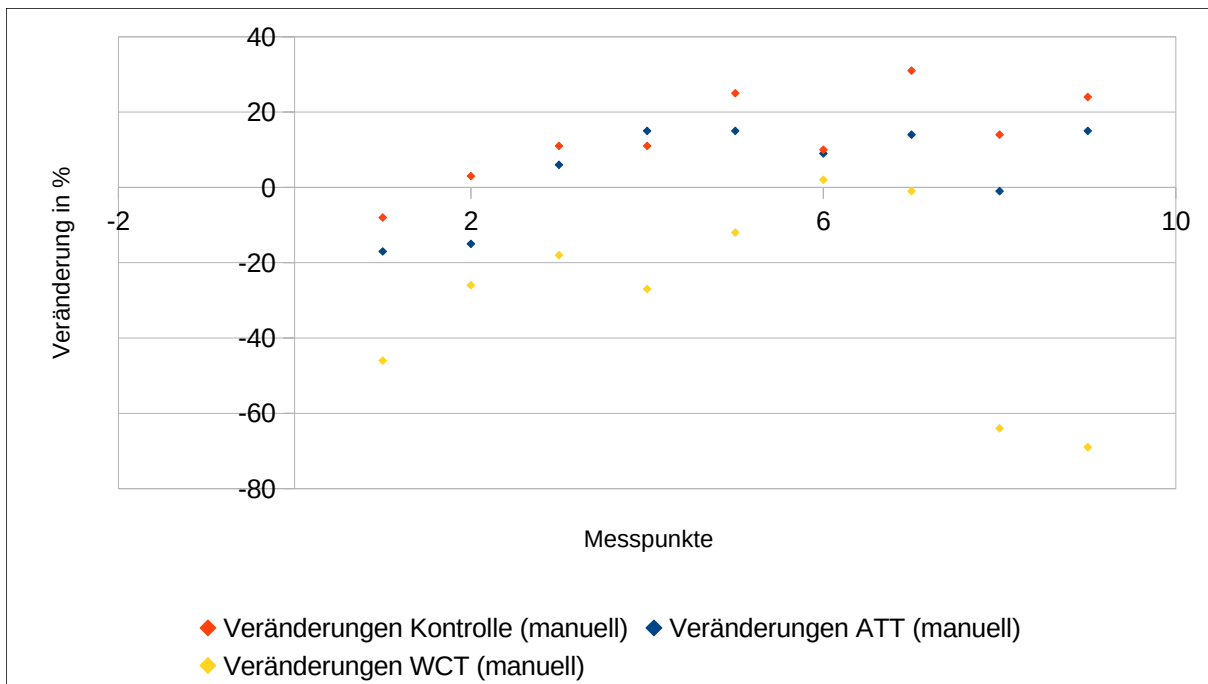


Abbildung 6: Veränderung der einzelnen Messpunkte der Kontrolle und der beiden Probemedien (ATT und WCT) der manuellen Zählung zur Referenz T0 nach dreistündiger Inkubation.

Die Messdaten für Abbildung 6 sind der 4. Spalte der Tabellen 9-12 (Seiten 35-38) zu entnehmen. Um jeweils nur einen Messpunkt zu erhalten, wurden die dort aufgeführten Doppelbestimmungen gemittelt. Diese Mittelung wurde im Messpunkt 1 für die Referenz, die Kontrolle und das ATT, sowie für das ATT in Messpunkt 2 und 3 durchgeführt.

Die Messdaten für Abbildung 7 der 4. Spalte der Tabellen 9-12 (Seiten 35-38) zu entnehmen. Die Doppelbestimmungen wurden hier gleichermaßen durchgeführt.

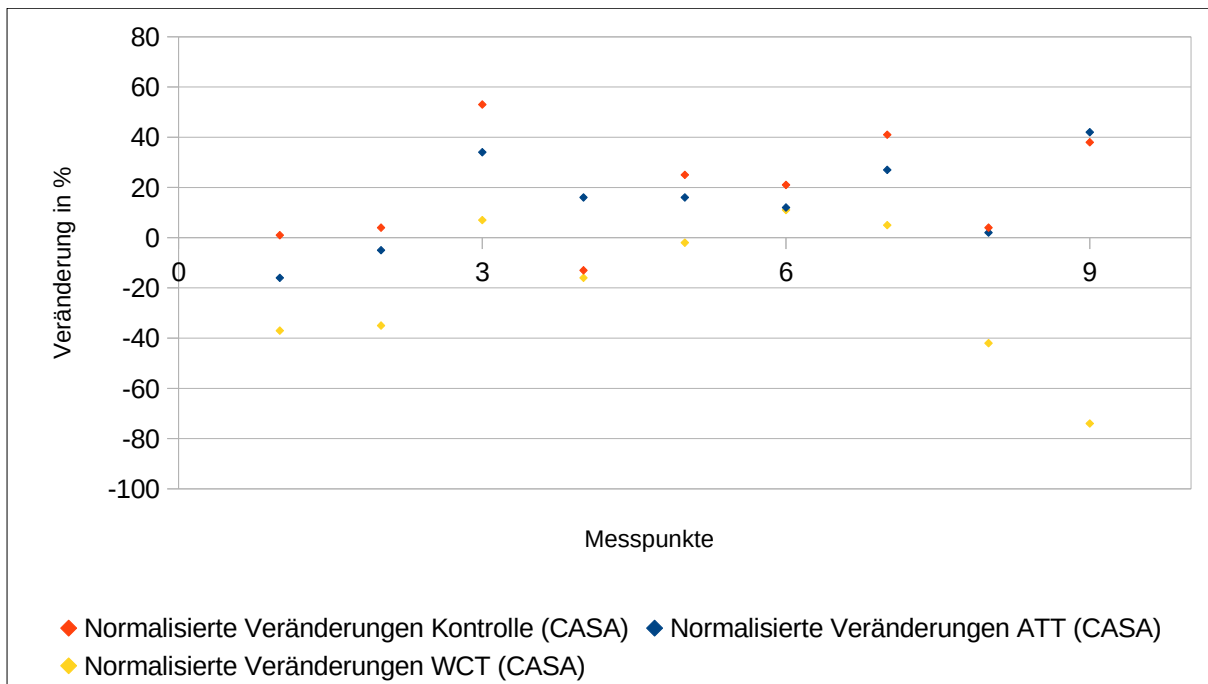


Abbildung 7: Normalisierte Veränderung der einzelnen Messpunkte der CASA-Zählung zur Referenz T0 nach dreistündiger Inkubation.

4.5. HOS und Eosin-Test

Beim HOS ist erkennbar, dass sich die Membranfunktion innerhalb der dreistündigen Inkubation nicht korrelierend mit der Motilitätsveränderung (Abbildung 6 und 7) verringert. Die Reihenfolge der Veränderungen der Probemedien variiert von Messpunkt zu Messpunkt. Probe 1 und 4 stimmen größtenteils überein, mit relativ geringer Veränderung der einzelnen Probemedien voneinander. Die Veränderungen bei Probe 5 sind bei ATT und WCT übereinstimmend und grundsätzlich nah bei einander. Probe 8 und 9 sehen ebenfalls ähnlich aus. Es ist jedoch keine grundsätzlich gleichmäßige Veränderung oder Reihenfolge erkennbar. Veränderung bedeutet sowohl beim HOS, als auch beim Eosin-Test die Veränderung der Zählung nach dreistündiger Inkubation. Wenn beim HOS zum Startzeitpunkt T0 zunächst 80 % der Spermien coiled sind und beim Zeitpunkt T180 der Kontrolle 72 % der Spermien coiled vorliegen, so ist ein Verlust von 10 % vorhanden und in Abbildung 8 auf Seite 45 würde dieser als -10 % dargestellt werden. Gleiches gilt für ungefärbte Spermien beim Eosin-Test (Abbildung 9, Seite 45).

Tabelle 13: Übersicht des HOS und des Eosin-Tests mit den jeweiligen prozentualen Parametern der Messung. Es wird die aus den Rohdaten berechnete prozentuale Rate der Zellen, die beim HOS als coiled (Membran funktionell) gewertet wurden und die beim Eosin-Test als weiß (Membran unbeschädigt, Zelle lebendig) bewertet wurden. Zudem wird die Veränderung der einzelnen dreistündig inkubierten Proben von der Referenz berechnet. Ein – bedeutet einen nicht gemessenen Wert bei der letzten Probe. Teil 1.

Datum	Probenart	HOS		Eosin-Test	
		Coiled%	Veränderung in %	Weiß%	Veränderung in %
17.09.25	T0	76,92	-	90	-
	T0 2	76,32	-0,79	85,5	-5
	K 1	70,69	-8,1	84,5	-6,11
	K 2	71,83	-6,62	83,5	-7,22
	ATT 1	69,64	-9,46	78	-13,33
	ATT 2	70,73	-8,05	82	-8,89
	WCT	72,37	-5,92	77	-14,44
22.09.25	T0	72	-	80	-
	K	67,47	-6,29	86,5	8,13
	ATT 1	62,96	-12,55	83	3,75
	ATT 2	74,14	2,97	80,5	0,63
	WCT	72,97	1,35	81,5	1,88
24.09.25	T0	78,5	-	81	-
	K	77,23	-1,62	80	-1,23
	ATT 1	72,38	-7,79	75	-7,41
	ATT 2	74,51	-5,08	78	-3,70
	WCT	70,13	-10,66	74	-8,64
29.09.25	T0	76	-	86	-
	K	68,42	-9,97	83,5	-2,91
	ATT	67,88	-10,69	77	-10,47
	WCT	69,33	-8,77	77	-10,47

Tabelle 14: Übersicht des HOS und des Eosin-Tests mit den jeweiligen prozentualen Parametern der Messung. Es wird die aus den Rohdaten berechnete prozentuale Rate der Zellen, die beim HOS als coiled (Membran funktionell) gewertet wurden und die beim Eosin-Test als weiß (Membran unbeschädigt, Zelle lebendig) bewertet wurden. Zudem wird die Veränderung der einzelnen dreistündig inkubierten Proben von der Referenz berechnet. Ein – bedeutet einen nicht gemessenen Wert bei der letzten Probe. Teil 2.

Datum	Probenart	HOS		Eosin-Test	
		Coiled%	Veränderung in %	Weiß%	Veränderung in %
02.10.25	T0	91,50	-	93,5	-
	K	87,50	-4,37	92	-1,60
	ATT	86,50	-5,46	95	1,60
	WCT	86,50	-5,46	92,5	-1,07
06.10.25	T0	73	-	88	-
	K	65,83	-9,82	77,5	-11,93
	ATT	77,21	5,76	72	-18,18
	WCT	62,60	-14,25	71,5	-18,75
09.10.25	T0	83,5	-	81	-
	K	75,5	-9,58	80	-1,23
	ATT	88,5	5,99	78	-3,70
	WCT	79	-5,39	78	-3,70
13.10.25	T0	65,50	-	85	-
	K	76,04	16,09	88	3,53
	ATT	75,61	15,43	84	-1,18
	WCT	65,38	-0,18	79	-7,06
14.10.25	T0	69,50	-	-	-
	K	75,42	8,52	-	-
	ATT	75,56	8,71	-	-
	WCT	66,06	-4,96	-	-

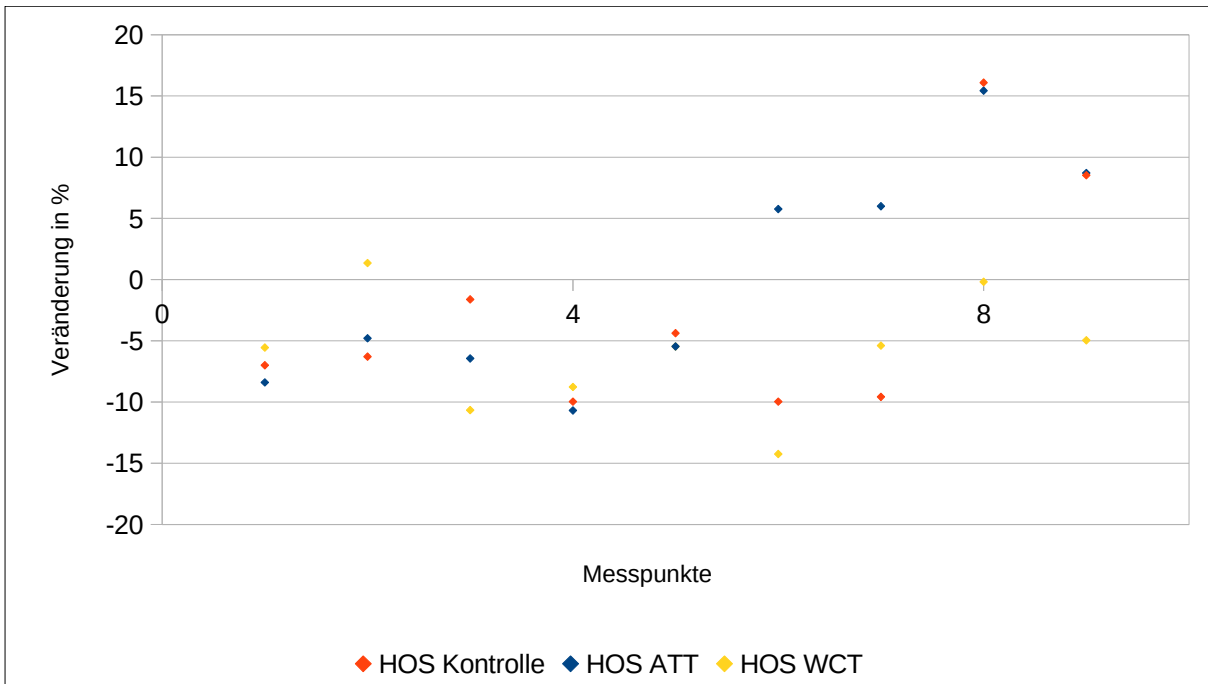


Abbildung 8: Veränderung der einzelnen Messpunkte des HOS zur Referenz T0 nach dreistündiger Inkubation.

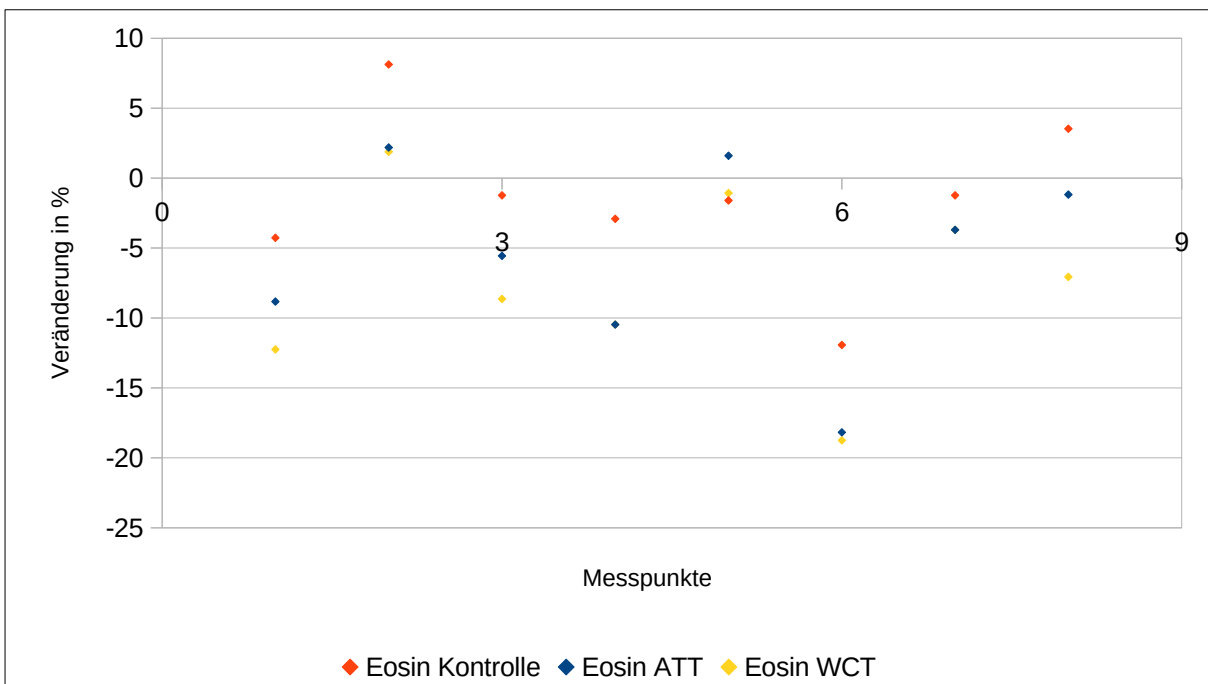


Abbildung 9: Veränderung der einzelnen Messpunkte des Eosin-Tests zur Referenz T0 nach dreistündiger Inkubation.

Der Eosin-Test auf der anderen Seite zeigt eine gewisse Korrelation zur Motilität. Bis auf einen Messpunkt (Messpunkt 5) ist die Kontrolle der positivste Messpunkt. Die Veränderung des ATT ist in jedem Punkt größer oder gleichgroß (Messpunkt 4 und 7) wie die Veränderung des WTC, sodass sich bis auf Messpunkt 5 die Reihenfolge der Vitalität als Kontrolle > ATT ≥ WTC darstellt.

4.6. Probenqualität der Testreihe Probemedien

Tabelle 15: Volumen, Konzentration und Gesamtzellzahl der einzelnen Proben der Testreihe Probemedien und die dazugehörige Vitalität der Eosin-Nigrosin-Färbung.

Probe	Volumen in mL	Konzentration in 10 ⁶ /mL	Gesamtzellzahl in 10 ⁶	Vitalität in %	Verdünnungsfaktor Probe:Medium
1	1,5	30,63	45,95	90	3:2
2	1,9	17,14	32,57	80	3:2
3	1,7	94,10	159,96	81	1:4
4	2,4	18,89	45,33	86	3:2
5	1,9	39,24	74,55	93,5	1:1
6	2,9	42,29	122,63	88	3:2
7	1,4	180	252	81	1:7
8	1,9	25,52	48,50	85	1:1
9	1,2	66,67	80	-	1:5

Für die in Tabelle 15 dargestellten Werte wurde die höchste Gesamtzellzahl der CA-SA-Videos der einzelnen Probetage genommen, da diese den maximalen Wert angeben, die eine Probe mindestens hat. Jede Probe wurde gleich verdünnt und dann muss der höchste Wert der Zählungen das beschreiben, was der nativen Probe am ähnlichsten ist. Das heißt diese Zellzahl ist das Minimalste, das die native Probe haben konnte.

Die Konzentrationsbestimmung erhält man durch die Zählung von 10 Feldern der Maklerzählkammer. Das Gesichtsfeld der Mikroskopkamera füllt 35 Felder aus, so dass die Spermienanzahl in einem CASA-Videoausschnitt durch 3,5 dividiert werden muss, um die Spermienkonzentration in $10^6/\text{mL}$ zu erhalten. Die Gesamtzellzahl wird durch eine Multiplikation von Volumen und Konzentration erhalten.

Beispiel für Probe 1:

Gesamtzellzahl in 3 CASA-Videos:	193 Spermien
Auf ein Video heruntergerechnet:	64,3 Spermien
Verdünnung eingerechnet:	107,22 Spermien
Konzentrationsberechnung:	30,63 $10^6/\text{mL}$ Spermien
Gesamtzellzahl:	45,95 10^6 Spermien

Die Probenqualität ist durchaus verschieden über alle Proben hinweg. Die Gesamtzellzahl in Probe 2 ist unterhalb des minimalen Kriteriums, genauso wie das Volumen bei Probe 9. Die restlichen Werte sind oberhalb des Minimums.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Bachelorarbeit war zunächst die Erörterung, ob man die manuelle Zählung durch CASA ersetzen oder erweitern kann. Es lässt sich anhand der Daten durchaus die Schlussfolgerung ziehen, dass man mit CASA zu den gleichen Ergebnissen kommen kann. Allerdings gibt es mehrere Faktoren, die es nicht zulassen, dass man die manuelle Zählung durch CASA ersetzen kann. Da ist zum Einen der zeitliche Faktor, der bei dieser CASA-Methode wesentlich größer ist. Zwar ist die Erstellung der Videos wesentlich kürzer, als die manuelle Zählung, jedoch dauert die Auswertung der Videos je nach Probenqualität länger (abhängig von den zählbaren Spermien und möglicher Probenverschmutzung durch Partikel). Die Auswertung der motilen Spermien kann in ähnlicher Zeit erfolgen wie die manuelle Zählung, aber da die Gesamtzellzahl auch notwendig ist, dauert die CASA-Auswertung im Allgemeinen mindestens genauso lange. Kommerzielle CASA-Anwendungen können im Vergleich

zu dieser CASA-Methode und der manuellen Zählung jedoch schneller sein^[26]. Der zweite Faktor ist die Abhängigkeit der Genauigkeit der Referenz, die nicht immer gegeben ist. Die Messpunkte 11 bis 14 (Abbildung 5), die einer einzelnen Probe entstammen, bei der alle normalisierten Veränderungen oberhalb der Toleranzgrenze liegen, sind nur durch die Zählung der erhöhten Gesamtzellzahl der Referenz, die bei 202 Spermien lag, zu hoch. Da die Referenz zu hoch ist, sind alle Konzentrationsfaktoren zu hoch und damit auch die daraus berechneten normalisierten Veränderungen. Bei einer Beispielrechnung mit einer Gesamtzellzahl von 150 Spermien bei der Referenz, würden sich die normalisierten Veränderungen alle in den Toleranzbereich verschieben (2,46 %, -7,98 %, -2,49 % und -7,03 %). Des Weiteren ist eine gewisse Einarbeitung in die Methode nötig, da die normalisierten Veränderungen primär in der ersten Hälfte außerhalb des Toleranzbereichs lagen. Es gab in den ersten 36 Messpunkten 17 Messpunkte (47,22%) außerhalb des Toleranzbereichs und in den letzten 45 Messpunkten 4 Messpunkte (8,89 %). Abschließend lässt sich aber auch an dieser Stelle nicht deutlich mitteilen, ob die Veränderungen dadurch entstehen, ob die manuelle Zählung fehlerhaft ist oder die Auswertung mit CASA. Auch hier wird bei kommerziellen Anwendungen ein gegenteiliger Effekt beschrieben, da hier der Prozess standardisiert ist und somit auch weniger geschultes Laborpersonal die Versuche durchführen kann^[26]. Auf der anderen Seite wird in einigen Studien die unterschiedliche Spermienkonzentration als möglicher Nachteil genannt^[27], der durch die durchgeführte Verdünnung auf eine Konzentration von maximal 50 motilen Spermien pro Sichtfeld der Mikroskopkamera aber keine Auswirkungen hat.

Die Grundabweichung der normalisierten Veränderung betrug $-6,40 \pm 12,29$ % und deckt sich grundsätzlich mit den meisten Studien, die ebenfalls eine Korrelation zwischen CASA und manueller Zählung in Bezug auf die Motilität sehen^[25 – 28]. Eine Studie hat eine erhöhte Veränderung von + 21 % Motilität im Vergleich zur manuellen Zählung^[25] gezeigt, während eine weitere Studie nur eine Abweichung von 5 % darstellt^[26].

Da in den Abbildungen 6 und 7 jeweils 8 von 9 Messpunkten die gleiche Reihenfolge der Veränderungsausprägung der Probemedien zeigen, kann man feststellen, dass beide Methoden zumindest die gleichen Aussagen über die Probemedien abgeben können. Dazu muss man jedoch in Betracht ziehen, dass die Reihenfolge alleine

nicht das beste Kriterium für diese Einschätzung ist, da die Ausprägungen der Veränderungen unterschiedlich stark sind und diese bei Medien mit weniger signifikanten Unterschieden der physikochemischen Faktoren vermutlich schwerer zu detektieren sind. Das heißt bei unserer Kontrolle, dem Auftau-Testmedium und dem Worstcase-Testmedium sind die Unterschiede absichtlich stark gewählt, um diese auch detektieren zu können. Wie gut sich CASA für Medien mit weniger starken Unterschieden eignet, sollte in Zukunft getestet werden.

Die durch beide Zählweisen festgestellten Veränderungen der Motilität nach dreistündiger Inkubation sollten im Anschluss durch HOS und Eosin-Test teilweise erklärt werden. Beim HOS wurde getestet, ob die eingeschränkte Motilität durch eine Hemmung der Membranfunktionen hervorgerufen wird. Dies konnte anhand der Messdaten (Reihenfolge und Ausprägung der Veränderungen) nicht bestätigt werden. Im Vergleich dazu lässt sich aber durchaus sagen, dass beim Eosin-Test eine Korrelation besteht zwischen der dadurch getesteten Vitalität und der Motilitätseinschränkung der Spermien, da die Reihenfolge der Veränderungsausprägung (von geringster Veränderung (WCT) zu stärkster Veränderung (Kontrolle)) der Probenmedien und die Veränderungen der Zählmethoden in 8 von 9 Messpunkten übereinstimmt. Auch hier ist die Ausprägung unterschiedlich, aber anhand der Medienauswahl detektierbar. Beide Methoden, die zur Einschätzung der Membranintegrität gewählt wurden, weichen jedoch in keiner Probe stärker ab als 18,18 % von der Referenz ab, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Einschränkung der Motilität bei Messpunkt 9 in Abbildung 7 (Seite 42) von 74 % nicht auf die Membranintegrität zurückzuführen ist. Eine ähnliche Aussage wurde schon in einer zitierten Studie im Zusammenhang mit dem pH-Wert getroffen^[11].

Abschließend lässt sich also sagen, dass man die manuelle Zählung durch die hier benutzte CASA-Software nicht ersetzen kann, sie aber durchaus als weitere Analyse-methode einen Einsatz finden kann, wenn die Zeit nicht begrenzt ist. Mit automatisierten Ausführung der Auswertungsschritte könnte der Zeitnachteil behoben werden und die Methode könnte zumindest Einsatz finden, um manuelle Zählungen in der Grundlagenforschung zu validieren oder zu invalidieren.

6. Quellen

6.1. Quellenliste

[1]: World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th Edition. Geneva: WHO, 2021.

[2]: Wang Yutao , Fu Xun , Li Hongjun. Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology* Volume 16 – 2025. DOI=10.3389/fen-do.2025.1520835

[3]: Davies R, Minhas S, Jayasena CN. The role of seminal reactive oxygen species assessment in the setting of infertility and early pregnancy loss. *World J Urol.* 2023 Nov;41(11):3257-3265. doi: 10.1007/s00345-023-04472-2. Epub 2023 Jul 15. PMID: 37452867; PMCID: PMC10632302.

[4]: Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res.* 2015 Oct;18(5):422-36. doi: 10.1089/rej.2014.1656. Epub 2015 Sep 22. Erratum in: *Rejuvenation Res.* 2018 Feb;21(1):87. doi: 10.1089/rej.2014.1656.correx. PMID: 25826677; PMCID: PMC4620521.

[5]: Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril.* 1988 Aug;50(2):314-20. PMID: 3396701.

[6]: Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril.* 1985 Oct;44(4):493-8. doi: 10.1016/s0015-0282(16)48918-1. PMID: 3902512.

[7]: Zhou J, Chen L, Li J, Li H, Hong Z, Xie M, Chen S, Yao B. The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLoS One.* 2015 Jul 14;10(7):e0132974. doi: 10.1371/journal.pone.0132974. PMID: 26173069; PMCID: PMC4501804.

[8]: Thundathil JC, Rajamanickam GD, Kastelic JP. Na/K-ATPase and Regulation of Sperm Function. *Anim Reprod.* 2018 Aug 3;15(Suppl 1):711-720. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0024. PMID: 36249829; PMCID: PMC9536046.

- [9]: Dhumal SS, Naik P, Dakshinamurthy S, Sullia K. Semen pH and its correlation with motility and count - A study in subfertile men. *JBRA Assist Reprod.* 2021 Apr 27;25(2):172-175. doi: 10.5935/1518-0557.20200080. PMID: 33507718; PMCID: PMC8083857.
- [10]: Mishra AK, Kumar A, Swain DK, Yadav S, Nigam R. Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. *Vet World.* 2018 Jun;11(6):852-858. doi: 10.14202/vetworld.2018.852-858. Epub 2018 Jun 26. PMID: 30034181; PMCID: PMC6048093.
- [11]: Achikanu C, Pendekanti V, Teague R, Publicover S. Effects of pH manipulation, CatSper stimulation and Ca²⁺-store mobilization on [Ca²⁺]_i and behaviour of human sperm. *Hum Reprod.* 2018 Oct 1;33(10):1802-1811. doi: 10.1093/humrep/dey280. PMID: 30239776.
- [12]: Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci.* 2013 Jan 30;136(4):252-9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.11.008. Epub 2012 Nov 22. PMID: 23238050.
- [13]: Marín-Briggiler CI, Luque GM, Gervasi MG, Oscoz-Susino N, Sierra JM, Mondillo C, Salicioni AM, Krapf D, Visconti PE, Buffone MG. Human Sperm Remain Motile After a Temporary Energy Restriction but do Not Undergo Capacitation-Related Events. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Nov 12;9:777086. doi: 10.3389/fcell.2021.777086. PMID: 34869380; PMCID: PMC8633110.
- [14]: Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int.* 2010 Sep 7;2010:686137. doi: 10.4061/2011/686137. PMID: 20871827; PMCID: PMC2943128.
- [15]: Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med.* 1997;18 Suppl:S213-9. doi: 10.1016/s0098-2997(97)00036-8. PMID: 9266524.
- [16] Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci.* 1996 Aug 1;1:e78-86. doi: 10.2741/a146. PMID: 9159248.

- [17]: Yun JI, Gong SP, Song YH, Lee ST. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation in vitro. *Fertil Steril*. 2013 Aug;100(2):373-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.015. Epub 2013 May 4. PMID: 23651626.
- [18]: Dutta S, Sengupta P, Roychoudhury S, Chakravarthi S, Wang CW, Slama P. Antioxidant Paradox in Male Infertility: 'A Blind Eye' on Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 16;11(1):167. doi: 10.3390/antiox11010167. PMID: 35052671; PMCID: PMC8772926.
- [19]: Hyakutake T, Suzuki H, Yamamoto S. Effect of non-Newtonian fluid properties on bovine sperm motility. *J Biomech*. 2015 Sep 18;48(12):2941-7. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.08.005. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26277700.
- [20]: Hyun N, Chandsawangbhuwana C, Zhu Q, Shi LZ, Yang-Wong C, Berns MW. Effects of viscosity on sperm motility studied with optical tweezers. *J Biomed Opt*. 2012 Feb;17(2):025005. doi: 10.1117/1.JBO.17.2.025005. PMID: 22463031.
- [21]: Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod*. 1992 Apr;46(4):686-91. doi: 10.1095/biolreprod46.4.686. PMID: 1576267.
- [22]: Sanchez-Rodriguez A, Sansegundo E, Tourmente M, Roldan ERS. Effect of High Viscosity on Energy Metabolism and Kinematics of Spermatozoa from Three Mouse Species Incubated under Capacitating Conditions. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 3;23(23):15247. doi: 10.3390/ijms232315247. PMID: 36499575; PMCID: PMC9737050.
- [23]: Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Mar;28(3):191-7. doi: 10.1007/s10815-010-9531-3. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21234667; PMCID: PMC3082651.
- [24]: Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984 Jan;70(1):219-28. doi: 10.1530/jrf.0.0700219. PMID: 6694140.

[25]: Köse M, Sokmensuer LK, Demir A, Bozdog G, Gunalp S. Manual versus computer-automated semen analysis. Clin Exp Obstet Gynecol. 2014;41(6):662-4. PMID: 25551959.

[26]: Lammers J, Spingart C, Barrière P, Jean M, Fréour T. Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. J Assist Reprod Genet. 2014 Jan;31(1):35-43. doi: 10.1007/s10815-013-0139-2. Epub 2013 Nov 16. PMID: 24242989; PMCID: PMC3909144.

[27]: Finelli R, Leisegang K, Tumallapalli S, Henkel R, Agarwal A. The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. Transl Androl Urol 2021;10(7):3069-3079. doi: 10.21037/tau-21-276

[28]: Centola GM. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. Arch Androl. 1996 Jan-Feb;36(1):1-7. doi: 10.3109/01485019608987878. PMID: 8824662.

6.2. Rohdaten

Bei der Tabelle wird motil mit m, immotil mit i und Video mit V abgekürzt. Die Tage an denen nur Zeitpunkte (Tn) genannt werden, gehören zur Testreihe der Methodeneta-blierung und die restlichen gehören zu Testreihe mit den Probemedien.

Tabelle 16: Rohdaten der Spermazählungen vor der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 1.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
15.09.25	T0	51/149	51/149	13	23	17	173
	H74	27/173	27/173	9/40	7/39	3/44	142
	H69	51/149	53/147	8	9	8	119
	H-HSA	34/166	42/158	8/53	8/47	10/49	175
	H+HPC	57/143	58/142	9/43	10/38	22/47	169

Tabelle 17: Rohdaten der Spermazählungen vor der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 2.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
17.09.25	T0	162/38	181/19	27/10	27/7	22/7	100
	T0 2	154/46	156/44	32/3	27/13	22/11	108
	K 1	153/47	158/42	57/10	50/9	42/25	193
	K 2	146/54	146/54	29/15	32/6	35/10	127
	ATT 1	135/65	147/57	22/10	13/14	22/11	92
	ATT 2	124/76	135/65	22/12	19/12	25/13	103
	WCT	86/114	91/109	12/11	13/11	9/16	72
18.09.25	T0	65/135	65/135	18/52	15/54	16/58	213
	T50	70/130	70/130	23/52	25/54	21/55	230
	T70	79/121	79/121	31/53	33/65	26/52	260
	T100	54/146	61/139	18/54	8/49	8/53	190
	T160	69/131	73/127	26/52	21/63	26/49	237

Tabelle 18: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 1.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
19.09.25	T0	93/107	84/106	20/24	19/23	13/21	120
	T30	72/128	76/124	19/33	12/33	17/36	150
	T40	76/124	79/121	16/39	22/33	17/39	166
	T60	67/133	73/127	15/37	16/39	14/47	168
	T80	72/128	72/128	15/42	13/31	13/49	163
	T100	65/135	73/127	14/28	15/26	8/45	136
	T120	58/142	60/140	6/38	8/38	8/42	140

Tabelle 19: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 2.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
22.09.25	T0	147/53	137/63	22/7	25/6	24/7	91
	K	140/60	152/48	22/4	18/6	23/5	78
	ATT 1	130/70	144/56	20/8	19/9	21/4	81
	ATT 2	105/95	106/94	-	-	-	-
	WCT	102/98	107/93	8/8	8/11	12/8	55
23.09.25	T0	108/92	102/98	22/12	22/22	18/17	113
	T45	98/102	103/97	18/36	20/26	22/55	177
	T80	64/136	67/133	7/28	10/38	14/45	142
	T132	54/146	56/144	11/36	8/32	14/35	136
	T150	61/139	63/137	17/44	10/37	14/43	165
	T170	75/125	78/122	19/43	19/69	23/45	218
	T187	51/149	53/147	15/40	10/28	8/35	136
	T210	45/155	55/145	9/56	9/34	13/34	155
	T230	41/159	50/150	11/42	5/35	6/32	131
24.09.25	T0	112/88	119/81	37/34	35/29	32/35	202
	K	128/72	128/72	46/16	62/20	86/17	247
	ATT 1	116/84	119/81	37/17	42/24	38/22	180
	ATT 2	127/73	131/69	41/15	40/12	38/18	164
	WCT	96/104	94/106	25/21	21/21	27/17	132

Tabelle 20: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 3.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
25.09.25	T0	95/105	93/107	27/43	29/37	29/47	212
	T20	95/105	93/107	20/60	25/28	30/43	206
	T40	79/121	82/118	28/46	23/56	22/58	233
	T60	78/122	75/125	19/33	15/35	14/42	158
	T80	67/133	73/127	28/61	22/71	23/49	254
	T100	42/158	54/146	10/37	9/30	17/47	150
29.09.25	T0	123/77	131/69	12/4	16/6	13/4	55
	K	140/60	141/59	21/8	10/6	11/15	71
	ATT	145/55	148/52	44/5	27/7	32/4	119
	WCT	92/108	93/107	14/8	17/9	7/6	61
01.10.25	T0	171/29	173/27	28/2	25/1	24/2	82
	T27	187/13	187/13	46/2	81/3	79/1	212
	T42	180/20	186/14	25/2	25/0	24/0	76
	T60	173/27	179/21	18/3	12/1	14/0	48
	T146	168/32	172/28	24/2	24/0	17/1	68
	T220	183/17	180/20	50/3	76/4	67/2	202
	T240	178/22	178/22	54/4	27/1	44/2	132
	T260	169/31	172/28	21/0	22/1	25/1	70
02.10.25	T0	74/126	70/130	30/52	27/31	19/47	206
	K	91/109	89/111	28/30	31/42	28/29	188
	ATT	86/114	80/120	23/36	40/40	20/35	194
	WCT	62/138	64/136	17/34	13/33	27/34	158

Tabelle 21: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 4.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
02.10.25	T0	156/44	161/39	16/6	28/4	17/4	75
	T45	153/47	148/52	18/4	16/3	26/2	69
	T69	146/54	154/46	30/6	22/2	14/3	77
	T87	151/49	153/47	17/1	18/3	16/4	59
06.10.25	T0	131/69	131/69	31/9	20/13	22/6	101
	K	145/55	144/56	22/3	30/6	25/2	88
	ATT	141/59	144/56	31/9	24/7	35/5	111
	WCT	132/68	134/66	27/8	24/5	26/6	96
09.10.25	K T0	106/94	112/88	26/32	37/16	28/34	173
	ATT T0	85/115	94/106	18/32	15/34	28/34	161
	WCT T0	92/108	98/102	30/31	16/25	40/23	165
	K T180	143/57	142/58	72/23	60/23	68/24	270
	ATT T180	120/80	129/71	48/28	66/36	51/18	247
	WCT T180	100/100	116/84	27/29	29/22	28/17	152
	K T246	145/55	147/53	107/24	117/17	85/19	369
10.10.25	K1 T0	72/128	74/126	16/46	19/57	20/43	201
	K2 T16	55/145	56/144	11/38	6/43	10/49	157
	K1 T45	68/132	74/126	15/62	20/52	20/60	229
	K2 T60	43/157	50/150	10/22	11/26	5/36	137
	K1 T90	65/135	65/135	19/52	20/58	22/65	236
	K2 T115	38/162	48/152	16/42	8/56	11/53	186
	K1 T180	56/144	49/151	9/53	16/53	7/65	203
	K2 T195	55/145	77/123	18/38	14/48	16/60	194

Tabelle 22: Rohdaten der Spermazählungen nach der Methodenänderung mit Datum, Probenbezeichnung und Gesamtzellzahl. Teil 5.

Datum	Probe	1. Zählung m/i	2. Zählung m/i	CASA-V 1 m/i	CASA-V 2 m/i	CASA-V 3 m/i	Gesamt zellzahl
13.10.25	K T0	131/69	149/51	18/8	36/10	17/8	97
	ATT T0	142/58	143/57	26/5	36/14	37/14	132
	WCT T0	139/61	143/57	34/9	45/13	21/12	134
	K T180	163/37	156/44	30/14	30/9	37/7	127
	ATT T180	139/61	137/63	24/13	38/8	19/7	109
	WCT T180	45/155	57/143	5/18	11/8	9/8	59
14.10.25	K T0	57/143	53/147	5/-	5/-	6/-	96
	ATT T0	70/130	72/128	11/-	10/-	12/-	140
	WCT T0	60/140	65/135	4/-	5/-	7/-	81
	K T180	66/134	70/130	7/-	7/-	7/-	91
	ATT T180	51/149	75/125	8/-	7/-	7/-	93
	WCT T180	18/182	16/184	1/-	2/-	0/-	70

Tabelle 23: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 1.

Datum	Probe	HOS		Eosin-Tests	
		coiled	uncoiled	weiß	rot
17.09.25	T0 1	80	24	180	20
	T0 2	87	27	171	29
	K 1	41	17	169	31
	K 2	51	20	167	33
	ATT 1	39	17	156	44
	ATT 2	58	24	164	36
	WCT	55	21	154	46

Tabelle 24: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 2.

Datum	Probe	HOS		Eosin-Tests	
		coiled	uncoiled	weiß	rot
22.09.25	T0	144	56	160	40
	K	56	27	173	27
	ATT 1	51	30	166	34
	ATT 2	86	30	161	39
	WCT	27	10	163	37
24.09.25	T0	157	43	162	38
	K	78	23	160	40
	ATT 1	76	29	150	50
	ATT 2	76	26	156	44
	WCT	54	23	148	52
29.09.25	T0	152	48	172	28
	K	65	30	167	33
	ATT	112	53	154	46
	WCT	52	23	154	46
02.10.25	T0	183	17	187	13
	K	175	25	184	16
	ATT	173	27	190	10
	WCT	173	27	185	15
06.10.25	T0	146	54	176	24
	K	79	41	155	45
	ATT	105	31	144	56
	WCT	82	49	143	57

Tabelle 25: Die Rohdaten des HOS und Eosin-Tests der Probemedien. Ein – bedeutet ein Messwert, der nicht aufgenommen wurde und beim HOS waren manchmal keine 200 Spermien zählbar. Teil 3.

Datum	Probe	HOS		Eosin-Tests	
		coiled	uncoiled	weiß	rot
09.10.25	K T0	167	33	162	38
	K T180	151	49	160	40
	ATT T0	-	-	-	-
	ATT T180	177	23	156	44
	WCT T0	-	-	-	-
	WCT T180	158	42	156	44
13.10.25	K T0	131	69	170	30
	K T180	73	23	176	24
	ATT T0	-	-	-	-
	ATT T180	62	20	168	32
	WCT T0	-	-	-	-
	WCT T180	68	36	158	42
14.10.25	K T0	139	61	-	-
	K T180	89	29	-	-
	ATT T0	-	-	-	-
	ATT T180	102	33	-	-
	WCT T0	-	-	-	-
	WCT T180	72	37	-	-

6.3. Eidstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass ein Exemplar meiner Bachelorthesis in die Bibliothek des Fachbereichs aufgenommen wird; Rechte Dritter werden dadurch nicht verletzt.

Wesel, den 24. November 2025

Stefan Kieser