

Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

**Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren
zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Matthias Krienke
aus
Siegen

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	Morphologie der Hengstspermien	2
2.1.1	Die Plasmamembran	2
2.1.2	Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen in Zusammenhang mit der Kapazitation und der Akrosomenreaktion	4
2.1.3	Der Zellkern	6
2.1.4	Die Mitochondrien	6
2.2	Spermatogenese und epididymale Spermienreifung beim Hengst	7
2.3	Verschiedene Einflussfaktoren auf die Qualität von Hengstsamen	8
2.3.1	Jahreszeit	8
2.3.2	Individueller Einfluss der Hengste	10
2.3.3	Einfluss einer Hyperthermie	11
2.4	Computergestützte Beurteilung von Tiefgefriersamenproben	12
2.4.1	Spermienmotilität	12
2.4.2	Morphologie	13
2.5	Durchflusszytometrie	14
2.5.1	Physikalische Grundlagen	14
2.5.2	Zuverlässigkeit der durchflusszytometrischen Methoden	19
2.5.3	Bestimmung verschiedener Spermaqualitätsparameter	19
2.5.3.1	Bestimmung der Plasmamembranintegrität	19
2.5.3.1.1	SYBR 14/Propidiumjodid (PI)-Färbung	20
2.5.3.1.2	Plasmamembranintegrität und andere Spermaqualitätsmerkmale	21
2.5.3.1.3	Plasmamembranintegrität und Fertilität	22

2.5.3.2	Bestimmung des akrosomalen Status	23
2.5.3.2.1	FITC-PNA/SYTO 17/PI-Färbung	23
2.5.3.2.2	Induktion der Akrosomenreaktion in vitro	25
2.5.3.2.3	Akrosomaler Status und Fertilität	26
2.5.3.3	Integrität der Spermachromatinstruktur	27
2.5.3.3.1	Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA®)	27
2.5.3.3.2	Faktoren, die die Spermachromatinstruktur beeinflussen	30
2.5.3.3.3	Veränderungen der SCSA® Parameter in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Temperatur des Spermas	31
2.5.3.3.4	Zusammenhang zwischen der Spermachromatinstruktur und anderen Spermaqualitätsparametern	31
2.5.3.3.5	Spermachromatinstruktur und Fertilität	32
2.5.3.4	Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP)	33
2.5.3.4.1	Bestimmungsmethode des MMP	33
2.5.3.4.2	Beziehung zwischen dem MMP, verschiedenen Spermaqualitätsparametern und der Fertilität	34
3	MATERIAL UND METHODEN	36
3.1	Tiere	36
3.2	Spermagewinnung	36
3.3	Kryokonservierung der Samenproben	37
3.4	Versuchsaufbau	38
3.4.1	Überprüfung der Reproduzierbarkeit	39
3.4.2	Variabilität in Abhängigkeit vom Hengst und vom Ejakulat	39
3.4.3	Einfluss der Jahreszeit und des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben und Einfluss einer Deckruhe	39
3.5	Durchflusszytometrische Untersuchung der aufgetauten Proben	40
3.5.1	Geräte und Geräteeinstellung	41
3.5.2	Bestimmung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR® 14 / PI-Färbung	41
3.5.3	Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials mittels JC-1-Färbung	42

3.5.4	Bestimmung des akrosomalen Status mittels SYTO [®] 17/FITC-PNA/PI-Färbung	43
3.5.5	Induktion der Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor	45
3.5.6	Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA [™])	46
3.6	Weitere Untersuchungen der aufgetauten Proben	47
3.6.1	Vitalität (Plasmamembranintegrität)	47
3.6.2	Bestimmung des Anteils morphologisch abweichender Spermien	47
3.6.3	Computergestützte Motilitätsanalyse	48
3.7	Bestimmung der Fertilität der Hengste	48
3.8	Statistische Auswertung	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Konventionelle Samenqualitätsparameter	50
4.2	Reproduzierbarkeit der angewandten durchflusszytometrischen Messungen	51
4.3	Ejakulat- und individuell bedingte Schwankungen der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter	52
4.4	Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben	54
4.5	Zusammenhang zwischen den konventionellen Spermaqualitätsparametern und den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen	57
4.5.1	Korrelationen zwischen der lichtmikroskopisch beurteilten Vitalität der Spermien und den durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern	57
4.5.2	Korrelation zwischen JC-1 Färbung und computergestützter Motilitätsanalyse	58
4.5.3	Korrelationen zwischen SCSA [™] -Test und lichtmikroskopischer Beurteilung der Spermienmorphologie	59
4.6	Zusammenhänge zwischen den durchflusszytometrischen Tests	60

4.7	Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgehenden Deckruhe	64
4.8	Einfluss der Jahreszeit	66
4.9	Einfluss des Alters der Hengste	68
4.10	Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern und der Fertilität	69
5	DISKUSSION	73
5.1	Genauigkeit der Methoden	74
5.2	Ejakulat- und individuell bedingte Schwankungen der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter	74
5.3	Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben	75
5.4	Zusammenhänge zwischen durchflusszytometrisch und herkömmlich erfassten Spermaparametern	75
5.5	Zusammenhänge zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparametern	77
5.6	Variabilität der durchflusszytometrisch erfassten Spermaparameter in Abhängigkeit von der Saison	78
5.7	Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgehenden Deckpause und Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparameter und dem Alter der Tiere	80
5.8	Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparametern und der Fertilität der Hengste	81
5.9	Schlussfolgerungen	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	84

7	SUMMARY	86
8	LITERATURVERZEICHNIS	88
9	ANHANG	107

1 EINLEITUNG

Bei der Qualitätsbestimmung von tiefgefrorenem Hengstsperma steht bis heute die Beurteilung der Vitalität und der Motilität der Spermien nach dem Auftauen im Vordergrund. Hierbei werden aber nur sehr kleine Zellpopulationen bewertet. Die Aussagekraft dieser Qualitätsparameter im Hinblick auf das Befruchtungsvermögen der untersuchten Spermien gilt deshalb insbesondere bei Tiefgefriersperma als sehr begrenzt. Derzeit werden neue, durch die technische Weiterentwicklung ermöglichte Wege im Bereich der Spermauntersuchung beschritten. Eine der neuen Methoden, von denen man sich wesentliche Fortschritte verspricht, ist die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Strukturen der Samenzelle mit Hilfe unterschiedlicher Fluoreszenzfärbungen. Der Vorteil dieser neuen Technik liegt zum einen in der Analyse tausender Spermien innerhalb von Sekunden und zum anderen in der höheren Sensitivität verglichen mit anderen Methoden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, verschiedene durchflusszytometrische Verfahren dahingehend zu überprüfen, ob sie geeignete objektive Methoden zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma darstellen. Es wurde durchflusszytometrisch die Plasmamembranintegrität, das Mitochondrienmembranpotential, der akrosomale Status und die Integrität der Chromatinstruktur bei kryokonserviertem Hengstsperma beurteilt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dieser Verfahren wurde überprüft. Weiterhin wurden verschiedene Fragestellungen, so zum Beispiel die Variabilität in Abhängigkeit vom Ejakulat, saisonale und individuelle Variabilität und der Einfluss einer Deckpause vor der Ejakulatgewinnung untersucht. Als Letztes wurden die Beziehungen zwischen den durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter und der Fruchtbarkeit der Hengste überprüft.

2 LITERATUR

2.1 Morphologie der Hengstpermien

Die Morphologie von Hengstpermien gleicht grundsätzlich der anderer Säugetier – spermien (Abb. 2.1). Das Spermium besteht aus Kopf und Schwanz. Der Kopf teilt sich in einen akrosomalen und einen postakrosomalen Bereich (DOTT, 1975; SHARMA, 1976). Der Spermien Schwanz lässt sich in einen kurzen Halsabschnitt, ein Mittelstück sowie ein Hauptstück und Endstück untergliedern (SINOWATZ, 2001). Asymmetrische Köpfe, abaxiale Position des Schwanzes, relativ geringes Volumen des Akrosoms und die Anwesenheit von Mikrotubuli im Bereich des Halses sind hengstspezifische Charakteristika (HANCOCK, 1957; DOTT, 1975). Umfassend dargestellt wird der Themenkomplex der Spermien-morphologie von EDDY und O'BRIEN (1994), DOTT (1975) und von SCHÜLKE (1991). Nachstehend sollen nur die zum Verständnis dieser Arbeit wichtigsten Aspekte der Spermienmorphologie erwähnt werden.

2.1.1 Die Plasmamembran

Die Plasmamembran überzieht alle Komponenten des Spermiums, und entspricht in ihrer Struktur dem Fluid-Mosaik-Modell für Biomembranen (SINGER und NICHOLSEN, 1972). Sie bildet die äußere Begrenzung zum extrazellulären Raum (Abb.2.1) und ist durch eine regional unterschiedliche Glykoprotein- und Lipidzusammensetzung einzelner, topographisch eng benachbarter Membranareale (surface domains) charakterisiert. Dieser regional differierende Aufbau hat eine unterschiedliche funktionelle Wertigkeit der einzelnen Membranbereiche zur Folge. So verschmilzt beispielsweise nur der vordere Anteil der Plasmamembran des Spermiums während der Akrosomenreaktion mit der darunter gelegenen, äußeren akrosomalen Membran, wobei die hydrolytischen Enzyme des Akrosoms freigesetzt werden. Die Plasmamembran im Bereich des Äquatoralsegments vermittelt dagegen den Kontakt des Spermiums mit der Zellmembran der Eizelle (SINOWATZ, 2001).

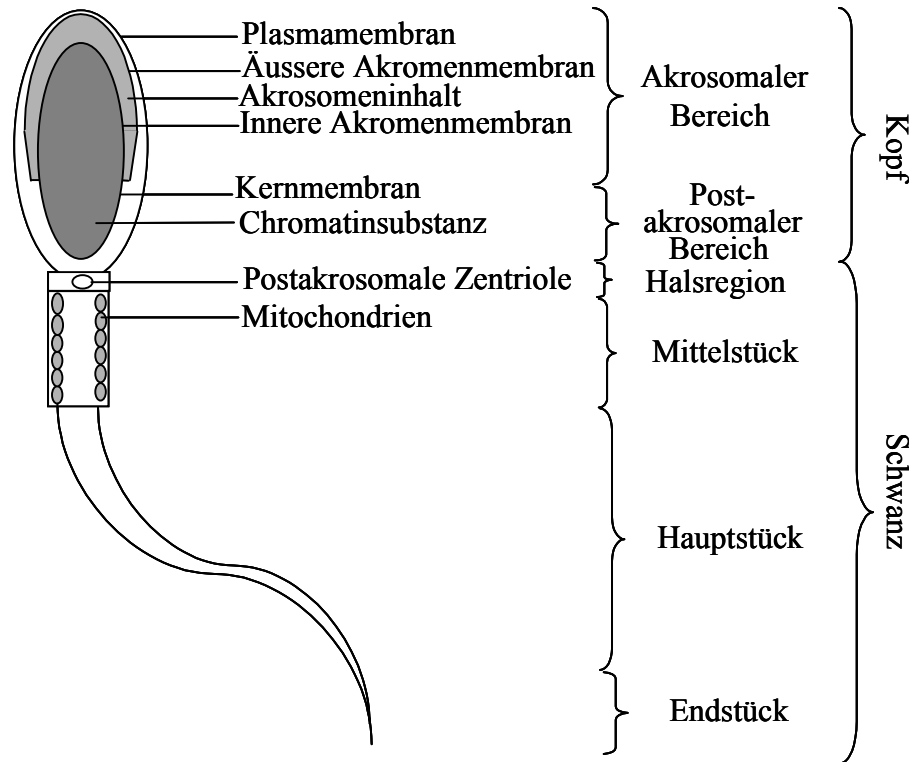


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Spermienmorphologie an Hand eines Sagittalschnittes (modifiziert nach GADELLA et al., 2001).

Die Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Lipiden, überwiegend Phospholipiden, die infolge ihres amphipatischen Charakters in wässrigem Milieu spontan zur Bildung von Doppelmembranen mit hydrophilen Oberflächen und lipophiler Zwischenschicht fähig sind (WELSCH und STORCH, 1973; LODISH et al., 1995). Darin eingelagert sind Cholesterinmoleküle, Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane. Dieser besondere Aufbau verleiht der Plasmamembran eine relative Impermeabilität für Moleküle mit polarer elektrischer Ladung (BUDDECKE, 1980). Bei Schädigung der Plasmamembran zum Beispiel durch niedrige Temperaturen kommt es zu einem Verlust der Membranfluidität bis hin zur Auflösung der lamellären Doppelmembranstruktur. Die Membranpermeabilität sowie die metabolische Funktionsfähigkeit dieser biologischen Einheit wird somit stark gestört (WATSON, 1981; AMANN und PICKETT, 1987). Gleichzeitig erhöht sich die Membranpermeabilität für verschiedene Farbstofflösungen (HANCOCK, 1951).

2.1.2 Morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen in Zusammenhang mit der Kapazitation und der Akrosomenreaktion

Die vorderen zwei Drittel des Kerns werden vom Akrosom kappenartig überzogen (Abb. 2.1). Es wird von einer äußeren bzw. einer inneren akrosomalen Membran begrenzt, die im distalen Bereich des Akrosoms ineinander übergehen (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Das Akrosom entsteht während der Spermatogenese aus enzymgefüllten Vesikeln des Golgi-Apparates. Sein Inhalt besteht aus verschiedenen hydrolytischen Enzymen (Akrosin, Hyaluronidase, verschiedene saure Hydrolasen und Esterasen), welche für das Durchdringen der die Eizelle umgebenden Corona radiata und Zona pellucida notwendig sind (EDDY und O'BRIEN, 1994).

CHANG (1951) und AUSTIN (1952) entdeckten den für die Befruchtung unabdingbaren Vorgang der Kapazitation. Man versteht darunter den gesamten Reifungsprozess der Spermien im weiblichen Genitaltrakt (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001), welcher Voraussetzung für das Ablufen der Akrosomenreaktion ist. Morphologische Veränderungen an den Spermien, die einen Hinweis auf die Kapazitation liefern, können selbst elektronenmikroskopisch nicht festgestellt werden (BREDFORD, 1967). Es ist anzunehmen, dass mikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen an den Membranoberflächen der Spermien stattfinden, die einen Abbau der Membranstabilität bedingen (VITT, 1997). Durch diese Umbauvorgänge kommt es zu Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentration und zu einer Erhöhung der Membranfluidität (YANAGIMACHI, 1994; TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Besonders im periakrosomalen Plasmamembranbereich bilden sich proteinarme Mikrodomänen, welche in der sich anschließenden Akrosomenreaktion mit der äußeren Akrosomenmembran fusionieren (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Parallel zu den Veränderungen in der akrosomalen Region der Spermatozoenmembran kommt es zu einer Veränderung des Bewegungsmusters kapazitierter Spermien, zur so genannten „Hyperaktivierung“ (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001).

Die Akrosomenreaktion schließt sich an den Kapazitationsprozess an und stellt einen essentiellen Schritt im Fertilisationsprozess dar (BLOTTNER et al., 1998). Sie schafft die Voraussetzungen für die Fusion mit der Eizelle und ist unabdingbar für die Penetration der

Zona pellucida (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Durch die Zonabindung kommt es zu einer Öffnung von Ionenkanälen und somit zu einem starken Influx extrazellulärer Kalziumionen. Dieser intrazelluläre Kalziumstrom gilt als Auslöser der Membranfusion bei der Akrosomenreaktion (YANAGIMACHI und USUI, 1974; ZANEVELD et al., 1991). Die Fusion der Plasmamembran und der äußeren Akrosomenmembran der Spermien wird Vesikulation genannt; dabei werden die oben erwähnten hydrolytischen Enzyme aus dem Akrosomeninhalt freigesetzt. Bei fortgeschrittener Akrosomenreaktion geht das gesamte Akrosom verloren und die innere Akrosomenmembran begrenzt nun das Spermium im Kopfkappenbereich zum extrazellulären Raum.

Eine Reihe im Sekret des weiblichen Genitaltraktes nachgewiesener Substanzen spielt bei Auslösung der Kapazitation und Akrosomenreaktion eine bedeutende Rolle (AX et al., 1985; MEIZEL, 1985; PARRISH et al., 1989). Hierzu zählen Glykosaminoglykane wie Heparin, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure. Außerdem wurde in den letzten Jahren das Kalziumionophor A23187 vermehrt zur Induktion der Akrosomenreaktion von Hengstspermien eingesetzt (GRAHAM, 1996).

Für die Dauer der Kapazitation *in vivo* gibt DORST (1982) bei Hengstspermien 6 Stunden an. *In vitro* konnten VARNER et al. (1993) durch Zugabe von Heparin zu Hengstspermien die Kapazitation und die sich anschließende Akrosomenreaktion beschleunigen. Hierbei wurde die Kapazitation der Spermien mit Hilfe der Chlortetracyclin-Ethidium-Homodimer-Färbung und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Auswertung nachgewiesen. Nach RATHI et al. (2001) ist diese Färbemethode bis heute Mittel der Wahl, um den Kapazitationsstatus von Spermien untersuchen zu können. Nach 4,5-stündiger Inkubation in einer einprozentigen Heparinlösung war bei den Untersuchungen von VARNER et al. (1993) ein signifikanter Unterschied bei der Anzahl sowohl kapazitierter als auch akrosomenreagerter Hengstspermien im Vergleich zur heparinfreien Lösung zu beobachten. Nach der Inkubation bei 38° C in einem heparinfreien Medium waren 35 ± 3 % der Spermien kapazitiert und 6 ± 3 % akrosomenreagiert. Im Vergleich dazu waren in heparinisiertem Inkubationsmedium 45 ± 3 % der Spermien kapazitiert und 15 ± 3 % zeigten eine Akrosomenreaktion.

2.1.3 Der Zellkern

Da im Verlauf der Spermatogenese das Zytoplasma fast vollständig verschwindet, ist der Spermienkopf zum größten Teil durch den Zellkern ausgefüllt. Das Chromatin im Inneren des Zellkerns ist hochkondensiert und lamellenartig verpackt (SATORI BLANC et al., 2001).

Im Verlauf der Spermatogenese werden die Zellkernproteine des diploiden Genoms, die Histone, durch Protamine ersetzt. Bis heute sind 3 verschiedene Typen von Protaminen in Säugetierspermien nachgewiesen worden. Die beiden Protamine P1 und P2 sind kleine basische Proteine, die im Vergleich zu Histonen reich an Cystein und Arginin sind (ACEVEDO, 2001). Beide Protamintypen besitzen eine positive elektrische Ladung, die eine Anlagerung an die Spermien-DNA ermöglicht, und so die negative Ladung der DNA-Phosphatgruppen aufhebt (BALHORN, 1982; RHIM et al., 1995). Die zusätzliche Ausbildung von quervernetzten Disulfidbrücken zwischen und innerhalb der Protaminmoleküle sorgen für eine starke Verdichtung und Stabilisierung der Erbsubstanz (EDDY und O'BRIEN, 1994; TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Eine weitere Funktion der Nucleoproteine besteht vermutlich in der Hemmung der Transkriptionsaktivität im Spermienkopf (MÜLLER, 1982). Neben diesen beiden schon länger bekannten Protaminen konnten SCHLÜTER und ENGEL (1995) einen dritten Protamintyp (P3) in Rattenspermien nachweisen. Dieses saure Protein bindet Histone, löst sie vom Chromatin ab und bewirkt so den Nukleosomenabbau im Zuge der Spermiogenese.

2.1.4 Die Mitochondrien

Die Mitochondrien der reifen Spermien haben eine längsovale Form und liegen schraubenartig angeordnet im Mittelstück (Abb. 2.1). Ihre Aufgabe besteht hauptsächlich darin, sowohl über die Glykolyse als auch mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung ATP-Moleküle zu synthetisieren (MANN und LUTWAK-MANN, 1981; KARLSON, 1974). Diese energetisch hochwertigen Moleküle werden fast ausschließlich für die Fortbewegung der Spermien gebraucht (GRAVANCE et al., 2000). Die Motilität der Spermien ist daher in erster Linie von der korrekten Funktionsweise der Mitochondrien abhängig (AUGER et al., 1989).

Der Mitochondrienaufbau zeichnet sich durch zwei voneinander getrennte Membransysteme aus. Eine glatte äußere und eine innere, stark gefaltete Membran, welche die Mitochondrienmatrix umschließt. Bei der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) kommt es zur Ausschleusung von Protonen aus der Mitochondrienmatrix und es entsteht an der inneren Mitochondrienmembran ein elektrochemischer Gradient (LEHNINGER et al., 1994), der als Mitochondrienmembranpotential (MMP) bezeichnet wird. Nach COSSARIZZA et al. (1996) beträgt das MMP bei funktionstüchtigen Mitochondrien -180 bis -200 mV. Dieser elektrochemische Gradient zwischen Innen- und Außenseite der inneren Mitochondrienmembran dient der Synthese der ATP-Moleküle, wodurch sich über die Höhe des Mitochondrienmembranpotentials Rückschlüsse auf die Mitochondrienfunktion und den Energiestatus der Spermien ziehen lassen (COSSARIZZA et al., 1993).

2.2 Spermatogenese und epididymale Spermienreifung beim Hengst

Mit der Geschlechtsreife eines Hengstes setzen in den Samenkanälchen der Hoden die zyklisch ablaufenden Samenbildungsprozesse ein. Dieser Prozess wird als Spermatogenese bezeichnet (RÜSSE und SINOWATZ, 1991) und dauert beim Hengst 57 Tage (JOHNSON et al., 1991, LEIDL, 1983)). Sie wird nach MEYERS (2000) in folgende, zeitlich hintereinander ablaufende Entwicklungsabschnitte eingeteilt: die Spermatozytogenese (Dauer beim Hengst ca. 20 Tage), die primäre und sekundäre meiotische Teilung (Dauer beim Hengst ca. 20 Tage) und die Spermio-genese (Dauer beim Hengst ca. 15 Tage).

Mit Spermatozytogenese wird der Vermehrungszyklus der Spermatogonien bezeichnet (SINOWATZ, 2001). Diese liegen peripher an der Basalmembran der Samenkanälchen und produzieren durch fortgesetzte Mitosen neue Spermatogonien. Aus den sich anschließenden beiden meiotischen Teilungen gehen die Spermatoziden hervor, die einen haploiden Chromosomensatz besitzen (RÜSSE und SINOWATZ, 1991). Daran schließt sich die Spermio-genese an, in der es zu weiteren Umformungs- und Reifungsvorgängen ohne Änderungen des DNA – Gehalts kommt, aber unter Verdichtung der Chromatinsubstanz (SINOWATZ, 2001). Auch die Bildung des Akrosoms und die Entwicklung der Geißel mit der Mitochondrienscheide des Mittelstücks findet ebenfalls im Verlauf der Spermio-genese statt (SINOWATZ und WROBEL, 1981). Nach Abschluss der Spermatogenese erfolgt die

Freisetzung der Spermien ins Lumen der Samenkanälchen. Während der Nebenhodenpassage erfahren die Samenzellen eine weitere Umgestaltung und Reifung, wodurch sie erst ihre volle Befruchtungsfähigkeit erlangen (BAMBERG, 1975). Für die Dauer der Nebenhodenpassage beim Hengst werden 9 bis 14 Tage (LEIDL, 1983, SWIESTRA et al., 1974; PICKETT et al., 1989) angegeben.

Neben zahlreichen anderen physiologischen Veränderungen der Spermien ist der epididymale Reifungsprozess durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Protaminmolekülen zur Stabilisierung der Chromatinsubstanz gekennzeichnet (AMANN, 1993; YANAGIMACHI, 1994; COOPER, 1998; KIRCHHOFF, 1999).

2.3 Verschiedene Einflussfaktoren auf die Qualität von Hengstsamen

Von den vielen Faktoren, die die Qualität von Hengstsamen beeinflussen, werden im Folgenden die saisonalen und die individuell bedingten Einflüsse sowie die möglichen Auswirkungen einer lokalen testikulären Hyperthermie besprochen, da sie für die hier bearbeitete Fragestellung von besonderer Bedeutung sind.

2.3.1 Jahreszeit

Die Ejakulatbeschaffenheit unterliegt beim Hengst saisonalen Veränderungen, die jedoch nach GEBAUER et al. (1976) und LEIDL (1983) hauptsächlich das Volumen und die chemische Zusammensetzung des Seminalplasmas und weniger die Spermien selbst betreffen. Saisonal unterschiedlich produzierte Mengen an Sekret der Samenblasendrüsen sind hauptverantwortlich für diese Volumenänderungen. In den Monaten außerhalb der Paarungssaison (August bis März) werden nur geringe Mengen abgegeben verglichen mit den restlichen Monaten (LEIDL, 1983). PICKETT et al. (1975a) fanden einen erhöhten Anteil an pathologisch geformten Spermien außerhalb der Paarungssaison. Ihrer Meinung nach ist dies eventuell auf die veränderte Zusammensetzung des Seminalplasmas zurückzuführen. In den Monaten der Paarungssaison wirkt die zunehmende Tageslichtlänge via Zentralnervensystem und Endokrinium stimulierend auf die Funktion der Gonaden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Dies reflektiert auch die in den Sommermonaten im Vergleich zu den

Wintermonaten fast doppelt so hohe Androgenkonzentration im peripheren Blut (GANJAM und KENNEY, 1975).

Dem entgegen stehen die Untersuchungsergebnisse verschiedener Autoren, die keinen Einfluss der Jahreszeit auf die Spermaqualität beim Hengst feststellen konnten (SWIESTRA et al., 1974; VAN DER HOLST, 1975; BLOTTNER et al., 2001). In diesen Untersuchungen wurden hauptsächlich die Motilität und die Morphologie der Spermien als Qualitätsparameter herangezogen.

Über jahreszeitliche Schwankungen der Anzahl der ejakulierten Spermien liegen widersprüchliche Aussagen in der Literatur vor. PICKETT (1980) berichtet über ein Absinken der Anzahl der ejakulierten Spermien im Winter, dagegen fand NISHIKAWA (1959) keinen solchen jahreszeitlich bedingten Effekt.

BLOTTNER et al. (2001) konnten bei aufgetautem Tiefgefriersperma von 4 Hengsten mittels einer Fluoreszenzfärbung mit FITC-PNA bei Ejakulaten, die außerhalb der Paarungs- saison gewonnen wurden, vermehrt Spermien mit Akrosomenschäden nachweisen. Auch der prozentuale Anteil an Spermien mit Chromatinstrukturen lag im Winter mit 5,4 % signifikant ($p < 0,01$) höher als im Frühjahr, wo er 3,4 % betrug .

Auch MAGISTRINI et al. (1987) beurteilten die saisonal bedingten Unterschiede bei aufgetautem Tiefgefriersperma von Hengsten. Dabei wurden die Ejakulate von 6 Hengsten über ein Jahr lang kryokonserviert und anschließend untersucht. Die Qualität der aufgetauten Spermaproben wurde mittels subjektiver und computergestützter Bestimmung der Spermien - motilität und unter Verwendung von zwei verschiedenen Vitalitätsfärbungen beurteilt. Es ergab sich eine bessere Kryokonservierbarkeit außerhalb der Paarungssaison, jedoch war der saisonale Unterschied, verglichen mit den individuellen Variationen, nur sehr gering. Auch WARNKE et al. (2000) konnte durch computergestützte Analyse der Motilität von aufgetautem Tiefgefriersperma von Hengsten einen geringen jahreszeitlichen Unterschied feststellen. Bei den im Winter gewonnen Proben betrug der prozentuale Anteil vorwärts- beweglicher Spermien nach dem Auftauen $15,6 \pm 7,0$ %. Bei den Samenproben vom Frühjahr betrug dieser Wert $11,3 \pm 5,8$ %. PICKETT et al. (1980) kamen zu dem Ergebnis, dass zur Kryokonservierung sowohl Hengstsperma in der Decksaison als auch außerhalb der

Decksaison verwendet werden kann. Sie beurteilten die Spermaqualität anhand der Motilität der Spermien nach dem Auftauen und fanden keinen signifikanten saisonalen Unterschied.

2.3.2 Individueller Einfluss der Hengste

Nach MERKT (1976) und JASKO et al. (1991) bestehen in der Spermaqualität von Hengsten große individuelle Schwankungen.

Es liegen zahlreiche Studien vor, aus denen deutlich hervorgeht, dass der individuelle Einfluss des einzelnen Hengstes den limitierenden Faktor bei der Eignung zur Kryokonservierung darstellt (SAMPER et al., 1991; COCHRAN et al., 1983; LOOMIS et al., 1983; VIDAMENT et al., 1997a). Zur Qualitätsbeurteilung der Tiefgefriersamenproben wurden sowohl die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen, als auch das Befruchtungspotential der kryokonservierten Proben in Inseminationsversuchen bestimmt. Auch MAGISTRINI et al. (1987) und VIDAMENT et al. (1998) bestätigen die großen individuellen Schwankungen in der Spermaqualität nach der Kryokonservierung. Neben der Beurteilung der Vorwärtsbeweglichkeit wandten sie verschiedene Färbemethoden zur Bestimmung der Vitalität an und analysierten die Plasmamembranintegrität mit Hilfe des hypoosmotischen Schwellungstests. VIDAMENT et al. (1997b) untersuchten Hengstsperma vor dem Einfrieren und danach hinsichtlich verschiedener Samenqualitätsparameter. Sie fanden kein zuverlässiges Kriterium bei der Untersuchung des Nativspermas, um die Qualität nach dem Einfrieren und Auftauen vorhersagen zu können. Auch MAGISTRINI et al. (1997b) führten Untersuchungen an nativem Hengstsperma und nach der Kryokonservierung durch. Zur Bestimmung der Samenqualität benutzten sie eine computergestützte Motilitätsanalyse. Es ergab sich nur ein mäßiger Zusammenhang ($r = 0,52$; $p < 0,01$) zwischen den Ergebnissen direkt nach der Ejakulatgewinnung und den Ergebnissen nach dem Auftauen der kryokonservierten Proben.

Die Untersuchungsergebnisse von DIGRASSI (2000) zeigen ebenfalls, dass die Variabilität der verschiedenen Spermaqualitätsparameter bei den untersuchten Tiefgefriersamenproben von 29 Hengsten zum größten Teil auf individuelle Unterschiede zurückzuführen sind. Sowohl bei der subjektiven Beurteilung der Motilität, als auch bei der flowzytometrischen Bestimmung der Integrität der Spermachromatinstruktur, der

Plasmamembranintegrität und des Mitochondrienmembranpotentials ergaben sich große individuelle Unterschiede.

2.3.3 Einfluss einer Hyperthermie

Eine Wärmebelastung des Hodengewebes, wie sie durch erhöhte Körpertemperatur oder hohe Umgebungstemperatur auftreten kann, hat erheblichen Einfluss auf die Spermaqualität. Länger anhaltende hohe Umgebungstemperaturen können zu einer Teratozoospermie führen (STOLLA, 1984). Auch bei einem lokalen Entzündungsprozess, z.B. als Folge eines Traumas, entsteht eine zeitlich begrenzte Temperaturerhöhung im Hodengewebe. In den Versuchen von ROSS und ENTWISTLE (1979) und VOGLER et al. (1991) konnte nachgewiesen werden, dass eine 48-stündige lokale Hodenerwärmung beim Bullen die Spermatogenese an vorhersagbaren Zeitpunkten stört. LOVE und KENNEY (1999) nutzten dieses Modell der Hodenerwärmung auch beim Hengst. Neben der durchflusszytometrischen Beurteilung der Integrität der Spermachromatinsubstanz bestimmten sie auch dessen Gehalt an Protaminen und Disulfidbrückenbindungen. Die Spermien, die sich während der Hyperthermie im Nebenhoden befanden, waren nicht verändert, aber Samenzellen, deren Entwicklung durch die Erwärmung im Hodengewebe geschädigt wurde, zeichneten sich durch eine erhöhte Instabilität der Chromatinsubstanz aus. Bei unverändertem Protamingehalt waren überraschenderweise die Disulfidbrückenbindungen in der Spermachromatinsubstanz reduziert. Da jedoch, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, die Ausbildung der Disulfidbrückenbindungen zum größten Teil im Nebenhoden stattfindet, diskutieren LOVE und KENNEY (1999) die Synthese eines Faktors während der Spermatogenese, der bei der weiteren Spermaentwicklung an der Konfiguration der Protamine und Disulfidbrückenbindungen beteiligt ist. Sie vermuten, dass es bei der hyperthermiebedingten Spermatogenesestörung zu einer verminderten oder fehlerhaften Synthese dieses Faktors kommt.

EVENSON et al. (2000) berichten in einem Fallbericht aus der Humanmedizin über Veränderungen der Spermachromatinstruktur nach einer fieberhaften Influenzaerkrankung. Dabei konnten sie nachweisen, dass ein erhöhtes Ausmaß an Chromatinschäden mit einem erhöhten Histon / Protamin –Verhältnis einhergeht.

2.4 Computergestützte Beurteilung von Tiefgefriersamenproben

Das Ziel aller Untersuchungen von Samenproben ist, deren Befruchtungsvermögen so exakt wie möglich einzuschätzen. Die Beurteilung der Spermienmotilität und die Erfassung des Anteils lebender Samenzellen steht hierbei heute noch im Vordergrund (SCHARLACH, 1996). Die Aussagekraft dieser Parameter im Hinblick auf das Befruchtungspotential der untersuchten Spermien gilt jedoch insbesondere bei Tiefgefriersperma als sehr begrenzt (VOSS et al., 1981; AMANN, 1989; JASKO, 1992; MAGISTRINI, 2000). BIELANSKI (1975) sieht den Grund dafür in der Tatsache, dass durch den Tiefgefrierprozess Samenzellen in ihrer Ultrastruktur geschädigt werden, ohne dass deren Motilität sofort beeinträchtigt wird.

2.4.1 Spermienmotilität

Verschiedene Untersuchungen belegen, dass der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien sich beim Tiefgefrierprozess von Hengstsaamen um bis zu 60 Prozent reduziert (COCHRAN et al., 1983; CHRISTANELLI et al., 1984; KLOPPE et al., 1988).

Die heutigen Computersysteme bieten die Möglichkeit, mit computergesteuerter Bildanalyse (CASA) die Spermienmotilität in Samenproben objektiv und mit hoher Zuverlässigkeit zu untersuchen (SCHRÖPPEL, 1988; BLACH et al., 1989). Ein weiterer Vorteil gegenüber der subjektiven Beurteilung ist die Möglichkeit, zusätzlich zum prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher und ortsbeweglicher Spermien, auch die Bewegungsgeschwindigkeit und Bewegungsrichtung zu bestimmen (LEIDL et al., 1987; WEITZE, 2001).

DIGRASSI (2000) konnte bei Untersuchungen an Tiefgefrierspermaproben von 29 Hengsten keinen Zusammenhang aufzeigen zwischen der subjektiven Beurteilung der Motilität nach dem Auftauen und den Trächtigkeitsergebnissen, die mit diesen TG-Proben erzielt wurden. Bei Verwendung eines computerisierten Motilitätsanalysegeräts zeigten andere Autoren einen schwachen Zusammenhang ($r \leq 0,34$; $p < 0,01$) zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien und der Fruchtbarkeit der Hengste auf (DOWSETT und PATTIE, 1982; JASKO et al., 1992). Dem entgegen stehen die Untersuchungsergebnisse von

BATAILLE et al. (1990) und PALMER und MAGISTRINI (1992), die einen solchen Zusammenhang auch bei computergestützter Motilitätsanalyse nicht nachweisen konnten.

2.4.2 Morphologie

Nach JASKO et al. (1990) wird überwiegend davon ausgegangen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz morphologisch veränderter Spermien eines Hengstejakulates und dessen Befruchtungsvermögen gibt. Zudem sind morphologische Spermienanomalien ein guter Indikator für Einwirkungen von toxischen Stoffen oder bei der Konservierung der Spermien auftretenden Kälteschäden. Jedoch deutet vieles darauf hin, dass das Befruchtungsvermögen einer Samenprobe trotz Erfüllung der Mindestanforderungen bei der morphologischen Untersuchung sehr gering sein kann. Dies trifft insbesondere auf Tiefgefriersperma von Hengsten zu. VOSS et al. (1981) und ANDERSON et al. (1980) konnten mit verschiedenen kryokonservierten Hengstspermaproben keine Trächtigkeit erzielen, obwohl eine morphologische Untersuchung nach dem Auftauen akzeptable Ergebnisse lieferte.

Neben der üblicherweise verwendeten Methode der subjektiven Beurteilung der Morphologie einer Samenprobe wurde in den letzten Jahren die computergestützte Morphometrie entwickelt (GRAVANCE et al., 1996; CASEY et al., 1997; RASSHOFER, 1998; UHLENBROCK, 1999). Diesem Verfahren haften jedoch, verglichen mit der subjektiven Beurteilung der Spermienmorphologie, mehrere Nachteile an. Bei den Untersuchungen, die von UHLENBROCK (1999) durchgeführt wurden, war eine automatische Ermittlung morphometrischer Kriterien für Spermienanomalien beim Hengst mit der zur Verfügung stehenden Software (Metrix, Version 10.7B) nicht möglich. Die sogenannte Learn-Funktion, mit der das System (Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS) aus den metrischen Daten, die durch den Untersucher subjektiv klassifizierten Spermien, Normwerte berechnen sollte, funktionierte nicht ordnungsgemäß. Bei einer Überprüfung der Zuverlässigkeit des Systems, verglichen mit einer subjektiven Auswertung durch einen geübten Untersucher, erbrachte die subjektive Beurteilungsmethode überraschenderweise bessere Ergebnisse. Gründe für die schlechtere Reproduzierbarkeit der

Messdaten bei der computergestützten Methode im Vergleich zur subjektiven Auswertung werden nicht genannt.

2.5 Durchflusszytometrie

Im Jahre 1965 wurden die ersten Durchflusszytometer entwickelt (GROGAN und COLLINS, 1990). Damit wurde es möglich, eine große Anzahl an Zellstrukturen und deren physiologische Eigenschaften mit Hilfe optischer Messungen objektiv zu untersuchen. Der Vorteil dieser Technik liegt zum einen in der Analyse tausender Zellen innerhalb von Sekunden (STOLLA, 1984) und zum anderen in der höheren Sensitivität verglichen mit einer mikroskopischen Beurteilung (MIYAZAKI et al., 1990; MAGISTRINI et al., 1997a). Ein weiterer Vorteil dieser Technik liegt in der Möglichkeit, verschiedene Zelleigenschaften simultan zu beurteilen. Nachteilig sind die hohen Kosten für Geräteanschaffung. Außerdem ergeben sich anhand der durchflusszytometrisch erhobenen Daten keine direkten Hinweise auf die genaue Lokalisation der Fluoreszenz an bzw. in der Zelle (DIGRASSIE, 2000).

2.5.1 Physikalische Grundlagen

Man unterscheidet 5 Untereinheiten an einem Durchflusszytometer (SHAPIRO, 1988). Das Flüssigkeitssystem zur Zufuhr des Probenmaterials, die Optik des Anregungslichts (Laser) und die Detektionsoptik. Weiter gibt es die Photomultiplikatordetektorenröhren (PMT), die zur Signalverarbeitung dienen und einen an das System angeschlossenen Computer, der zur weiteren Analyse der Messdaten nötig ist.

Bei der Durchflusszytometrie (Flowcytometry; FCM) werden physikalische und/oder chemische Eigenschaften einzelner Zellen analysiert (SHAPIRO, 1988). Dazu werden suspendierte einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem fokussierten Lichtstrahl (Laserstrahl) vorbeigeführt und die in Abhängigkeit vom Zelltyp und der entsprechenden Probenaufbereitung charakteristische Lichtemissionen mittels Detektoren nachgewiesen. Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung gewährleistet, dass jede Zelle einzeln den gemeinsamen Fokus von Anregungslicht und Nachweisoptik passiert (KUBBIES et al., 1989; NEBE, 1996).

Heutzutage arbeiten die in der Routinediagnostik eingesetzten Geräte fast ausschließlich mit Argonionenlaser als Anregungsquelle, wobei die am häufigsten vorkommende Wellenlänge bei 488 nm liegt (GROGAN und COLLINS, 1990; GÖTTLINGER et al., 1999). Die Laserquellen liefern monochromatisches, kohärentes Licht, dessen Intensität konstant sein muss. Nach Fluoreszenzfärbung und anschließender Anregung durch den Laser wird von der Zelle gestreutes und fluoreszierendes Licht emittiert (GROGAN und COLLINS, 1990). Man hat in der Regel die Möglichkeit drei verschiedene Lichtparameter simultan zu messen:

1. Forward Scatter (FSC): Dies entspricht der Lichtbeugung, die proportional zum Zelldurchmesser ist. Somit liefert dieser Parameter Hinweise auf die Zellgröße. Der FSC wird entlang der Achse des einfallenden Lichts gemessen (Abb. 2.2).

2. Side Scatter (SSC): Dies entspricht der Lichtbrechung (Reflexion) und liefert vorwiegend Informationen über die Granulation des Zellinhaltes. Der SSC wird im Winkel von 90° zum einfallenden Licht gemessen (Abb. 2.2).

3. Fluoreszierendes Licht: Die Wellenlänge dieses Lichts hängt vom verwendeten Fluorochrom, das bei der Probenaufbereitung verwendet wird, ab. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle (RAFFAEL, 1987). Dieses Licht wird ebenfalls im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen.

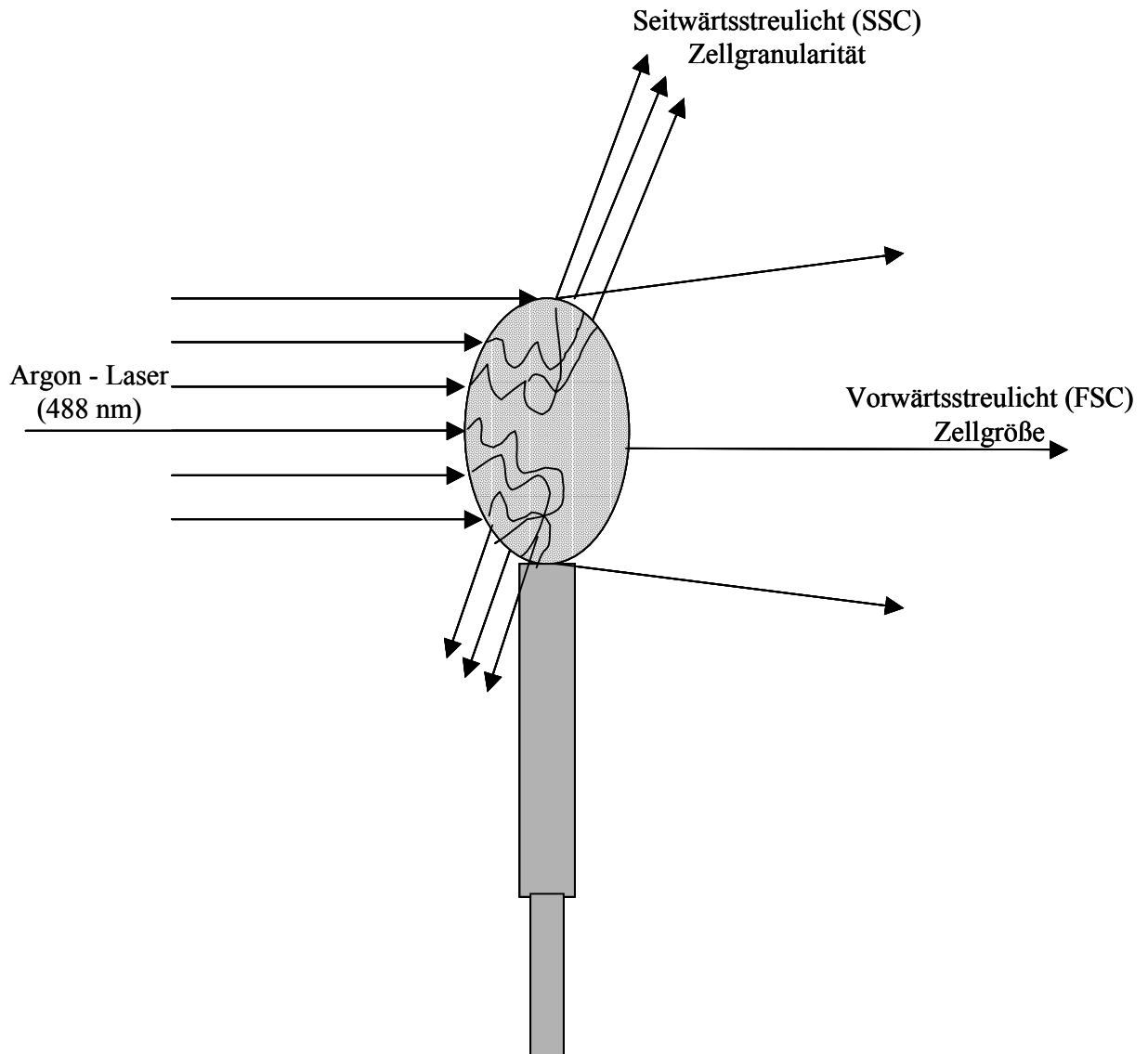


Abb. 2.2: Entstehung des Vorwärtsstreulichts und des Seitwärtsstreulichts bei der durchfluss zytometrischen Analyse eines Spermiums (modifiziert nach BECTON DICKINSON, 1999).

Nach der Laseranregung wird das von der Zelle emittierte Licht mit einer Linse gesammelt und weiter auf verschiedene Photomultiplikatordetektorröhren (PMTs) gerichtet. Das Vorwärtsstreulicht wird auf eine Photodiode geleitet. Sowohl die PMTs als auch die Photodiode wandeln die Photonen in Spannungsimpulse um. Diese analogen Signale können

anschließend linear oder logarithmisch verstärkt werden. Eine Umwandlung der analogen Signale in digitale Form ermöglicht die Weiterverarbeitung der Daten durch einen an die Messeinheit angeschlossenen Computer (BALLACHEY et al., 1986a). Der Messbereich für die oben beschriebenen Lichtparameter ist in eine vom Gerätetyp abhängige Anzahl von Kanälen eingeteilt. Die Anzahl der Kanäle bestimmt den Grad der Auflösung. Fast immer sind die verschiedenen Messbereiche in 1024 Kanäle eingeteilt. Mit Hilfe des angeschlossenen Computersystems erfolgt die Speicherung und die bildliche Darstellung der Messdaten in Form von Verteilungshistogrammen oder Punktwolkendiagrammen.

Die bei der Probenaufbereitung eingesetzten Fluorochrome bestimmen die Wellenlänge des nach der Laseranregung von der Zelle emittierten Lichts. Die Farbskala reicht von Ultraviolett (<390 nm) über Grün (500-570 nm), Orange (585-620 nm) bis hin zum Rot (620-750 nm). Dieses Licht wird in der Detektionsoptik eines Durchflusszytometers durch dichroitische Teilerspiegel (Halb Spiegel) und verschiedene Bandpassfilter in entsprechende Farbbereiche zerlegt und auf unterschiedlichen, separaten Fluoreszenzkanälen (FL₁-FL₃) gemessen (Abb.2.3).

Durch Verwendung von Fluorochromen mit gleichem Absorptionsspektrum und unterschiedlichen Emissionsspektren werden simultane Mehrfarbenmessungen möglich (CULMSEE und NOLTE, 2000).

Abkürzungen:

PMT = Photomultiplikatordetektorröhren

FSC = Forward Scatter

SSC = Side Scatter

FL 1-3 = Fluoreszenzkanäle 1-3

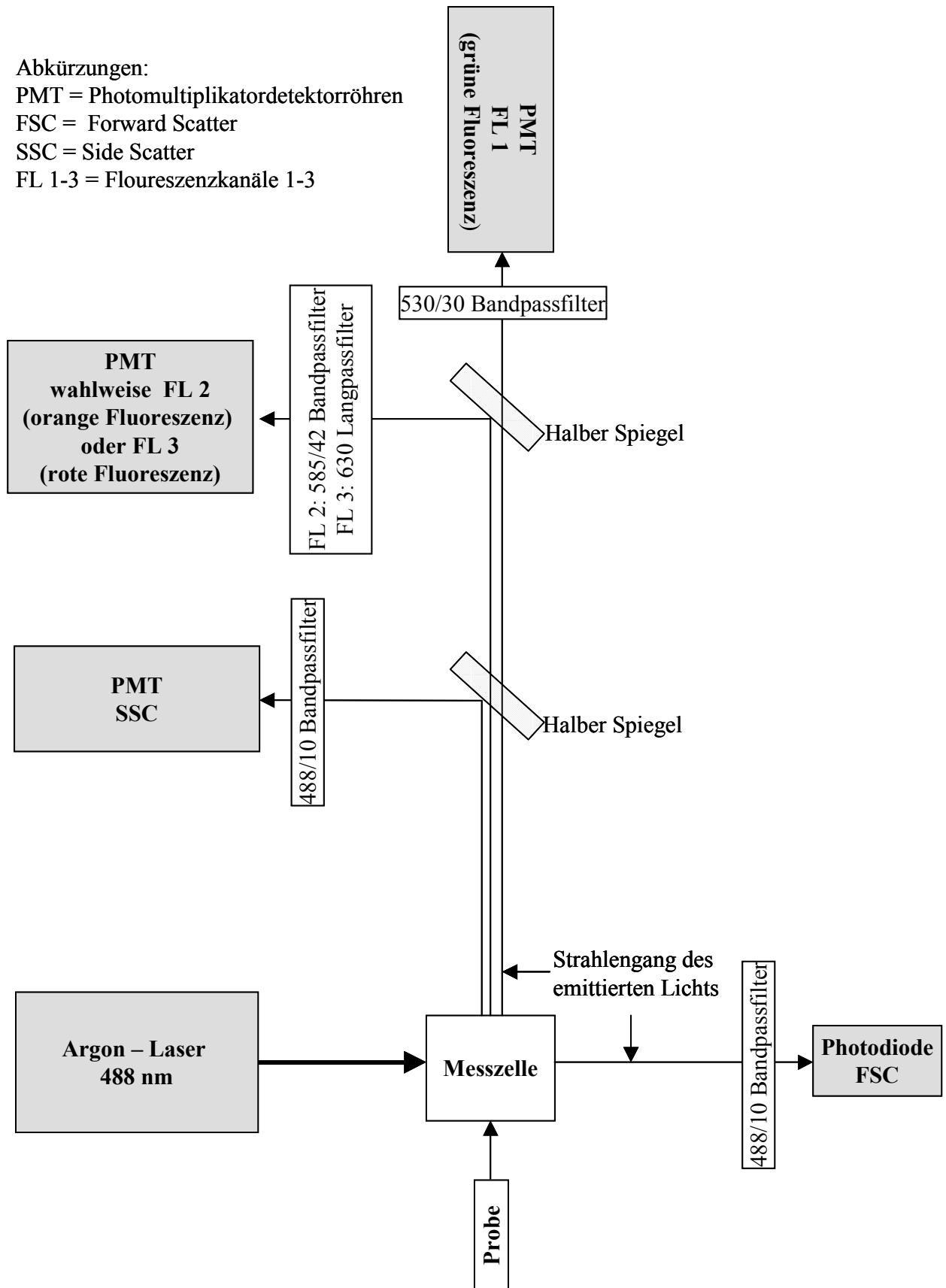


Abb. 2.3.: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflusszytometers (modifiziert nach BECTON DICKINSON, 1999).

2.5.2 Zuverlässigkeit der durchflusszytometrischen Methoden

Die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter wurde bisher nur bei der Spermachromatinstrukturanalyse überprüft. BALLACHEY et al. (1987) testete im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der Spermachromatinstruktur bei Bullenspermien die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Bei Doppelmessungen einer identischen Probe an einem Untersuchungstag ergaben sich sehr hohe Werte für die Reproduzierbarkeit der verschiedenen SCSATM-Parameter (ICC = Intra-Class-Korrelationskoeffizient $\geq 0,92$). Auch bei Messungen zweier verschiedener Pailletten eines Ejakulates an einem Untersuchungstag ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Daten (ICC $\geq 0,91$). Bei Messungen zweier Pailletten eines Ejakulates an unterschiedlichen Tagen war die Reproduzierbarkeit gut (ICC $\geq 0,79$). Auch EVENSON et al. (1991) bestätigten die hohe Zuverlässigkeit der flowzytometrisch ermittelten Ergebnisse bei den von ihnen durchgeführten SCSATM-Tests an humanen Samenproben (ICC $> 0,97$).

2.5.3 Bestimmung verschiedener Spermaqualitätsparameter

Wie bereits in Kapitel 2.5.1 erwähnt, kommen bei der flowzytometrischen Analyse der Spermienqualität verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz. In Abhängigkeit vom eingesetzten Farbstoff erhält man unterschiedliche spezifische Informationen über den funktionalen Status der Spermienzelle. Es lassen sich so z.B. die Unversehrtheit der Plasmamembran, das Mitochondrienmembranpotential, der akrosomale Status und die Integrität der Chromatinstruktur der Spermien untersuchen. Die unterschiedlichen Fluorochrome lassen sich auch kombiniert anwenden, so dass mehrere Funktionen der Zellen gleichzeitig überprüft werden können. Dadurch wird die Anwendung solcher Farbstoffe sehr effektiv (ERICSSON et al., 1993; GARNER et al., 1997b).

2.5.3.1 Bestimmung der Plasmamembranintegrität

Die Unversehrtheit und die damit verbundene Funktionalität der Plasmamembran ist nach JEYENDRAN et al. (1984) von erheblicher Bedeutung für die Vitalität und Befruchtungs -

fähigkeit der Spermien. Daher wurden viele unterschiedliche Färbetechniken entwickelt, um die Integrität der Zellmembran bei Spermien zu beurteilen.

2.5.3.1.1 SYBR[®] 14 / Propidiumjodid (PI) - Färbung

GARNER et al. (1994) entwickelten auf der Basis früherer Untersuchungen (GARNER et al., 1986) die kombinierte Färbung mit SYBR[®] 14 und Propidiumjodid. Mit Hilfe der Kombination von SYBR[®] 14 und PI, beides Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher Bindungs - affinität zur DNA, lässt sich die Plasmamembranintegrität bei Spermien durchfluss - zytometrisch bestimmen (GARNER et al., 1994). Da PI nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff ist, gelingt eine Kernfärbung der Spermien mit PI nur bei geschädigter Plasmamembran (GARNER et al., 1994; LICHTENSTERN, 1995). Propidiumjodid emittiert Licht nach einer optischen Anregung bei 488 nm im roten Bereich. Dabei liegt das Emissionsmaximum bei 617 nm (GROGAN, 1990). SYBR[®] 14 ist membranpermeabel und färbt somit jede Zelle unabhängig vom funktionellen Zustand der Zellmembran. Das Emissionsmaximum von SYBR[®] 14 nach Anregung bei 488 nm liegt bei 516 nm, d. h. im grünen Bereich. Verwendet man beide Farbstoffe in Kombination wird bei geschädigter Spermienmembran SYBR[®] 14 durch PI verdrängt. Dabei breitet sich die Rotfärbung von posterior nach anterior im Spermienkopf aus. Nach GARNER und JOHNSON (1995) lassen sich nach Färbung mit SYBR[®] 14 und PI drei unterschiedlich angefärbte Spermienpopulationen identifizieren: Spermien mit geschädigter Plasmamembran haben eine rote Kernfärbung, Spermien mit intakter Plasmamembran sind grün gefärbt und Samenzellen mit teilweise geschädigter Plasmamembran sind sowohl grün als auch rot angefärbt.

GARNER et al. (1994) bezeichneten diese doppelt angefärbten Spermien als moribund. Da diese doppeltgefärbten Spermien bereits erste Degenerationserscheinungen der Zellmembran zeigen, werden sie von GARNER und JOHNSON (1995) zu den toten Spermien gezählt .

Grundler et al. (2001) führten durchflusszytometrische Kinetikstudien an SYBR[®] 14/PI gefärbten Bullenspermien durch. Um die Population der moribunden Spermien gut zu beurteilen war eine Färbekubationsdauer von 15 Minuten optimal. Der prozentuale Anteil an doppelt gefärbten Spermien war bei den aufgetauten Tiefgefriersamenproben deutlich höher

verglichen mit den entsprechenden flüssigkonservierten Spermaproben. Daher beurteilen die Autoren diese Population von Spermien als einen guten Indikator für schädliche Einflüsse, die bei der Lagerung und dem Umgang mit TG-Proben auf diese einwirken.

In verschiedenen Studien wurde überprüft, inwieweit diese Kombinationsfärbung zwischen lebenden und toten Spermien differenzieren kann. GARNER et al. (1994) und GRAVANCE et al. (2001) bestimmten durch die Messung einer definierten Mischung von lebenden und durch wiederholtes Eintauchen der Samenproben in flüssigen Stickstoff abgetöteten Spermien die Genauigkeit dieser Methode. Sie fanden eine sehr hohe Korrelation ($r \geq 0,98$; $p < 0,001$) zwischen den theoretisch zu erwartenden und den durchflusszytometrisch gemessenen Werten. Auch bei Eber-, Schafbock-, Kaninchen-, Maus-, und Humanspermien (GARNER und JOHNSON, 1995) sowie bei Hengstspermien (BRAUN et al., 1995; MERKIES et al., 2000; MAGISTRINI et al., 1997a) wurde die SYBR[®]14/PI-Färbung erfolgreich zur Differenzierung lebender und toter Spermien eingesetzt.

2.5.3.1.2 Plasmamembranintegrität und andere Spermaqualitätsmerkmale

Im Rahmen verschiedener experimenteller Studien wurde der Zusammenhang zwischen der Plasmamembranintegrität und der Motilität der Spermien untersucht. Bei den Untersuchungen, die GARNER et al. (1997b) mit aufgetautem Bullentiefgefriersperma durchführte, zeigte sich eine hohe positive Korrelation zwischen den SYBR[®]14 angefärbten Spermien und dem prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen ($r = 0,97$; $p < 0,001$). Der prozentuale Anteil von Spermien mit intakter Plasmamembran korrelierte außerdem mit dem prozentualen Anteil von Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential ($r = 0,97$; $p < 0,001$), der mit Hilfe einer JC-1-Färbung ermittelt wurde. VIDAMENT et al. (1998) bestimmten flowzytometrisch die Vitalität von aufgetauten Hengstspermien mit der SYBR[®]14/PI – Färbung. Der prozentuale Anteil an SYBR[®]14 angefärbten Spermien korrelierte signifikant ($r = 0,76$; $p < 0,01$) mit den Ergebnissen der computergestützten Motilitätsanalyse direkt nach dem Auftauen. MAGISTRINI et al. (1997a) wiesen einen inversen Zusammenhang ($r = - 0,35$; p-Wert nicht angegeben) nach zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit hoher Geschwindigkeit ($> 30 \mu\text{m}/\text{sec}$), der mittels

CASA bestimmt wurde und dem Prozentsatz PI angefärbter Spermien bei aufgetauten Hengstsamenproben.

2.5.3.1.3 Plasmamembranintegrität und Fertilität

Sowohl THOMAS et al. (1996) als auch GARNER et al. (1997a) fanden bei ihren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen der Vitalität der Spermien, die mit Hilfe einer SYBR[®]14/PI-Färbung bestimmt wurde und der Fruchtbarkeit der Bullen. In beiden Studien wird die Meinung vertreten, dass die Vitalität kein genaues Maß ist für eine Vorhersage der Fruchtbarkeit. Dem entgegen stehen die Aussagen von CHRISTENSEN et al. (2000), die einen groß angelegten Besamungsversuch mit je 4 Ejakulaten von 157 Bullen durchführten. Dabei wurden 115416 Besamungen mit einer Inseminationsdosis von jeweils 10 bis 15 Millionen motiler Spermien in den aufgetauten Samenproben durchgeführt. Zogen sie von den Bullen jeweils die Mittelwerte aus den 4 Ejakulaten heran, so fanden sie einen deutlichen Zusammenhang ($r = 0,71$; p-Werte nicht angegeben) zwischen den SYBR[®]14 angefärbten Spermien im Nativsamen und der Non-Return-Rate (am Tag 56). Bei der flowzytometrischen Analyse der aufgetauten TG-Proben der Bullen fiel dieser Korrelationskoeffizient etwas niedriger aus ($r = 0,55$; p-Wert nicht angegeben). Betrachtete man die einzelnen Ejakulate unabhängig vom Bullen, wurde der Zusammenhang zwischen Vitalität der Spermien und Fertilität noch deutlicher. Hierbei kam ein statistisches Verfahren ('compact' mixed linear model) zur Anwendung, mit dessen Hilfe Einflüsse wie zum Beispiel durch Umweltfaktoren, unterschiedliche Tierbestände und Besamungstechniker ausgeschlossen werden konnten. Der Korrelationskoeffizient betrug bei der flowzytometrischen Bestimmung der Vitalität sowohl im Nativsamen als auch in aufgetauten TG - Samenproben 0,99 (kein p-Wert angegeben).

Mit Hilfe einer Kombinationsfärbung von Rhodamin 123 und PI, die von KARABINUS et al. (1991) beschrieben wurde, untersuchte DIGRASSI (2000) die Plasmamembranintegrität bei aufgetautem Tiefgefriersperma von 33 Hengsten über 2 Zuchtperioden. Nach dieser Färbung zeigten sich bei der flowzytometrischen Auswertung drei unterschiedlich angefärbte Spermienpopulationen. Die Spermien, deren Mitochondrien sich mit R 123 anfärbten, wurden als vital eingestuft. Eine weitere Population, die als tot klassifiziert wurde, bestand aus

Spermien, deren Zellkerne sich nur mit PI angefärbt hatten. Daneben gab es noch eine dritte Population Spermien mit beiden Färbungen. Der prozentuale Anteil an Spermien, die nur mit PI angefärbt waren, korrelierte negativ ($r = -0,68$; $p = 0,0003$) mit den bei Insemination der untersuchten Tiefgefriersamenproben erzielten Trächtigkeitsergebnissen der Hengste.

2.5.3.2 Bestimmung des akrosomalen Status

Befruchtungskompetente Spermien müssen intakte und reaktionsfähige Akrosomen besitzen (BLOTTNER et al., 1998; ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000; CHENG et al., 1996; RATHI et al., 2000). Nach BEDFORD (1970) ist bei der Beurteilung des akrosomalen Status in vitro die „echte“ von der „falschen“ Akrosomenreaktion zu unterscheiden. Unter „echter Akrosomenreaktion“ versteht man nach Ansicht des Autors den physiologischen Vorgang, während man unter dem Begriff „falsche Akrosomenreaktion“ degenerative Veränderungen des Akrosoms im Sinne einer Autolyse, wie sie bei Tod oder Alterung der Spermien auftreten, zusammenfasst.

2.5.3.2.1 FITC-PNA / SYTO[®]17 / PI - Färbung

Diese Färbemethode wurde erstmals von THOMAS et al. (1997) bei Untersuchungen an aufgetauten unfixierten Bullenspermien beschrieben. Hierbei kommen 3 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe simultan zur Anwendung. Arachis hypogaea Lectin (PNA) gekoppelt an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) dient zur Bestimmung des akrosomalen Status der Spermien. Dieses Lektin bindet sich selektiv an die äußere Akrosomenmembran und emittiert nach Laseranregung grünes Licht. SYTO[®]17 ist ein Farbstoff, der wie das in Kapitel 2.5.3.1.1. beschriebene SYBR[®]14 die DNA aller Spermien anfärbt, aber nach Laseranregung Licht im orangen Bereich emittiert. Der dritte Farbstoff ist Propidiumjodid, mit dessen Hilfe man die toten von den vitalen Spermien unterscheiden kann.

Eine selektive Bindung von PNA an die äußere Akrosomenmembran wird von vielen Autoren beschrieben (MORTIMER et al., 1987; BLOTTNER et al., 1998; COOPER und YEUNG, 1998; SIRIVAIDYAPONG et al., 2000; GADELLA et al., 2001). CHENG et al.

(1996) konnten dies für HengstspERMien eindeutig mit immunhistochemischen Untersuchungen nachweisen.

Bei unfixierten, vitalen Spermien ist die Plasmamembran, die über der äußeren Akrosomenmembran verläuft, nicht permeabel für FITC-PNA (CHENG et al., 1996). Da SYTO[®]17 auch die intakte Plasmamembran durchdringt, färben sich Spermien mit intakter Plasmamembran und mit intaktem Akrosom nur mit SYTO[®]17 an (Abb.2.4 A) und fluoreszieren orange. Kommt es bei den vitalen Spermien zur Vesikulation im Rahmen der Akrosomenreaktion, kann sich FITC-PNA an die äußere Akrosomenmembran binden (Abb. 2.4 B). Diese Spermien zeigen daher zusätzlich zu der orangen Kernfärbung eine deutlich grün fluoreszierende Kopfkappe. Davon zu unterscheiden sind die Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die soweit sie noch Teile einer äußeren Akrosomenmembran besitzen, neben einer roten Kernfärbung eine grüne Fluoreszenz im Bereich der Kopfkappe zeigen. Neben diesen 3 unterschiedlich gefärbten Spermienpopulationen lässt sich eine weitere Population detektieren, die sich nur mit PI anfärbt. Diese besteht aus Spermien, deren Zellmembran geschädigt ist, aber deren äußere Akrosomenmembran sich nicht mit FITC-PNA anfärben lässt. Dazu gehören Spermien mit völliger Degeneration und Verlust des Akrosoms (GARNER et al.,1999; RATHI et al., 2001). Somit ermöglicht die FITC-PNA/SYTO[®]17 /PI-Färbung an unfixierten Spermien die Unterscheidung zwischen vitalen Spermien mit Akrosomenreaktion und toten Spermien mit degeneriertem Akrosom (THOMAS et al., 1997).

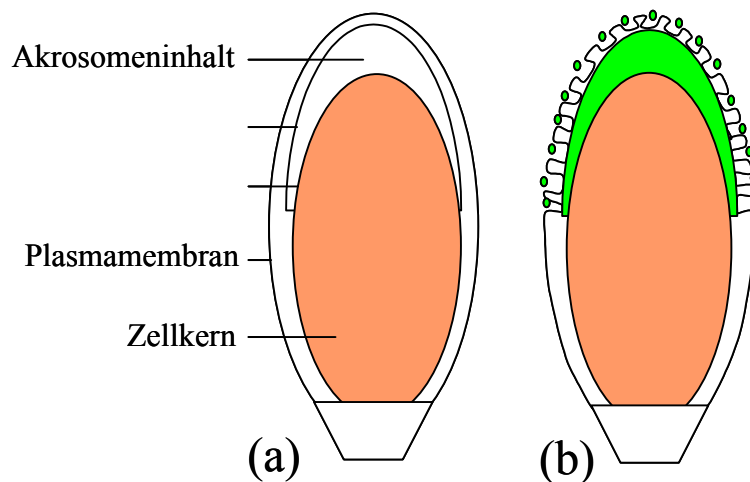


Abb. 2.4: Sagittalschnitt durch einen reifen unfixierten Spermienkopf; Spermium mit intakter Plasmamembran, ohne (a) und mit (b) Akrosomenreaktion nach FITC-PNA/ SYTO[®] 17 /PI Färbung; Schematische Darstellung (modifiziert nach VARNER et al., 2000b).

Neben *Arachis hypogaea* Lectin (PNA) kommt auch *Pisum sativum* Lectin (PSA) zur Anwendung, um selektiv Teile des Akrosoms anzufärben. Dieses Lektin bindet sich jedoch im Gegensatz zu PNA an Strukturen im Inneren des Akrosoms, wenn diese bei der Akrosomenreaktion freigesetzt werden (FARLIN et al., 1992).

2.5.3.2.2 Induktion der Akrosomenreaktion in vitro

Nach GADELLA et al. (2001) gibt es verhältnismäßig wenig Studien über die Kapazitation und die Akrosomenreaktion bei Hengstspermien.

Bei Hengstsamenzellen werden zur Schaffung günstigerer Bedingungen hinsichtlich der Kapazitation und Akrosomenreaktion Calciumionophor (A23187) und Heparin in vitro verwendet (CHRISTENSEN et al., 1996). Nach HAHN (2001) haben unterschiedliche Studien bei Hengstspermien gezeigt, dass eine vierstündige Präinkubation der Spermien bei 38,5° C in Tyrodemedium mit anschließender Zugabe von Heparin oder 5 µM Kalziumionophor die besten Ergebnisse bezüglich der Auslösung der Akrosomenreaktion liefert. Nach

Meinung von HAHN (2001) sind die Forschungsergebnisse zur in vitro Kapazitation von Hengstspermien jedoch mit vielen Unsicherheiten behaftet, da bei bisherigen Untersuchungen der Nachweis der Akrosomenreaktion vorwiegend an fixierten und gefärbten Präparaten erfolgte und somit eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Spermien nicht möglich war.

BLOTTNER et al. (1998) konnte mit Hilfe der flowzytometrischen Untersuchung von FITC-PNA angefärbten Hengstspermien nachweisen, dass durch eine 30-minütige Inkubation bei 37° C mit Kalziumionophor der prozentuale Anteil an Spermien, deren Akrosom nicht intakt war, von 12,4 % vor der Induktion auf 22,5 % anstieg. ALM et al. (2001) berichten über einen Anstieg der akrosomenreagierten Spermien in aufgetauten Tiefgefriersamenproben von Hengsten bei Auslösung der Akrosomenreaktion durch Kalziumionophor von 17,6 % auf 31,7 %. Bei beiden Studien wurden jedoch fixierte Spermienproben verwendet, d.h. eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Spermien war nicht möglich.

2.5.3.2.3 Akrosomaler Status und Fertilität

VARNER et al. (2000a) induzierten in vitro die Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor (A23187) bei Frischsamen von Hengsten mit unterschiedlicher Fruchtbarkeit und untersuchten den akrosomalen Status der Spermien mittels Elektronenmikroskopie. Bei einem Kontrollansatz ohne Zugabe von Kalziumionophor unterschied sich die Gruppe der fertilen Hengste nicht von der Gruppe der subfertilen Tiere ($p = 0,1$). Jedoch zeigte sich nach einer zweistündigen Inkubation der Spermien mit Kalziumionophor bei 37° C ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei den fertilen Hengsten hatten 84,0 % der Spermien morphologische Anzeichen einer Akrosomenreaktion, dagegen waren bei den subfertilen Hengsten nur 5,6 % der Spermien akrosomenreagiert.

MEYERS et al. (1995) untersuchten bei insgesamt 31 Ejakulaten von 10 Hengsten die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion durch Zugabe von Progesteron bei einer 5-stündigen Inkubation bei 39⁰ C. In den Ejakulaten der 6 Hengste, die als fertil eingestuft wurden, waren nach Inkubation $19,7 \pm 2,3$ % lebende akrosomenreagierte Spermien nachweisbar. Bei den

subfertilen Tieren betrug dieser Wert nur $5,8 \pm 0,6 \%$ ($p < 0,05$). Hierbei wurde der akrosomale Status der Spermien mit Hilfe einer FITC-PSA Färbung analysiert.

2.5.3.3 Integrität der Spermachromatinstruktur

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, führen physiologische Vorgänge während der Spermatogenese und der epididymalen Reifungsphase zu einer starken Komprimierung der Chromatinsubstanz. Dadurch wird die Erbsubstanz sehr widerstandsfähig gegen äußere Schadeinwirkungen. Nur so wird eine ungestörte Fertilisation und Embryonalentwicklung gewährleistet (LOVE und KENNEY, 1998; EVENSON und JOST, 2000).

Innerhalb eines Ejakulates gibt es eine gewisse Heterogenität der Chromatinstruktur, d. h. nicht bei allen Spermien eines Ejakulates ist die Chromatinverdichtung gleichermaßen ausgeprägt. EVENSON et al. (1978) erklären dies damit, dass die Vorgänge, die zur Verdichtung des Chromatins während der Spermatogenese führen, nicht bei allen Spermien gleichermaßen intensiv ablaufen. In verschiedenen Studien an Human- (EVENSON und MELAMED, 1983; EVENSON et al., 1984), Mäuse- (EVENSON et al., 1985; EVENSON et al., 1986; BALLACHEY et al., 1986a) und Bullensperma (EVENSON et al., 1980b; BALLACHEY et al., 1986b) zeigte sich, dass eine zunehmende Heterogenität der Spermachromatinstruktur assoziiert ist mit Störungen der Spermatogenese, hohem prozentualem Anteil morphologisch abnormaler Spermien und Sub- bzw. Infertilität.

2.5.3.3.1 Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™)

Auf der Grundlage der von Nash und Plaut 1964 bei Chromosomen der Drosophilafliege beobachteten unterschiedlichen Fluoreszenz von nativer und denaturierter DNA nach Anfärbung mit Akridinorange arbeiteten DARZYNKIEWICZ et al. (1975) die sogenannte „Two-step AO-Färbeprozedur“ aus. EVENSON et al. (1980a) entwickelten auf der Basis dieser Arbeiten den Sperm Chromatin Structur Assay®. Seither wird dieses Verfahren sowohl bei Human- als auch bei Tierspermien (EVENSON und JOST, 1994; SPANO et al., 1998) angewendet, um die Integrität der Spermachromatinstruktur zu beurteilen. Der Sperm Chromatin Structur Assay® beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin in

situ eine erhöhte Empfindlichkeit für eine physikalisch induzierte Denaturierung besitzt (DIGRASSIE, 2000). Die Denaturierung der DNA, zum Beispiel durch Säure, führt teilweise zur Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküle in Einzelstränge.

Nach der sich anschließenden Färbung mit Akridinorange kommt es zu einer Anlagerung des Farbstoffs an die gesamte DNA. Doppelsträngige DNA emittiert Licht im grünen Bereich, dagegen zeigt einzelsträngige DNA eine rote Fluoreszenz (EVENSON et al., 1991; EVENSON et al., 1995a). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die Intensität beider Fluoreszenzen für jedes analysierte Spermium bestimmt. Anschließend errechnet man für jedes einzelne Spermium den Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot und grün). Diese Zahl, die einen Wert zwischen 0 und 1 einnimmt, wird nach EVENSON et al. (2002) als DFI-Wert (DNA Fragmentation Index) bezeichnet. Die DFI-Werte der einzelnen Spermien werden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm (Abb.2.5) dargestellt (EVENSON et al., 2002; PETSCHOW, 2002). Es ergeben sich hierbei zwei verschiedene Spermienpopulationen. Neben der Hauptpopulation mit niedrigen DFI-Werten findet sich eine weitere Population mit höheren DFI-Werten (EVENSON et al., 2002). Aus diesem Verteilungshistogramm leiten sich die verschiedenen SCSATM-Parameter wie Mittelwert des DFI mit Standardabweichung (SD_{DFI}) sowie der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten ab. Nach der neuesten Nomenklatur bezeichnet EVENSON et al. (2002) diese Spermien mit erhöhtem DFI-Wert als DFI-Spermien. Hier liegt ein Nachteil bei der Bestimmung dieses SCSATM-Parameters, da durch eine subjektive Entscheidung die Abgrenzung der Spermien mit niedrigem DFI-Wert (Hauptpopulation) von den Spermien mit erhöhten DFI-Werten erfolgt (DIGRASSIE 2000). Die Parameter DFI-Mittelwert und SD_{DFI} sind dagegen objektiv ermittelte Parameter.

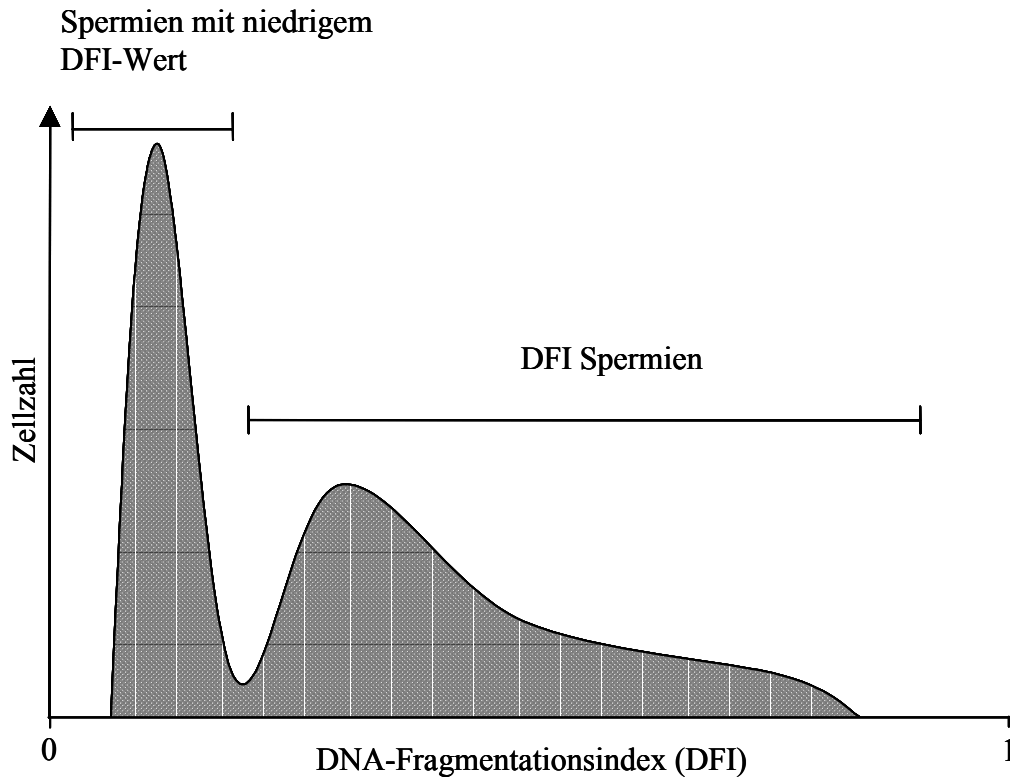


Abb. 2.5: Häufigkeitsverteilung der DFI-Werte, d.h. des Anteils der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) (modifiziert nach EVENSON et al., 2002).

Die genaue Ursache für diese verstärkte pH-induzierte Denaturierung bei abnormal strukturierter Chromatinsubstanz ist nicht bekannt. Jedoch konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Empfindlichkeit der Spermien gegenüber einer Säuredenaturierung mit einer erhöhten Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen verbunden ist (GORCZYCA et al., 1993; ARAVINDAN et al., 1997). SAILER et al. (1995) konnten bei Hengstspermien einen Zusammenhang ($r = 0,65$; $p < 0,001$) zwischen den prozentualen Anteilen von Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen und DNA-Strangbrüchen feststellen. Die quantitative Bestimmung der DNA-Strangbrüche erfolgte flowzytometrisch mittels Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Assay. GORCZYCA et al. (1993) sehen als Ursache für das vermehrte Vorkommen von Strangbrüchen in der Spermien-DNA eine frühe Form der Zellapoptose. LOVE und KENNEY (1999) konnten nachweisen, dass bei Spermien, die vermehrt geschädigte Chromatinsubstanz aufwiesen, die Anzahl der Disulfidbrückenbindungen in der Kernsubstanz reduziert war.

2.5.3.3.2 Faktoren, die die Spermachromatinstruktur beeinflussen

In epidemiologischen Studien an 277 Männern konnten SPANO et al. (1998) mit Hilfe der Varianzanalyse einen signifikanten ($P < 0,0001$) Einfluss des Alters der Samenspender auf den prozentualen Anteil der Spermien mit erhöhtem DFI-Mittelwert nachweisen. Der prozentuale Anteil an DFI-Spermien lag bei älteren Männer (18,0 %) deutlich über dem Wert bei jüngeren Männern (8,7 %). Ein solcher signifikanter Einfluss des Alters der Samenspender auf die Qualität der Chromatinstruktur zeigte sich auch bei Bullenspermien (KARABINUS et al., 1990).

GOGOL et al. (2002) untersuchten den Einfluss nicht abgeschlossener sexueller Reife auf die Spermachromatinstruktur. Dazu analysierten sie die Spermien mit Hilfe des SCSATM-Tests von postpubertären und älteren Kaninchen. Sie fanden in den Ejakulaten von Tieren, die jünger als 6 Monate (3,2 %) waren, signifikant ($p < 0,01$) mehr Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen als bei Tieren im Alter von 6 (1,7 %) bis 10 Monaten (1,9 %). Diese altersabhängigen Untersuchungsergebnisse erklären die Autoren mit effizienteren Reifungsvorgängen der Spermien während der Nebenhodenpassage bei Tieren, die älter als 6 Monate sind.

Nach SPANO et al. (1998) wird die Chromatinstruktur von Humanspermien neben dem Alter der Samenspender auch von der Dauer der sexuellen Ruhepause vor der Ejakulatgewinnung beeinflusst. Je länger die Ruhephase vor der Ejakulatgewinnung war, um so höher war der prozentuale Anteil an Spermien mit Chromatinstrukturen im Ejakulat. Auch die Jahreszeit, in der die Ejakulatgewinnung erfolgte, hatte einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) auf die SCSATM-Ergebnisse. Bei den in den Monaten Oktober bis Dezember gewonnenen Ejakulaten fanden sich deutlich mehr DFI-Spermien verglichen mit den Ejakulaten aus den Frühjahr- und Sommermonaten. Dem stehen die Untersuchungsergebnisse von EVENSON et al. (1991) entgegen, die bei 45 Männern jeweils 1 Ejakulat aus 9 aufeinanderfolgenden Monaten untersuchten. Bei Betrachtung der verschiedenen Ejakulate eines Mannes konnten sie keinen Einfluss einer unterschiedlich langen sexuellen Abstinenzzeit (0,5 bis 7 Tage) feststellen. Auch waren bei diesen Untersuchungen keine jahreszeitlich bedingten Unterschiede bezüglich der Spermachromatinsubstanz nachweisbar.

2.5.3.3.3 Veränderungen der SCSA™-Parameter in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Temperatur des Spermas

KARABINUS et al. (1997) untersuchten den Einfluss der Inkubationsdauer auf die Spermachromatinstruktur von aufgetautem Bullensperma. Sie analysierten das Sperma direkt nach dem Auftauen sowie nach 30, 60, 120 und 180-minütiger Inkubation bei 38,5° C. Sie stellten hierbei einen linearen Anstieg des DFI-Mittelwertes und des prozentualen Anteils an DFI-Spermien bei zunehmender Inkubationszeit fest.

LOVE et al. (2000), die an flüssigkonserviertem Sperma von 18 Hengsten den Einfluss einer 46-stündigen Inkubationszeit bei 5° C auf die Integrität der Chromatinsubstanz der Spermien untersuchten, fanden dabei keinerlei signifikante Veränderungen der Spermachromatinstruktur.

2.5.3.3.4 Zusammenhang zwischen der Spermachromatinstruktur und anderen Spermaqualitätsparametern

KENNEY et al. (1995) konnten bei aufgetauten schockgefrorenen Nativsamenproben von 106 Hengsten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der DNA-Denaturierung und der Spermienmotilität sowie der Spermienmorphologie im entsprechenden Nativsamen feststellen. Der prozentuale Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien korrelierte geringgradig negativ mit dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien ($r = -0,35$; $p < 0,005$) der untersuchten Hengstejakulate. Die negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil morphologisch normaler Spermien und dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien war dagegen deutlicher ausgeprägt ($r = -0,41$; $p < 0,001$).

DIGRASSI (2000) untersuchte aufgetaute kryokonservierte Samenproben von 29 Hengsten und fand keinen Zusammenhang ($r = 0,13$; $p = 0,44$) zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen und dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien. Auch der prozentuale Anteil an morphologisch normalen Spermien in den aufgetauten Samenproben korrelierte nicht ($r = 0,13$; $p = 0,46$) mit diesem SCSA™-Parameter.

Einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil an toten Spermien, die mittels einer Propidiumjodid-Färbung ermittelt wurden und dem prozentualen Anteil an Spermien mit geschädigter Chromatinstruktur konnte DIGRASSIE (2000) bei aufgetautem Sperma von 29 Hengsten nachweisen ($r = 0,82$; $p \leq 0,0001$).

2.5.3.3.5 Spermachromatinstruktur und Fertilität

Verschiedene Untersuchungen an Samenproben von Bullen (BALLACHEY et al., 1987; BALLACHEY et al., 1988), Hengsten (KENNEY et al., 1995; EVENSON et al., 1995b; DIGRASSI, 2000) und Ebern (EVENSON et al., 1994) zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Fertilitätsdaten der Tiere und den SCSATM-Parametern der untersuchten Ejakulate.

LOVE und KENNEY (1998) vertreten die Meinung, dass beim Vergleich der verschiedenen SCSATM-Parameter der prozentuale Anteil an DFI-Spermien die größte Aussagekraft hat hinsichtlich der Prognose der Trächtigkeitsraten, die von Hengsten erzielt werden.

KENNEY et al. (1995) konnten einen deutlichen negativen Zusammenhang zwischen den saisonalen Trächtigkeitsraten, die Hengste erzielten und den DFI-Mittelwerten der analysierten Samenproben ($r = - 0,40$; $p < 0,004$) aufzeigen. LOVE und KENNEY (1998) untersuchten mit Hilfe der Spermachromatinstrukturanalyse die Ejakulate von 84 Hengsten während einer Zuchtsaison. Die saisonalen Trächtigkeitsergebnisse der Hengste korrelierten nur schwach negativ mit den DFI-Mittelwerten ($r = - 0,24$; $p < 0,05$) sowie mit dem prozentualen Anteilen von DFI-Spermien ($r = - 0,27$; $p < 0,05$). Ein deutlicherer Zusammenhang ergab sich zwischen den SCSATM-Parametern und den Trächtigkeitsergebnissen bezogen auf den jeweils ersten Besamungszyklus der Stuten (FCP in %: percentage pregnant per first cycle). Der FCP korrelierte invers mit der Standardabweichung der DFI-Werte ($r = - 0,30$; $p < 0,01$) und mit dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien ($r = - 0,42$; $p < 0,0001$).

EVENSON und JOST (2000) haben für Humanspermaproben auf der Grundlage der Ergebnisse von IVF-Studien folgendes Klassifikationsschema erarbeitet:

Anteil an DFI-Spermien < 15 %: Samenprobe mit sehr gutem Befruchtungspotential

Anteil an DFI-Spermien 16-24 %: Samenprobe mit gutem Befruchtungspotential

Anteil an DFI-Spermien 25-30 %: Samenprobe mit mäßigem Befruchtungspotential

Anteil an DFI-Spermien > 30 %: Samenprobe mit schlechtem Befruchtungspotential

Sowohl EVENSON und JOST (2000) als auch EVENSON et al. (1994) nehmen an, dass die mit Hilfe des SCSATM-Tests als denaturiert detektierten Spermien nur „die Spitze des Eisbergs“ darstellen, die einen Anstieg der Chromatinschädigung der gesamten Spermien - population widerspiegelt. Dies ist den Autoren zufolge der Grund dafür, dass bei 30 % denaturierten Spermien die anderen 70 %, die theoretisch eine intakte DNA-Struktur aufweisen müssten, nicht für eine erfolgreiche Befruchtung ausreichen.

2.5.3.4 Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP)

Die physiologischen Vorgänge, die zur Entstehung des Mitochondrienmembranpotentials führen, wurden bereits in Kapitel 2.1.4 dargestellt.

2.5.3.4.1 Bestimmungsmethode des MMP

Das Kation Rhodamin 123 (Rh 123) wurde bisher am häufigsten zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials angewandt (GARNER et al., 1997b). Nach einer optischen Anregung bei 488 nm emittiert dieser Farbstoff Licht im grünen Bereich. Das Rh 123 wird durch die Mitochondrienmembran ins Innere der Mitochondrien transportiert (ERICSSON et al., 1993) und akkumuliert dort (GARNER et al., 1997b; PAPAIOANNOU et al., 1997; DIGRASSI, 2000). Voraussetzung dafür sind lebende Zellen mit funktionsfähigen Mitochondrien, die eine negativ geladene Mitochondrienmatrix aufweisen (GARNER et al., 1997b; ERICSSON et al., 1993). Nach GARNER et al. (1997b) werden durch Rh 123 nur solche Mitochondrien identifiziert, die ein Mitochondrienpotential aufweisen. Über die Höhe des MMPs sagt diese Methode nichts aus.

Das lipophile Kation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid (JC-1) ist ein membranpermeables Cyanid mit einer delokalisierten positiven Ladung (REERS et al., 1991). Dieser metachromatische Farbstoff kann sowohl in monomerer Form vorliegen oder reversibel in Aggregatform übergehen. JC-1 Monomere werden in die Mitochondrienmatrix eingeschleust (COSSARIZZA et al., 1996). Da es sich um ein positiv geladenes Molekül handelt, ist der Einstrom um so stärker, je höher das Mitochondrienmembranpotential ist. Ab einem Schwellenwert des MMP von -80 bis -100 mV werden reversibel JC-1-Aggregate gebildet. Nach einer Laseranregung (488 nm) fluoresziert die monomere Form von JC-1 mit einer Wellenlänge von 527 nm grün, während es in Aggregatform bei 590 nm oranges Licht emittiert (SMILEY et al., 1991; REERS et al., 1991). Folglich lassen sich mit Hilfe dieser Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung Spermien mit hohem MMP, deren Mitochondrien orange fluoreszieren, von denen mit niedrigem MMP, deren Mitochondrien grün fluoreszieren, unterscheiden (COSSARIZZA et al., 1996).

GRAVANCE et al. (2000) bestimmten durch Messungen verschiedener Mischungsverhältnisse von vitalen und durch Schockgefrieren abgetöteten Hengstspemien die Genauigkeit dieser Methode. Sie fanden eine sehr hohe Korrelation ($r = 0,99$; $p < 0,0001$) zwischen den theoretisch zu erwartenden Werten der JC-1-Aggregate und den durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteilen an Spermien mit hohem MMP. Jedoch wurden in der Probe mit 100 % toten Spermien, die durch wiederholtes Eintauchen in flüssigen Stickstoff und Wiederauftauen behandelt wurden, noch 7 % Spermien mit hohem MMP bei der flowzytometrischen Auswertung nachgewiesen. Die Autoren führen diese Beobachtung darauf zurück, dass durch den dreimaligen Vorgang des Schockgefrierens nicht alle Spermien abgetötet werden.

2.5.3.4.2 Beziehung zwischen dem MMP, verschiedenen Spermaqualitätsparametern und der Fertilität

Da der Farbstoff JC-1 noch nicht lange für die Untersuchung von Spermien verwendet wird, gibt es bisher dazu nur eine beschränkte Anzahl von Arbeiten (PETSCHOW, 2002).

Überwiegend wurde bisher der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Rh 123) zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials herangezogen.

GARNER et al. (1997b) fanden bei aufgetauten Bullenspermien eine sehr gute Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit hohem MMP und der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen ($r = 0,97$; $p < 0,001$). In gleicher Weise korrelierte der prozentuale Anteil an Spermien mit hohem MMP mit der Anzahl der Spermien die mit Hilfe einer SYBR[®]14/PI-Färbung als vital eingestuft wurden. Neuere Untersuchungen dieser Autoren bestätigen dieses Ergebnis (GARNER et al., 2001).

BAUMBER et al. (2000) untersuchten den Einfluss einer erhöhten ROS-Produktion equiner Spermien. Durch die Zugabe eines Enzymsystems (Xanthin (x)-Xanthine Oxidase (xo)) konnten sie die Spermien zu einer nachgewiesenen erhöhten Wasserstoffperoxyd-Produktion anregen. Mit Hilfe der JC-1-Färbung untersuchten sie danach das MMP der Spermien und bestimmten gleichzeitig deren Motilität. Die Beweglichkeit der Spermien reduzierte sich durch die erhöhte ROS-Aktivität von 73 % auf 29 % vorwärtsbeweglicher Spermien. Die Resultate der MMP-Bestimmung veränderten sich jedoch nicht.

Über Zusammenhänge zwischen dem MMP von Spermien und dem Befruchtungspotential einer Samenprobe ist bisher nur wenig bekannt. Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen der Fertilität und dem MMP der Spermien, das mit Hilfe einer Rhodamin 123-Färbung beurteilt wurde, liegen in der Literatur vereinzelt vor. ERICSSON et al. (1993) konnte bei aufgetautem Bullensperma keinen Zusammenhang zwischen der Non-Return-Rate der Bullen und dem MMP der Spermien nach dem Auftauen feststellen. Auch DIGRASSI (2000) konnte bei aufgetauten Hengstsamenproben keinen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Spermien, die durch eine Anfärbung mit Rhodamin 123 als Spermien mit vorhandenem MMP klassifiziert wurden und den Trächtigkeitsergebnissen, die mit diesen kryokonservierten Spermaproben erzielt wurden, feststellen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 57 Hengste des Niedersächsischen Landesgestüts Celle verwendet. Das durchschnittliche Alter betrug 10 ± 5 Jahre. Das minimale Alter lag bei 3 Jahren, das maximale bei 25 Jahren. Von diesen Tieren gehörten 50 der Rasse Warmblut und 7 der Rasse Englisches Vollblut an. Das Allgemeinbefinden und die Sexualfunktion waren während der Zeiträume der Ejakulatgewinnung ungestört.

3.2 Spermagewinnung

Die Samengewinnung erfolgte mittels künstlicher Scheide (Modell nach Götze) unter Benutzung eines Phantoms und in Anwesenheit einer Stute. Die Spermagewinnung wurde in der Zeit vom Oktober 2000 bis Juli 2001 auf dem Landesgestüt Celle durchgeführt. Nur im März 2001 wurden die Ejakulate auf den dem Landesgestüt Celle angeschlossenen Außenstationen gewonnen.

Im Oktober 2000 wurden konsekutiv von 18 Hengsten je 4 Ejakulate gewonnen. In den Monaten Dezember 2000, März 2001 und Juli 2001 wurden 11 der 18 Hengste und zusätzliche 39 Hengste zur Ejakulatgewinnung herangezogen und je 1 Ejakulat kryokonserviert.

Alle Hengste, die im Oktober 2000 zur Ejakulatgewinnung dienten, wurden regelmäßig 3 mal wöchentlich im Abstand von 2 bis 3 Tagen zur Spermagewinnung herangezogen. Im Dezember hatten 33 der insgesamt 50 Hengste vor der Gewinnung der Ejakulate eine viermonatige Deckpause, wohingegen die 17 Hengste von August an regelmäßig 3 mal wöchentlich im Abstand von 2 bis 3 Tagen abgesamt wurden. In den Monaten März bis Juli 2001 standen alle Tiere in regelmäßigem Deckeinsatz. Die Ejakulatgewinnung erfolgte in diesem Zeitraum täglich.

3.3 Kryokonservierung der Samenproben

Im Anschluss an die Samenentnahme erfolgte die Dichtebestimmung des Samens mit Hilfe eines Photometers (SpermaCue, Fa. Minitüb, Landshut, Germany). Durch Zugabe von modifiziertem INRA 82 Zentrifugationsverdünner (MAGISTRINI et al., 1992) wurde die Samenzellkonzentration auf $50 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Das so verdünnte Sperma wurde in Zentrifugationsröhrchen (100 ml) abgefüllt und 10 Minuten mit 650 g zentrifugiert. Danach erfolgte die Entfernung des Seminalplasmas mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, wobei ein Seminalplasmaanteil von ca. 5 % im Zentrifugat verblieb. Zur Resuspension des im Zentrifugat befindlichen Samenpellets wurden vorab ca. 3 ml des Endverdünners (INRA 82 + 2 % klarifizierter Eidotter + 2,5 % Glycerol) zugefügt und das Behältnis auf einer Rüttelvorrichtung bis zur vollständigen Auflösung des Pellets geschüttelt. Danach erfolgte die restliche Zugabe des Endverdünners bis zu einer Spermienkonzentration von $200 \times 10^6/\text{ml}$. Anschließend wurden die Proben vollautomatisch mit einer entsprechenden Vorrichtung in 0,5 ml Pailletten abgefüllt, verschlossen und gekennzeichnet. Nach der Konfektionierung wurden die Proben nach der von KLUG und SIEME (2003) beschriebenen Methode kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) bis zum Untersuchungszeitpunkt gelagert. Das Auftauen aller Pailletten erfolgte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad für 30 Sekunden.

3.4 Versuchsaufbau

Zur Evaluierung der durchflusszytometrischen Verfahren im Rahmen der Sperma-
beurteilung wurden folgende Fragestellungen (Tab. 3.1) bearbeitet:

Tab. 3.1: Übersicht über die durchgeführten durchflusszytometrischen und sonstigen
spermatologischen Untersuchungen.

Fragestellung	Tiere	Ejakulate pro Hengst	Proben pro Ejakulat	Flowzytometrie Zeitpunkt der Untersuchung	Untersuchungsmethoden
Reproduzierbarkeit	11	1	3	0 h	Flowzytometrie: SCSA [®] ; JC-1; SYBR [®] 14/PPI; SYTO [®] 17/FITC-PNA/PI;
Variabilität in Abhängigkeit vom Hengst und vom Ejakulat	18	4	1	0 h	Flowzytometrie: SCSA [®] ; JC-1; SYBR [®] 14/PPI; SYTO [®] 17/FITC-PNA/PI
Einfluss der Jahreszeit und des Untersuchungszeit- punktes nach dem Auftauen der Proben	50	3	1	0 h + 3 h	Flowzytometrie: SCSA [®] ; JC-1; SYBR [®] 14/PPI; SYTO [®] 17/FITC-PNA/PI mit und ohne Induktion der Akrosomenreaktion;
Einfluss einer Deckpause	38	3	1	0 h	Computergestützte Motilitätsanalyse; Lichtmikroskopische Beurteilung der Spermienvitalität und Spermienmorphologie Fertilität (saisonale Trächtigkeitsrate);

Untersuchungszeitpunkt: 0 h=direkt nach dem Auftauen der Samenproben; 3 h= nach dreistündiger
Inkubation der Samenproben bei 37 °C.

3.4.1 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der in Kapitel 3.5 beschriebenen durchflusszytometrischen Testverfahren zur Beurteilung der Plasmamembranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials, des akrosomalen Status und der Integrität der Chromatinstruktur der Spermien wurden von 11 Hengsten an 3 verschiedenen Tagen je eine Paillette desselben Ejakulates aufgetaut, unmittelbar danach gefärbt und analysiert.

3.4.2 Variabilität in Abhängigkeit vom Hengst und vom Ejakulat

Um die Variabilität in Abhängigkeit vom Hengst und vom Ejakulat zu untersuchen, wurden von 18 Hengsten Samenproben von je 4 konsekutiv gewonnenen Ejakulaten durchflusszytometrisch mit den oben erwähnten Testverfahren untersucht. Die verschiedenen durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden direkt nach dem Auftauen der Samenproben durchgeführt.

3.4.3 Einfluss der Jahreszeit und des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben und Einfluss einer Deckruhe

Um saisonale Effekte bezüglich der durchflusszytometrisch ermittelten Samenqualität zu erfassen und den Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Samenproben dazustellen, wurde aus den Monaten Dezember 2000, März 2001 und Juli 2001 je eine kryokonservierte Samenprobe eines Ejakulats von 50 Hengsten untersucht. Hierbei wurden die verschiedenen durchflusszytometrischen Tests direkt nach dem Auftauen der Proben durchgeführt sowie auch nach einer dreistündigen Inkubation der Samenproben bei 37 °C.

Zusätzlich wurde der Einfluss einer viermonatigen Deckpause auf die durchflusszytometrisch ermittelten Samenqualitätsparameter überprüft. Dazu wurde bei den Ejakulaten von 38 der 50 Hengste, die im Dezember 2000 gewonnen wurden, die Deckbeanspruchung in den letzten 4 Monaten vor der Ejakulatgewinnung berücksichtigt. 17 Hengste wurden von August an regelmäßig 3 mal wöchentlich im Abstand von 2 bis 3 Tagen zur Spermagewinnung herangezogen. Von den restlichen 33 Hengsten, die eine viermonatige Deckpause

vor der Ejakulatgewinnung einhielten, wurden bei dieser Untersuchung nur 21 Tiere berücksichtigt, um eine vergleichbare Altersstruktur der beiden Gruppen zu erreichen. (ungepaarter t-Test; $p > 0,05$). Die Gruppe der Tiere ohne Deckruhe vor der Probengewinnung war im Durchschnitt mit $8,9 \pm 3,6$ Jahren nahezu gleich alt wie die Gruppe der Hengste mit Deckpause, die ein mittleres Alter von $8,6 \pm 2,6$ Jahren hatten. Von den Hengsten der beiden Gruppen wurden je 3 kryokonservierte Samenproben aufgetaut und wie unter 3.5 beschrieben durchflusszytometrisch untersucht.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Analyseverfahren wurden verschiedene andere Untersuchungsmethoden angewendet. Neben der computergestützten Motilitätsbestimmung erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der Vitalität und der Morphologie der Spermien mittels Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung. Schließlich wurde auf Zusammenhänge zwischen den verschiedenen durchflusszytometrisch ermittelten Samenqualitätsparametern und den Fertilitätsdaten der Hengste (individuelle, saisonale Trächtigkeitsrate) geachtet.

3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung der aufgetauten Proben

Die Untersuchungen zur Überprüfung der Membranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials, der Akrosomenreaktion mit und ohne Induktion und die Bestimmung der Chromatinstruktur der Spermien wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren unter Verwendung spezifischer Färbemethoden durchgeführt. Bei allen Analyseverfahren wurden 10.000 Spermien pro Probe analysiert. Für die Färbungen mit SYBR[®]14/PI, JC-1 und SYTO 17/FITC-PNA/PI wurde das Sperma nach dem Auftauen mit TALP-Medium (siehe Anhang) auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Spermien/ml gebracht. Bei der Durchführung des SCSA[™]-Tests erfolgte die Probenaufbereitung nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000). Um die verschiedenen Tests miteinander vergleichen zu können, wurden die Inkubationszeiten der verschiedenen Färbungen vereinheitlicht. Bei allen durchgeführten Tests, außer dem SCSA[™]-Test, wurden die Proben nach der Zugabe der entsprechenden Farbstoffe im abgedunkelten Raum 15 Minuten bei 37 °C in einem Thermostat (Typ 5320, Fa. Eppendorf) inkubiert.

3.5.1 Geräte und Geräteeinstellungen

Für die Untersuchungen wurde ein Durchflusszytometer FACScan™ (Fa. Becton Dickinson), das mit einem luftgekühlten Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW ausgestattet war, verwendet. Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, FL-2 (585/42 nm) für die orange Fluoreszenz und FL-3 (650LP nm) für die rote Fluoreszenz. Für die Datenanalyse war ein Power Mac G4-Computer der Fa. Apple Computer Inc. an dieses Gerät angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm Cellquest™ (Fa. Becton Dickinson). Die Auswertung der SCSA™-Daten wurde mit dem Software-Programm DAS Version 4.40 (BEISKER, 1994) vorgenommen.

Für die verschiedenen Untersuchungen mit den Färbungen SYBR® 14/PI, JC-1 und SYTO 17/FITC-PNA/PI wurden einheitliche Geräteeinstellungen am Durchflusszytometer gewählt (siehe Anhang). Die Geräteeinstellungen wurden beim SCSA™-Test entsprechend den Angaben von EVENSON und JOST (2000) zu Beginn einer jeden Messreihe neu eingestellt und nach jeder zehnten Probe überprüft (siehe Anhang).

3.5.2 Bestimmung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR® 14/PI-Färbung

Die Bestimmungen der Plasmamembranintegrität erfolgte nach dem bei GARNER et al. (1999) beschriebenen Verfahren. Verwendet wurde der LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit der Fa. Molecular Probes (Katalog-Nr.: L-7011).

Zu 500 µl des vorverdünnten Spermas wurden jeweils 5 µl SYBR® 14 (10 µM) und PI (0,3 mM) zugegeben und entsprechend inkubiert. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Es wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit hoher Intensität der Grünfluoreszenz (Abb. 3.1) bestimmt. Diese wurden, da sie nicht mit PI angefärbt waren und somit eine intakte Plasmamembran aufwiesen, als vital eingestuft. Die anderen Spermien, d.h. diejenigen mit erhöhter Rotfluoreszenz, wurden als tot bewertet (Abb. 3.1). Die Eingrenzungen der einzelnen Spermienpopulationen (SP 1 und SP 2) erfolgte subjektiv mit Hilfe des Analyseprogramm der Cellquest™-Software (Fa. Becton Dickinson).

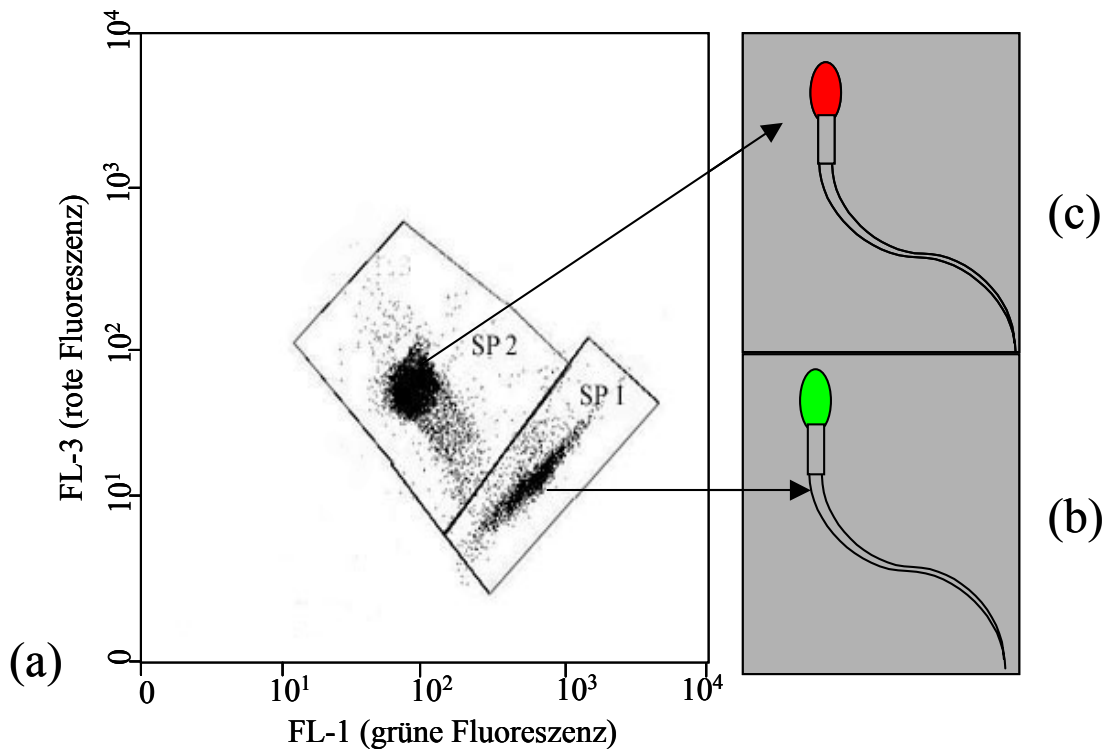


Abb. 3.1: Punktwolkendiagramm (a) der beiden Spermienpopulationen (SP) nach SYBR[®]14/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Analyse (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = vitale Spermien; SP 2 = tote Spermien). Schematische Darstellung der vitalen Spermien (b) mit grüner Fluoreszenz und der toten Spermien (c) mit roter Fluoreszenz nach SYBR[®]14/PI-Färbung.

3.5.3 Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials mittels JC-1-Färbung

Die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) erfolgte nach dem bei GRAVANCE et al. (2000) beschriebenen Verfahren. Verwendet wurde der Farbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaninjodid (JC-1) von Molecular Probes (Katalog-Nr.: T-3168).

Zu 500 μ l des vorverdünnten Spermias wurden jeweils 10 μ l JC-1 (0,153 mM) zugesetzt und 15 Minuten inkubiert. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-2 für die orange Fluoreszenz eingesetzt. Bei der Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhter Orangefluoreszenz, d.h. mit hohem MMP bestimmt (Abb. 3.2). Auch hier erfolgte die Trennung zwischen den Spermienpopulationen subjektiv.

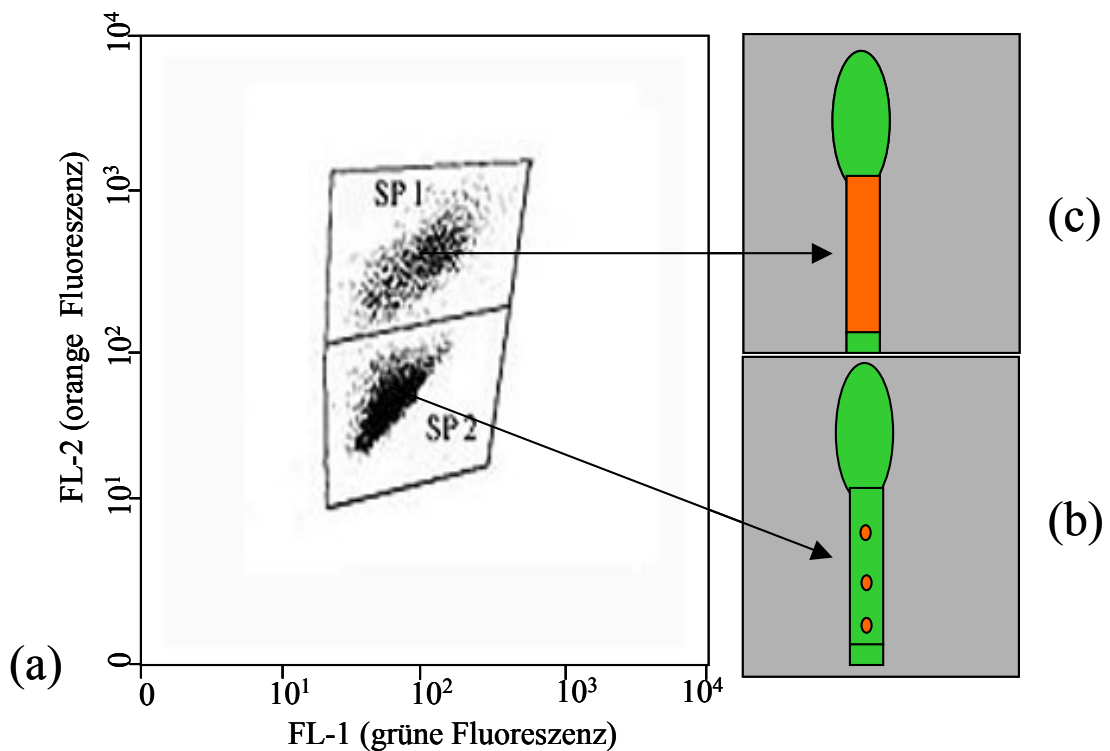


Abb. 3.2: Punktwolkendiagramm (a) der beiden Spermienpopulationen (SP) nach JC-1-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Auswertung (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = Spermien mit hohem MMP; SP 2 = Spermien mit niedrigem MMP). Schematische Darstellung der Spermien mit niedriger Orange fluoreszenz des Mittelstücks, d.h. mit niedrigem MMP (b) und der Spermien mit hoher Orange fluoreszenz des Mittelstücks, d.h. mit hohem MMP (c) nach JC-1-Färbung.

3.5.4 Bestimmung des akrosomalen Status mittels SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI-Färbung

Bei der Bestimmung des akrosomalen Status wurde unterschieden zwischen Spermien mit intaktem Akrosom und solchen mit Akrosomenschäden. Nur bei den letzteren ist das Akrosom mit FITC-PNA anfärbbar und leuchtet daher grün. Zusätzlich wurde durch Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe SYTO[®] 17 und PI die Plasmamembranintegrität und damit die Vitalität der Spermien bestimmt.

Zur Bestimmung des akrosomalen Status der Spermien wurden die Samenproben nach dem bei GARNER et al. (1999) beschriebenen Verfahren durchflusszytometrisch analysiert, wobei die verwendeten Farbstoffmengen modifiziert wurden. Zur Anwendung kamen die

Farbstoffe SYTO[®] 17 von Molecular Probes (Katalog-Nr.: S-7579), FITC-PNA von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr.: L-7381) und Propidium Iodide 95-98% von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr.: P-4170). Es wurden 500 µl verdünntes Sperma mit 2 µl SYTO[®] 17 (0,5 mM), 3 µl PI (2,99 mM) und 5 µl FITC-PNA (100 µg/ml Aqua dest.) gemischt und entsprechend inkubiert.

Es kamen dieselben Filter zum Einsatz wie unter Kapitel 3.5.3 beschrieben. Bei der Auswertung (Abb. 3.3) wurden die Spermienköpfe zum einen hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, zum anderen hinsichtlich des Unversehrtheit des Akrosoms in vier verschiedene Populationen eingeteilt, wobei die Zuordnung zu den einzelnen Spermienpopulationen subjektiv erfolgte: membranintakte Spermien mit intaktem Akrosom (orange angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms (rot angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom (rot angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom) und membranintakte Spermien mit geschädigtem Akrosom (orange angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom).

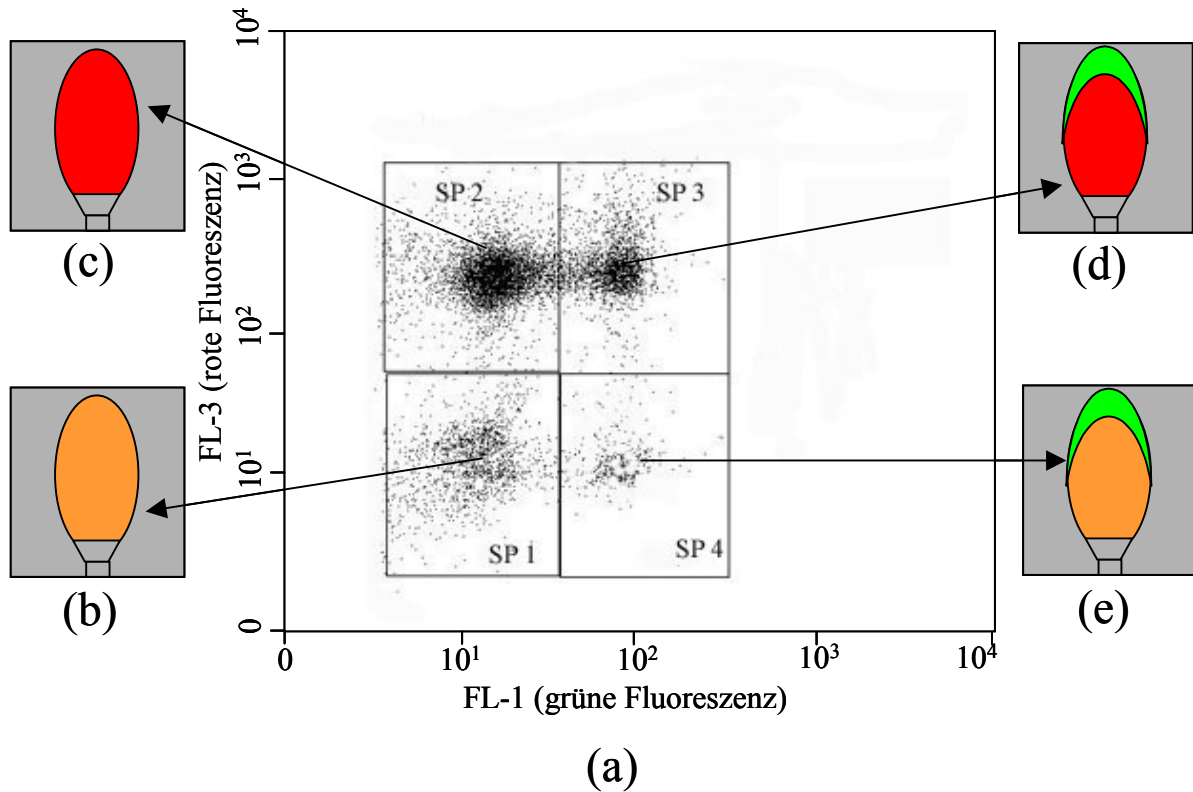


Abb. 3.3: Punktwolkendiagramm (a) der 4 Spermienpopulationen (SP) nach SYTO[®]17/ FITC-PNA / PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Auswertung (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = vitale Spermien mit intaktem Akrosom; SP 2 = membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms; SP 3 = membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom; S 4 = vitale Spermien mit geschädigtem Akrosom). Schematische Darstellung der vitalen Spermien mit intaktem Akrosom (b), der toten Spermien mit intaktem Akrosom (c), der toten Spermien mit Akrosomenschädigung (d) und der vitalen Spermien mit Akrosomenschädigung (e) nach SYTO[®]17 / FITC-PNA / PI-Färbung.

3.5.5 Induktion der Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor

Die Induktion der Akrosomenreaktion erfolgte nach dem bei CHENG et al. (1996) beschriebenen Verfahren. Hierbei wurde das Sperma nach dem Auftauen mit modifiziertem TALP-Medium (100 ml TALP + 1 mg Heparin) auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Spermien/ml eingestellt. Danach wurden jeweils zu 500 μ l der verdünnten Probe 3,5 μ l Kalziumionophor A23187 (0,717 mM) der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr.: C-7522) zugegeben. Nach einer 3-stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung des akrosomalen Status wie unter Kapitel 3.5.5 beschrieben.

3.5.6 Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™)

Die Probenaufbereitung und Messung erfolgte nach der bei EVENSON und JOST (2000) beschriebenen Methode. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Zu Beginn und nach jeder zehnten Probe wurde eine Referenzprobe gemessen. Für die weitere computergestützte Auswertung der Messdaten wurde die in die Auswertung eingehende Spermienpopulation eingegrenzt (Abb. 3.4). Nach EVENSON et al. (1991) galt für Spermien, dass entweder die grüne oder die rote Fluoreszenzintensität mindestens 200 betragen musste und die grüne Fluoreszenzintensität maximal 800 und die rote Fluoreszenzintensität maximal 1000 betragen durfte.

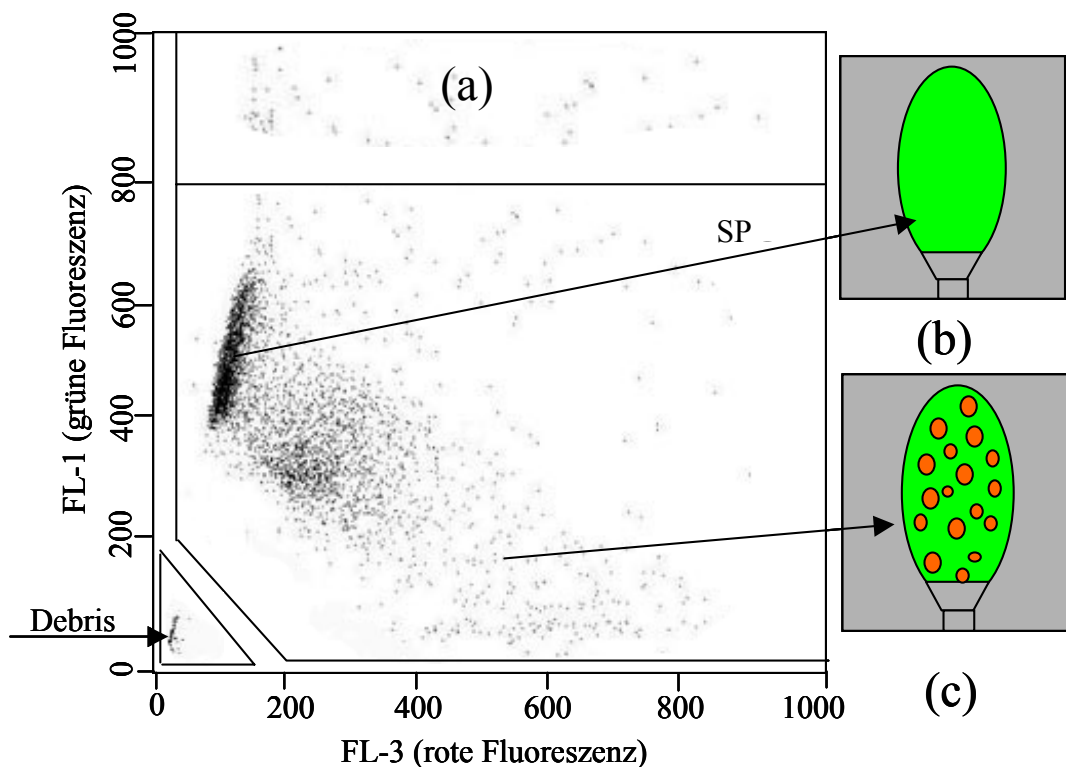


Abb. 3.4: Punktwolkendiagramm (a) bei der durchflusszytometrisch durchgeführten Spermachromatinstrukturanalyse (SP = Spermienpopulation). Schematische Darstellung der Spermien mit grüner Fluoreszenz (b), d.h. doppelsträngiger DNA und Spermien mit erhöhter Rotfluoreszenz (c), d.h. mit vermehrt vorkommender einzelsträngiger DNA nach dem SCSA™.

Durch eine weitere computergestützte Auswertung der Punktwolkendiagramme wurde, wie in Kapitel 2.5.3.3.1 beschrieben, für jedes einzelne Spermium der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) ermittelt, und nach EVENSON und JOST (2000) als

DFI-Wert (DNA Fragmentations Index) bezeichnet. Alle DFI-Werte der analysierten Spermien einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm (siehe Abb. 2.4) dargestellt. Anhand dieses Histogramms wurde der Mittelwert der DFI-Werte und die Standardabweichung (SD), als Maß für die Streuung um den Mittelwert, errechnet. Beide Parameter wurden zur besseren Darstellung mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Den prozentualen Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten an der Gesamtpopulation errechnete das Computerprogramm nach einer zuvor durchgeführten subjektiven Abgrenzung der Spermien mit niedrigen DFI-Werten von solchen mit erhöhten DFI-Werten. Diese Spermien werden nach EVENSON et al. (2002) als DFI-Spermien (%) bezeichnet (Abb. 2.4).

3.6 Weitere Untersuchungen der aufgetauten Samenproben

3.6.1 Vitalität (Plasmamembranintegrität)

Von den Samenproben wurden unmittelbar nach dem Auftauen Bromphenolblau-Nigrosin Ausstriche auf angewärmten Objektträgern angefertigt und mikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung im Hellfeld und unter Ölimmersion beurteilt. Die Einteilung der jeweils 300 ausgezählten Spermien erfolgte in vitale (ungefärbt) und tote Zellen (blau angefärbt).

3.6.2 Bestimmung des Anteils morphologisch abweichender Spermien

Die subjektiv-morphologischen Untersuchungen erfolgten ebenfalls an Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen bei 1000-facher Vergrößerung unter einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leitz). Es wurden jeweils 300 Spermien ausgewertet und sowohl hinsichtlich der Kopf- als auch der Schwanzanomalien beurteilt. Nach dem Schema von LEIDL et al. (1971) wurden die Spermien in normale Formen, primäre (Kopf-, Mittelstück-, Schwanzanomalien, Doppelmissbildungen) und sekundäre Missbildungen (abgelöste Köpfe, abgelöstes Akrosom, Krümmlinge) eingeteilt. Die Anzahl der proximalen und distalen Zytoplasmatröpfchen wurde gleichzeitig ausgezählt.

3.6.3 Computergestützte Motilitätsanalyse

Die computergestützte Bestimmung der Motilität wurde nach dem bei HAKE (2001) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Die aufgetauten Tiefgefrierspermproben wurden mit INRA 82 Zentrifugationsverdünner auf eine Konzentration von $20 \times 10^6/\text{ml}$ verdünnt. Das Motilitätsmesssystem bestand aus einer Aufnahme- und einer Auswertungseinheit, so dass Videoaufnahme und computergestützte Auswertung räumlich und zeitlich getrennt werden konnten. Zur Anwendung kam ein computerassistiertes Samenanalyseprogramm (CMA Motion Analyser, V 2.0, Fa. Strömberg-Mika, 1993-1997 MTM SA, Schweiz; Computer ARTIST P 200 MHz, Monitor Triniton Multiscan 200 sf (Fa. Sony). Für die Videoaufnahmen wurden von 3 Samentropfen à $4 \mu\text{l}$ jeweils 4 unterschiedliche Felder in einer Makler-Kammer (Fa. Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) mit einem Videomikrophieset (Mikroskop Nikon Optiphot, Videokamera CCD Color Camera Modell ICD-700 PDC IPPI GmbH, S-VHS Videorekorder Panasonic AG-7330, Monitor Panasonic WV, Videotitelgenerator TG 4000 Fa. VSP) im negativen Phasenkontrast bei 200-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Für die Aufnahmen wurden S-VHS-Videokassetten (EQ 240, BASF) verwendet.

Für die Auswertung der Motilitätsparameter wurde das in der Dissertation von DOMES (2002) beschriebene Setup gewählt (siehe Anhang). Bei jeweils ca. 500 Spermien pro Probe wurden folgende Motilitätsparameter bestimmt: Prozentsatz lokal motiler Spermien, Prozentsatz linear motiler Spermien, Prozentsatz nicht-linear motiler Spermien, Prozentsatz zirkulär motiler Spermien. Linear motile und nicht-linear motile Spermien wurden zu vorwärtsbeweglichen Spermien zusammengefasst.

3.7 Bestimmung der Fertilität der Hengste

Für die Berechnung der individuellen saisonalen Trächtigkeitsraten wurde die Anzahl der Stuten, die am Tag 14 nach der Besamung trächtig waren, zur Gesamtzahl der dem Hengst zugeführten Stuten ins Verhältnis gesetzt.

Um eine statistisch gesicherte Aussage über die Fertilität der Hengste treffen zu können, wurden in dieser Studie nur Hengste miteinbezogen, welche mindestens 50 Stuten belegt

hatten. Da teilweise die Bedeckungszahlen pro Saison sehr niedrig waren, wurden bei 49 Hengsten die Mittelwerte der saisonalen Trächtigkeitsergebnisse aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 gebildet. Einer der 50 Hengst erfüllte die geforderte Stutenanzahl in diesem Zeitraum nicht.

3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary/North Carolina, USA, 1998) und SPSS 11.0.1 (SPSS GmbH Software München) herangezogen. Neben der deskriptiven Statistik kamen die Varianzanalyse (GLM Type III SS: allgemeines lineares Modell Typ III Summenquadrate), mit Post-Hoc-Test (Bonferroni-Test), der gepaarte und ungepaarte t-Test, die Varianzkomponentenschätzung (Methode: Minimum norm quadratic unbiased estimator; MINQUE) und das lineare Regressionsmodell zur Anwendung. Weiterhin wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson und der Intra-Class-Korrelationskoeffizient (ICC) errechnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Konventionelle Samenqualitätsparameter

Der prozentuale Anteil vitaler Spermien, der durch lichtmikroskopische Auszählung der Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche bestimmt wurde, betrug durchschnittlich $23,9 \pm 6,6 \%$ (Tab. 4.1). Wie die Minimal- und Maximalwerte zeigten, waren die individuell bedingten Unterschiede beträchtlich.

Tab. 4.1: Prozentualer Anteil vitaler Spermien (ungefärbte Spermien) nach lichtmikroskopischer Auszählung von 300 Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Mittelwert, Standardabweichung, Maximal- und Minimalwerte (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

Parameter	$x \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Vitale Spermien	$23,9 \pm 6,6$	5,0	38,5

Der durch computergestützte Motilitätsanalyse bestimmte prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug im Mittel $15,7 \pm 12,4$. Auch hier zeigten Minimal- und Maximalwerte große, individuell bedingte Unterschiede (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Prozentualer Anteil der verschiedenen Bewegungsarten nach dem Auftauen: Mittelwert, Standardabweichung, Maximal- und Minimalwerte (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

Parameter	$x \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Lokal motile Spermien	$4,5 \pm 3,3$	0,0	24,7
Vorwärtsbewegliche Spermien	$15,7 \pm 12,4$	0,0	58,5
Zirkulär motile Spermien	$3,1 \pm 1,0$	0,0	6,7

Der prozentuale Anteil an Spermien mit primären Anomalien schwankte zwischen 0 und 16,5 %. Durchschnittlich betrug er $5,3 \pm 3,1$ %. Die Kopfanomalien waren die weitaus größte Gruppe innerhalb der primären Anomalien. Der prozentuale Anteil dieser Anomalieform an der Gesamtpopulation betrug durchschnittlich $4,0 \pm 2,7$ %. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien, wozu abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge zählten, lag mit einem Durchschnittswert von $6,9 \pm 5,5$ % etwas höher als der Prozentsatz der Spermien mit primären Anomalien. Der Prozentsatz der Spermien mit Zytoplasmatröpfchen betrug durchschnittlich $1,6 \pm 2,3$ %.

Tab. 4.3: Prozentualer Anteil von Spermienanomalien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Mittelwert, Standardabweichung, Maximal- und Minimalwerte (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

Parameter	$\bar{x} \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Kopfanomalien	$4,0 \pm 2,7$	0,0	13,0
Mittelstückanomalien	$0,06 \pm 0,2$	0,0	1,5
Schwanzanomalien	$1,2 \pm 1,1$	0,0	8,0
Doppelmissbildungen	$0,2 \pm 0,5$	0,0	3,5
Primäre Anomalien gesamt	$5,3 \pm 3,1$	0,0	16,5
Sekundäre Anomalien gesamt ¹	$6,9 \pm 5,5$	0,0	35,5
Spermien mit Zytoplasmatröpfchen	$1,6 \pm 2,3$	0,0	14,0

¹: abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge.

4.2 Reproduzierbarkeit der angewandten durchflusszytometrischen Messungen

Um die Reproduzierbarkeit der angewandten durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials, der Unversehrtheit des Akrosoms und der Integrität der Chromatinstruktur der Spermien zu überprüfen, wurde von 11 verschiedenen Hengsten an 3 unterschiedlichen Tagen je 1 Paillette desselben Ejakulates aufgetaut, unmittelbar danach gefärbt und analysiert.

Bei allen durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern bestanden zwischen den Messergebnissen der 3 Wiederholungsmessungen sehr hohe Korrelationen ($r \geq 0,86$; $p < 0,0001$). Die Intra-Class-Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,88 und 0,98 (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Korrelationskoeffizienten (r) und Intra-Class-Korrelationskoeffizienten (Intra-CC) zwischen 3 Wiederholungsmessungen der durchflusszytometrischen Messparameter (11 Hengste, je 1 Ejakulat).

Parameter	Korrelationskoeffizienten (r)	Intra-CC
Vitale Spermien (%)	$0,90 \leq r \leq 0,92$	0,88
Spermien mit hohem MMP (%)	$0,92 \leq r \leq 0,94$	0,93
Vitale Spermien ohne AF (%)	$0,88 \leq r \leq 0,93$	0,91
Vitale Spermien mit AF (%)	$0,86 \leq r \leq 0,97$	0,90
Tote Spermien mit AF (%)	$0,93 \leq r \leq 0,99$	0,96
Tote Spermien ohne AF (%)	$0,91 \leq r \leq 0,95$	0,94
DFI-Spermien (%)	$0,96 \leq r \leq 0,99$	0,96
DFI-Mittelwert	$0,98 \leq r \leq 0,99$	0,98
SD_{DFI}	$0,98 \leq r \leq 0,98$	0,97

alle Korrelationen $p < 0,0001$; MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

Bei keinem der erfassten Parameter gab es signifikante Unterschiede zwischen den drei Wiederholungsmessungen (gepaarter t-Test; $p \geq 0,05$).

4.3 Ejakulat- und individuell bedingte Schwankungen der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter

Um ejakulatbedingte Unterschiede bezüglich der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter zu überprüfen, wurden je 4 konsekutiv gewonnene Ejakulate von 18 Hengsten mit den verschiedenen durchflusszytometrischen Tests untersucht. Der Einfluss der Zufallsfaktoren Ejakulat und Hengst auf die Gesamtvariabilität der Messergebnisse wurde mit Hilfe der Varianzkomponentenschätzung bestimmt.

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Plasmamembranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials und der Integrität des Akrosoms zeigte sich, dass ejakulatbedingte Unterschiede erheblich mitverantwortlich waren für die Variationen der Messergebnisse. Der Schätzwert für den Einflussfaktor Ejakulat betrug bei den verschiedenen ermittelten Spermaqualitätsparametern zwischen 43 % und 75 % (Tab. 4.5).

Bei der Bestimmung der Integrität der Spermachromatinstruktur mit Hilfe des SCSA™-Tests, waren hauptsächlich die individuellen Unterschiede verantwortlich für die Variationen der 3 SCSA™-Parameter (Tab. 4.5). Der Schätzwert für den Einflussfaktor Ejakulat war bei diesen 3 Parametern mit 9 % bis 12 % deutlich geringer.

Tab. 4.5: Varianzkomponentenschätzung; Schätzwerte (%) für den Einfluss der Zufallsfaktoren Hengst und Ejakulat auf die Variabilität der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter (18 Hengste, je 4 Ejakulate).

	V a r i a n z k o m p o n e n t e		
	Schätzwerte in %		
	Hengst	Ejakulat ¹	Gesamt (n = 72)
Vitale Spermien (%)	55	45	100
Spermien mit hohem MMP (%)	52	48	100
Vitale Spermien ohne AF (%)	43	57	100
Tote Spermien ohne AF (%)	57	43	100
Tote Spermien mit AF (%)	53	47	100
Vitale Spermien mit AF (%)	25	75	100
DFI-Spermien (%)	88	12	100
DFI-Mittelwert	90	10	100
SD _{DFI}	91	9	100

¹: geschachtelt innerhalb der Hengste; MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

4.4 Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben

Es wurde von 50 Hengsten je ein Ejakulat vom Dezember, März und Juli aufgetaut, unmittelbar danach und nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C gefärbt und analysiert. Der prozentuale Anteil vitaler Spermien, der mit Hilfe der SYBR 14[®]/PI – Färbung bestimmt wurde, lag im Durchschnitt bei $16,6 \pm 10,2$ %. Nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C sank dieser Anteil an Spermien im Durchschnitt auf $6,1 \pm 4,5$ % ab. Sowohl der prozentuale Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential und der prozentuale Anteil an vitalen Spermien mit intaktem Akrosom war ähnlich hoch wie der prozentuale Anteil an vitalen Spermien (Tab. 4.6).

Wie die Minimal- und Maximalwerte zeigten, war der prozentuale Anteil an vitalen Spermien mit geschädigtem Akrosom sowohl direkt nach dem Auftauen der Samenproben als auch nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C sehr gering. Der maximale Wert direkt nach dem Auftauen lag bei 1,8 % und nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C betrug er 2,8 %. Die Minimalwerte lagen unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt bei 0 % (Tab. 4.6).

Der prozentuale Anteil an toten Spermien mit geschädigtem Akrosom betrug im Durchschnitt $37,7 \pm 12,6$ %. Dieser Anteil erhöhte sich nur geringfügig nach dreistündiger Inkubation der Samenproben auf durchschnittlich $39,5 \pm 13,9$ % (Tab. 4.6).

Nach der Induktion der Akrosomenreaktion mit Hilfe von Kalziumionophor zeigte sich bei allen Parametern die bei der Bestimmung der Integrität des Akrosoms erhoben wurden nur geringfügige Änderungen verglichen mit den Messergebnissen nach dreistündiger Inkubation ohne Kalziumionophor. Nur der prozentuale Anteil vitaler Spermien mit intaktem Akrosom war mit einem Mittelwert von $4,8 \pm 4,0$ % etwas niedriger verglichen mit den Werten bei Inkubation der Proben ohne Kalziumionophor. Der prozentuale Anteil vitaler Spermien mit geschädigtem Akrosom betrug nach Zugabe von Kalziumionophor im Durchschnitt $1,7 \pm 1,6$ %.

Alle drei Parameter des SCSA™-Tests zeigten nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C deutlich höhere Messwerte verglichen mit den Messungen direkt nach dem Auftauen der Samenproben (Tab. 4.6).

Im Durchschnitt lag der prozentuale Anteil an Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen (DFI-Spermien) direkt nach dem Auftauen bei $20,4 \pm 12,7$ %. Nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C erhöhte sich dieser Anteil an Spermien auf durchschnittlich $41,7 \pm 20,7$ %.

Der DFI-Mittelwert betrug bei Messung direkt nach dem Auftauen der Samenproben durchschnittlich 215 ± 28 und lag nach der Inkubation der Samenproben bei 37 °C ebenfalls deutlich über dem Wert direkt nach dem Auftauen der Samenproben (Tab. 4.6).

Die Standardabweichung der DFI-Verteilung (SD_{DFI}) betrug im Durchschnitt 82 ± 20 direkt nach dem Auftauen der Samenproben und lag mit einem durchschnittlichen Wert von 92 ± 20 auch deutlich über dem Ausgangswert.

Tab. 4.6: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Beurteilung der Plasmamembranintegrität, des MMP, des akrosomalen Status und der Spermachromatinstruktur zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten; Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

Parameter	Untersuchungszeitpunkt	$x \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Vitale Spermien (%)	0h	16,6 ± 10,2	0,0	46,9
	3h	6,1 ± 4,5	0,0	26,3
MMP hohe Spermien (%)	0h	16,4 ± 9,9	0,4	47,5
	3h	6,1 ± 4,3	0,1	26,6
Vitale Spermien ohne AF (%)	0h	15,5 ± 9,7	0,5	44,4
	3h	6,6 ± 4,5	0,0	27,3
	Induktion AR	4,8 ± 4,0	0,0	25,8
Vitale Spermien mit AF (%)	0h	0,4 ± 0,3	0,0	1,8
	3h	0,6 ± 0,5	0,0	2,8
	Induktion AR	1,7 ± 1,6	0,0	10,3
Tote Spermien mit AF (%)	0h	37,7 ± 12,6	15,2	72,0
	3h	39,5 ± 13,9	2,9	67,6
	Induktion AR	39,2 ± 13,8	4,1	68,1
Tote Spermien ohne AF (%)	0h	45,0 ± 9,4	23,4	72,3
	3h	52,4 ± 13,2	27,7	95,3
	Induktion AR	53,4 ± 13,0	28,9	93,2
DFI-Spermien (%)	0h	20,4 ± 12,7	3,7	76,6
	3h	41,7 ± 20,7	7,9	100,0
DFI-Mittelwert	0h	215 ± 28	144	357
	3h	253 ± 40	198	434
SD _{DFI}	0h	82 ± 20	48	150
	3h	92 ± 20	61	160

Untersuchungszeitpunkt: 0h = direkt nach dem Auftauen der Samenproben; 3h = drei Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Samenproben; Induktion AR = nach Induktion der Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor. MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

4.5 Zusammenhang zwischen den konventionellen Spermaqualitätsparametern und den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Es wurde überprüft, inwieweit Zusammenhänge zwischen den verschiedenen durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern und der lichtmikroskopischen Bestimmung der Vitalität der Spermien bestanden. Weiterhin wurde auf eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der computergestützten Motilitätsanalyse und dem durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteilen der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (MMP) geachtet. Als letztes wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Resultaten der Spermachromatinstrukturanalyse und der subjektiven Beurteilung der Spermienmorphologie bestand.

4.5.1 Korrelationen zwischen der lichtmikroskopisch beurteilten Vitalität der Spermien und den durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern

Bei den 150 untersuchten Ejakulaten wiesen fast alle durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter einen signifikanten Zusammenhang zum lichtmikroskopisch bestimmten prozentualen Anteil vitaler Spermien auf (Tab. 4.7).

Der prozentuale Anteil vitaler Spermien nach SYBR 14[®]/PI-Färbung, Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (MMP) und vitaler Spermien mit intaktem Akrosom korrelierte positiv mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Bestimmung der Vitalität der Spermien ($0,60 \geq r \geq 0,58$; $p < 0,0001$). Dagegen korrelierte der prozentuale Anteil toter Spermien mit geschädigtem Akrosom negativ mit der lichtmikroskopischen Bestimmung der Vitalität der Spermien ($r = -0,43$; $p < 0,01$).

Auch der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten (DFI-Spermien) und der DFI-Mittelwert der Ejakulate korrelierte negativ ($r = -0,50$ bzw. $r = -0,49$; $p < 0,01$) mit dem Prozentsatz vitaler Spermien, der durch Auszählung der Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen ermittelt wurde. Die Standardabweichung vom DFI-Mittelwert zeigte nur einen schwachen negativen Zusammenhang zu den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Bestimmung der Spermienvitalität ($r = -0,34$; $p < 0,05$).

Tab. 4.7: Korrelationen (r) zwischen den Ergebnissen der verschiedenen durchflusszytometrischen Untersuchungen und des prozentualen Anteils an vitalen Spermien bestimmt durch lichtmikroskopische Auszählung von Bromphenolblau-Nigrosin-Austriche (50 Hengste, je 3 Ejakulate)

Parameter	Vitale Spermien
Vitale Spermien (%)	0,58***
Spermien mit hohem MMP(%)	0,58***
Vitale Spermien ohne AF (%)	0,60***
Vitale Spermien mit AF (%)	0,32
Tote Spermien ohne AF (%)	- 0,11
Tote Spermien mit AF (%)	- 0,43**
DFI-Spermien (%)	- 0,50**
DFI-Mittelwert	- 0,49**
SD _{DFI}	- 0,37*

*: Korrelation $p < 0,05$; **: Korrelation $p < 0,01$; ***: Korrelation $p < 0,0001$
MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

4.5.2 Korrelation zwischen JC-1 Färbung und computergestützter Motilitätsanalyse

Nur der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien korrelierte signifikant ($r = 0,50$; $p < 0,01$) mit dem durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Korrelationen (r) zwischen dem durchflusszytometrisch ermittelten Anteil (%) an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential und den Ergebnissen der computergestützten Motilitätsanalyse (50 Hengste, je 3 Ejakulate)

Parameter (%)	MMP hohe Spermien (%)
Lokal motile Spermien	0,13
Zirkulär motile Spermien	- 0,10
Vorwärtsbewegliche Spermien	0,50**

** : Korrelation $p < 0,01$; ***: Korrelation $p < 0,0001$

4.5.3 Korrelationen zwischen SCSA™-Test und lichtmikroskopischer Beurteilung der Spermienmorphologie

Insgesamt gesehen zeigten sich nur sehr schwache Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der subjektiven Beurteilung der Spermienmorphologie und dem prozentualen Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten (Tab. 4.9).

Der prozentuale Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten korrelierte mit dem Prozentsatz an Spermien sowohl mit primären Anomalien als auch mit sekundären Anomalien in gleicher Weise ($r = 0,24$; $p < 0,01$). Innerhalb der Gruppe der primären Anomalien korrelierte nur der prozentuale Anteil an Spermien mit Kopfanomalien mit dem prozentualen Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten ($r = 0,24$; $p < 0,01$). Zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten und dem Prozentsatz an Spermien mit Zytoplasmatröpfchen bestand kein Zusammenhang ($r = - 0,12$; $p \geq 0,05$).

Tab. 4.9: Korrelationskoeffizienten (r) zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten nach Durchführung des SCSA-Tests und den prozentualen Anteilen an Spermienanomalien (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

Parameter	DFI-Spermien (%)
Kopfanomalien	0,24**
Mittelstückanomalien	0,06
Schwanzanomalien	0,05
Doppelmissbildungen	0,06
Primäre Anomalien gesamt	0,24**
Sekundäre Anomalien gesamt ¹	0,24**
Spermien mit Zytoplasmatröpfchen	- 0,12

** : Korrelation $p < 0,01$; ¹: abgelöste Köpfe, abgelöstes Akrosom und Krümmlinge.

4.6 Zusammenhänge zwischen den durchflusszytometrischen Tests

Zwischen den Spermaparametern vitale Spermien, Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (MMP) und vitale Spermien mit intaktem Akrosom bestanden sehr gute Zusammenhänge ($r \geq 0,96$; $p < 0,0001$) bei den Untersuchungen direkt nach dem Auftauen der Samenproben (Tab. 4.10). Ebenso korrelierten die 3 unterschiedlichen Parameter des SCSA™-Tests sehr gut untereinander ($r \geq 0,82$; $p < 0,0001$). Zwischen den 3 Parametern des SCSA™-Tests und den Parametern vitale Spermien, Spermien mit hohem MMP und den 4 Parametern der SYTO 17®/PI/ FITC-PNA Färbung bestanden keine ($p \geq 0,05$) oder nur schwache inverse Zusammenhänge ($r \leq -0,37$; $p < 0,0001$).

Nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C korrelierten die Parameter vitale Spermien, Spermien mit hohem MMP und vitale Spermien mit intaktem Akrosom untereinander sehr hoch ($r \geq 0,95$; $p < 0,0001$) (Tab. 4.11). Bei den Ergebnissen des SCSA™-Tests nach dreistündiger Inkubation der aufgetauten Samenproben bei 37 °C zeigte sich zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit erhöhten DFI-Werten und dem DFI-Mittelwert eine hohe Korrelation ($r = 0,80$; $p < 0,0001$). Dagegen waren die Zusammenhänge zwischen dem Parameter SD_{DFI} und den anderen beiden SCSA™-Parametern schwächer ($r = 0,50$ bzw; $r = 0,65$; $p < 0,0001$).

Tab. 4.10: Korrelationskoeffizienten (r) zwischen den Ergebnissen der verschiedenen durchflusszytometrischen Untersuchungen direkt nach dem Auftauen der Samenproben (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

	Spermien mit hohem MMP	Vitale Spermien ohne AF	Vitale Spermien mit AF	Tote Spermien mit AF	Tote Spermien ohne AF	DFI Spermien	DFI Mittelwert	SD _{DFI}
Vitale Spermien	0,99***	0,96***	0,42***	- 0,60***	- 0,20	- 0,35***	- 0,24**	- 0,10
Spermien mit hohem MMP		0,98***	0,44***	- 0,61***	- 0,21**	- 0,37***	- 0,24**	- 0,10
Vitale Spermien ohne AF			0,48***	- 0,67***	- 0,16	- 0,36***	- 0,25**	- 0,09
Vitale Spermien mit AF				- 0,32***	- 0,13	- 0,07	0,05	0,17
Tote Spermien mit AF					- 0,61***	0,26**	0,13	0,04
Tote Spermien ohne AF						- 0,01	0,02	-0,03
DFI Spermien							0,88***	0,85***
DFI-Mittelwert								0,82***

** : Korrelation $p < 0,01$; *** : Korrelation $p < 0,0001$; MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom

Tab. 4.11: Korrelationskoeffizienten (r) zwischen den Ergebnissen der verschiedenen durchflusszytometrischen Untersuchungen nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C (50 Hengste, je 3 Ejakulate).

	Spermien mit hohem MMP	Vitale Spermien ohne AF	Vitale Spermien mit AF	Tote Spermien mit AF	Tote Spermien ohne AF	DFI Spermien	DFI Mittelwert	SD _{DFI}
Vitale Spermien	0,97***	0,97***	0,42***	- 0,30**	- 0,03	- 0,53***	- 0,38***	- 0,02
Spermien mit hohem MMP		0,95***	0,44***	- 0,32***	0,00	- 0,50***	- 0,36***	- 0,01
Vitale Spermien ohne AF			0,45***	- 0,31***	-0,03	- 0,52***	- 0,36***	0,05
Vitale Spermien mit AF				- 0,05	-0,15	- 0,26**	- 0,16	0,14
Tote Spermien mit AF					- 0,94***	- 0,02	- 0,06	0,06
Tote Spermien ohne AF						0,19	0,18	- 0,10
DFI Spermien							0,80***	0,50**
DFI-Mittelwert								0,65***

** : Korrelation $p < 0,01$; *** : Korrelation $p < 0,0001$; MMP: Mitochondrienmembranpotential; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom

Bedingt durch die große Anzahl der Parameter erschien es sinnvoll, sich bei den weiteren Darstellungen auf einige der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaparameter zu beschränken. Da sich die Parameter Vitale Spermien, Spermien mit hohem MMP und Vitale Spermien mit intaktem Akrosom sowohl bei den Messungen direkt nach dem Auftauen, als auch nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C sehr ähnlich verhielten ($r \geq 0,95$) und die Dreifachfärbung mit SYTO 17[®], PI und FITC-PNA neben dem prozentualen Anteil vitaler Spermien noch zusätzliche Informationen liefert, werden in den weiteren Darstellungen nur die verschiedenen Parameter der SYTO 17[®]/FITC-PNA/PI-Färbung wiedergegeben. Da der prozentuale Anteil vitaler Spermien mit geschädigtem Akrosom verschwindend gering war, wurden vitale und membrangeschädigte Spermien mit Akrosomenschäden zusammengefasst. Zur Darstellung der Integrität der Spermachromatinstruktur werden im folgenden nur die beiden Parameter DFI-Mittelwert und SD_{DFI} wiedergegeben, da hier die Beurteilung objektiver ist verglichen mit dem subjektiv ermittelten Prozentsatz an Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen (DFI-Spermien in %).

4.7 Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgehenden Deckruhe

Bezüglich des prozentualen Anteils an vitalen Spermien, Spermien mit Akrosomenschädigung und toten Spermien ohne Akrosomenschädigung ergab sich kein signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test; $p > 0,05$) zwischen den beiden Hengstgruppen mit unterschiedlicher sexueller Aktivität vor der Ejakulatgewinnung (Abb. 4.1).

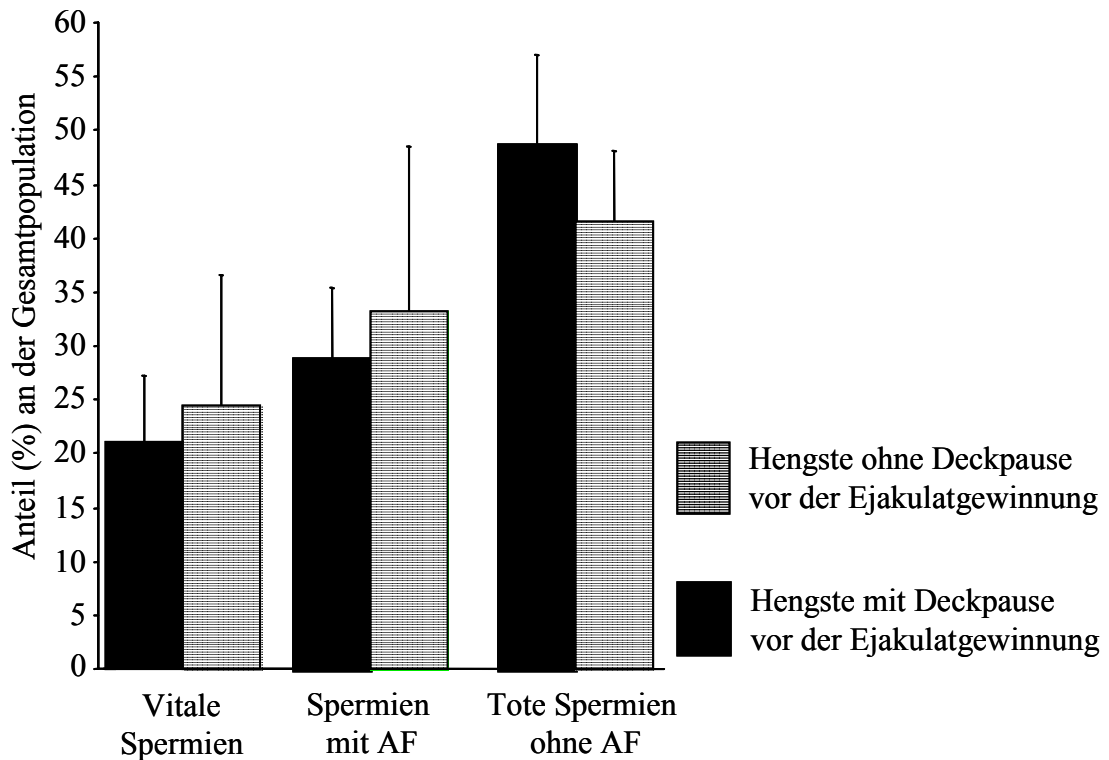


Abb.4.1: Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgehenden unterschiedlichen sexuellen Aktivität auf die durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter nach SYTO 17/PI/FITC-PNA-Färbung: Mittelwert und Standardabweichung (38 Hengste, je 1 Ejakulat) AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

Auch bei den Ergebnissen des SCSA-Tests zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Integrität der Chromatinstruktur zwischen den beiden Tiergruppen mit unterschiedlicher sexueller Aktivität vor der Probenentnahme (Abb. 4.2).

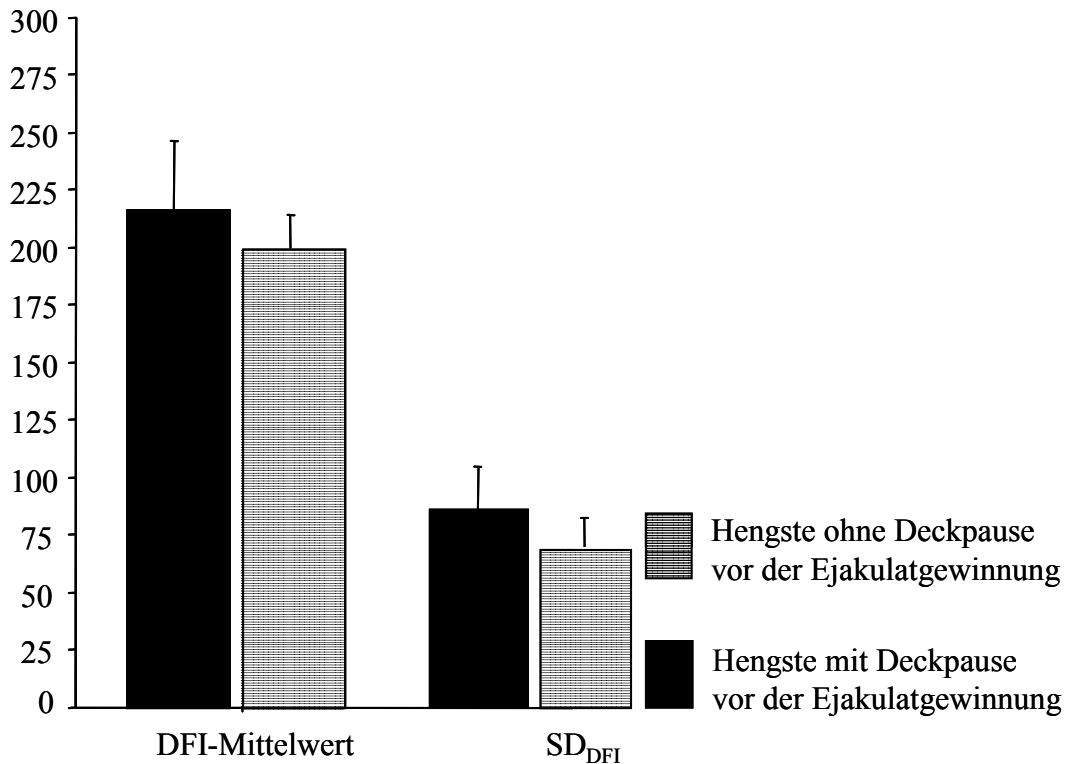


Abb.4.2: Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgehenden unterschiedlichen sexuellen Aktivität auf die durchflusszytometrisch ermittelte Integrität der Spermachromatinstruktur: Mittelwert und Standardabweichung (38 Hengste, je 1 Ejakulat)

Auf Grund dieser Ergebnisse blieb bei den weiteren Untersuchungen die sexuelle Aktivität der Hengste vor der Ejakulatgewinnung unberücksichtigt.

4.8 Einfluss der Jahreszeit

Zur Darstellung jahreszeitlicher Unterschiede der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter wurden von 50 Hengsten je 3 Ejakulate aus den Monaten Dezember 2000, März 2001 und Juli 2001 durchflusszytometrisch untersucht. Tabelle 4.12 zeigt die Ergebnisse.

Tab.4.12: Einfluss des Monats, der Ejakulatgewinnung auf die durchflusszytometrisch ermittelten Spermaparameter: Mittelwert und Standardabweichung, alle Parameter in (%) außer DFI-Mittelwert und SD_{DFI} (50 Hengste, je 1 Ejakulat pro Monat)

Parameter	Untersuchungszeitpunkt	Dezember	März	Juli
Vitale Spermien	0h	22,0 ± 10,0 ^a	9,4 ± 7,1 ^b	16,3 ± 9,5 ^c
	3h	9,8 ± 4,9 ^a	4,0 ± 3,2 ^b	7,5 ± 4,1 ^c
	Induktion AR	9,6 ± 5,3 ^a	3,4 ± 3,1 ^b	6,2 ± 4,5 ^c
Spermien mit AF	0h	31,4 ± 10,5 ^a	43,2 ± 12,9 ^b	39,8 ± 11,2 ^b
	3h	32,3 ± 9,2 ^a	39,0 ± 16,3 ^b	48,7 ± 9,5 ^c
	Induktion AR	32,4 ± 8,2 ^a	40,1 ± 16,4 ^b	49,9 ± 8,9 ^c
Tote Spermien ohne AF	0h	45,3 ± 7,9 ^a	46,6 ± 11,1 ^a	43,1 ± 8,8 ^a
	3h	57,2 ± 8,3 ^a	56,1 ± 16,8 ^a	43,8 ± 8,1 ^b
	Induktion AR	58,3 ± 7,8 ^a	56,6 ± 16,8 ^a	45,3 ± 8,0 ^b
DFI-Mittelwert	0h	215 ± 27 ^a	213 ± 24 ^a	217 ± 34 ^a
	3h	241 ± 32 ^a	268 ± 45 ^b	250 ± 36 ^{ab}
SD_{DFI}	0h	82 ± 20 ^{ab}	75 ± 17 ^a	87 ± 21 ^b
	3h	93 ± 20 ^a	88 ± 19 ^a	94 ± 19 ^a

a, b, c: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (Bonferroni-Test; $p < 0,01$); Untersuchungszeitpunkt: 0h = direkt nach dem Auftauen der Samenproben; 3h = drei Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Samenproben; Induktion AR = nach Induktion der Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor. AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

Hinsichtlich der Plasmamembranintegrität der Spermien ergaben sich signifikante (Bonferroni-Test; $p < 0,01$) Unterschiede zwischen den 3 Monaten, in denen die Ejakulate gewonnen wurden. Der prozentuale Anteil vitaler Spermien betrug im Dezember durchschnittlich 22,0 %. Im Frühjahr sanken die Werte deutlich ab und betragen im Mittel nur noch 9,4 %. Im Sommer stieg der durchschnittliche Wert der vitalen Spermien wieder auf 16,3 % an. Der prozentuale Anteil an Spermien mit Akrosomenschädigung lag mit einem Mittelwert von 31,4 % signifikant (Bonferroni-Test; $p < 0,01$) unterhalb der Mittelwerte vom März und Juli (43,2 % bzw. 39,8 %). Hinsichtlich des prozentualen Anteils an membran-geschädigten Spermien ohne Akrosomenschädigung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Bonferroni-Test; $p > 0,05$) zwischen den Ejakulaten vom Dezember (45,3 %), März (46,6 %) und Juli (43,1 %). Die Spermachromatinstruktur, gemessen am DFI-Mittelwert direkt nach dem Auftauen der Samenproben, ließ keinen jahreszeitlich bedingten Einfluss der Ejakulatgewinnung erkennen (Bonferroni-Test; $p > 0,05$). Nach dreistündiger Inkubation dagegen lagen die Samenproben, die im Dezember gewonnen wurden, mit einem Durchschnittswert von 241 signifikant (Bonferroni-Test; $p < 0,01$) unterhalb dem Mittelwert von 268 im März. Der SCSATM-Parameter SD_{DFI} lag mit einem Durchschnittswert von 75 direkt nach dem Auftauen der Samenproben im Frühjahr signifikant niedriger (Bonferroni-Test; $p < 0,01$) verglichen mit den Proben vom Sommer, wo er 87 betrug. Nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Bonferroni-Test; $p > 0,05$) zwischen den 3 Jahreszeiten.

4.9 Einfluss des Alters der Hengste

Um eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen dem Alter der Tiere und den Resultaten der durchflusszytometrischen Beurteilung der Plasmamembranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials, der Unversehrtheit des Akrosoms und der Integrität der Chromatinstruktur der Spermien aufzuzeigen, wurden von 50 Hengsten je 3 Ejakulate aus den Monaten Dezember, März und Juli durchflusszytometrisch analysiert und mit dem Alter korreliert. Um den Einfluss ejakulatabhängiger Schwankungen zu minimieren, wurden für diese Berechnung die Mittelwerte der 3 Ejakulate verwendet. Nur der DFI-Mittelwert, der ein relatives Maß für den Gehalt an einzelsträngiger DNA in der Gesamtpopulation beim SCSATM-Test ist, korrelierte positiv mit dem Alter der Tiere (Tab. 4.13).

Tab. 4.13: Korrelationen (r) zwischen dem Alter der Tiere und den gemittelten Ergebnissen der durchflusszytometrischen Assays von 3 Ejakulaten (50 Hengste je 3 Ejakulate)

	Vitale Spermien	Spermien mit AF	DFI-Mittelwert	SD _{DFI}
Alter der Tiere	0,09	0,11	0,43 **	0,23

** : Korrelation $p < 0,01$; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

4.10 Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern und der Fertilität

Für diese Untersuchungen standen nur die Fertilitätsdaten der 50 Hengste aus der Frischsamenübertragung zur Verfügung. Um statistisch gesicherte Aussagen zu erhalten, wurden mindestens 50 dem Hengst zugeführte Stuten gefordert. Aus diesem Grunde war es notwendig, die Mittelwerte der saisonalen Trächtigkeitsraten, die die 50 Hengste in den Jahren 1999, 2000 und 2001 erzielt hatten, zu verwenden. Von den 50 Hengsten erfüllte nur einer diese Anforderung nicht. Daher wurden nur die Ergebnisse von 49 Hengsten für die weiteren Untersuchungen herangezogen. Für die Analyse wurden die Mittelwerte der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter der 3 Ejakulate vom Dezember 2000, März und Juli 2001 verwendet.

Nur die Ergebnisse des SCSATM-Tests zeigten Zusammenhänge zu den von den Hengsten erzielten Trächtigkeitsraten (Tab. 4.14). Der SCSATM-Parameter DFI-Mittelwert korrelierte mit den Trächtigkeitsergebnissen etwas deutlicher als der Parameter SD_{DFI}. Die Messergebnisse des SCSATM-Tests direkt nach dem Auftauen der Samenproben korrelierten schwächer ($r = -0,51$ bzw. $r = -0,45$; $p < 0,01$) mit den Trächtigkeitsraten, die die Hengste erzielten, verglichen mit den Ergebnissen nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C ($r = -0,59$ bzw. $r = -0,52$; $p < 0,0001$).

Tab. 4.14: Korrelationen (r) zwischen den gemittelten Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen von 3 Ejakulaten und dem Mittelwert der Trächtigkeitsrate von 3 Jahren (49 Hengste je 3 Ejakulate)

Parameter (Mittelwert von 3 Ejakulaten)	Untersuchungszeitpunkt	Trächtigkeitsrate (Mittelwert von 3 Jahren)
Vitale Spermien	0h	0,24
	3h	0,06
	Induktion AR	- 0,01
Spermien mit AF	0h	0,16
	3h	0,01
	Induktion AR	0,06
Tote Spermien ohne AF	0h	- 0,24
	3h	0,01
	Induktion AR	- 0,01
DFI-Mittelwert	0h	- 0,51**
	3h	- 0,59***
SD _{DFI}	0h	- 0,45**
	3h	- 0,52***

** : Korrelation $p < 0,01$ ***: Korrelation $p < 0,0001$; AF: Akrosomenanfärbung mit FITC-PNA, d.h. geschädigtes Akrosom.

Die Verteilung der DFI-Mittelwerte, sowohl direkt nach dem Auftauen der Samenproben als auch nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C, in Abhängigkeit zu den Trächtigkeitsergebnissen der Hengste in % sind in Abb. 4.3 bzw. 4.4 dargestellt.

Bei den 4 Hengsten mit den schlechtesten Fertilitätsergebnissen (Trächtigkeitsrate < 60%) erbrachte der SCSA-Test direkt nach dem Auftauen der Samenproben DFI-Mittelwerte von über 240 (Abb. 4.3). Bei einem Hengst, der eine durchschnittliche Trächtigkeitsrate von 80 % erzielte, lag der gemittelte DFI-Mittelwert bei 248. Die restlichen Hengste mit DFI-Mittelwerten unter 240 erzielten gemittelte Trächtigkeitsraten zwischen 67 und 87 %. Auch bei den Hengsten, deren Ejakulate sehr niedrige DFI-Mittelwerte aufzeigten, d.h. eine relativ gute Integrität der Spermachromatinstruktur aufwiesen, gab es Tiere die relativ schlechte Trächtigkeitsraten erzielten (Trächtigkeitrate < 70 %).

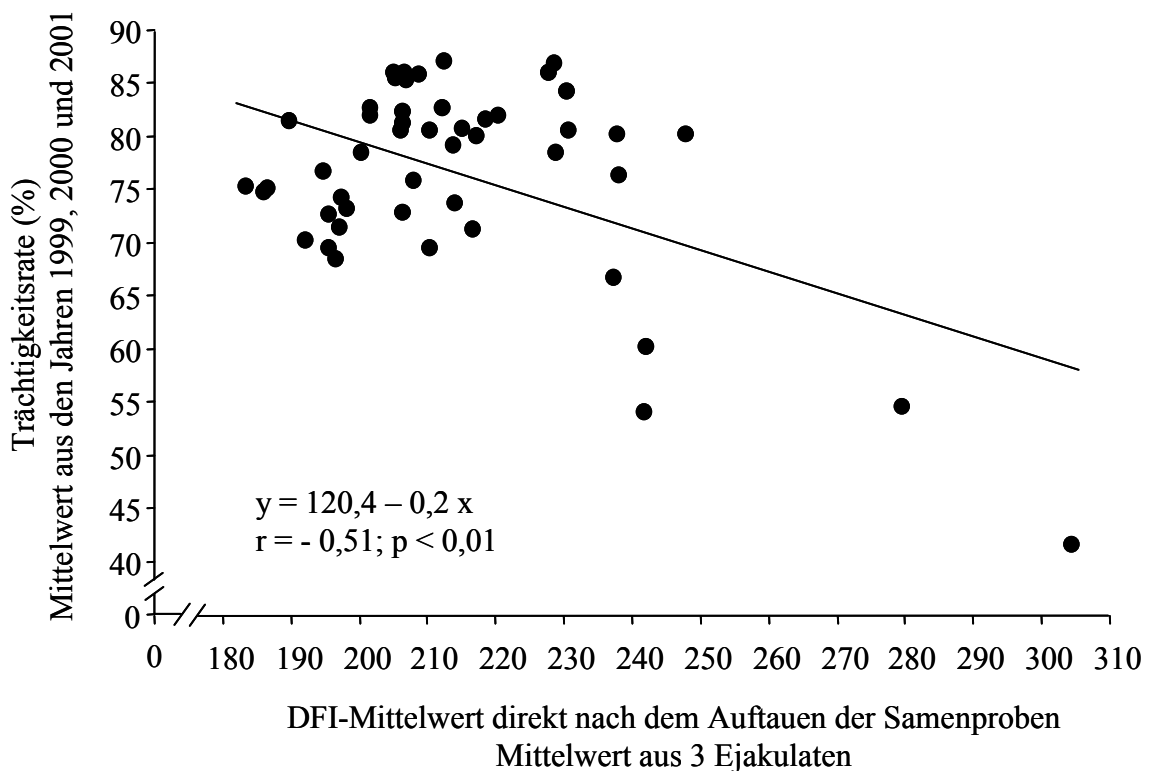


Abb. 4.3: Darstellung der DFI- Mittelwerte (Mittelwert aus 3 Ejakulaten) direkt nach dem Auftauen der Proben in Abhängigkeit zur Fertilität der Hengste mit entsprechender Regressionsgerade (Trächtigkeitsergebnisse in % von 49 Hengsten; Mittelwert von 3 Jahren)

Bei den Ergebnissen des SCSA-Tests nach dreistündiger Inkubation der Samenproben zeigten die 4 Hengste mit den schlechtesten Fertilitätsraten DFI-Mittelwerte von über 281 (Abb. 4.4). Bei den restlichen Hengsten, die alle gemittelte saisonale Trächtigkeitsraten von über 60 % erzielten, lag der durchschnittliche DFI-Mittelwert unter 281. Jedoch gab es auch hier Hengste, die relativ schlechte gemittelte Trächtigkeitsraten (Trächtigkeitrate < 70 %) erzielten, deren Ejakulate jedoch sehr niedrige DFI-Mittelwerte aufzeigten.

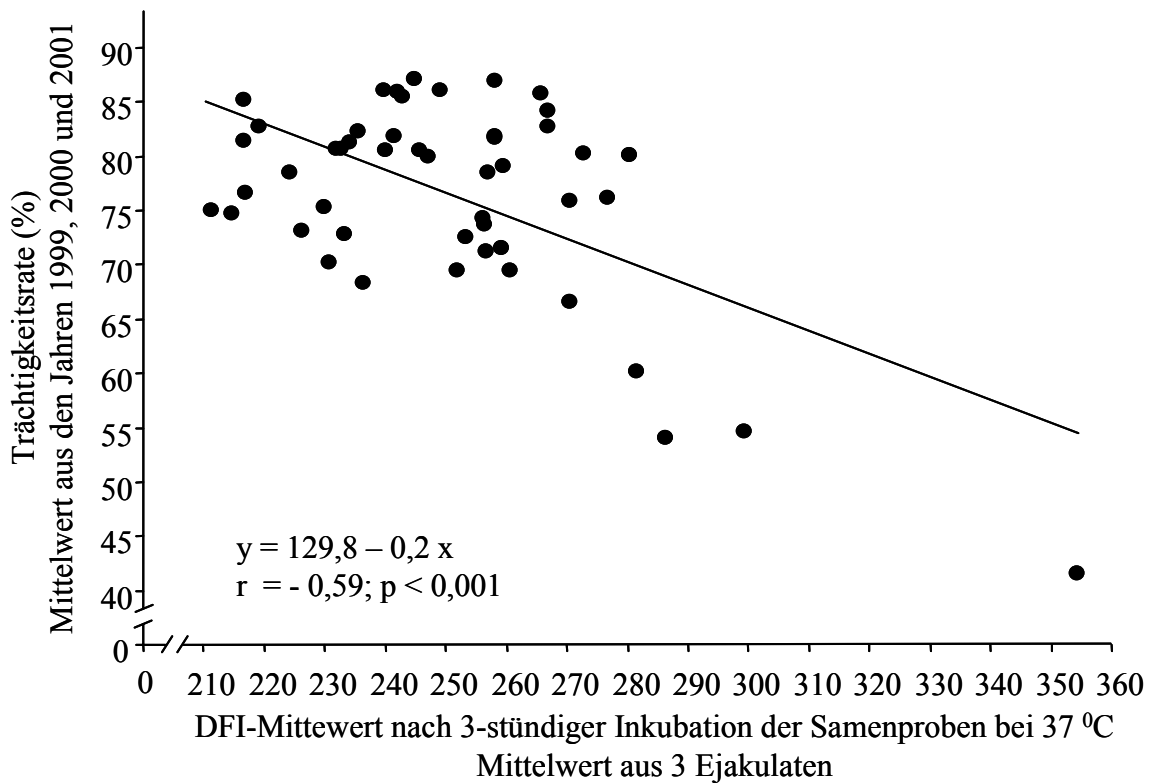


Abb. 4.4: Darstellung der DFI- Mittelwerte (Mittelwert aus 3 Ejakulaten) nach dreistündiger Inkubation der Samenprobe bei 37 °C in Abhängigkeit zur Fertilität der Hengste mit entsprechender Regressionsgerade (Trächtigkeitsrate in % von 49 Hengsten; Mittelwert von 3 Jahren)

5 DISKUSSION

Bis heute steht bei der Qualitätsbestimmung von tiefgefrierkonserviertem Hengstsperma die Beurteilung der Vitalität und der Motilität der Spermien nach dem Auftauen im Vordergrund. Allerdings gilt die Aussagekraft dieser Qualitätsparameter, trotz Objektivierung der Beurteilung einzelner Qualitätsmerkmale, wie z. B. der Motilität mittels computergestützter Analyse, im Hinblick auf das Befruchtungsvermögen der untersuchten Spermien als sehr begrenzt

Seit etwa 10 Jahren bemüht man sich, die Qualität von Samenproben mit Hilfe verschiedener durchflusszytometrischer Analyseverfahren zu bestimmen. Eine der Vorteile dieser Methodik besteht in der Möglichkeit, tausende von Spermien innerhalb von Sekunden zu analysieren. Dadurch erreicht man eine relativ höhere Genauigkeit, verglichen mit den herkömmlichen Verfahren zur Spermaqualitätsbeurteilung. Die Durchflusszytometrie ermöglicht daneben die simultane Analyse mehrerer verschiedener Qualitätsmerkmale an ein und der selben Zelle (ERICSSON et al., 1993).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zum einen zu überprüfen, ob die durchflusszytometrische Analyse eine geeignete, gut reproduzierbare Methode zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma darstellt. Zum anderen sollte untersucht werden, inwieweit die damit erfassten Parameter gegenüber den herkömmlichen Untersuchungsverfahren zusätzliche Informationen über die Spermaqualität liefern. Weiterhin wurde in der vorliegenden Untersuchung getestet, ob mit den durchflusszytometrischen Analysen etwaige vorkommende individuelle, ejakulatabhängige bzw. saisonal bedingte Variationen in der Spermaqualität von tiefgefrorenem Hengstsperma nachweisbar sind. Schließlich wurde die durchflusszytometrisch ermittelte Spermaqualität noch auf Zusammenhänge zur Fertilität der Hengste überprüft.

Für die Untersuchungen standen tiefgefrierkonservierte Samenproben von insgesamt 57 in der Besamung eingesetzten Hengsten des Niedersächsischen Landgestüts in Celle zur Verfügung. An diesen Proben wurde durchflusszytometrisch die Plasmamembranintegrität nach SYBR[®] 14/PI-Färbung, das Mitochondrienmembranpotential (MMP) mittels JC-1-Färbung, die Unversehrtheit des Akrosoms mit Hilfe der SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI -Färbung

und die Integrität der Chromatinstruktur der Spermien unter Anwendung des SCSA™ beurteilt.

5.1 Genauigkeit der Methoden

Die mit Hilfe der durchgeführten durchflusszytometrischen Tests erhobenen Spermaqualitätsparameter waren sehr gut reproduzierbar. Die Ergebnisse der unabhängig von einander durchgeführten Messungen von 3 verschiedenen Pailletten eines Ejakulats unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Intra-Class-Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,88 und 0,98 (Tab. 4.4). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von BALLACHEY et al. (1987) und EVENSON et al. (1991) überein, welche bei wiederholter Bestimmung der Integrität der Chromatinstruktur an bovinen bzw. humanen Spermproben mittels SCSA™ ähnlich hohe ICC-Korrelationskoeffizienten erhalten hatten. Nach BURDOCK et al. (1963) weisen Intra-Class-Korrelationskoeffizienten mit Werten über 0,75 auf eine gute Reproduzierbarkeit der jeweiligen Methode hin.

5.2 Ejakulat- und individuell bedingte Schwankungen der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter

Für die Untersuchung von ejakulatbedingten Schwankungen (Tab. 4.5) wurden von 18 Hengsten je 4 konsekutiv gewonnene Ejakulate durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich hinsichtlich der Bestimmung der Vitalität, des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) und der Unversehrtheit des Akrosoms, dass das Ejakulat einen erheblichen Einfluss (43 bis 75 %) auf die Variabilität der Ergebnisse hatte. Die Untersuchungen von FUCHS et al. (2002) erbrachten ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der ejakulatbedingten Schwankungen bei kryokonserviertem Bullensperma. Der Einfluss des Ejakulats auf die Variabilität der gemessenen Ergebnisse betrug zwischen 50 % und 57 %.

Bei der Beurteilung der Integrität der Spermachromatinstruktur zeigte sich, dass die individuell bedingten Unterschiede hauptverantwortlich waren für die Variabilität der Messergebnisse (Abb. 4.5). Der Einfluss des Ejakulats auf die Gesamtvariabilität der Ergebnisse betrug nur zwischen 9 % und 12 %.

5.3 Einfluss des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen der Proben

Der prozentuale Anteil vitaler Spermien direkt nach dem Auftauen der Proben betrug durchschnittlich ca. 16 %. Die Werte des Anteils an Spermien mit hohem MMP und vitaler Spermien mit intaktem Akrosom verhielten sich etwa gleich. Diese sehr niedrigen Werte sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Tiere nicht nach Eignung zur Kryokonservierung ihrer Spermien selektiert waren. Nach der dreistündigen Inkubation bei 37 °C sank der durchschnittlich prozentuale Anteil an vitalen Spermien deutlich auf ca. 6 % ab. Auch hier verhielten sich die prozentualen Anteile an Spermien mit hohem MMP und vitaler Spermien mit intaktem Akrosom fast gleich.

Bei der Bestimmung der Unversehrtheit des Akrosoms war der sehr kleine Prozentsatz vitaler Spermien mit Akrosomenschädigung, sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach dreistündiger Inkubation der Proben bei 37 °C auffällig. Auch nach der Induktion der Akrosomenreaktion mit Kalziumionophor betrug dieser Spermienanteil im Durchschnitt nur 1,7 %. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der Untersuchungen von RATHI et al. (2001), die ähnliche Ergebnisse bei der Beurteilung des akrosomalen Status von nativen Hengstspermien direkt nach der Spermagewinnung und nach 5-stündiger Inkubation der Samenproben bei 38 °C fanden.

Der prozentuale Anteil der Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen lag im Durchschnitt bei ca. 20 % (Tab.4.6). Nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C verdoppelte sich dieser Anteil an Spermien. Einen solchen zeitabhängigen Anstieg der Spermien mit Chromatinstrukturveränderung durch Inkubation der Samenproben bei 37 °C stellten auch KARABINUS et al. (1997) bei kryokonservierten Bullenspermien und LOVE et al. (2000) bei flüssigkonservierten Hengstspermien fest.

5.4 Zusammenhänge zwischen durchflusszytometrisch und herkömmlich erfassten Spermaparametern

Bei insgesamt 150 untersuchten Samenproben wurde zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen die Vitalität der Spermien und ihre Morphologie mit Hilfe der Bromphenolblau-Nigrosinfärbung lichtmikroskopisch beurteilt. Weiterhin wurde eine

computergestützte Spermienmotilitätsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl der mittels SYBR[®] 14/PI-Färbung, als auch der unter Anwendung der SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI-Färbung ermittelte Prozentsatz vitaler Spermien mit dem Anteil der lichtmikroskopisch als vital beurteilten Spermien positiv korrelierte. Auch der prozentuale Anteil der Spermien mit hohem MMP, der mit Hilfe der JC-1-Färbung bestimmt worden war, korrelierte positiv mit dem nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung unter dem Mikroskop als vital eingestuften Spermien (Tab. 4.7). Auch VIDAMENT et al. (1998) sowie GRAHAM et al. (1990) fanden in ihren Untersuchungen über die Beziehung zwischen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelter Vitalität positive Zusammenhänge, jedoch lagen die Korrelationskoeffizienten höher

All diese letztgenannten durchflusszytometrischen Parameter korrelierten in der vorliegenden Untersuchung aber nur mittelgradig mit dem lichtmikroskopisch ermittelten vitalen Spermienanteil. Dies ist vermutlich auf die Subjektivität und die vergleichsweise höhere Ungenauigkeit bei der lichtmikroskopischen Methode zurückzuführen.

Zwischen den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Beurteilung der Vitalität und mittels SCSA[™] bestimmten Veränderungen in der Spermachromatinstruktur bestanden gering- bis mittelgradige negative Zusammenhänge (Tab. 4.7), d.h. je niedriger der Anteil vitaler Spermien in der Population war, desto mehr Spermachromatinschäden lagen vor. Entsprechende Untersuchungen von JANUSKAUSKAS et al. (2001) erbrachten ebenfalls negative Korrelationskoeffizienten in ähnlicher Größenordnung.

Da die Motilität der Spermien in erster Linie von der energetischen Ladung der Mitochondrien abhängig ist (AUGER et al., 1989), wurden die Ergebnisse der Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) zusätzlich mit den Resultaten der computergestützten Motilitätsbestimmung auf Zusammenhänge hin überprüft. Es zeigte sich eine mittelgradige Korrelation zwischen dem Anteil der Spermien mit hohem MMP und demjenigen an vorwärtsbeweglichen Spermien. Die Untersuchungen von DIGRASSI (2000) mit kryokonservierten Hengstsamenproben erbrachten ebenfalls positive Zusammenhänge ($r = 0,76$; $p < 0,0001$) zwischen der Motilität der Spermien nach dem Auftauen und der durchflusszytometrischen Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials der Spermien.

Bereits in den Untersuchungen von LEIDL et al. (1971) und STOLLA (1984) wurde die Fragestellung untersucht, inwieweit Veränderungen der Spermienmorphologie, insbesondere solche des Kopfes, als Indikator für genetische und chromosomale Anomalien in der Spermatogenese zu werten sind. In Studien mit Sperma verschiedener Tierarten (EVENSON et al., 1985, 1986, 1980b; BALLACHEY et al, 1986a, 1986b) wird ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil an morphologisch abnormalen Spermien und der Heterogenität der Spermachromatinstruktur einer Samenprobe diskutiert. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen des SCSA™ und der lichtmikroskopischen Beurteilung der Spermienmorphologie geachtet (Tab. 4.9). Allerdings zeigten sich hier nur sehr schwache Zusammenhänge zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien mit Chromatinstrukturveränderungen und dem prozentualen Anteil an Spermien mit Kopfanomalien bzw. dem prozentualen Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien ($r = 0,24$; $p < 0,01$). Diese niedrigen Korrelationen decken sich mit den Resultaten der Untersuchungen, die EVENSON et al. (1991) und EVENSON et al. (1999) bei humanen Samenproben fanden. In den Untersuchungen von DIGRASSI (2000), welche ebenfalls an kryokonserviertem Hengstsperma durchgeführt wurden, zeigte sich zwischen dem prozentualen Anteil an Spermien, die als morphologisch normal eingestuft wurden und den Ergebnissen des SCSA™ kein Zusammenhang ($p > 0,05$).

5.5 Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparametern

Die prozentualen Anteile an Spermien mit hohem MMP nach JC-1-Färbung und an vitalen Spermien nach der SYTO® 17/FITC-PNA/PI-Färbung waren in etwa gleich hoch wie der nach SYBR® 14/PI-Färbung als vital beurteilte Prozentsatz der Spermien (Tab. 4.10). Da auch sehr hohe Korrelationen zwischen diesen Ergebnissen bestanden, sind die drei letztgenannten durchflusszytometrischen Tests hinsichtlich der Beurteilung der Vitalität der Spermien als gleichwertig anzusehen. Die SYTO® 17/FITC-PNA/PI-Kombinationsfärbung liefert als einzige dieser Testsverfahren zusätzliche Informationen, nämlich über die Integrität des Akrosoms der Spermien. Daher kann man bei Durchführung der SYTO® 17/FITC-PNA/PI-Kombinationsfärbung auf die Färbung mit SYBR 14/PI und JC- verzichten, ohne einen wichtigen Informationsverlust in Kauf zu nehmen.

Die mit Hilfe der SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI-Färbung erhaltenen Ergebnisse zur Integrität des Akrosoms korrelierten nicht oder nur mittelgradig mit der Vitalität der Spermien (Tab. 4.10 und Tab. 4.11). Ebenso zeigten sich keine oder nur sehr schwache Zusammenhänge zwischen der akrosomalen Schädigung bzw. der Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion und den Ergebnissen des SCSA[™] (Tab. 4.10 und Tab. 4.11). Da außerdem auch die mittels SCSA[™] erhobenen Parameter nur gering- bis mittelgradig mit der flowzytometrisch ermittelten Vitalität der Spermien korrelierten (Tab. 4.10 und Tab. 4.11), lässt sich folgern, dass von den in dieser Arbeit aufgeführten durchflusszytometrischen Analyseverfahren neben dem SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI-Test auch der SCSA[™] zur Untersuchung kryokonservierten Hengstspermas durchgeführt werden sollte, da diese beiden Tests unterschiedliche Informationen über die Spermienqualität liefern.

5.6 Variabilität der durchflusszytometrisch erfassten Spermaparameter in Abhängigkeit von der Saison

Um einen eventuellen Einfluss der Jahreszeit auf die durchflusszytometrisch ermittelte Spermaqualität zu untersuchen, wurden die Ejakulate der 50 Hengste, die im Dezember, März und Juli gewonnen wurden, miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bezüglich eines saisonalen Einflusses auf die unterschiedlichen Spermaqualitätsparameter fielen unterschiedlich aus (Tab. 4.12). Hinsichtlich der Vitalität der Spermien zeigte sich eine deutlich schlechtere Qualität der Ejakulate im Frühjahr verglichen mit den Samenproben, die im Winter gewonnen wurden. Die Proben, die im Sommer gewonnen wurden, hatten durchschnittlich wieder einen höheren Anteil an vitalen Spermien, jedoch lag der Durchschnittswert noch signifikant unterhalb der Proben, die im Winter gewonnen wurden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Aussagen von SWIESTRA et al. (1974), VAN DER HOLST (1975) und BLOTTNER et al. (2001), die keinen saisonalen Effekt auf die Qualität von kryokonserviertem Sperma gefunden hatten. Der in der vorliegenden Untersuchung beobachtete starke Abfall des prozentualen Anteils der vitalen Spermien im Frühjahr ist aber wahrscheinlich nicht als jahreszeitlich bedingter Effekt anzusehen, sondern scheint managementbedingt zu sein. So wurden die Hengste im Februar vom Landgestüt Celle auf die Außenstationen verlegt. Da nur im Landgestüt Celle die Möglichkeit zur Tiefgefrierkonservierung bestand, mussten die nativen Samenproben teilweise einige Stunden gekühlt transportiert werden. In mehrere Untersuchungen wurde ein negativer Effekt der

längeren Anwesenheit von Seminalplasma auf die Spermaqualität bei Hengsten nachgewiesen (NISHIKAWA, 1975; PICKETT et al., 1975b; AMANN et al., 1987). Ein weiterer Grund für den niedrigen Anteil vitaler Spermien in den kryokonservierten Samenproben im März liegt wahrscheinlich auch im Stress, dem die Hengste durch den Ortswechsel auf die Außenstationen und die tägliche Samenentnahme ab Ende Februar ausgesetzt waren. In diesem Zeitraum war auch eine individuell mehr oder weniger stark ausgeprägte Oligozoospermie und Asthenozoospermie bei diesen Hengsten zu beobachten (pers. Mitteilung, SIEME 2002).

Es konnten auch Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils an Spermien festgestellt werden, bei welchen eine Bindung von FITC-PNA an das Akrosom stattgefunden hat. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass eine solche Reaktion unmittelbar nach dem Auftauen auf eine Schädigung des Akrosoms hindeutet, die häufig durch den Tiefgefrierprozess entsteht (BAILEY und BUHR, 1993; FULLER und WHITTINGHAM, 1995). Der Anstieg in der akrosomalen Bindung nach dreistündiger Inkubation ohne bzw. mit Zugabe von Kalziumionophor kann dagegen als eine physiologische, spontan bzw. induziert ablaufende Reaktion gewertet werden (BEDFORD, 1970). Bei den im Winter gewonnenen Ejakulaten lag der Anteil an Spermien mit akrosomaler Schädigung, d.h. der Prozentsatz der Spermien, deren Akrosom sich unmittelbar nach dem Auftauen anfärbte, bei $31,4 \pm 10,5 \%$ und war damit niedriger als im Frühjahr ($43,2 \pm 12,9 \%$) und Sommer ($39,8 \pm 11,2 \%$). Auch der Anteil der Spermien mit FITC-PNA-Bindung nach einer dreistündigen Inkubation mit und ohne Kalziumionophor war bei den im März gewonnen Proben höher als in den Proben vom Dezember. Am höchsten war er hier jedoch bei den Samenproben im Juli. Die entsprechenden Werte lagen im Juli um fast 10 % höher als diejenigen vom Frühjahr und um 16 bis 18% über denjenigen vom Winter. Die Ergebnisse hinsichtlich des akrosomalen Status deuten also darauf hin, dass es hierbei jahreszeitlich bedingte Variationen gibt. Die hohen akrosomalen Schädigungen im Frühjahr sind zwar wahrscheinlich auf die bereits erwähnten Änderungen im Management der Hengste und der Samenverarbeitung zurückzuführen, die erhöhten Werte in den akrosomalen Reaktionen bei den Proben im Juli waren jedoch unabhängig von externen artifiziellen Einflüssen zu beobachten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie konnten BLOTTNER et al. (2001) bei einer sehr begrenzten Untersuchung an 4 Hengsten mit kryokonservierten Ejakulaten, die im Winter gewonnen wurden, signifikant mehr Spermien mit FITC-PNA angefärbten Akrosom nachweisen ($86,5 \%$) verglichen mit Samenproben, die im Mai gewonnen wurden ($77,0 \%$).

Bei der Beurteilung der Integrität der Spermachromatinstruktur direkt nach dem Auftauen der Samenproben ergaben sich hinsichtlich der DFI-Mittelwerte keine saisonal bedingten Unterschiede. Erst nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C war der durchschnittliche DFI-Mittelwert im Frühjahr mit einem Wert von 268 signifikant höher gegenüber den im Winter gewonnenen Proben, bei denen der Durchschnittswert 241 betrug. EVENSON et al. (1991) konnten bei Untersuchungen an humanen Spermien ebenfalls keinen saisonalen Effekt bezüglich der Spermachromatinstruktur direkt nach dem Auftauen beobachten. SPANO et al. (1998) kommen in ihren Untersuchungen an Humanspermien zu gegensätzlichen Ergebnissen. Nach ihrer Aussage hat die Jahreszeit, in der die Ejakulatgewinnung erfolgte, einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$) auf die SCSATM-Ergebnisse. Bei den in den Monaten Oktober bis Dezember gewonnenen Ejakulaten fanden sich deutlich mehr DFI-Spermien verglichen mit den Ejakulaten aus den Frühjahr- und Sommermonaten.

5.7 Einfluss einer der Ejakulatgewinnung vorausgegangen Deckpause und Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparameter und dem Alter der Tiere

Es wurde der Einfluss einer viermonatigen Deckpause vor der Ejakulatgewinnung auf die durchflusszytometrisch ermittelten Samenqualitätsparameter überprüft. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualität zwischen den Hengsten, die eine viermonatige Deckpause vor der Ejakulatgewinnung hatten und den Hengsten, die regelmäßig dreimal wöchentlich zur Spermagewinnung herangezogen wurden (Abb. 4.1; Abb. 4.2). Auch EVENSON et al. (1991) konnten bei ihren Untersuchungen an humanen Spermien keinen Einfluss einer unterschiedlich langen sexuellen Abstinenzzeit auf die Integrität der Spermachromatinstruktur nachweisen.

Zwischen der Vitalität bzw. dem akrosomalen Status der Spermien war keine Abhängigkeit zum Alter der Tiere feststellbar (Tab. 4.13). Auch SQUIRES et al. (1979) hatten hinsichtlich der Vitalität der Spermien ähnliche Beobachtungen gemacht.

Nur zwischen dem DFI-Mittelwert und dem Alter der Tiere war eine mittelgradige positive Korrelation festzustellen ($r = 0,43$; $p < 0,01$). Auch SPANO et al. (1998) konnten einen

solchen Zusammenhang in ähnlichen Größenordnungen beim Menschen und KARABINUS et al. (1990) beim Rind nachweisen.

5.8 Zusammenhang zwischen den durchflusszytometrisch erfassten Spermaparametern und der Fertilität der Hengste

Zur Überprüfung der Zusammenhänge zwischen der Fertilität der Hengste und den verschiedenen durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern standen nur die saisonalen Trächtigkeitsraten der Hengste aus der Frischsamenübertragung zur Verfügung, da das kryokonservierte Hengstsperma, an dem die Messungen vorgenommen wurden, zum Großteil ins Ausland exportiert wurde und daher keine zuverlässigen Fertilitätsdaten zu erhalten waren. Die aus dieser Untersuchung gezogenen Schlussfolgerungen gelten deshalb nur unter der Prämisse, dass die mit den kryokonservierten Samenproben erzielten Trächtigkeitsergebnisse vergleichbar wären mit denen aus der Frischsamenübertragung.

Es ergaben sich hinsichtlich der Vitalität und des akrosomalen Status der Spermien nach dem Auftauen keine Zusammenhänge zu der Fertilität der Hengste (Tab. 4.14). Ein Grund hierfür dürfte in der Tatsache liegen, dass bei der Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Status schwache oder nur mittelgradige Zusammenhänge zwischen flüssigkonserviertem und kryokonserviertem Sperma bei Hengsten bestehen. VIDAMENT et al. (1998) untersuchten die Beziehung zwischen den Ergebnissen einer computergestützten Motilitätsanalyse von Hengstspermien vor und nach der Kryokonservierung. Hierbei wurde nur eine mittelgradige Korrelation zwischen diesen Spermaqualitätsparametern gefunden ($r = 0,52$; $p < 0,01$). Auch FUCHS et al. (2002) konnten in ihren Untersuchungen an Bullensperma nur schwache Beziehungen zwischen der durchflusszytometrisch beurteilten Vitalität bzw. dem akrosomalen Status vor und nach dem Tiefgefrierprozess nachweisen. Ein weiterer Grund liegt vermutlich in der Verwendung von hohen Inseminationsdosen bei den Stuten in der Frischsamenübertragung beim Landesgestüt Celle (500×10^6 /ml vorwärtsbewegliche Spermien). Nach SAACKE et al. (1994) wirken sich Faktoren wie schlechte Spermiovitalität oder vermehrtes Auftreten von Spermien mit Akrosomenschäden bei Erhöhung der Inseminationsdosis nicht unbedingt negativ auf das Befruchtungsergebnis aus, da es sich hierbei um kompensierbare Faktoren handelt. Dies bedeutet, dass Mängel in diesen

Spermaqualitätsmerkmalen durch Erhöhung der Besamungsdosis ausgeglichen werden können.

Dagegen war zwischen den Ergebnissen des SCSA-Tests und der Fertilität der Hengste eine negative Beziehung ($r = -0,51$ bzw. $r = -0,45$; $p < 0,01$) festzustellen (Tab. 4.14). Im Gegensatz zur Vitalität und dem akrosomalen Status handelt es sich bei der Chromatinstruktur nach SAACKE et al. (1994) um einen nicht-kompensierbaren Faktor, d.h. die Fertilität von Hengsten mit einem erhöhten Anteil an Spermien mit geschädigter Chromatinstruktur lässt sich nicht durch Erhöhung der Besamungsdosis verbessern. Bei Chromatinstrukturveränderungen findet zwar eine Fertilisation, aber keine ordnungsgemäße Entwicklung des Embryos statt (STOLLA, 1984).

Der Zusammenhang zwischen den SCSATM-Parametern und den Fertilitätsdaten der Hengste waren nach dreistündiger Inkubation der Samenproben bei 37 °C deutlicher ausgeprägt verglichen mit den Ergebnissen direkt nach dem Auftauen der Samenproben. EVENSON und JOST (2000) nehmen an, dass die Sensitivität des SCSATM-Tests nur ausreicht, um „die Spitze des Eisbergs“ aufzuzeigen, d.h. sie gehen davon aus, dass der damit bestimmte prozentuale Anteil an denaturierten Spermien viel niedriger ist als die wirklich im Ejakulat vorhandenen Spermien mit Chromatinschäden. Durch die mehrstündige Inkubation der Spermien bei 37°C scheint daher die Sensitivität des SCSATM erhöht zu werden, wodurch Spermachromatinschäden, die direkt nach dem Auftauen der Samenproben nicht festgestellt werden können, dann durch eine zusätzliche Schädigung der Chromatinsubstanz nachweisbar werden.

5.9 Schlussfolgerungen

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen für die durchflusszytometrische Untersuchung von kryokonserviertem Hengstsperma ziehen:

- Die durchflusszytometrische Beurteilung von kryokonserviertem Hengstsperma liefert zuverlässige Informationen über verschiedene Spermaqualitätsparameter

- Es sind der SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI- Assay und der SCSA[™] zu empfehlen. Die beiden anderen evaluierten Verfahren mit Hilfe der SYBR[®] 14/PI- und der JC-1 Färbung liefern gegenüber den oben genannten Tests keine zusätzlichen Informationen über die Spermaqualität.

- Die Variationen in den Parametern Vitalität und Integrität des Akrosoms sind etwa zu gleichen Teilen individuell und durch das Ejakulat bedingt. Unterschiede in der Spermachromatinstruktur sind dagegen vorwiegend individuell bedingt.

- Unter der in Kap. 5.8 eingangs erwähnten Prämisse besteht kein Zusammenhang zwischen der Vitalität bzw. dem akrosomalen Status kryokonservierten Spermias und der Fertilität der Hengste. Negative Korrelationen bestehen aber zwischen den von den Hengsten erzielten Trächtigkeitsraten und den mittels SCSA[™] untersuchten Änderungen in der Chromatinstruktur.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, verschiedene durchflusszytometrische Verfahren dahingehend zu überprüfen, ob sie geeignete objektive Methoden zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma darstellen. Es wurde die Plasmamembranintegrität, das Mitochondrienmembranpotential, der akrosomale Status und die Integrität der Chromatinstruktur bei kryokonserviertem Hengstsperma beurteilt. Hierfür wurden verschiedene Fluoreszenzfärbungen sowohl direkt nach dem Auftauen der Samenproben als auch nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C mit SYBR[®] 14, JC-1 und SYTO[®] 17 / Propidiumjodid / FITC-PNA und eine Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA[™]) durchgeführt und anschließend ausgewertet.

Die durchflusszytometrisch erhobenen Spermaqualitätsparameter wiesen eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die Ergebnisse der unabhängig von einander durchgeführten Messungen von 3 verschiedenen Pailletten eines Ejakulats unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Intra-Class-Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,88 und 0,98. Daher sind die in dieser Untersuchung evaluierten durchflusszytometrischen Tests als zuverlässig zu bezeichnen

Um die Zusammenhänge zwischen den herkömmlichen Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Spermaqualität und den in dieser Arbeit evaluierten Analyseverfahren darzustellen, wurde mit Hilfe von Bromphenolblau-Nigrosin- Ausstrichen lichtmikroskopisch die Vitalität und die Morphologie der Spermien nach dem Auftauen beurteilt. Zusätzlich wurde eine computergestützte Motilitätsanalyse durchgeführt. Zwischen der lichtmikroskopisch beurteilten Vitalität und dem durchflusszytometrisch erfassten prozentualen Anteil an vitalen Spermien bestanden mittelgradige Korrelationen ($0,60 \geq r \geq 0,58$; $p < 0,0001$). Der prozentuale Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien korrelierte positiv ($r = 0,50$; $p < 0,01$) mit dem prozentualen Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential. Die Beziehungen zwischen den Ergebnissen des SCSA-Tests und den prozentualen Anteilen sowohl an primären als auch an sekundären Spermienanomalien waren schwach ausgeprägt ($r = 0,24$; $p < 0,01$).

Bei der flowzytometrischen Beurteilung der Vitalität, des Mitochondrienmembranpotentials und der Integrität des Akrosoms zeigte sich, dass die ejakulatbedingten Schwankungen in etwa gleich groß wie die Schwankungen zwischen den Hengsten waren. Nur bei der Beurteilung der Spermachromatinstruktur waren die individuellen Schwankungen (88 - 91 %) erheblich größer als die ejakulatbedingten (9 – 12 %).

Weiter zeigte sich, dass die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Spermaqualitätsbeurteilung bei Hengsten, die eine mehrmonatige Deckpause vor der Ejakulatgewinnung einhielten, sich nicht signifikant von denen der Hengste, die im regelmäßigen Deckeinsatz standen, unterschieden. Bezüglich des Alters der Tiere bestand nur eine schwache Beziehung ($r = 0,43$; $p < 0,01$) zu der Integrität der Spermachromatinstruktur.

Die für die Beurteilung der Vitalität der Spermien verwendeten durchflusszytometrischen Verfahren (SYBR[®] 14/PI, JC-1 und SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI-Kombinationsfärbung) führten zu vergleichbaren Ergebnissen ($r \geq 0,96$; $p < 0,0001$). Die letztere lieferte als einzige dieser drei Tests zusätzliche Informationen über die Integrität des Akrosoms. Die Kombination dieser Dreifachfärbung mit der Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA[™]) bringt darüber hinaus weitere wichtige Informationen über die Spermaqualität.

Zur Überprüfung der Zusammenhänge zwischen der Fertilität der Hengste und den verschiedenen durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparametern standen in der vorliegenden Untersuchung nur die saisonalen Trächtigkeitsraten der Hengste aus der Frischsamenübertragung zur Verfügung. Hier ergaben sich hinsichtlich der Vitalität und des akrosomalen Status der Spermien nach dem Auftauen keine Zusammenhänge ($p > 0,05$) zu der Fertilität der Hengste. Dagegen war zwischen der Integrität der Chromatinstruktur und der Fertilität der Hengste eine negative Beziehung festzustellen. ($r = - 0,51$ bzw. $r = - 0,59$; $p < 0,01$).

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die durchflusszytometrische Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstesperma eine zuverlässige und objektive Methode darstellt. Sie liefert in Ergänzung der herkömmlichen Spermaqualitätsbeurteilung weitere wichtige Informationen, wie z.B. über die Unversehrtheit des Akrosoms und die Integrität der Spermachromatinstruktur.

7 SUMMARY

“Evaluation of flow cytometric methods for assessing the quality of cryopreserved sperm from stallions”

The aim of these examinations was to check various flow cytometric methods to establish whether they are suitable objective methods for assessing the quality of cryopreserved sperm from stallions. The plasma membrane integrity, the mitochondrial membrane potential, the acrosomal status and the integrity of the chromatin structure in cryopreserved sperm from stallions were assessed. For this purpose various fluorescent stainings were carried out both immediately after the semen samples were thawed and after a three-hour period of incubation at 37°C with SYBR[®] 14, JC-1 and SYTO[®] 17 / propidium iodide / FITC-PNA and a sperm chromatin structure analysis (SCSA[™]) and were then evaluated.

The sperm quality parameters obtained by flow cytometry showed good reproducibility. The results of measurements of three different straws of an ejaculate which were carried out independently of each other did not differ significantly. The intra-class correlation coefficients were between 0.88 and 0.98. The flow cytometric tests evaluated in this examination were therefore considered to be reliable.

In order to demonstrate the correlations between the routine examination methods for assessing the sperm quality and the analysis processes evaluated in this study, the viability and the morphology of the sperms after thawing were assessed by light microscopy using bromide phenol blue nigrosine smears. A computer controlled motility analysis was also carried out. Moderate correlations ($0.60 \geq r \geq 0.58$; $p < 0.0001$) were obtained between the viability assessed by light microscopy and the percentage of vital sperms obtained by flow cytometry. The proportion of progressively forward moving sperms correlated positively ($r = 0.50$; $p < 0.01$) to the proportion of sperms with a high mitochondrial membrane potential. The relationships between the results of the SCSA[™] test and the proportions of both primary and secondary sperm anomalies were weakly pronounced ($r = 0.24$; $p < 0.01$).

In the flow cytometric assessment of the viability, the mitochondrial membrane potential and the integrity of the acrosome it was shown that the ejaculate-related variations were approximately the same as the variations between the stallions. Regarding the results of the

sperm chromatin structure the individual variations (88 - 91%) were considerably greater than those dependent on the ejaculate (9 – 12%).

It was also shown that the results of the flow cytometric sperm quality assessment did not vary significantly in stallions which had a period (four months) of sexual rest before providing ejaculate compared to stallions which ejaculates were collected with a regular frequency. In terms of the animals' age there was only a weak relationship ($r = 0.43$; $p < 0.01$) with integrity of the sperm chromatin structure.

The results of the flow cytometric methods for assessing the viability (SYBR[®] 14/PI, JC-1 and SYTO[®] 17/FITC-PNA/PI combination staining) were comparable ($r \geq 0.96$; $p < 0.0001$). The latter is the only one of these tests which provides additional information about the integrity of the acrosome of the sperms. The combination of this triple staining with the sperm chromatin structure analysis (SCSA[™]) also provides further important information about the sperm quality.

To check the relationships between fertility of the stallions and the various sperm quality parameters obtained by flow cytometry, only seasonal pregnancy rates from fresh semen insemination were available. In terms of the viability and the acrosomal status of the sperms after thawing, these showed no correlations ($p > 0.05$) with the fertility of the stallions. On the other hand, a negative relationship was established between the integrity of the chromatin structure and the fertility of the stallions ($r = - 0.51 / - 0.59$).

This study shows that the flow cytometric assessment of the quality of cryopreserved sperm from stallions represents a reliable and objective method. In addition to the routine assessment of sperm quality, it provides important additional information, for example about the intactness of the acrosome and the integrity of the sperm chromatin structure.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABOU-HAILA, A. and D.R.P. TULSIANI (2000):
Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function.
Arch. Biochem. Biophys. **379**, 173-182
- ACEVEDO, N. (2001):
Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine.
Vet. Med. Diss., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- ALM, H., H. TORNER, S. BLOTTNER, G. NURNBERG und W. KANITZ (2001):
Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes.
Theriogenology **56**(5), 817-829
- AMANN, R.P. (1989):
Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?
J. Androl. **10**, Nr. 2, 89-98
- AMANN, R. und B.W. PICKETT (1987):
Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.
E. Vet. Sci., 145-173
- AMANN, R. und J. GRAHAM (1993):
Spermatozoal function.
In: McKINNON, A. und J. VOSS : Equine Reproduction.
Lea & Febiger, Philadelphia, 715-745
- ANDERSON, E., B.W. PICKETT und J. VOSS (1980):
The relationship between motility and fertility of frozen stallion semen.
In: 9th Internat. Cong. Anim. Reprod. and AI, Madrid, 371
- ARAVINDAN, G.R., J. BJORDAHL, L.K. JOST und D.P. EVENSON (1997):
Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis.
Exp. Cell. Res. **236**, 231-237
- AUGER, J., X. RONOT and J.P. DADOUNE (1989):
Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment.
J. Androl. **10**, 439-448
- AUSTIN, C.R. (1952):
The capacitation of mammalian sperm.
Nature, Lond. **170**, 326

- AX, R., L.K. DICKSON und R.W. LENZ (1985):
Induction of acrosome reaction by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls.
- J. Dairy. Sci. **68**, 387-390
- BAILEY, J.L. und BUHR, M.M. (1993):
Ca²⁺ regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187.
Cryobiology, **30**, 470-481
- BALHORN, R. (1982):
A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.
J. Cell. Biol. **93**, 298-305
- BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN und D.P. EVENSON (1986a):
Sperm head morphology and nuclear chromatin structure evaluated by flow cytometry in a diallel cross in mice.
Can. J. Genet. Cytol. **28**, 954-966
- BALLACHEY, B.E., H.L. MILLER, L.K. JOST und D.P. EVENSON (1986b):
Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol.
J. Anim. Sci. **63**, 995-1004
- BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN und D.P. EVENSON (1987):
Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to fertility of bulls.
Biol. Reprod. **36**, 915-925
- BALLACHEY, B.E., R.G. SAACKE und D.P. EVENSON (1988):
The sperm chromatin structure assay: Relationship with alternate tests of sperm quality and heterospermic performance of bulls.
J. Androl. **9**, 109-115
- BAMBERG, E. (1975):
Untersuchung über die Spermienreifung im Nebenhoden.
Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Wien
- BATAILLE, B., M. MAGISTRINI und E. PALMER (1990):
Objective determination of sperm motility in frozen-thawed stallion semen. Correlation with fertility.
Anim. Breed. Abstr., 96-106
- BAUMBER, J., B.A. BALL, C.G. GRAVANCE, V. MEDINA und M.C. DAVIES-MOREL (2000):
The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation.
J. Androl. **21**(6), 895-902
- BECTION DICKINSON (1999):
Trainingshandbuch der Durchflusszytometrie.
BD Deutschland, Heidelberg

- BEDFORD, J.M. (1967):
Experimental requirement for capacitation and observations on ultrastructural changes in rabbit spermatozoa during fertilization.
J. Reprod. Fert. Suppl. **2**, 35
- BEDFORD, J.M. (1970):
Sperm capacitation and fertilization in mammals.
Biol. Reprod. Suppl. **2**, 128-158
- BEISKER, W. (1994):
A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry.
Computer Methods and Programs in Biomedicine **42**, 15-26
- BIELANSKI, W.F. (1975):
The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination.
J. Reprod. Fert., Suppl. **23**, 19-24
- BLACH, E.L., R.P. AMANN, R.A. BOWEN und D. FRANTZ (1989):
Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics.
Theriogenology **31**, 283-298
- BLOTTNER, S., I. WEGNER, H. ROELANTS und K. JEWGENOW (1998):
Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstspermien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA.
Tierärztl. Umschau **53**, 441-447
- BLOTTNER, S., c. WARNKE, A. TUCHSCHERER, V. HEINEN und H. TORNER (2001):
Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season.
Anim. Reprod. Sci. **65**, 75-88
- BRAUN, J., S. HOCHI, N. OGURI, K. SATO und F. TORRES-BOGGINO (1995):
Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa.
Cryobiology **32**, 487-492
- BUDDECKE, E. (1980):
Zelle und subzelluläre Strukturelemente.
In: BUDDECKE, E.: Grundriss der Biochemie.
Verlag de Gryter, Berlin-New York, 428-429
- BURDOCK, E.I., J.L. FLEISS und A.S. HARDESTY (1963):
A new view of interobserver agreement.
Pers. Psychol. **16**, 373-384

- CASEY, P.J., C.G. GRAVANCE, R.O. DAVIS, D.D. CHABOT und I.K.M. LIU (1997):
Morphometric differences in sperm head dimension of fertile and subfertile stallions.
Theriogenology **47**, 575-582
- CHANG, M.C. (1951):
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.
Nature, Lond. **168**, 697-698
- CHENG, F.P., A. FAZELLI, W.F. VOORHOUT, A. MARKS, M.M. BEVERS und B. COLLENBRANDER (1996):
Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.
J. Androl. **17**, 674-682
- CHRISTANELLI, M.J., E.L. SQUIRES, R.P. AMANN und B.W. PICKETT (1984):
Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure.
Theriogenology **22**, 39-45
- CHRISTENSEN, P., C.H. WHITFIELD und T.J. PARKINSON (1996):
In vitro induction of acrosome reaction in stallion spermatozoa by Heparin and A 23187.
Theriogenology **45**, 1201-1210
- CHRISTENSEN, P., Z. GUO, K.M. PEDERSEN, I.R. KORSGAARD und J. JENSEN (2000):
Use of flow cytometry for routine assessment of semen quality in A.I. stations.
Congr. about Application of flow cytometry in semen processing centers, Alta, Garnwerd, NL, 18./19.12.2000
- COCHRAN, J.D., R.P. AMANN, E.L. SQUIRES und B.W. PICKETT (1983):
Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0 ml straws.
Theriogenology **20**, 735-741
- COOPER, T.G. (1998):
Epididymis.
In: E. KNOBIL und J.D. Neill : *Encyclopedia of Reproduction*. Vol 2.
Academic Press, San Diego, 1-17
- COOPER, T.G. und C.-H. YEUNG (1998):
A flow cytometric technique using Peanut Agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa.
J. Androl. Vol.19, No.5, 542-550
- COSSARIZZA, A., M. BACCARANI-CONTRI, G. KALASHNIKOVA und C. FRANCESCHI (1993):
A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).
Biochem. Biophys. Res. Commun. **197**, 40-45

- COSSARIZZA, A., D. CECCARELLI and A. MASINI (1996):
Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level.
Exp. Cell. Res. **222**, 84-94
- CULMSEE, K. und I. Nolte (2000):
Möglichkeiten und Nutzen der Durchflusszytometrie im Rahmen der klinischen Diagnostik bei Hund und Katze.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **107**, 481-485
- DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS und M. MELAMED (1975):
Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry.
Exptl. Cell. Res. **90**, 411-428
- DIGRASSI, W.A.(2000):
Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric assays.
Vet. Med. Diss., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- DOHMES, U. (2002):
Untersuchung über die Bestimmung der Spermaqualität –insbesondere Motilität und Membranintegrität- und Zusammenhänge zur Fertilität von Besamungshengsten.
Vet. Med. Diss., München
- DORST, J. (1982):
Befruchtung, Bildung der Keimblase (Blastozyste) und deren Kontaktaufnahme zur Gebärmutterschleimhaut.
In: BUSCH, W., K. LÖHLE und W. PETER: *Künstliche Befruchtung bei Nutztieren.*
Enke Verlag, Stuttgart, 185-191
- DOTT, H.M. (1975):
Morphology of stallion spermatozoa.
J. Reprod. Fert. Suppl. **23**, 41-46
- DOWSETT, K. und W.A. PATTIE (1982):
Characteristics and fertility of stallion semen.
J. Reprod. Fert. Suppl., **32**, 1-8
- EDDY, E.M. und D.A. O'BRIEN (1994):
The Spermatozoon (Chapter 2).
In: E. KNOBIL und J.D. Neill : *The Physiology of Reproduction.*
Raven Press, Ltd., Vol. **1**, 29-77
- ERICSSON, S.A., D.L. GARNER, C.A. THOMAS, T.W. DOWNING and C.E. MARSHALL (1993):
Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.
Theriogenology **39**, 1009-1024

- EVENSON, D.P. und M.R. MELAMED (1983):
Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry.
J. Histochem. Cytochem. **31**, 248-253
- EVENSON, D. und L. JOST (1994):
Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability.
Methods Cell Biol. **42** Pt B, 159-176
- EVENSON, D.P. und L. JOST (2000):
Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.
Methods in Cell Science **0-0**, 1-20
- EVENSON, D.P., S.S. WITKIN, E. DE HARVEN und A. BENDICH (1978):
Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoal chromatin.
Ultrastruct. Res. **63**(2), 178-187
- EVENSON, D., Z. DARZYNKIEWICZ und M. MELAMED (1980a):
Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry.
Chromosoma **78**, 225-238
- EVENSON, D.P. Z. DARZYNKIEWICZ und M.R. MELAMED (1980b):
Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.
Science **210**, 1131-1133
- EVENSON, D.P., F.A. KLEIN, W.F. WHITMORE und M.R. MELAMED (1984):
Flow cytometric evaluation of sperm from patients with testicular carcinoma.
J. Urol. **132**, 1220-1225
- EVENSON, D.P., P.J. HIGGINS, D. GRUENEBERG und B.E. BALLACHEY (1985):
Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea.
Cytometry **6**, 238-253
- EVENSON, D.P., R.K. BAER, L.K. JOST und R.W. GESCH (1986):
Toxicity of thiotepa on mouse spermatogenesis as determined by dual-parameter flow cytometry.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **82**, 151-163
- EVENSON, D.P., L.K. JOST, R.K. BAER, T.W. TURNER und S.M. SCHRADER (1991):
Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay.
Reprod. Toxicol. **5**, 115-125
- EVENSON, D.P., L. THOMPSON und L. JOST (1994):
Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.
Theriogenology **41**, 637-651

EVENSON, D.P., L. JOST, D. GANDOUR, L. RHODES, B. STANTON, O.P. CLAUSEN, P. DE ANGELIS, R. COICO, A. DALEY, K. BECKER and T. YOPP (1995a):

Comparative sperm chromatin structure assay measurements on epillumination and orthogonal axes flow cytometers.
Cytometry **19**, 295-303

EVENSON, D.P., B.L. SAILER und L.K. JOST (1995b):

Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: Implications for fertility and embryo viability.
Biol. Reprod. Mono **1**, 655-659

EVENSON, D.P., L.K. JOST, D. MARSHALL, M.J. ZINAMAN, E. CLEGG, K. PURVIS, P. de ANGELIS und O.P. CLAUSSEN (1999):

Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.
Human Reproduction **14**, 1039-1049

EVENSON, D.P., L.K. JOST, M. CORZETT und R. BALHORN (2000):

Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study.
J. Androl. **21**(5), 739-746

EVENSON, D.P., K.L. LARSON and L.K. JOST (2002):

Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.
J. Androl. **23**, 25-43

FARLIN, M.E., D.J. JASKO, J.K. GRAHAM und E.L. SQUIRES (1992):

Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa.
Mol. Reprod. Dev. **32**(1), 23-27

FUCHS, I., H. BOLLWEIN, P. DIRSCHERL, E. KIOSSIS und R. STOLLA (2002):

Examination of sperm quality before and after cryopreservation in bovine semen using flow cytometry.
6th Annual conference of the ESDAR, Parma, Italy

FULLER, S.J. und D.G. WHITTINGHAM (1995):

Capacitation-like changes induced in mouse spermatozoa at low temperatures above freezing.
J. Biol. Reprod., **15**, 95

GADELLA, B.M., R. RATHI, J.F. BROUWERS, T.A. STOUT und B. COLENBRANDER (2001):

Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.
Anim. Reprod. Sci. **68**(3-4), 249-265

GANJAM, V.K. und R.M. KENNEY (1975):
Androgens in normal and cryptorchid stallions.
J. Reprod. Fert. Suppl. **23**, 67-73

GARNER, D.L., D. PINKEL, L.A. JOHNSON und M.M. PACE (1986):
Assessment of spermatozoal using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses.
Biol. Reprod. **34**, 127-138

GARNER, D.L., L.A. JOHNSON, S.T. YUE, B.L. ROTH and R.P. HAUGLAND (1994):
Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.
J. Androl. **15**, 620-629

GARNER, D.L. and L.A. JOHNSON (1995):
Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide.
Biol. Reprod. **53**, 276-284

GARNER, D.L., C.A. THOMAS, C.H. ALLEN, P.L. SENGER and R.G. SASSER (1997a):
Effect of cryopreservation on bovine sperm viability as determined by dual DNA staining.
Reprod. Dom. Anim. **32**, 279-283

GARNER, D.L., C.A. THOMAS, H.W. JOERG, J.M. DEJARNETTE and C.E. MARSHALL (1997b):
Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.
Biol. Reprod. **57**, 1401-1406

GARNER, D.L., C.A. THOMAS und C.G. GRAVANCE (1999):
The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa.
Reprod. Dom. Anim. **34**, 399-404

GARNER, D.L., C.A. THOMAS, C.G. GRAVANCE, C.E. MARSHALL, J.M. DE JARN und C.H. ALLEN (2001):
Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm.
Theriogenology **56**(1), 31-40

GEBAUER, M. R., B.W. PICKETT, L.C. FAULKNER, E.E. REMENGA und W.E. BERNDTSON (1976):
Reproductive physiology of the stallion VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa.
J. Animal Science, **43**, 626-632

GÖTTLINGER, C., B. MECHHOLD und A. RADBRUCH (1999):
Operation of a flow cytometer.
In: A. RADBRUCH: Flow cytometry and cell sorting.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 3-25

GOGOL, P., M. BOCHENEK und Z. SMORAG (2002):
Effect of rabbit age on sperm chromatin structure.
Reprod. Dom. Anim **37**, 92-95

GORCZYCA, W., F. TRAGANOS, H. JESIONOWSKA und DARZYNKIEWICZ (1993):
Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in
abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells.
Exp. Cell. Res. **207**, 202-205

GRAHAM, J.K., E. KUNZE and R.H. HAMMERSTEDT (1990):
Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow
cytometry.
Biol. Reprod. **43**, 55-64

GRAHAM, J.K. (1996):
Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa.
Reproductive Technology **12** (1), 111-117

GRAVANCE, C.G., K.M. LIU, R.O. DAVIS, J.P. HUGHES und P.J. CASEY (1996):
Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.
J. Reprod. Fert. **108**, 41-46

GRAVANCE, C.G., D.L. GARNER, J. BAUMBER und B.A. BALL (2000)
Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.
Theriogenology **53**(9), 1691-1703

GRAVANCE, C.G., D.L. GARNER, M.G. MILLER und T. BERGER (2001):
Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial
function.
Reprod. Toxicol. **15** (1),5-10

GROGAN, W. und J. COLLINS (1990):
Guide to flow cytometry methods.
Marcel Dekker, Inc., New York

GRUNDLER, W., P. DRSCHERL, W. BEISKER, F. WEBER, H. BOLLWEIN und R.
STOLLA (2001):
Quantification of temporary and permanent subpopulation of bull sperm treated by an
optimised SYBR-14/propidium iodide assay.
Annual Conference of the German Soc. of Cytometry; 14. Heidelberger Zytometrie
Symposium, Okt. 18-20, 2001 Heidelberg DKFZ

HAKE, S. (2001):
Computergestützte Untersuchung von Spermienkopfanomalien nach einer induzierten
Spermatogenesestörung beim Bullen.
Vet. Med. Diss., München

HAHN, J. (2001):
Maturationsverfahren und Fertilisationsmethoden von Spermatozoen und Oozyten in vitro.
In: BUSCH, W. und A. Holzmann: Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer GmbH, Stuttgart, 517-539

HANCOCK, J.L. (1951):

A staining technique for the study of temperatureshock in semen.
Nature **167**, 323-324

HANCOCK, J.L. (1957):

The structure of spermatozoa.
Vet.Rec. **69**, 996-997

JANUSKAUSKAS, A., A. JOHANNISSON and H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2001):
Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls.
Theriogenology **55**, 947-961

JASKO, D. (1992):

Evaluation of stallion semen.
In: BLANCHARD, T. und D. Varner: Equine Practice, Stallion Management, vol. 8.
W.B. Saunders Co, 129-148

JASKO, D.J., D.H. LEIN und R.H. FOOTE (1990):

Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions.
J. Am. vet. med. Ass., **197**, 389-393

JASKO, D.J., D.H. LEIN und R.H. FOOTE (1991):

The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion.
Theriogenology **30**, 1159-1167

JASKO, D., T. Little, D. LEIN und R. FOOTE (1992):

Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallion: 64 cases (1987-1988)
J. Am. vet. med. Ass., **200**, 979-985

JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAEZ, B.G. GRABO und L.J. ZANEVELD (1984):

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.
J. Reprod. Fertil. **70**, 219-225

JOHNSON, L., D.D. VARNER, D.L. Jr. THOMPSON (1991):

Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse.
J. Reprod. Fert.,Suppl. **44**, 87-97

KARABINUS, D.S., D.P. EVENSON, L.K. JOST, R.K. BAER und M.T. KAPROTH (1990):

Comparison of semen quality in young and mature holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry.
J. Dairy Sci. **73**, 2364-2371

- KARABINUS, D., D. EVENSON und M. KAPROTH (1991):
Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm.
J. Dairy Sci. **74**, 3836-3848
- KARABINUS, D.S., C.J. VOGLER, R.G. SAACKE und D.P. EVENSON (1997):
Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls.
J. Androl. **18** (5), 549-555
- KARLSON, P. (1974):
Die biologische Oxidation.
In: KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 172-190
- KENNEY, R.M., D.P. EVENSON, M.C. GARCIA and C.C. LOVE (1995):
Relationships between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate.
Biol. Reprod. Mono **1**, 647-653
- KIRCHHOFF, C. (1999):
Epididymal Maturation.
Int. Rev. Cytol. **188**, 133-202
- KLOPPE, L.H., D.D. VARNER, R.G. ELMORE, K.N. BRETZLAFF und J.W. SHULL (1988):
Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa.
Theriogenology **29**, 429-439
- KLUG, E. und H. SIEME (2003):
Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis.
Verlag M.&H. Schaper, Hannover (Im Druck)
- KUBBIES, M., H. HOEHN, D. SCHINDLER, Y.C. CHEN und P.S. RABINOVITCH (1989):
Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometrie: principles and application.
In: A. YEN: Flow cytometrie, Vol. II
CRC-Press, Florida, 5
- LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON und M.M. COX (1994):
Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung.
In: LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON und M.M. COX: Prinzipien der Biochemie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 644-647
- LEIDL, W. (1983):
Gestörte Fruchtbarkeit beim Hengst.
In: KÜST, D. und F. SCHAETZ: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren.
Enke-Verlag, Stuttgart, 247-254

LEIDL, W., W. SCHEFELS, R. STOLLA und E. METZGER (1971):
Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **78**, 129-134

LEIDL, W., P. RIEMKE, I. SCHRÖPPEL (1987):
Computergesteuerte Videomikrographie-Auswertung zur Bestimmung der
Spermienmotilität am Modell des Bullen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **94**, 461-464

LICHTENSTERN, A. (1995):
Färbeverhalten von Bullen-, Schafbock- und Eberspermien vor und nach in vitro-
Kapazitation in verschiedenen Medien.
Vet. Med. Diss., München

LODISH, L., D. BALTIMOR, A. BERK, L. ZIPURSKY, P. MATSUDARIA und J.
DARNELL (1995):
Membrane structure: The plasma membrane.
In: Molecular Cell Biology, 3rd ed..
Scientific American Books, Inc., New York, 595-629

LOOMIS, P.R., R.P. AMANN, E.L. SQUIRES und B.W. PICKETT (1983):
Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk
and packaged in straw.
J. Anim. Sci. **56**, 687-693

LOVE, C.C. und R.M. KENNEY (1998):
The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in
the stallion.
Theriogenology **50**, 955-972

LOVE, C.C. und R.M. KENNEY (1999):
Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in
protamine disulfide bonding in the stallion.
Biol. Reprod. **60**, 615-620

LOVE, C.C., J. THOMPSON, G. LOWRY und D. VARNER (2000):
Effect of time of exposure to different temperatures on stallion sperm DNA and fertility.
Havemeyer Foundation workshop; stallion veterinary practice;
17.-20. Sept. 2000, Krakow, Poland; Abstracts, 37-39

MAGISTRINI, M. (2000):
Semen evaluation.
In: SAMPER, J.: Equine breeding management and artificial insemination.
W.B. Saunders Co., Philadelphia, 91-108

MAGISTRINI, M., P. CHANTELOUBE und E. PALMER (1987):
Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for
freezing. J. Reprod. Fert., Suppl. **35**, 127-133

- MAGISTRINI, M., I. COUTY und E. PALMER (1992):
Interaction between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival.
Acta vet. scand., Suppl. **88**, 97-110
- MAGISTRINI, M., E. GUITTON und Y. LEVERN, J.CI. NICOLLE, M. VIDAMENT, D. KERBOEUF und E. PALMER (1997a):
New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry.
Theriogenology **48**, 1229-1235
- MAGISTRINI, M., M. SATTLER, J.M. YVON und M. VIDAMENT (1997b):
Freezability of stallion spermatozoa evaluated by motility, membrane integrity and ATP content.
34th annual meeting of the society of cryobiology, Barcelona, June 8-12, Abstract 95
- MANN T. und C. LUTWAK-MANN (1981):
Male reproductive function and the composition of semen: General considerations.
In: Male reproductive function and semen.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-34
- MEIZEL, S. (1985):
Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface.
Am J Anat **174**, 285-302
- MERKIES, K., T. CHENIER, C. PLANTE und M.M. BUHR (2000):
Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis.
Theriogenology **54**(8), 1215-1224
- MERKT, H. (1976):
Equine artificial insemination.
Vet. Rec. **99**,69-71
- MEYERS, S.A. (2000):
Sperm Physiology.
In: SAMPER, J. : Equine Breeding Management and Artificial Insemination.
W.B. Saunders, Philadelphia, 27-39
- MEYERS, S. A., J.W.OVERSTREET, I.K. LIU und E.Z. DOBNIS (1995):
Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males.
J. Androl. **16**, 47-54
- MIYAZAKI, R., M. FUKUDA, H. TAKEUCHI (1990):
Flow cytometry to evaluate acrosome reacted sperm.
Arch. Androl. **25**, 243-251

MORTIMER, D., E.F. CURTIS und R.G. MILLER (1987) :
Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon.

J. Reprod. Fert. **81**(1), 127-135

MÜLLER, K.E. (1982):

Prinzipien der Spermauntersuchung.

In: BUSCH, W., K. LÖHLE und W. PETER: Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Enke Verlag, Stuttgart, 199-229

NEBE, C.T. (1996):

Flow cytometry and data analysis.

Infusionsther. Transfusionsmed. Apr. **23**(2),111-113

NISHIKAWA, Y. (1959):

Studies on reproduction in horses. Singularity and artificial control in reproductive phenomena.

Japan racing assoc. Shiba Tamuracho Minatoku, Tokyo

NISHIKAWA, Y. (1975):

Studies on the protective effects off egg yolk and glycerol on the freezability of horse sperm.

Proc. 7th Intern. Congr. Anim. Reprod. A.I. **2**, 1539

PALMER, E. und M. MAGISTRINI (1992):

Automated analysis of stallion semen post-thaw motility.

Acta vet. Scand., Suppl.**88**, 137-152

PAPAIOANNOU, K.Z., R.P. MURPHY, R.S. MONKS, N. HYNES, M.P. RYAN, M.P. BOLAND and J.F. ROCHE (1997):

Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry.

Theriogenology **48**, 299-312

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, R.R. HANDROW, M.M. SIMS und N.L. FIRST (1989):

Capacitation of bovine sperm by oviduct fluid.

Biol. Reprod. **40**, 1020-1025

PETSCHOW, K. (2002):

Agglutinationen im Ebersperma: Einfluss auf die Spermaqualität und die Fertilität.

Vet. med. Diss., München

PICKETT, B. W. (1980):

Factors affecting stallion management.

In: MORROW, D.A.: Current Therapy in theriogenology.

W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 681-688

PICKETT, B.W., L.C. FAULKNER und J.L. VOSS (1975a):
Effect of season on some characteristics of stallion semen.
J. Reprod. Fert., Suppl. **23**, 25-28

PICKETT, B.W., J.J. SULLIVAN, W.W. BYERS, M:M: PACE und E.E. REMMENGA
(1975b):
Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull
spermatozoa.
Fertil Steril, **26**, 167

PICKETT, B. W., E. ANDERSON, A. ROBERTS und J. VOSS (1980):
Freezability of first and second ejaculates of stallion semen.
In: 9th Internat. Cong. Anim. Reprod. and AI, Madrid, 339-347

PICKETT, B. W., R.P. Amann, A. O, McKINNON, E.L. SQUIRES, J.L. VOSS (1989):
Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency II.
Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University

RAFFAEL, A. (1987):
Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie.
Arbeitsunterlagen von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

RASSHOFER, R. (1998):
Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Bullen mit dem Hamilton Thorne
Morphology Analyzer IVOS.
Vet. Med. Diss., München

RATHI, R., M. NIELEN, F.P. CHENG, A. van BUITEN und B. COLENBRANDER
(2000):
Exposure of progesterone receptors on the plasma membranes of stallion spermatozoa as a
parameter for prediction of fertility.
J. Reprod. Fertl., **56**, 87-91

RATHI, R., B. COLENBRANDER, M:M: BEVERS und B.M. GADELLA (2001):
Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa
Biol. Reprod. **65**, 462-470

REERS, M., T.W. SMITH and L.B. CHEN (1991):
J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of
membrane potential.
Biochem. **30**, 4480-4486

RHIM, J., W. CONNER, G.DIXON, C. HARENDZA, D. EVENSON, R. PALMITER, R.
BRINSTER (1995):
Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in
spermatozoa.
Biol. Reprod. **52**, 20-32

ROSS A., K. ENTWISTLE (1979):

The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull.
Theriogenology **11**, 111-129

RÜSSE, I. und F. SINOWATZ (1991):

Gametogenese.

In: RÜSSE, I. und F. SINOWATZ: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.
 Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 42-88

SAACKE, R., S. NADIR und R. NEBEL (1994):

Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants.

Theriogenology **41**, 45-50

SAILER, B.L., L.K. Jost und D.P. EVENSON (1995):

Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay.

J. Androl. **18**, 167-173

SAMPER, J.C., J.C. HELLANDER und B.G. CRABO (1991):

Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality.

J. Reprod. Fertl. , Suppl. **44**, 107-114

SATORI BLANC, N., A. SENN, A. LEFORESTIER, F. LIVOLANT und J. DUBOCHET (2001):

DNA in human and stallion spermatozoa forms local hexagonal packing with twist and many defects.

J. Struct. Biol. **134**, 76-81

SCHARLACH, A.G. (1996):

Der Einsatz eines computergesteuerten Einfriergerätes bei Verwendung verschiedener Verdüner in der Tiefgefrierkonservierung von Hengstsamen.

Vet. Med. Diss., München

SCHLÜTER, G. und ENGEL, W.(1995):

The rat Prm3 gene is an intronless member of the protamine gene cluster and is expressed in haploid male germ cells.

Cytogenetics and Cell Genetics **71**, 352-355

SCHRÖPPEL, I. (1988):

Untersuchung der Motilität von Spermien einiger Haustierarten mit einem Computer-Videomikrographie-Verfahren.

Vet. Med. Diss., München

SCHÜLKE B. (1991):

Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas.

In: BUSCH W., K. LÖHLE und W. PETER: Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 209-248

SHAPIRO H. (1988):
Practical flow cytometry.
Alan R. Liss, Inc., New York

SHARMA, O.P. (1976):
Scanning electron microscopy of equine spermatozoa.
J. Reprod. Fert. **48**, 413-414

SINGER, S.J. und G.L. NICHOLSON (1972):
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science **175**, 720-731

SINOWATZ, F. (2001):
Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane.
In: BUSCH, W. und A. Holzmann: Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer GmbH, Stuttgart, 23-54

SINOWATZ, F. und K.H. WROBEL (1981):
Development of the bovine acrosome. An ultrastructural and cytochemical study.
Cell. Tiss. Res. **219**, 511-524

SIRIVAIIDYAPONG, S., F.P. CHENG, A. MARKS, W.F. VOORHOUT, M.M. BEVERS
und B. COLENBRANDER (2000):
Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.
Theriogenology, **53**(3), 789-802

SMILEY, S.T., M. REERS, C. MOTTOLA-HARTSHORN, M. LIN, A. CHEN, T.W.
SMITH, G.D. STEELE and L.B. CHEN (1991):
Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate
forming lipophilic cation JC-1.
Proc. Natl. Acad. Sci. **88**, 3671-3675

SPANNO, M., A.H. KOLSTAD, S.B. LARSEN, E. CORDELLI, G. LETER, A.
GIWERCMAN und J.P. BONDE (1998):
The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in
epidemiological studies. Asclepios.
Hum. Reprod. **13**(9), 2495-2505

SQUIRES, E., B. PICKETT und R. AMANN (1979):
Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics.
J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 7-12

STOLLA, R. (1984):
Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.
Habilitationsschrift; Enke Verlag, Stuttgart

SWIESTRA, E.E., M.R. GEBAUER und B.W. PICKETT (1974):
Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition.
J. Reprod. Fert. **40**, 113-123

- THOMAS, C.A., D.L. GARNER, C.A. BURNER, P.L. SENGER, M.S. JOHNSON, R.G. SASSER and C.H. ALLEN (1996):
Fluorescent viability staining and the fertility of cryopreserved bovine sperm.
13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney, Australia, 24-22
- THOMAS, C.A., D.L. GARNER, J.M. DEJARNETTE und C.E. MARSHALL (1997).
Fluorometric assessment of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.
Biol. Reprod. **56**, 991-998
- TÖPFER-PETERSEN, E. und D. WABERSKI (2001):
Spermienreifung und Befruchtung.
In: BUSCH, W. und A. Holzmann: Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer GmbH, Stuttgart, 67-82
- UHLENBROCK, S. (1999):
Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Hengst mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS.
Vet. Med. Diss., München
- VAN DER HOLST, W. (1975):
Seizoeninvloeden op het sperma van hengsten in Nederland.
J. Reprod. Fert., Suppl. **23**, 87-89
- VARNER, D.D., J.A. BOWEN und L. JOHNSON (1993):
Effect of Heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm.
Arch. Androl. **31**, 199-207
- VARNER, D.D., S.P. BRINSKO, T.L. BLANCHARD, C.C. LOVE, R. HECK, M.L. MACPHERSON und L. JOHNSON (2000a)
Fertility in stallions associated with spermatozoal acrosome dysfunction.
Havemeyer Foundation workshop; stallion veterinary practice;
17.-20. Sept. 2000, Krakow, Poland; Abstracts 19-20
- VARNER, D.D., T.L. BLANCHARD, S.P. BRINSKO, C.C. LOVE, T.S. TAYLOR und L. JOHNSON (2000b):
Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallion.
Anim. Reprod. Sci. **60-61**, 493-509
- VIDAMENT, M., A.M. DUPERE, P. JULIENNE, P. EVAÏN, P. NOUE und E. PALMER (1997a):
Equine frozen semen freezability and fertility field results.
Theriogenologie **48**, 907-917
- VIDAMENT, M., E. COGNARD, M. MAGISTRINI und E. PALMER (1997b):
Comparison of 8 criteria estimating various aspects of frozen-thawed stallion spermatozoa.
34th annual meeting of the society of cryobiology, Barcelona, June 8-12, Abstract 94

VIDAMENT, M., E. COGNARD, J.-M. YVON, M. SATTLER, E. PALMER und M. MAGISTRINI (1998):

Evaluation of stallion semen before and after freezing.

Reprod. Dom. Anim. **33**, 271-277

VITT, U. (1997):

Fruchtbarkeitskriterien aufgetauter Bullenspermien in vitro und die Beeinflussung dieser durch Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung.

Vet. Med. Diss., Berlin

VOGLER C., R. SAACKE, J. BAME, J. DEJARNETTE und M. McGILLIARD (1991):

Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen.

J. Dairy. Sci. **74**, 3827-3835

VOSS, J., B. PICKETT und E. SQUIRES (1981):

Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility.

J. Am. vet. med. Ass. **178**, 287-289

WARNKE, C., S. BLOTTNER, W. KANITZ, A. TUCHSCHERER und H. TORNER (2000):

Different types of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor, season and cryopreservation.

4th Annual Conference of the ESDAR, Prag

WATSON, P.F. (1981):

The effect of cold shock on sperm cell membranes.

In: MORRIS, G.I. und A. CLARK: Effects of low temperature on biological membranes.

Academic Press, London, 189-218

WEITZE, K.-F. (2001):

Spermatologische Untersuchung.

In: BUSCH, W. und A. Holzmann: Veterinärmedizinische Andrologie.

Schattauer GmbH, Stuttgart, 87-118

WELSCH, U. und V. STORCH (1973):

Einführung in die Zytologie und Histologie der Tiere.

Fischer verlag, Stuttgart, 4-5

YANAGIMACHI, R. (1994):

Mammalian Fertilization.

In: NOBIL, E. und J.D. Neill : The Physiology of Reproduction.

Raven Press, Ltd., vol. 1, 189-317

YANAGIMACHI, R. und N. USUI (1974):

Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa.

Exp. Cell. Res. **89**, 161-174

ZANEVELD, L.J.D., C. J. DE JONGE, R.A. ANDERSON und S.R. MACK (1991):

Human sperm capacitation and the acrosome reaction.

Hum. Reprod. **6**, 1265-1274

9 ANHANG

Anhang A

Zusammensetzung des TALP-Medium (PARRISH et al., 1988):

0,5844 g	NaCl
0,0231 g	KCl
0,0294 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
0,0081 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
0,0047 g	NaH ₂ PO ₄
0,2100 g	NaHCO ₃
0,2421 g	Na-Laktat
0,0110 g	Na-Pyruvat
0,2383 g	HEPES
0,0050 g	Gentamycin
0,6000 g	BSA
ad 100,0 ml	Aqua bidest.

Anhang B

Geräteeinstellungen am FACScan-Durchflusszytometer

Bei allen Messungen wurden die folgende Einstellungen gewählt:

Einteilung des Messbereiches aller Parameter: 1024 Kanäle

Kompensation: keine

Probendruck (Flow rate): low (12 µl ± 3 µl / min)

Quantifizierung der Spannungsimpulse: Höhe (Amplitude)

Spezielle Geräteeinstellungen bei der Bestimmung der Plasmamembranintegrität, MMP und des akrosomalen Status:

Parameter	Detektor	Spannung	Amplitudenzunahme	Modus
P 1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P 2	SSC	234	1,00	logarithmisch
P 3	FL 1	400	4,92	logarithmisch
P 4	FL 2	491	4,92	logarithmisch
P 5	FL 3	450	4,92	logarithmisch

Schwellenwert: FSC bei 350

Spezielle Geräteeinstellung bei der Beurteilung der Spermachromatinstruktur:

Parameter	Detektor	Spannung	Amplitudenzunahme	Modus
P 1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P 2	SSC	234	1,00	logarithmisch
P 3	FL 1	variabel ca. 440	2,63	linear
P 4	FL 3	variabel ca. 600	1,00	linear

Schwellenwert: FL 1 bei 60

Die Einstellungen der Spannung für die Detektoren FL 1 und FL 2 wurden entsprechend der gemessenen Referenzprobe zu Beginn jeder Messreihe eingestellt und nach jeder zehnten Probe überprüft und gegebenenfalls nachkorrigiert. Die benötigten Referenzproben wurden alle aus ein und demselben Ejakulat eines klinikeigenen Hengstes gewonnen. Bei der Messung der Referenzprobe wurden die Spannungswerte so eingestellt, dass die Mittelwerte für FL 1 500 und FL 3 130 betrug.

Anhang C**Einstellungsparameter für die computergestützte Motilitätsanalyse mit dem Cell Motion Analyser (CMA) V. 2.0:**

Einstellungsparameter	Einheit	Wert
Anzahl der Bilder		32
Mindestbildanzahl		14
Vielfache der Bildfrequenz		1
Minimale Fläche des Objekts	Pixel	25
Maximale Fläche des Objekts	Pixel	400
Schwellwert für Objektsuche		5
Objekte		hell
Geschwindigkeitsklassenbreite	µm/s	5
Geschwindigkeitsgrenze für immobile Objekte	µm/s	10
Geschwindigkeitsgrenze für lokalmobile Objekte	µm/s	25
Tiefe der Messkammer	µm	10
Verdünnung 1/(n)		1
Temperatur der Probe	°C	37
Eichungsfaktor		322
Korrektur		No
Richtung		No
Zeilensprung		2
Distanz	Pixel	31
Anzahl der Relaxationen		7
Pause		2
Tukeyfenster		4
Maximaler Radius	µm	10
Min. Fläche der unbeweglichen Objekte	Pixel	25
Max. Fläche der unbeweglichen Objekte	Pixel	150
Schwanzdetektion		On
Empfindlichkeit der Schwanzdetektion		1,1
Messfenster XA, YA, XE, YE		30, 30, 576, 545
Schwanzsuche anwenden auf		immobile Objekte
Größe Fenster		15
Anzahl Dilatationen/Erosion		4
Suchschwelle Schwanz		6
Minimale Schwanzgröße		5
Doppelter Schwellenwert		On
Schwanz		hell
Benutzerklassifikator ausführen		On

Anhang D

Erläuterung zu den Bezeichnungen der durchflusszytometrisch ermittelten Spermaqualitätsparameter

Für die Spermaqualitätsparameter, die mit Hilfe der verschiedenen durchflusszytometrischen Untersuchungen ermittelt wurden, gelten folgende Bezeichnungen:

Vitale Spermien	prozentualer Anteil der Spermien, der sich nach SYBR 14 [®] /PI-Färbung ausschließlich mit SYBR 14 [®] grün anfärbt, d.h. eine intakte Plasmamembran aufweist
Spermien mit hohem MMP	prozentualer Anteil der Spermien, deren Mittelstück nach JC-1-Färbung orange fluoresziert, d.h. ein hohes Mitochondrienmembranpotential (MMP) aufweist
Vitale Spermien ohne AF	prozentualer Anteil der Spermien, der sich nach SYTO 17 [®] /FITC-PNA/PI-Färbung ausschließlich orange mit SYTO 17 [®] anfärbt, d.h. bei intakter Plasmamembran ohne Akrosomenschädigung (AF) ist
Vitale Spermien mit AF	prozentualer Anteil der Spermien, der sich nach SYTO 17 [®] /FITC-PNA/PI-Färbung mit SYTO 17 [®] orange und FITC-PNA grün anfärbt, d.h. bei intakter Plasmamembran eine Schädigung des Akrosoms aufweist
Tote Spermien ohne AF	prozentualer Anteil der Spermien, der sich nach SYTO 17 [®] /FITC-PNA/PI-Färbung ausschließlich mit PI rot anfärbt, d.h. bei defekter Plasmamembran keine Anfärbung des Akrosoms mit FITC-PNA aufweist
Tote Spermien mit AF	prozentualer Anteil der Spermien, der sich nach SYTO 17 [®] /FITC-PNA/PI-Färbung mit PI rot und FITC-PNA grün anfärbt, d.h. bei defekter Plasmamembran eine Akrosomenschädigung aufweist
DFI-Spermien	prozentualer Anteil der Spermien, der nach Acridinorang-Färbung beim SCSA-Test ein erhöhten Anteil der Rot – an der Gesamtfluoreszenz (Rot und Grün) aufweist, d.h. vermehrt einzelsträngige DNA aufweist
DFI-Mittelwert	Mittelwert der DFI-Werte der Gesamtpopulation einer Samenprobe. Wobei die DFI-Werte den Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz jedes einzelnen Spermiums wiedergebe

Danksagung

Herrn Professor Dr. Stolla danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die freundliche jederzeit gewährte Unterstützung und für die Betreuung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Herrn Privatdozent Dr. H. Bollwein für sein Engagement, für wertvolle Ratschläge und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU, die mich in irgendeiner Weise bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Sieme vom Niedersächsischen Landesgestüt Celle für die Möglichkeit, das benötigte Probenmaterial dort zu gewinnen und für seine tatkräftige moralische Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Inge, Lorenzo, Sandra, Simone, Sonni, Jenny, Frank, Peter, Heidi, Alex, Nicki und allen Tierpflegern am Oberwiesenfeld für die schöne Zeit, den Spaß, die Feste und die so oft nötige Ablenkung von der Arbeit und den Trost danken.

Schließlich danke ich besonders meinen Eltern, da sie immer an mich geglaubt haben und mich mit allem was nötig war unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Matthias Krienke
Geburtsdatum: 30.12.1962
Geburtsort: Siegen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Karl-Horst Krienke
Christel Krienke, geb. Schneider

Ausbildung/Schule

1969 - 1973 Hauptschule in Hanau /Steinheim a.M.
1973 – 1982 Grimmelshausen – Gymnasium Gelnhausen

Studium

1983 – 1984 Studium der Veterinärmedizin an der RUCA Antwerpen/Belgien
1984 – 1989 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
November 1989 Tierärztliche Prüfung ; Staatsexamen
Februar 1990 Approbation zum Tierarzt
seit SS 2001 Promotionsstudium an der LMU München

Berufserfahrung

1990 - 1995 Angestellter Tierarzt in der Tierärztlichen Klinik für Pferde des Herrn Dr. Karl Gräf, Großwallstadt
1995 – 2001 Selbständiger Tierarzt in der Tierärztlichen Klinik für Pferde Dr. Karl Gräf und Partner, Großwallstadt
seit 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Teilzeit) an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Ludwig Maximilians Universität München