

Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. U. Matis
Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. R. Stolla

**Durchflusszytometrische Verfahren zur Beurteilung der Spermaqualität
nach einer experimentell induzierten Hyperthermie am Bullenhoden**

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

von
Chen-ti Wu
aus
Kaohsiung / Taiwan

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Korreferent:	Prof. Dr. W. Rambeck

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinem Land, Taiwan

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1.	Physiologischer Ablauf der Spermatogenese und der epididymalen Spermienreifung beim Bullen	2
2.2.	Morphologie der Bullenspermien	4
2.2.1.	Plasmamembran	4
2.2.2.	Akrosom	5
2.2.3.	Chromatinstruktur	5
2.2.4.	Mitochondrien	5
2.3.	Wärmeregulation des Hodens	6
2.3.1.	Physiologische Wärmeregulation des Hodens	6
2.3.2.	Einfluss der Hyperthermie auf die Samenqualität beim Bullen	9
2.4.	Durchflusszytometrische Spermienuntersuchungen	11
2.4.1.	Bestimmung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR[®] 14 / PI – Färbung	12
2.4.2.	Bestimmung des akrosomalen Status mittels FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI – Färbung	13
2.4.3.	Bestimmung der Chromatinstruktur mittels des Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA[™])	14
2.4.4.	Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) mittels JC-1-Färbung	16
2.5.	Computergestützte Spermienuntersuchungen	17
2.5.1.	Computergestützte Motilitätsanalyse	17
2.5.2.	Computergestützte Morphometrie	17

3.	MATERIAL UND METHODE	19
3.1.	Versuchsaufbau	19
3.2.	Untersuchte Tiere und Samengewinnung	19
3.3.	Lokale Wärmeapplikation am Hoden	20
3.4.	Konventionelle Spermaanlyse	20
3.5.	Durchflusszytometrische Spermauntersuchung	21
3.5.1.	Geräte und Geräteeinstellungen	21
3.5.2.	SYBR[®] 14 / PI-, JC-1- und FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI – Färbung, Messung, Auswertung	21
3.5.3.	Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA[™])	24
3.6.	Computergestützte Spermauntersuchung	26
3.6.1.	Geräte	26
3.6.2.	Funktionsweise und Einstellung	26
3.7.	Statistische Auswertung	27
4.	ERGEBNISSE	28
4.1.	Umgebungs- und skrotale Oberflächentemperatur während des Versuchs	28
4.2.	Einfluss der Hyperthermie auf konventionelle Spermaparameter	29
4.2.1.	Gesamtpermienanzahl und Konzentration der Spermatozoa	29
4.2.2.	Vitalität der Spermien	31
4.2.3.	Morphologische Veränderungen der Spermien	32
4.2.3.1.	Häufigkeit primärer Anomalien	33
4.2.3.2.	Häufigkeit sekundärer Anomalien	35

4.2.4.	Häufigkeit von Spermien mit Zytoplasmatröpfchen	36
4.2.5.	Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die konventionellen Spermaparameter	37
4.3.	Einfluss der Hyperthermie auf die computergestützten Motilitätsparameter	38
4.3.1.	Einfluss der Hyperthermie auf den Anteil motiler Spermien	38
4.3.2.	Einfluss der Hyperthermie auf den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien	39
4.3.3.	Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die Motilitätsparameter	39
4.4.	Einfluss der Hyperthermie auf die durchflusszytometrischen Spermienparameter	40
4.4.1.	Veränderungen von Plasmamembranintegrität und Mitochondrienmembranpotential	40
4.4.2.	Veränderungen des akrosomalen Status	41
4.4.3.	Veränderungen der Spermachromatinstruktur	42
4.4.4.	Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die durchflusszytometrische Spermienparameter	43
4.5.	Korrelationen der Spermienparameter	44
5.	DISKUSSION	46
5.1.	Einfluss der Hyperthermie auf die Spermaqualität	47
5.1.1.	Fesamtpermienanzahl und Spermienkonzentration	47
5.1.2.	Motilität und Vitalität	47
5.1.3.	Morphologie	48
5.2.	Zusammenhang zwischen Kopfanomalien und Chromatinstruktur der Spermien	49

5.3.	Zusammenhang zwischen Motilität und den Mitochondrienmembranpotential der Spermien	50
5.4.	Zusammenhang zwischen Plasmamembranintegrität und Vitalität der Spermien	51
5.5.	Schlussfolgerungen	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	54
7.	SUMMARY	56
8.	LITERATURVERZEICHNIS	58
9.	ANHANG	72
	DANKSAGUNG	75
	LEBENS LAUF	76

1. EINLEITUNG

Seit Mitte der 80er Jahre werden durchflusszytometrische Analyseverfahren vermehrt auf ihre Eignung für die Spermienbeurteilung überprüft. Mit den bisher gebräuchlichen konventionellen Methoden, die zum Teil auf subjektiver Basis beruhen, wie z.B. die Schätzung der Motilität, war es nur sehr bedingt möglich, die Fertilität von männlichen Zuchttieren zuverlässig vorherzusagen.

Gerade für Bullenbesamungsstationen ist es sehr wichtig, unterdurchschnittlich fruchtbare Tiere frühzeitig zu eliminieren, sowie die Produktivität von Bullen mit sehr guter Fruchtbarkeit zu erhöhen. Die bisher mit den durchflusszytometrischen Verfahren gesammelten Erfahrungen zeigen, dass es mit Hilfe dieser Methoden zwar grundsätzlich möglich ist, die Zuverlässigkeit der Fertilitätsvorhersage von Besamungsbullen zu verbessern. Nach wie vor gibt es aber sehr unterschiedliche Einschätzungen über die praktische Einsatzmöglichkeit der Verfahren. Ein Grund für die in der Literatur immer wieder diskutierten Divergenzen, vor allen was die Korrelation zwischen durchflusszytometrisch ermittelten Spermaparametern mit den von den Bullen erreichten Non-Return-Raten angeht, dürfte die Tatsache sein, dass es sich hierbei um bereits vorselektierte Tiere handelt, deren Spermaqualität bestimmte Mindestanforderungen erfüllt. Es ist daher nicht überraschend, dass die relativ geringen Qualitätsunterschiede und ihre möglichen Auswirkung auf die Fertilität auch mit Hilfe der durchflusszytometrischen Verfahren nicht in jedem Fall zuverlässig erfasst werden können.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher, an Ejakulaten mit größeren Qualitätsunterschieden zu überprüfen, ob mit Hilfe durchflusszytometrisch erfasster Parameter tatsächlich Aussagen über die Fertilität zu erhalten sind. Als Modell für diese Untersuchung wurden Bullen gewählt, bei denen durch eine experimentell herbeigeführte skrotale Hyperthermie eine temporäre Verschlechterung der Spermaqualität ausgelöst wurde.

2. LITERATUR

2.1. Physiologischer Ablauf der Spermatogenese und der epididymalen Spermienreifung beim Bullen

Die Entwicklung der Ursamenzelle (Spermatogonie) im Keimepithel (*Tubuli seminiferi contorti*) des Hodens zum befruchtungsfähigen Spermatozoon, die sogenannte Spermatogenese, umfasst den Spermatogonienvermehrungszyklus (Spermatocytogenese) und die sich anschließende Spermio-genese, eine zytologische Transformation der Spermatischen. Mit der Nebenhodenpassage, in der weitere Reifungsvorgänge stattfinden (epididymale Spermienreifung), ist die Produktion von befruchtungsfähigen Spermatozoa abgeschlossen (Barth and Oke, 1989; Johnson *et al.*, 1994; Leidl, 1968) (Abb. 1).

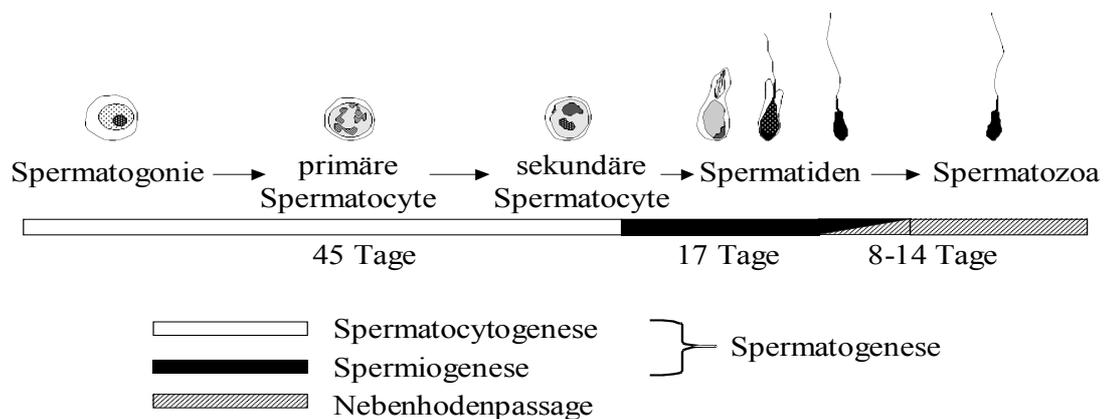


Abb. 1: Der Verlauf der Spermatogenese und der Nebenhodenpassage des Rindes (modifiziert nach Barth and Oke, 1989 und Johnson *et al.*, 1994).

Spermatocytogenese

Die Ursamenzellen stellen die erste Entwicklungsstufe der Spermien dar. Sie liegen in einer Schicht an der Basalmembran der Samenkanälchen und bringen durch fortgesetzte Mitosen neue Spermatogonien hervor. Diese teilen sich weiter mitotisch und bilden über die Zwischenstadien der A-Spermatogonien, die intermediären Spermatogonien und B-Spermatogonien, die primären Spermatozyten (Berndtson and Desjardins, 1974). In der folgenden Reifeteilung wird die Chromosomenzahl auf den haploiden Satz reduziert. Es entstehen die sekundären Spermatozyten. Durch die sich anschließende zweite meiotische Teilung werden Spermatischen mit jeweils $1/2n$ DNS gebildet (Berndtson and Desjardins, 1974). Der vollständige Prozess der Spermatocytogenese dauert beim Bullen ungefähr 45 Tage (Johnson *et al.*, 1994).

Spermiogenese

Die fortschreitende Umwandlung der runden Spermatiden zu Spermien wird als Spermiogenese bezeichnet. Die dafür benötigte Zeit variiert bei den verschiedenen Haus-säugetieren. Beim Bullen beträgt sie 17 Tage (Johnson *et al.*, 1994). Die Differenzierung der Spermatiden zu Spermatozoen umfasst die speziesspezifische Ausgestaltung des Spermienkopfes, die Bildung des Akrosoms und die Entwicklung des Schwanzes (Berndtson and Desjardins, 1974). Der Prozess der Spermiogenese ist in vier Phasen eingeteilt: Golgi-, Kappen-, Akrosom- und Reifungsphase. Besonders hervorzuheben ist dabei die Ausstattung des Spermienkopfes. Die Membran der Kopfkappe wird mit sogenannten Spermadhäsinen versehen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe multifunktionaler Proteine, die in der Kette der Ereignisse bis hin zur Kapazitation, Gametenerkennung und Spermien-Eizell-Bindung eine tragende Rolle besitzen (Calvete *et al.*, 1995). Nach Abschluss der Reifungsphase erfolgt die Freisetzung der Spermien (Spermiation) durch aktive Verformungsprozesse der Sertolizellen und Kontraktion der Tubuluswand ins Lumen der Samenkanälchen. Die Spermien werden schließlich in das Hodennetz (*Rete testis*) abgegeben, welches wiederum mit den *Ductuli efferentes* des Nebenhodens in Verbindung steht (Schummer and Vollmerhaus, 1987).

Nebenhodenpassage

Der Nebenhoden (*Epididymis*) dient der Speicherung und weiteren Reifung der Spermien (Schummer and Vollmerhaus, 1987). Während der Nebenhodenpassage erfahren die Spermien verschiedene physiologische, biochemische und morphologische Veränderungen, die insgesamt als epididymale Spermienreifung bezeichnet werden. Erst durch diese Reifung erlangen die Spermien ihre volle Befruchtungsfähigkeit (Bamberg, 1975). Der Prozess dieser Reifung beinhaltet folgende Veränderungen:

- Verlagerung und Ablösung des zytoplasmatischen Tröpfchens vom Mittelstück der Spermien.
- Umwandlung von Größe, Form und Ultrastruktur des Akrosoms.
- Veränderungen der Plasmamembran hinsichtlich ihrer Lipid- und Glykoproteinzusammensetzung.
- Motilitätsänderungen der Spermien. Im Nebenhodenkopf sind die Spermien weitgehend unbeweglich oder zeigen höchstens eine unkoordinierte Bewegung, während sie im Nebenhodenschwanz eine gerichtete Vorwärtsbewegung erkennen lassen.

Die physiologische Passagezeit der Spermien durch den *Ductus epididymidis* bis zu seiner Mündung in den *Ductus deferens* wird beim Rind mit ca. 14 Tagen angegeben (Ross and Entwistle, 1979; Sinowatz, 2001).

2.2. Morphologie der Bullenspermien

Das reife, befruchtungsfähige Spermium lässt sich beim Bullen ebenso wie bei den anderen Säugetieren in Kopf und Schwanz unterteilen. Am Kopf wird eine akrosomale und eine postakrosomale Region unterschieden. Der Schwanz des Spermiums besteht aus vier anatomisch getrennten Abschnitten: dem Halsabschnitt, dem Mittelstück, dem Hauptstück und dem Endstück. Alles wird von einer gemeinsamen Membran umgeben (Saacke and Almquist, 1964). Im Folgenden sollen nur die zum Verständnis dieser Arbeit wichtigsten Aspekte der Spermienmorphologie erwähnt werden.

2.2.1. Plasmamembran

Das gesamte Spermium wird von einer Plasmamembran umhüllt. Wie in anderen Zellen besteht die Plasmamembran hauptsächlich aus Phospholipiden, die infolge ihres amphipatischen Charakters im wässrigen Milieu spontan zur Bildung von Doppelmembranen mit hydrophilen Oberflächen und lipophiler Zwischenschicht fähig sind (Lodish *et al.*, 1995). Darin eingelagert sind neben Cholesterinmolekülen vor allem Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane. Diese besondere Konstruktion gibt 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). Gleichzeitig erhöht sich die Permeabilität für verschiedene Farbstofflösungen (Hancock, 1951).

2.2.2. Akrosom

Ein funktionell wichtiger Bestandteil des Kopfes ist das Akrosom. Es ist ein abgeflachtes Vesikel, welches kappenförmig den vorderen Abschnitt des Spermienkernes umhüllt. Im Längsschnitt liegen von innen nach außen vier Membranen übereinander. Die innere akrosomale Membran liegt auf der Kernmembran. Zwischen ihr und der äußeren akrosomalen Membran befindet sich die akrosomale Matrix. Schließlich ist die äußere akrosomale Membran von der Plasmamembran umgeben. Zwischen der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran befindet sich ein schmaler cytoplasmatischer Spalt. Die innere und die äußere akrosomale Membran gehen am äquatorialen Segment der Spermienzelle ineinander über (Schuelke, 1982). Während der Spermatogenese entsteht das Akrosom aus enzymgefüllten Vesikeln des Golgi-Apparates. Der Inhalt des Akrosoms besteht aus verschiedenen hydrolytischen Enzymen (Akrosin, Hyaluronidase, verschiedene saure Hydrolasen und Esterasen), die bei der Interaktion zwischen Spermien und der Corona radiata bzw. Zona pellucida der Eizelle aktiviert werden (Eddy and O'Brien, 1994).

2.2.3. Chromatinstruktur

Das Chromatin, welches die DNA-Stränge enthält, ist in Spermien höher kondensiert als in somatischen Zellen, ist lamellenartig verpackt (Satori Blanc *et al.*, 2001) und füllt die Nuclei komplett aus (Love and Kenney, 1999). Die Zellkernproteine des diploiden Genoms, die Histone, werden im Verlauf der Spermatogenese durch Protamine ersetzt. Durch die Komprimierung der Chromatinsubstanz wird während der Spermatogenese und der epididymalen Reifungsphase die Erbsubstanz vermehrt gegenüber mutagenen Substanzen und Umwelteinflüssen geschützt und ihre Integrität bis zur Fertilisation aufrechterhalten (Evenson and Jost, 2000; Love and Kenney, 1998).

2.2.4. Mitochondrien

Die längsovaleförmigen Mitochondrien des Spermiums liegen schraubenartig angeordnet im Mittelstück des Schwanzes. Ihr Aufbau zeichnet sich durch zwei voneinander getrennte Membransysteme aus: Eine glatte äußere und eine innere, stark gefaltete Membran, welche die

Mitochondrienmatrix umschließt. Während des Ablaufs der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) in der Innenmembran der Mitochondrien werden Protonen aus der Matrix nach außen geschleust. So entsteht ein Protonengradient und damit ein pH-Gradient an der inneren Mitochondrienmembran. Gleichzeitig wird mit den Protonen positive Ladung nach außen geleitet, so dass die Innenseite der inneren Membran negativ geladen ist (Lehninger *et al.*, 1994). Dieser elektrochemische Gradient zwischen Innen- und Außenseite der inneren Mitochondrienmembran wird als Mitochondrienmembranpotential (MMP) bezeichnet. Nach COSSARIZZA *et al.* (1996) beträgt das MMP bei funktionstüchtigen Mitochondrien - 180 bis - 200 mV. Diese so gespeicherte Energie wird für die ATP-Synthese verwendet, wobei sich über die Höhe des Mitochondrienmembranpotentials Rückschlüsse auf die Mitochondrienfunktion und den Energiestatus der Spermien ziehen lassen. Diese energetisch hochwertigen ATP-Moleküle werden fast ausschließlich für die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien benötigt (Gravance *et al.*, 2000). Die Motilität der Spermien ist daher in erster Linie von der Syntheseleistung der Mitochondrien abhängig (Auger *et al.*, 1989).

2.3. Wärmeregulation des Hodens

2.3.1. Physiologische Wärmeregulation des Hodens

Die physiologische Kerntemperatur im Hoden von Haussäugetieren und dem Menschen liegt um ca. 2,5-4,0 °C niedriger als die Körpertemperatur (Waites, 1970). Wie wichtig die Einhaltung dieses Temperaturunterschiedes ist, zeigen Untersuchungen bei Säugetieren an kryptorchiden Hoden, die morphologische und funktionelle Abweichungen aufweisen. Diese Veränderungen sind auf die intraabdominal herrschende höhere Temperatur zurückzuführen (Moore, 1923). Der anatomische Bau und die physiologische Umgebung des Hodens sind daher auch unter diesem Gesichtspunkt zu betrachten.

Mit Ausnahme von einigen wenigen Säugetieren, wie zum Beispiel Elefanten, Klippschliefer (Setchell and Miesusset, 1996), Wale (Rommel *et al.*, 1992; Rommel *et al.*, 1994) und Robben (Blix *et al.*, 1983; Rommel *et al.*, 1995), liegen bei den geschlechtsreifen Haussäugetieren die Hoden extraabdominal im sog. *Processus vaginalis*, einer Ausstülpung des Bauchfelles in der Leistengegend. Sie sind vor der Außenwelt geschützt durch den Hodensack, einer besonderen Modifikation des äußeren Integuments. Das Skrotum unterscheidet sich von der normalen

äußeren Haut durch verschiedene Eigenschaften: Einmal ist die dünne äußere Haut, *Cutis scroti*, im Gegensatz zur übrigen Körperhaut besonders reich an Talg- und Schweißdrüsen. Die folgende Hülle, eine muskulöselastische Schicht, *Tunica dartos*, enthält zahlreiche glatte Muskelfasern (Hartig, 1954). Das Fettgewebe, das vor Abkühlung schützt, fehlt im Skrotum völlig (Harrenstein, 1928). Im Vergleich zur restlichen Haut ist ein besonders ausgeprägter subepidermaler Lymphgefäßplexus vorhanden (Esser, 1932).

Bei exogener oder endogener Wärmeeinwirkung auf den Hodensack entspannt sich die *Tunica dartos* und die skrotale Oberfläche vergrößert sich, der Hoden sinkt in die tiefste Stelle des Hodensacks. Bei Kälteeinwirkung kommt es umgekehrt zu einer Verkleinerung des Skrotums, da die Kontraktion der *Tunica dartos* zu einer vielfachen Faltung des Hodensackes führt. Dies bewirkt eine geringere Wärmeabstrahlung, was durch die gleichzeitige reflektorische Kontraktion des *M. cremaster* unterstützt wird, indem der Hoden nahe an die Bauchwand herangezogen wird, so dass durch die Körperwärme ein Temperatenausgleich erfolgen kann (Hartig, 1954).

Auch die Blutversorgung spielt für die Wärmeregulation des Hodens eine entscheidende Rolle. Sie erfolgt hauptsächlich über die *Arteria spermatica interna* (Abb. 2). Dieses Gefäß gibt nach seiner Abzweigung aus der Aorta nur unbedeutende Seitenäste ab, so dass es fast ausschließlich der Versorgung von Hoden und Nebenhoden dient. Durch den *Descensus testicularum* erfährt dieses Gefäß eine ungewöhnliche Verlängerung, gleichzeitig aber auch eine entsprechende Verengung. Weiterhin bewirkt eine ausgeprägte Schleifenbildung der Arterie vor dem Herantreten an den Hoden eine zusätzliche Gefäßverlängerung. Diese Schleifenbildung führt zu einer Verlangsamung der Blutströmung und ermöglicht dadurch eine gewisse Wärmeregulation (Harrison and Weiner, 1949).

Die aus der Bauchaorta bzw. der *V. cava caudalis* entspringenden *Arteria* und *Vena testicularis* gelangen im gestreckten Verlauf zum *Anulus vaginalis* und treten in den Samenstrang ein. Die Arterie bildet in ihrem Verlauf zum Hoden im Samenstrang ein aus dicht beieinander liegenden Schlingen bestehendes konisches Rankenkonvolut (Abb. 2). Die Vene hingegen löst sich in ein dichtes Geflecht kleinerer Zweige auf, die die groben Schlingen der Arterie allseitig umspinnen. Die Gesamtheit dieses Venengeflechts wird als Rankengeflecht, *Plexus pampiniformis*, bezeichnet (Nickel, 1954). Am Hoden angelangt, vereinigt sich das Geflecht wieder zu größeren Venen; diese treten an die *Extremitas capitata* des Hodens heran.

Das Gegenstromsystem im *Plexus pampiniformis* ist wichtig für den Wärmeaustausch im Hoden. Dieses Rankengeflecht wirkt als Wärmeaustauscher, in dem das arterielle Blut abgekühlt wird. Dadurch kann auch bei hohen Umgebungstemperaturen ein Temperaturgradient zwischen Körperkern und Hoden aufrechterhalten werden (Coulter and Kastelic, 1994; Waites, 1970).

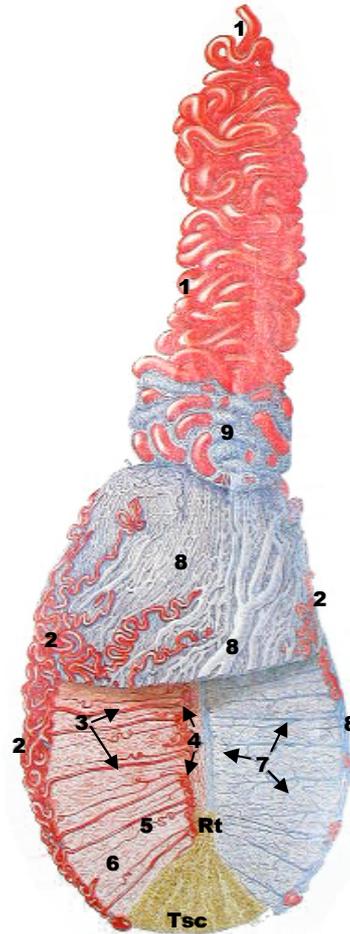


Abb. 2: Blutversorgung des Hodens eines Bullen. 1: *A. testicularis* als Rankenkonvolut; 2: Zweige der *A. testicularis* auf der Organoberfläche; 3: Zentripetalarterien; 4: Kmäuelbildung im *Meduastinum testis*; 5: Zentrifugararterien; 6: Kapillargebiet der *Tubuli seminiferi contorti*; 7: Zentrifugalvenen; 8: Venentapete an der Organoberfläche; 9: *Plexus pampiniformis*; Tsc: *Tubuli seminiferi contorti*; Rt: *Rete testis* (modifiziert nach Amselgruber and Sinowatz, 1987).

SETCHELL (1998) vermutet, dass unter dem Einfluss von Wärme durch reflektorische Innervation der äußerlichen Neurorezeptoren die skrotale Arterienerweiterung induziert wird. Diese Innervation führt zur Beseitigung des sympathischen vasokonstriktorisches Spannungszustandes und einer Zunahme der Durchblutung.

2.3.2. Einfluss der Hyperthermie auf die Samenqualität beim Bullen

Die im Vergleich zur Körpertemperatur um ca. 2,5-4,0 °C niedrigere Skrotaltemperatur, die Funktion des *M. cremaster* und die in den Sommermonaten schwankende Spermienqualität lassen vermuten, dass möglicherweise thermische Faktoren die Hodenfunktion beeinflussen (Coulter, 1988; Kraemer, 2000; Sinowatz, 2001). Eine Wärmebelastung des Hodengewebes hat erheblichen Einfluss auf die Spermienqualität und Fertilität (Setchell, 1998).

Um den Effekt höherer Temperatur auf die Spermienqualität zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt, wie z.B. die erhöhte Umgebungstemperatur, die lokale Wärmeapplikation durch den künstlich induzierten Kryptorchismus, Wärmezufuhr an die Hoden mittels Wasserbad oder Temperaturerhöhung durch eine Isolierung des Skrotums (Setchell, 1998).

Erhöhte Umgebungstemperatur

In frühen Untersuchungen (Cassady *et al.*, 1953; Skinner and Louw, 1966) zeigten sich bei Bullen, die einer erhöhten Umgebungstemperatur ausgesetzt gewesen waren, nach einer Woche morphologisch abnorme Spermien, größtenteils Krümmlinge und abgelöste Köpfe. Neben der Motilität ging zudem die gesamte Spermienanzahl als auch die Spermienkonzentration zurück. Diese Veränderungen konnten 40 bis 60 Tage nach dem Ende der Wärmeapplikation beobachtet werden.

Lokale Wärmeapplikation mittels Wasserbad

EL AZAB (1966) fand heraus, dass eine 1- bzw. 3-stündige Hodenerwärmung mittels eines Wasserbads von 43 °C nach der 3. Woche zu einer Vermehrung primärer Spermienanomalien und zwischen der 4. und 7. Woche zu einer Erhöhung des Anteils von Krümmlingen führte. Die Hodenerwärmung für 6, 12 und 18 Stunden hatte bereits am 9. Tag ein Ansteigen des Prozentsatzes von abgelösten Köpfen zur Folge. Außerdem wurde ab der 3. Woche nach der Behandlung eine Zunahme der primär missgebildeten Samenzellen beobachtet. 11 Wochen nach der Behandlung ging der Anteil der pathologischen Spermien auf die ursprünglichen Werte zurück. Ab der 3. Woche nach der Wärmeapplikation nahm die Spermienkonzentration ab, 9 Wochen nach der Applikation stieg die Dichte wieder kontinuierlich an. Nach einer 4,5-stündigen Hodenerwärmung mittels Wasserbad von 43 °C beobachtete WIDMANN (1974), dass es infolge dieser Wärmenoxe nach 20 Tagen zu einer Teratospermie kam.

Lokale Wärmeapplikation durch Isolierung des Skrotums

In den Versuchen von WILDEUS und ENTWISTLE (1983) und VOGLER et al. (1991; 1993) konnte nachgewiesen werden, dass eine 48-stündige skrotale Isolierung die Spermatogenese zu vorhersagbaren Zeitpunkten stört. Die Bezeichnung und Erscheinungszeit der Spermienanomalien waren (Tag 0 = Einleitung der Isolierung): abgelöste Köpfe, von Tag 6 bis Tag 30; abnorme Akrosomen, 12-27; abnorme Schwänze, 12-23; Diadem (Kopffdefekt; Sackbildung bei Invagination der Kernhüllen), 15-18; pyriform und nuclear vacuoles (Kopffdefekt), 15-21; Protoplasmatröpfchen, 17-23; und Dag-Defekt (Verbindungsstückdefekt des Schwanzes), 30. Außerdem fanden VOGLER et al. (1991), dass die Spermienanzahl nicht signifikant beeinflusst wurde und der Anteil der motilen Spermien ab Tag 15 abnahm. Im Gegensatz zu Nativsperma zeigte Tiefgefriersamen, der aus Ejakulaten zwischen Tag 3 und 9 nach der Wärmeapplikation stammte, einen geringeren Anteil motiler Spermien und solcher mit intaktem Akrosom. Daraus wurde geschlossen, dass die Wärmeeinwirkung am Hoden die Spermien im Nebenhodenkopf sowie die Spermatiden beeinflusst. Später entdeckte ACEVEDO (2001) bei einem ähnlichen 48-stündigen Hodenerwärmungsversuch durch skrotale Isolierung, dass auch eine hohe Korrelation zwischen den resultierenden Kopffdefekten der Spermien und den Veränderungen ihrer Chromatinstruktur besteht ($P \leq 0,01$).

Lokale Wärmeapplikation durch Isolierung des Samenstrangs

KASTELIC et al. (1995) beobachteten, dass auch eine 7-tägige Hyperthermie am flaschenhalsförmigen Samenstrang-Teil des Skrotums bei fünf Bullen zu Veränderungen der Spermienqualität führte. Ab Tag 5 bis 8 nach Versuchsbeginn war der Anteil der Spermien mit Mittelstückdefekt erhöht. Später, zwischen Tag 18 und 21, nahm der Anteil der Spermien mit Protoplasmatröpfchen und mit Kopfanomalien ebenfalls zu. Erst 35 Tage nach Erwärmung wies der Samen eine Qualität entsprechend der vor der Wärmeapplikation auf. Die Autoren schlossen daraus, dass Spermatiden im Verlauf der Spermiogenese und Spermatozoa im Nebenhoden am empfindlichsten auf erhöhte Temperatur reagieren.

Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur kann nicht ausgeschlossen werden, dass vielfältige physiologische, metabolische und endokrinologische Veränderungen im Organismus indirekt die Samenqualität beeinflussen (Setchell, 1998). Eine lokale Wärmeapplikation direkt am Hoden des Bullen mittels eines Wasserbades ist praktisch nur schwer durchführbar, da laut

EL AZAB (1966) über einen Zeitraum von 48 Stunden neben einer Fixation auch eine Sedation durchgeführt werden muss.

Im Vergleich zu einer 7-tägigen Hyperthermie am Samenstrang (Kastelic *et al.*, 1995) bietet die in dieser Arbeit gewählte 48-stündige skrotale Isolierung neben einem kürzeren Behandlungszeitraum und einem geringeren praktischen Aufwand auch die Gewähr einer systemischen Erwärmung des gesamten Skrotums (Acevedo, 2001; Vogler *et al.*, 1993; Vogler *et al.*, 1991; Wildeus and Entwistle, 1983).

2.4. Durchflusszytometrische Spermienuntersuchungen

Eine neue Methode, von der man sich wesentliche Fortschritte in Richtung einer objektiven Spermabeurteilung verspricht, ist die durchflusszytometrische Analyse der Spermien mit Hilfe unterschiedlicher Fluoreszenzfärbungen. Hierbei werden Spermien mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und in einen Flüssigkeitsstrom geleitet, der einem Laserstrahl ausgesetzt wird. Die von den einzelnen Zellen emittierten fluoreszierenden Signale werden von einem optischen System detektiert und in digitale Signale umgewandelt, die dann von einem Computer ausgewertet werden (Ballachey *et al.*, 1986).

Die Anfärbbarkeit von Spermien mit Fluoreszenzfarbstoffen liefert spezifische Informationen über den funktionalen Status der Zellen. Es lassen sich so z.B. die Integrität der Plasmamembran, der akrosomale Status, die Chromatinstruktur und das Mitochondrienmembranpotential der Spermien untersuchen.

Der Vorteil dieser neuen Technik liegt zum einen in der Analyse tausender Spermien innerhalb von Sekunden (Ballachey *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 1990; Stolla, 1984) und zum anderen in der höheren Sensitivität verglichen mit anderen Methoden (Magistrini *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1990). Auch lassen sich mit dieser Methode verschiedene Samenqualitätsparameter gleichzeitig bestimmen (Ballachey *et al.*, 1986).

2.4.1. Bestimmung der Plasmamembranintegrität mittels SYBR[®] 14 / PI - Färbung

SYBR[®] 14 und Propidiumjodid (PI) sind Fluoreszenzfarbstoffe, die an die DNA der Zellen binden. PI, ein nach optischer Laseranregung rotfluoreszierender Farbstoff (Excitation/Emission 488/617 nm), ist nicht membranpermeabel und färbt also nur Zellen mit geschädigter Plasmamembran (Garner *et al.*, 1994; Grogan and Collins, 1990; Harrison and Vickers, 1990). SYBR[®] 14 hingegen, ein grünfluoreszierender Farbstoff (Ex/Em 488/516 nm), kann die intakte Plasmamembran passieren und färbt deshalb alle Zellen unabhängig von dem funktionellen Zustand der Zellmembran. Mit Hilfe einer kombinierten Färbung mit SYBR[®] 14 und PI kann die Plasmamembranintegrität der Spermien durchflusszytometrisch bestimmt werden (Garner *et al.*, 1994). Spermien mit geschädigter Zellmembran werden mit PI angefärbt, wobei es an der DNA bereits gebundenes SYBR[®] 14 verdrängt. Nach Färbung mit SYBR[®] 14 und PI identifizierten GARNER und JOHNSON (1995) drei unterschiedlich angefärbte Spermienpopulationen: Spermien mit geschädigter Plasmamembran färben sich im Kopf rot, Spermien mit intakter Plasmamembran sind grün gefärbt und Spermien mit teilweise geschädigter Plasmamembran sind sowohl rot als auch grün angefärbt (Abb. 3).

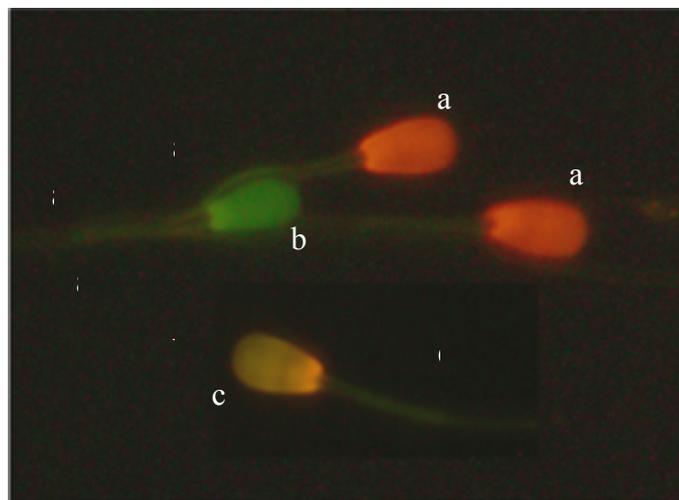


Abb. 3: Spermien nach SYBR[®] 14 / PI - Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Ölimmersion; Vergrößerung 1:1000). a: Spermien mit geschädigter Plasmamembran; b: Spermium mit intakter Plasmamembran; c: Spermium mit teilweise geschädigter Plasmamembran.

Die zweifarbigen Spermien wurden von GARNER und JOHNSON (1995) als moribund bezeichnet. Für die Auswertung wurden sie von den Autoren den Spermien mit geschädigter

Plasmamembran zugerechnet, da sie bereits erste Degenerationserscheinungen der Zellmembran zeigten.

Die Studie von GARNER *et al.* (1997) an aufgetautem Bullentiefgefriersperma ergab eine hohe Korrelation zwischen SYBR[®] 14 - positiven Spermien und dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien ($r = 0,97$; $p < 0,001$).

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

Nach BLOTTNER *et al.* (1998) ist eine selektive Fluoreszenzmarkierung des Akrosoms sehr gut mit Lektinen möglich, an die Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Fluorescence-Isothiocyanat (FITC) konjugiert sind. Dabei haben sich besonders Lektine von *Arachis hypogea* (peanut agglutinin, PNA) und *Pisum sativum* (PSA) bewährt. PNA zeigt eine selektive Bindung an die äußere Akrosomenmembran (Blottner *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1996; Cooper and Yeung, 1998; Gadella *et al.*, 2001; Mortimer *et al.*, 1987; Sirivaidyapong *et al.*, 2000). Die Zellmembran vitaler Spermien ist nicht durchlässig für FITC-PNA (Cheng *et al.*, 1996). SYTO[®] 17 (Em 634 nm) ist ein membranpermeabler Farbstoff, der sich, vergleichbar mit SYBR[®] 14, an die DNA anlagert. Daher färben sich Spermien mit intakter Plasmamembran und mit intaktem Akrosom mit SYTO[®] 17 an und emittieren nach Laseranregung Licht im orangen Bereich. Bei vitalen Spermien kommt es im Verlauf der Akrosomenreaktion zur sogenannten Vesikulation, wobei die Zellmembran und die äußere Akrosomenmembran miteinander verschmelzen. Diese Spermien zeigen zusätzlich zu der orangen Kernfärbung durch SYTO[®] 17 eine deutlich grün fluoreszierende Kopfkappe, da sich FITC-PNA (Ex/Em 495/518) an die äußere Akrosomenmembran binden kann. Davon zu unterscheiden sind die Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die, soweit sie noch Teile einer äußeren Akrosomenmembran besitzen, neben einer roten Kernfärbung (PI) eine grüne Fluoreszenz im Bereich der Kopfkappe aufweisen. Eine Dreifachfärbung an unfixierten Spermien mit anschließender durchflusszytometrischer Auswertung ermöglicht also die Unterscheidung zwischen vitalen Spermien mit Akrosomenreaktion und toten Spermien mit degeneriertem Akrosom (Thomas *et al.*, 1997). Somit lassen sich nach der Anwendung der FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI - Kombinationsfärbung vier verschiedene Spermienpopulationen unterscheiden (Rathi *et al.*, 2001): vitale Spermien mit intaktem Akrosom sind im Kern orange gefärbt, vitale Spermien mit Akrosomenreaktion sind im Kern orange und in der Kopfkappe grün angefärbt, tote Spermien mit Akrosomendegeneration

färben sich im Kern rot und am Akrosom grün an. Tote Spermien mit intaktem Akrosom färben sich nur mit PI an und fluoreszieren daher im Kopf nur rot (Abb. 4).

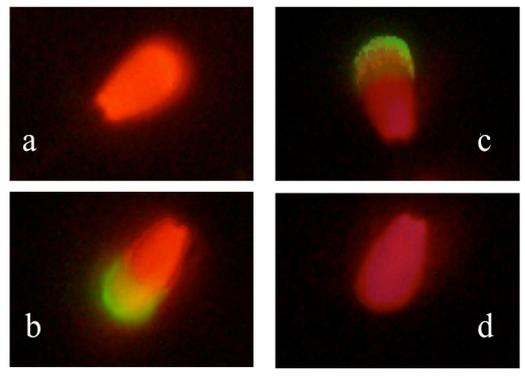


Abb. 4: Spermien nach FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI -Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Ölimmersion; Vergrößerung 1:1000). a: vitales Spermium mit intaktem Akrosom; b: vitales Spermium mit Akrosomenreaktion; c: totes Spermium mit Akrosomendegeneration; d: totes Spermium.

BERNDTSON et al. (1981) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Integrität der Akrosomen und der Motilität bei kryokonservierten Bullenspermien. Es zeigte sich zwar eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$) sowohl beim Vergleich zwischen den Bullen ($r = 0,33$) als auch beim Vergleich der Werte innerhalb der einzelnen Bullen ($r = 0,23$), die Korrelationskoeffizienten waren allerdings so niedrig, dass die Autoren daraus schlossen, dass zwischen den untersuchten Parametern keine direkte Abhängigkeit besteht und es nur zu kolinearen Veränderungen der beiden Parameter kommt. THOMAS et al. (1997) beurteilten den akrosomalen Status bei kryokonservierten Bullenspermien durchflusszytometrisch nach vier verschiedenen Akrosomenanfärbungen : LysoTracker Green DND-26 (LYSO-G), Acrosin/BIC, Acrosin/IgG und PNA-FITC. Sie fanden hohe Korrelationen zwischen der Akrosomenintegrität und der mikroskopisch beurteilten Motilität (LYSO-G: $r = 0,97$; Acrosin/BIC: $r = 0,89$; Acrosin/IgG: $r = 0,96$; PNA-FITC: $r = 0,95$).

2.4.3. Bestimmung der Chromatinstruktur mittels des Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA[™])

Mit Hilfe des SCSA[™] wird die Integrität der Spermienchromatinstruktur untersucht (Evenson *et al.*, 1991; Love and Kenney, 1998). Das Sperma wird hierzu zunächst mit einem stark sauren Medium ($pH = 1,2$) versetzt, um eine Denaturierung der DNA herbeizuführen. Die

Denaturierung führt teilweise zur Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküle in Einzelstränge. Das Ausmaß der provozierten Denaturierung hängt vom Grad der Chromatinintegrität der Spermien ab. Anschließend wird der metachromatische DNA - Farbstoff Akridinorange hinzugefügt. Doppelsträngige, also intakte DNA, zeigt eine grüne Fluoreszenz, während einzelsträngige Erbsubstanz rot fluoresziert (Evenson *et al.*, 1995; Evenson *et al.*, 1991). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die Intensität beider Fluoreszenzen für jedes Spermium bestimmt und nachfolgend der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) errechnet. Dieser Wert wird nach neuer Nomenklatur DNA-Fragmentationsindex (DFI) genannt (Evenson *et al.*, 2002). Er nimmt einen Wert zwischen 0 und 1 an. Anhand dieses Wertes lässt sich das Ausmaß der Denaturierung jedes einzelnen Spermiums quantifizieren. Je höher dieser Wert ist, umso mehr Spermien liegen mit teils einzelsträngiger beziehungsweise geschädigter DNA vor. Stellt man die Häufigkeitsverteilung der Spermien in Abhängigkeit ihrer DFI-Werte in einem Histogramm dar (Abb. 5), dann erkennt man in der Regel zwei verschiedene Spermienpopulationen. Neben der Hauptpopulation mit niedrigen DFI-Werten findet sich eine weitere Population mit höheren DFI-Werten, die nach EVENSON *et al.* (2002) als DFI-Spermien bezeichnet werden.

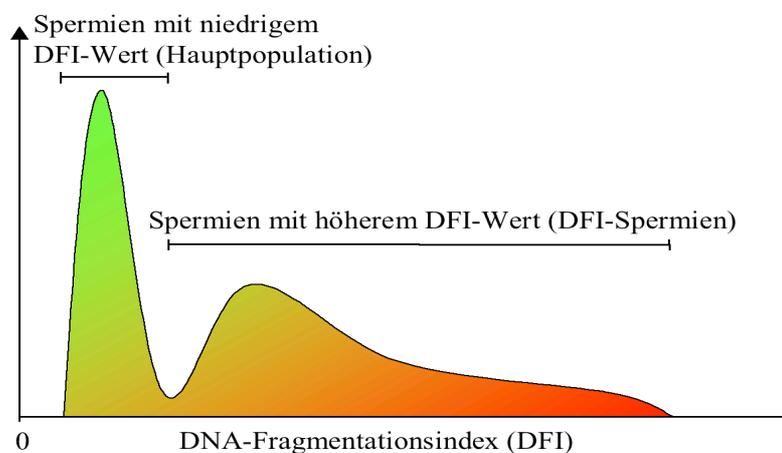


Abb. 5: Häufigkeitsverteilung der DFI-Werte. DFI: der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) (modifiziert nach EVENSON *et al.*, 2002).

In der Studie von JANUSKAUSKAS und RODRIGUEZ-MARTINEZ (1995) an kryokonserviertem Bullensperma wurden negative Zusammenhänge zwischen dem DFI-Mittelwert und dem prozentualen Anteil lebender Spermien ($r = -0,64$; $p < 0,001$) sowie zwischen der Standardabweichung (SD) und lebenden Spermien ($r = -0,59$; $p < 0,001$) ermittelt. Zusammenhänge zwischen der Integrität der Spermachromatinstruktur und der Fertilität wurden bei Eber (Evenson *et al.*, 1994), Hengst (Kenney *et al.*, 1995) und Bulle (Ballachey *et al.*, 1987; Ballachey *et al.*, 1988) beobachtet.

2.4.4. Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) mittels JC-1-Färbung

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 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 (MMP) 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 (Reers *et al.*, 1991; Smiley *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 unterscheiden (Cossarizza *et al.*, 1996) (Abb. 6).

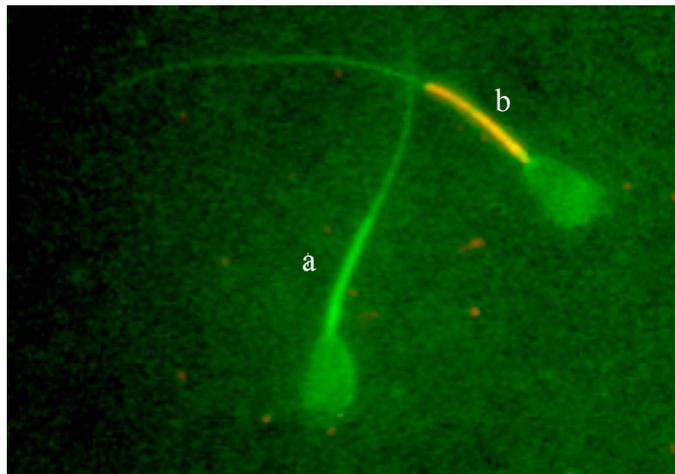


Abb. 6: Digitales Bild unter dem Fluoreszenzmikroskop nach JC-1-Färbung (Ölimmersion; Vergrößerung 1:1000). a: Spermium mit niedrigem MMP; b: Spermium mit hohem MMP.

GARNER *et al.* (1997) fanden bei kryokonservierten Bullenspermien hohe Korrelationen zwischen dem mit JC-1 bestimmten MMP und der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien ($r = 0,97$; $p < 0,001$). 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 plasmamembranintakt eingestuft wurden ($r = 0,99$; $p < 0,001$). Neuere Untersuchungen dieser Autoren (Garner *et al.*, 2001) bestätigen dieses Ergebnis ($r > 0,84$; $p < 0,05$).

2.5. Computergestützte Spermienuntersuchungen

2.4.5. Computergestützte Motilitätsanalyse

Mitte der achtziger Jahre wurde die computerassistierte Spermienanalyse (CASA) zur objektiven Untersuchung der Spermienmotilität eingeführt (Blach *et al.*, 1989; Jasko *et al.*, 1988; Schroepfel, 1988). Neben der hohen Zuverlässigkeit 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), ein weiterer Vorteil. Hierbei werden mit Hilfe einer Videosequenz des zu untersuchenden Spermias mit variierender Frequenz Einzelbilder angefertigt, auf denen die Bewegung der einzelnen Spermatozoen mittels Computerprogramm ausgewertet wird. Mehrere Geschwindigkeits- und Richtungsparameter werden dabei erhoben (Katz *et al.*, 1985).

Im Vergleich zur konventionellen Motilitätseinschätzung sehen MALMGREN *et al.* (1997) in der computergestützten Methode eine Möglichkeit, eine bessere Aussage hinsichtlich der Fertilität zu erhalten. In der Literatur gibt es unterschiedliche Aussagen, die von keiner Korrelation der Motilität zur Fertilität (Ericsson *et al.*, 1993; Hirai, 2000) bis zu einer hohen Korrelation ($r = 0,54$) reichen (Gschwend, 1986). In der Studie von ERICSSON *et al.* (1993), die Bullenspermien mit Carboxydimethylfluoreszeindiazetat (CDMFDA) und Rhodamin 123 anfärbten und so simultan die Integrität der Plasmamembran und das MMP beurteilten, fanden sich gute Zusammenhänge zwischen den Spermien mit intakter Plasmamembran und gleichzeitig hohem MMP und der Motilität ($r = 0,78$; $p < 0,05$).

2.4.6. Computergestützte Morphometrie

Neben der üblicherweise verwendeten Methode der subjektiven Beurteilung der Morphologie der Spermien wurde in den letzten Jahren die computergestützte Morphometrie entwickelt (Davis *et al.*, 1992; Garrett and Baker, 1995; Kruger *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1996; Perez-Sanchez *et al.*, 1994). Mit dem Ziel, die bei der morphologischen Spermauntersuchung bisher stets vorhandene Subjektivität zu reduzieren, entwickelten verschiedene Hersteller unterschiedliche Auswertungssysteme. Diese wurden bisher hauptsächlich im human-

medizinischen Bereich erprobt, jedoch fanden im tiermedizinischen Bereich ebenfalls einzelne Anwendungsversuche bei Ratten (Davis *et al.*, 1994), bei Kaninchen (Gravance and Davis, 1995), beim Eber (Hirai, 2000), beim Hengst (Davis *et al.*, 1993; Uhlenbrock, 1999) und beim Bullen (Hirai, 2000; Rasshofer, 1998; Sailer *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997) statt. Die voll-automatischen Systeme werden dadurch charakterisiert, dass der Computer die Objektträger eigenständig absucht und dabei die Basisparameter (Fläche, Länge, Breite, Umfang des Spermienkopfes) anhand ihres Grauwertes und ihrer Pixelgröße bewertet.

In den Studien von KRUGER *et al.* (1993; 1995) korrelierten bei der morphologischen Spermienuntersuchung die subjektive (manuelle) und die computergestützte Methode miteinander. Jedoch ist bei der computergestützten Spermienmorphometrie besonders auf die methodischen Komponenten zu achten, welche die Dimension des Spermienkopfes beeinflussen können. OMBELET *et al.* (1995) nennen folgende Faktoren: 1. Herstellung und Färbung der Ausstriche; 2. optische Ausstattung und Vergrößerung des Lichtmikroskops; 3. Qualität der Videokamera; 4. Bildgröße (Pixelanzahl) der Bildumwandlungskarte; 5. Bildverarbeitungstechnik und in besonderem Maße 6. Definitionen der metrischen Daten abhängig vom Klassifikationssystem. Jeder dieser Faktoren beeinflusst die Ergebnisse. In den Studien von RASSHOFER (1998) und UHLENBROCK (1999) war eine automatische Ermittlung morphometrischer Kriterien für Spermienanomalien beim Bullen und Hengst mit der zur Verfügung stehenden Software (Metrix, Version 10.7B) nicht möglich. Bei einer Überprüfung der Zuverlässigkeit des Systems, verglichen mit einer subjektiven Auswertung durch einen geübten Untersucher, erbrachte die subjektive Beurteilungsmethode überraschenderweise bessere Ergebnisse.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Die Untersuchungen über die Auswirkungen einer lokalen Hodenerwärmung auf die Spermaqualität wurden bei vier Bullen zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen Februar bis September 2002 durchgeführt. Während des Untersuchungszeitraumes, der sich von Tag 7 vor der lokalen Hodenerwärmung bis zum 83. Tag nach der Wärmeapplikation erstreckte, wurden die Hoden der Versuchstiere sonographisch untersucht und verschiedene Samenuntersuchungen vorgenommen. In dem Zeitraum von Tag -7 bis zum Tag 61 wurde von den Bullen dreimal pro Woche ein Ejakulat und in dem verbleibenden Zeitraum noch einmal pro Woche ein Ejakulat gewonnen, untersucht und verarbeitet. Jedes Ejakulat wurde sowohl konventionell, als auch mit der computergestützten Durchflusszytometrie analysiert und beurteilt. Am Tag 0 wurde anschließend an die Samengewinnung mit der 48-stündigen Wärmeapplikation am Hoden begonnen (Abb. 7).

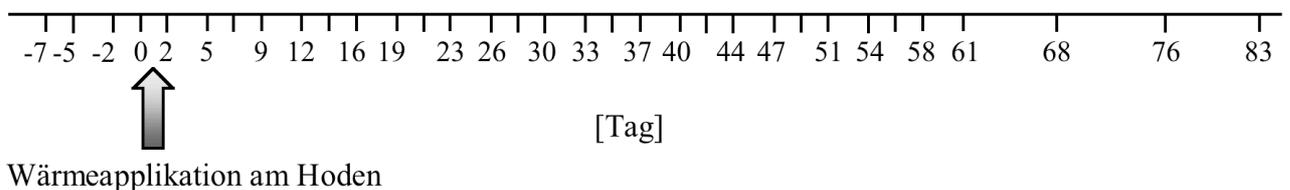


Abb. 7: Zeitpunkte der Spermagewinnung und -untersuchung vor (-) und nach lokaler Wärmeapplikation (Tag 0 bis Tag 83) am Hoden.

3.2. Untersuchte Tiere und Samengewinnung

Für den Versuch wurden vier klinisch gesunde Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 18-29 Monaten herangezogen. Diese Bullen hatten eine Spermaqualität mit mehr als 80% morphologisch normalen und mindestens 70% vorwärtsbeweglichen Spermatozoa. Während des Versuchszeitraumes wurden die Bullen in einem Stall in Anbindehaltung gehalten. Zur Gewinnung der Ejakulate wurde eine künstliche Vagina der Firma Minitüb verwendet, wobei jeweils ein anderer Bulle als Deckpartner diente.

3.3. Lokale Wärmeapplikation am Hoden

Um den ganzen Hoden und den Hodenhals zu isolieren, wurde das Skrotum mit einem wasserdichten, wattierten Nylonbeutel umschlossen. Der Nylonbeutel wurde für 48 Stunden befestigt. Um eine Verlagerung des Nylonbeutels möglichst gering zu halten, wurde dieser mit Hilfe von Gurten und medizinischen Bändern fixiert (Abb. 8). Die oberflächliche skrotale Temperatur wurde mit Hilfe einer Temperatursonde alle 2 Stunden gemessen.



Abb. 8: Lokale Hodenerwärmung mittels eines Nylonbeutels.

3.4. Konventionelle Spermaanlyse

Nach Gewinnung der Ejakulate wurden Volumen, Wolkenbildung, Farbe, Beimengungen und Konsistenz der Spermaprobe makroskopisch untersucht. Die Samenkonzentration wurde mit Hilfe eines Photometers der Firma Minitüb (SDM4) bestimmt.

Zur Beurteilung der Morphologie und des Anteiles toter Spermien im Ejakulat wurde ein Ausstrich mit Bromphenolblau-Nigrosin erstellt. Es wurden jeweils 300 Spermien mittels Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung ausgezählt und bewertet. Wie bereits in dem von LEIDL et al. (1971) aufgestellten Klassifizierungsschema wurde zwischen primären und sekundären Anomalien unterschieden. Zu den primären Anomalien gehören Missbildungen des Kopfes, des Mittelstückes und des Schwanzes. Abgelöste Köpfe, Kopfkappen und Krümmlinge zählen zu den sekundären Anomalien. Weiterhin wurden Spermien mit distalem und proximalem Zytoplasmatröpfchen unterschieden.

3.5. Durchflusszytometrische Spermauntersuchung

Die Untersuchungen zur Überprüfung der Membranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials, der Akrosomenintegrität und die Bestimmung der Chromatinstruktur der Spermien wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren unter Verwendung spezifischer Färbemethoden durchgeführt.

3.5.1. Geräte und Geräteeinstellungen

Für die Untersuchungen wurde das 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), FL-2 (585/42 nm) und FL-3 (650LP nm). Für die Datenanalyse war ein Power Mac G4-Computer (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 1). Die Geräteeinstellungen wurden bei der SCSA™ entsprechend den Angaben von EVENSON und JOST (2000) zu Beginn einer jeden Messreihe neu vorgenommen und nach jeder zehnten Probe überprüft (siehe Anhang 1).

3.5.2. SYBR® 14 / PI-, JC-1- und FITC-PNA / SYTO® 17 / PI – Färbung, Messung, Auswertung

Vor der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die frisch gewonnenen Ejakulate mit dem kommerziell vertriebenen Verdüner Biociphos Plus® (Fa. IMV Technologies, France) verdünnt. Die Konzentration des Frischspermas wurde dabei auf 20×10^6 Spermien / ml eingestellt. Bei allen durchflusszytometrischen Analyseverfahren wurden 10.000 Spermien pro Probe analysiert.

Für die Färbungen wurde das Frischsperma nach Verdünnung mit Tyrode-Medium (siehe Anhang 2) auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Spermien / ml gebracht. Bei jedem Test wurden 500 μ l der Spermaproben verwendet. Für die Untersuchung der Plasmamembranintegrität wurden jeweils 5 μ l SYBR[®] 14 (10 μ M) und PI (0,3 mM) vom LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit der Fa. Molecular Probes (Katalog-Nr.: L-7011) und zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials 10 μ l JC-1 (0,153 mM) von Molecular Probes (Katalog-Nr.: T-3168) zugesetzt. Um die Akrosomenintegrität zu untersuchen, wurden 500 μ l der Spermaprobe mit 2 μ l SYTO[®] 17 (0,5 mM) von Molecular Probes (Katalog-Nr.: S-7579), 3 μ l PI (2,99 mM) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr.: P-4170) und 5 μ l FITC-PNA (100 μ g/ml Aqua dest.) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr.: L-7381) gemischt.

Die Proben wurden im abgedunkelten Raum 15 Minuten bei 37°C in einem Thermostat (Typ 5320, Fa. Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden sie im Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von 150 bis 300 Spermien pro Sekunde gemessen. Für die SYBR[®] 14/PI- und FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI-Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Für die JC-1-Färbung wurde anstelle des FL-3 der Filter FL-2 für die orange Fluoreszenz herangezogen.

Die Auswertungen wurden nach dem bei KRIENKE (2003) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Bei der SYBR[®] 14/PI-Färbung wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit hoher Intensität der Grünfluoreszenz (Abb. 9) und bei der JC-1-Färbung der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhter Orangefluoreszenz (Abb. 10) bestimmt. Bei der Auswertung nach der FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI-Färbung (Abb. 11) wurden die Spermienköpfe zum einen hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, zum anderen hinsichtlich der Unversehrtheit des Akrosoms in vier verschiedene Populationen eingeteilt. Die Eingrenzungen der einzelnen Spermienpopulationen erfolgte subjektiv mit Hilfe des Analyseprogramms Cellquest[™] (Fa. Becton Dickinson).

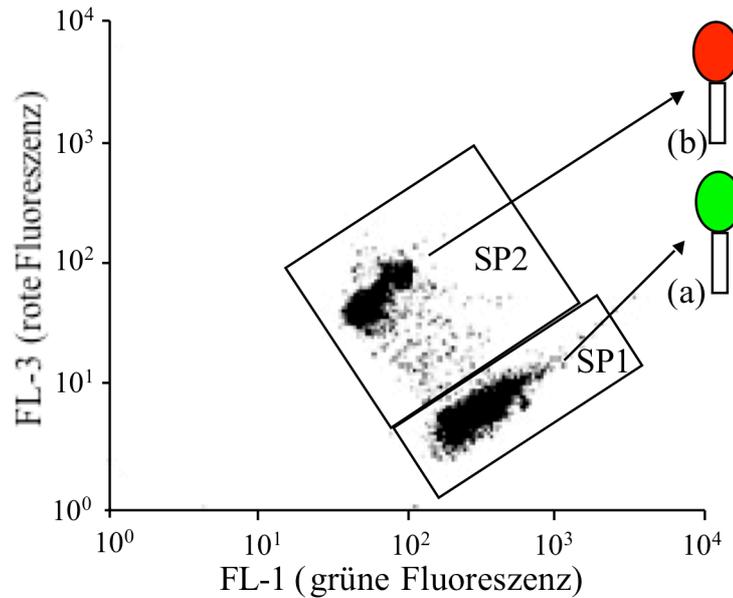


Abb. 9: Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP1, SP2) nach SYBR[®]14/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse (Ausdruck des Computerbildes; SP1 = Population der Spermien mit intakter Plasmamembran; SP2 = Population der Spermien mit geschädigter Plasmamembran). Schematische Darstellung von Kopf und Mittelstück der Spermien (a) mit intakter Plasmamembran (grüne Fluoreszenz) und (b) mit geschädigter Plasmamembran (rote Fluoreszenz) nach SYBR[®]14/PI-Färbung.

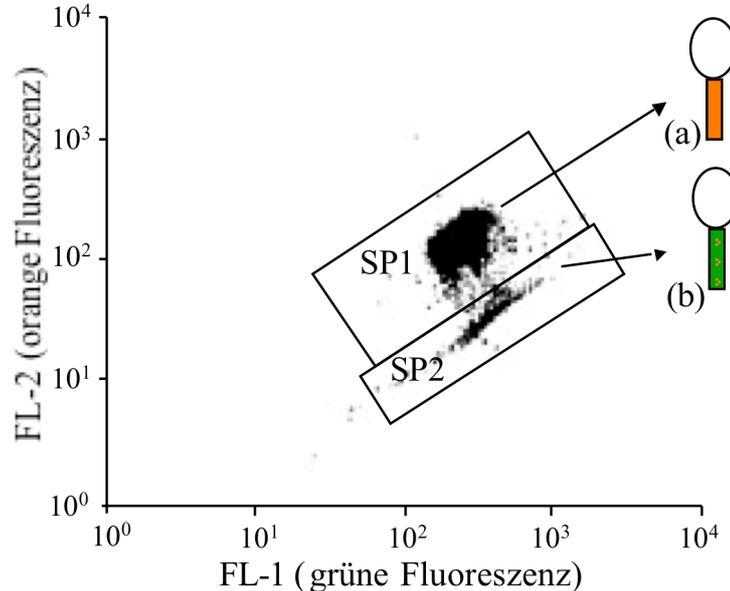


Abb. 10: Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP1, SP2) nach JC-1-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = Population der Spermien mit hohem MMP; SP 2 = Population der Spermien mit niedrigem MMP). Schematische Darstellung der Spermien (a) mit hoher Orangefluoreszenz im Mittelstück, d.h. mit hohem MMP und der Spermien (b) mit niedriger Orangefluoreszenz im Mittelstück bzw. mit niedrigem MMP nach JC-1-Färbung.

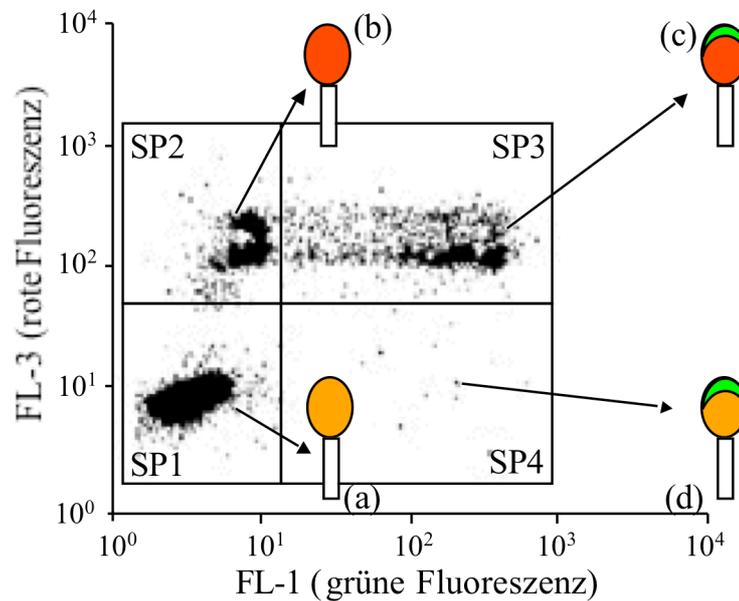


Abb. 11: Punktwolkendiagramm der 4 Spermienpopulationen (SP1, SP2, SP3, SP4) nach FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung (Ausdruck des Computerbildes; SP1 = Population der plasmamembranintakten Spermien mit intaktem Akrosom; SP2 = Population der membrangeschädigten Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms; SP3 = Population der membrangeschädigten Spermien mit geschädigtem Akrosom; SP4 = Population der plasmamembranintakten Spermien mit geschädigtem Akrosom). Schematische Darstellung der orange angefärbten plasmamembranintakten Spermien mit intaktem Akrosom (a), der rot angefärbten plasmamembrangeschädigten Spermien mit intaktem Akrosom (b), der rot angefärbten plasmamembrangeschädigten Spermien mit grün angefärbtem geschädigtem Akrosom (c) und der orange angefärbten plasmamembranintakten Spermien mit grün angefärbtem Akrosom (d) nach FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI-Färbung.

3.5.3. Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA[™])

Für die SCSA[™] wurde mit Biociphos Plus auf 20×10^6 Spermien / ml verdünntes Sperma in 0,50 ml Besamungspailletten bis zur Durchführung der SCSA[™] in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bei der Durchführung der SCSA[™] erfolgte die Probenaufbereitung und Messung nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000). Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Für die computergestützte Bestimmung der Messdaten wurde die in die Auswertung eingehende Spermienpopulation eingegrenzt (Abb. 12).

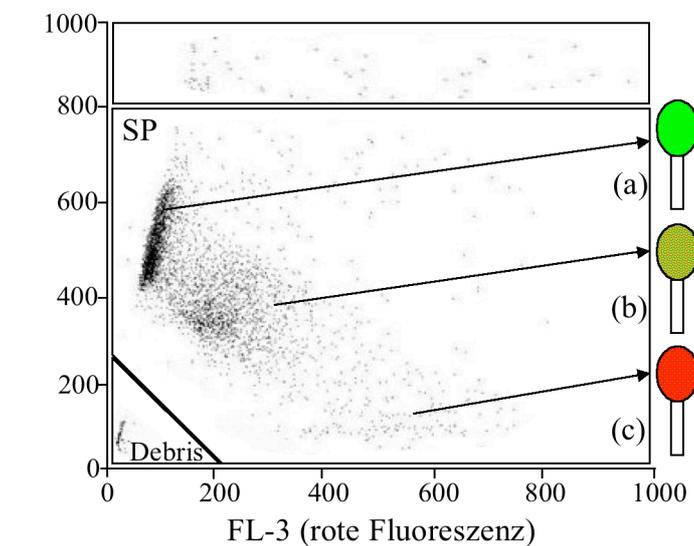


Abb. 12: Punktwolkendiagramm bei der durchflusszytometrisch durchgeführten Spermachromatinstrukturanalyse (SP = Spermienpopulation). Schematische Darstellung der Spermien mit grüner Fluoreszenz (a), d.h. doppelsträngiger DNA und Spermien mit erhöhter Rotfluoreszenz (b, c), d.h. mit vermehrt vorkommender einzelsträngiger DNA nach der SCSA™.

Wie in Kapitel 2.4.3. beschrieben, wurde für jedes einzelne Spermium der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) ermittelt und nach EVENSON und JOST (2000) als DFI (DNA-Fragmentationsindex) bezeichnet. Alle DFI-Werte der analysierten Spermien einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm (siehe Abb. 5) 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.

3.6. Computergestützte Spermauntersuchung

3.6.1. Geräte

Aufnahmeeinheit

- Mikroskop, Optiphot mit Objektiv Ph2 Plan 20 BM, Phasenkontrastkondensator (Fa. Nikon), eingebauter Heiztisch, HT 100 bzw. HT 200 (Fa. Minitüb)
- Videokamera CCD Color Camera Model ICD-700PDC (Fa. IPPI GmbH)
- Titelgenerator, VTW-100 (Fa. FOR.A Co LTD, Tokyo, Japan)
- Schwarz-Weiß-Monitor, TC 1910X (Fa. RCA)
- Videorekorder, AG-7330 (Fa. Panasonic)
- Videokassetten, S-VHS SE-120 Pro (Fa. Fuji)
- Zählkammer nach Makler (Fa. Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel)

Auswerteeinheit

- Personal-Computer, Computer ARTIST P200MHz
- Monitor Multiscan 200sf CPD-200SFT (Fa. Sony)
- Schwarz-Weiß-Monitor, WV-5350 (Fa. Panasonic)
- Videorekorder, AG-5700 (Fa. Panasonic)
- Software: Cell Motion Analyser V.2.0 (Fa. MTM Medical Technologies Montreux SA, Clarens/Montreux)

3.6.2. Funktionsweise und Einstellung

Die computergestützte Bestimmung der Motilität wurde nach dem bei HAKE (2001) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Die Proben (nach der Samengewinnung mit Biociphos Plus[®] auf 20×10^6 Spermien / ml verdünntes Sperma) wurden vor der Videoaufnahme auf 37°C erwärmt. Abweichend zu den Darstellungen bei HAKE (2001) wurden von insgesamt vier Tropfen (je 4 µl) jeweils 3 Blickfelder aufgenommen. Die Grenze für immobile Objekte lag bei

30 $\mu\text{m/s}$ (s. Anhang 3: Einstellungsparameter für computergestützte Motilitätsanalyse). Folgende Motilitätsparameter wurden bestimmt:

- der Prozentsatz aller motiler Spermien,
- der Prozentsatz linear motiler Spermien innerhalb der motilen Spermien.

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistikprogramme StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary/North Carolina, 1998) und SPSS 11.0.1 (SPSS GmbH Software München/Deutschland). Es wurden Mittelwerte, Standardfehler, Varianzanalysen (Cell line Modell), ANOVA (Analysis of Variance) und Korrelationen mit Fischer's r to z berechnet. Die nichtparametrischen Tests nach Fischer's PLSD vom Post-hoc Test und das lineare Regressionsmodell wurden ebenfalls angewendet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Umgebungs- und skrotale Oberflächentemperatur während des Versuchs

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die während des Versuchszeitraums ermittelten Umgebungstemperaturen sowie die erzielten skrotalen Oberflächentemperaturen.

Tab. 1: Jahreszeitraum und Umgebungstemperaturen während des Versuches und skrotale Oberflächentemperatur vor und während der 48-stündigen Wärmeapplikation am Hoden mittels der skrotalen Isolierung.

	Bulle 1	Bulle 2	Bulle 3	Bulle 4
Jahreszeit des Versuches (WF/FS)	27.02. - 27.05. (WF)	06.03. - 03.06. (WF)	29.05. - 27.08. (FS)	05.06. - 03.09. (FS)
UT während des Versuches	-4 bis 27	-4 bis 27	9 bis 32	9 bis 32
SOT vor der WA	27,6	27,9	28,8	29,1
SOT während der WA (min./max.)	33,2 / 34,0	33,4 / 34,2	35,1 / 35,9	35,3 / 36,0
maximale Temperaturerhöhung während der WA	+6,4	+6,3	+7,1	+6,9
UT während der WA (min./max.)	-2 / 8	1 / 9	15 / 22	15 / 24

WF/FS: Winter bis Frühling/Frühling bis Sommer; UT: Umgebungstemperatur (°C);
SOT: skrotale Oberflächentemperatur (°C); WA: Wärmeapplikation;
min./max.: minimal/maximal

Bei den Bullen 1 und 2 (Versuchszeitraum von Winter bis Frühling) wurde während der Hodenerwärmung die skrotale Oberflächentemperatur um maximal 6,4 bzw. 6,3 °C erhöht. Im Versuchszeitraum von Frühling bis Sommer (Bullen 3 und 4) betrug bei deutlich höherer Umgebungstemperatur (Maxima bis 24 °C) die maximale Temperaturerhöhung während der Wärmeapplikation 7,1 bzw. 6,9 °C.

4.2. Einfluss der Hyperthermie auf konventionelle Spermaparameter

4.2.1. Gesamtspermienanzahl und Konzentration der Spermatozoa

Die Gesamtspermienanzahl und Spermakonzentration zeigten bei den Bulle 1, 3 und 4 einen ähnlichen Verlauf. Ab Tag 12 nach der Wärmeapplikation am Hoden kam es zu einem deutlichen Rückgang in der Gesamtspermienanzahl in den Ejakulaten und in der Spermakonzentration (Abb. 13). Minimale Werte der Gesamtspermienanzahl als auch der Spermakonzentration wurden bei Bulle 1 und 4 am Tag 30, bei Bulle 3 am Tag 28 festgestellt. Danach kam es bei diesen Tieren zu einem Wiederanstieg der Spermakonzentration. Die Gesamtspermienanzahl stieg ebenfalls bis ca. Tag 40 deutlich bei Bulle 1 und 4, weniger ausgeprägt und mit Tag 37 auch etwas früher, bei Bulle 3. Daran anschließend kam es zwischen Tag 42 und 51 zu einem erneuten Abfall beider Parameter mit Minimumwerten, die mit denen des ersten Abfalls am Tag 30 vergleichbar waren.

Bei Bulle 2 gab es nach der Wärmeapplikation nur geringe Veränderungen in der Gesamtspermienanzahl. Die Spermakonzentration wies, vergleichbar den Bulle 1, 3 und 4, Minima am Tag 30 und Tag 51 auf.

Ab dem Tag 68 bis zum Tag 83 zeigten alle Bullen wieder eine kontinuierliche Zunahme der Gesamtspermienanzahl und der Spermakonzentration.

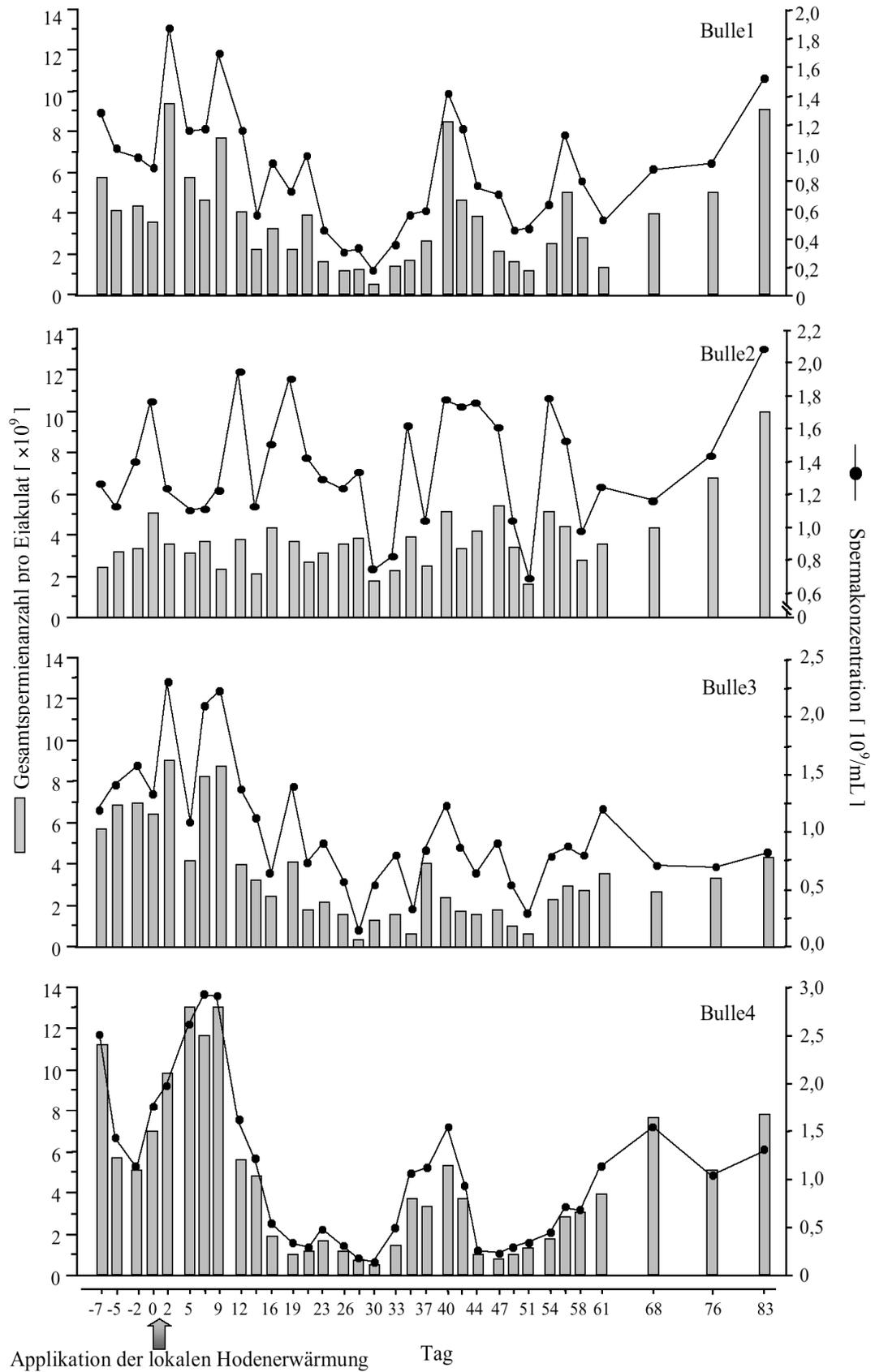


Abb. 13: Spermienanzahl und Spermakonzentration bei den Bullen 1, 2, 3 und 4 vor und nach der 48-stündigen Wärmeapplikation am Hoden.

4.2.2. Vitalität der Spermien

Die Spermiovitalität aller Bullen, gemessen am Prozentsatz ungefärbter Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, war 12 Tage nach der testikulären Erwärmung durch eine signifikante Abnahme ($p < 0,0001$) gegenüber den Werten vor der Wärmeapplikation gekennzeichnet (Abb. 14). Der Anteil lebender Spermien fiel von 86,3% bis 89,3% auf durchschnittlich 35,6% am Tag 19 ab. Danach stiegen die Werte bis Tag 33 wieder an. Ab Tag 35 gab es erneut bis zum Tag 37 eine Abnahme der Vitalität. Erst nach Tag 42 erreichten die Werte wieder das Ausgangsniveau.

Innerhalb der Bullen unterschieden sich die Werte der Spermiovitalität von Tag 12 bis Tag 40 (Abb. 14 Ausschnitt) signifikant ($p < 0,05$). Hierbei war der Abfall der Spermiovitalität, gemessen am Anteil lebender Spermien, bei den Bullen 3 und 4, bei denen eine maximale Temperaturerhöhung des Skrotums von 7,1 und 6,9 °C erreicht wurde, stärker und länger andauernd als bei den Bullen 1 und 2. Bei diesen hatte die maximale Temperaturerhöhung 6,4 bzw. 6,3 betragen (Tab. 1.).

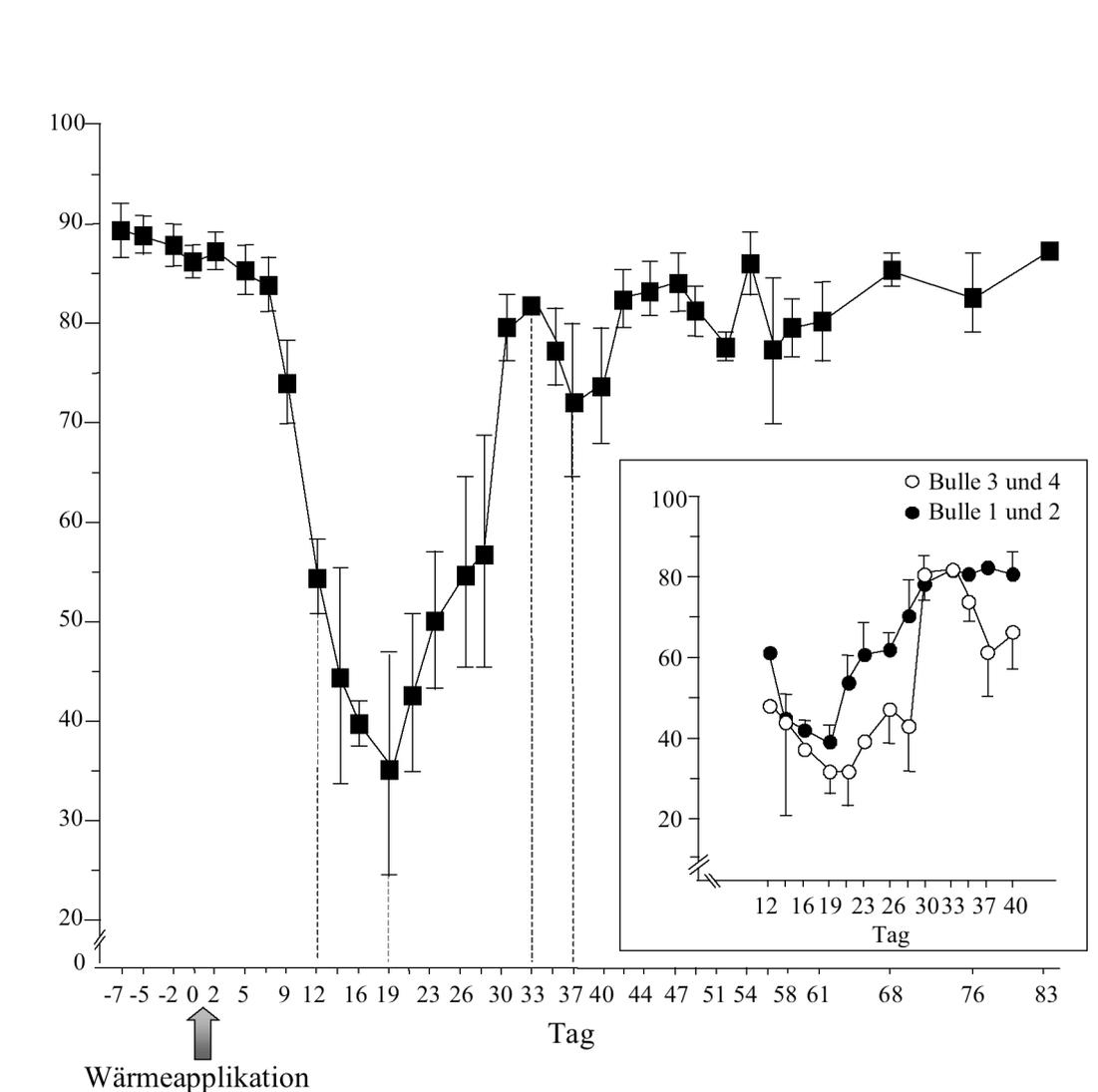


Abb. 14: Vitalität der Spermien (Anteil ungefärbter Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung) vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).
Ausschnitt: Vitalität der Spermien von Bullen mit Temperaturerhöhung um 7,1 bzw. 6,9 °C (Bulle 3 und 4) und von Bullen mit Temperaturerhöhung um 6,4 bzw. 6,3 °C (Bulle 1 und 2) zwischen Tag 12 und 40.

4.2.3. Morphologische Veränderungen der Spermien

Die gemittelten prozentualen Anteile an primären (Kopf-, Mittelstück- und Schwanzanomalien) und sekundären Anomalien (abgelöste Köpfe und Krümmlinge) an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung sind in Abb. 15 dargestellt. Ab Tag 9 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der sekundären Anomalien verglichen mit den Werten vor der Hodenerwärmung ($p < 0,005$). Ab Tag 14 erreichte der prozentuale Anteil an sekundären Anomalien seinen Maximalwert. Der prozentuale Anteil an primären Anomalien war ab Tag 16

nach der Hodenerwärmung signifikant erhöht ($p < 0,05$) und erreichte am Tag 23 sein Maximum. Danach kam es zu einem stetigen Rückgang der Anomalienrate. Ab Tag 42 lagen die prozentualen Anteile der morphologisch anomalen Spermien nicht signifikant über den Werten vor der Hodenerwärmung.

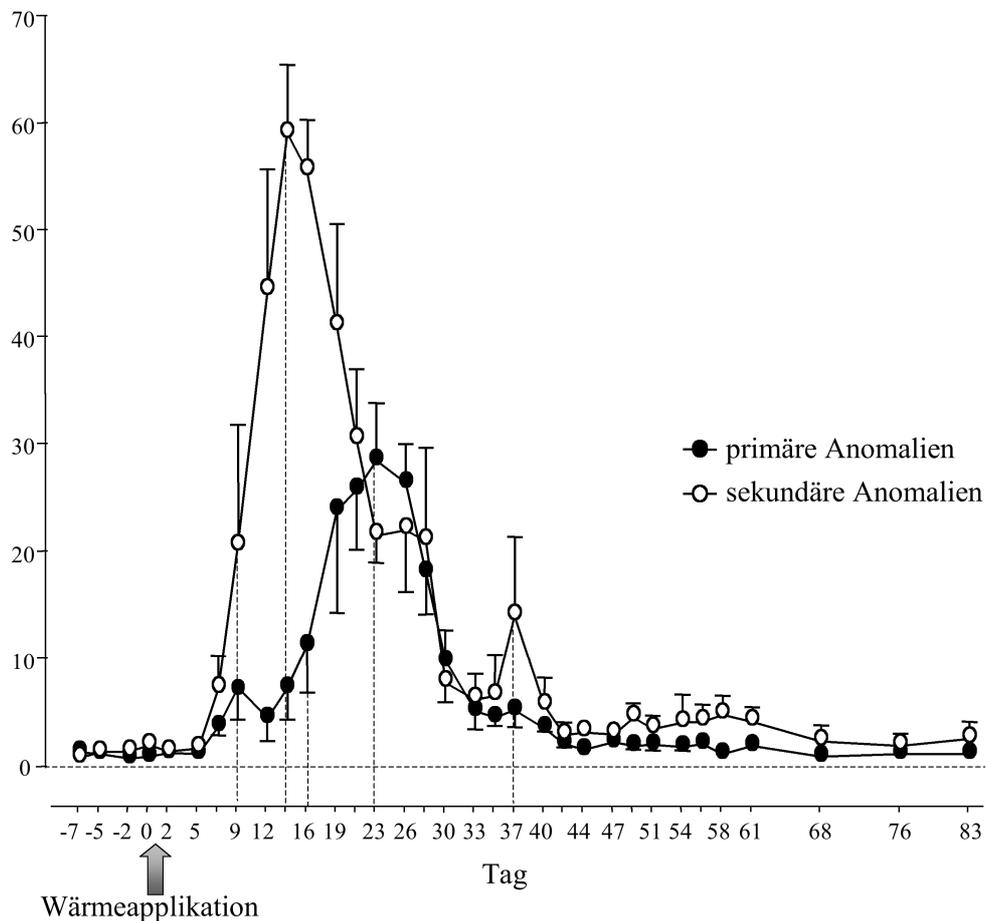


Abb. 15: Anteil der primären und sekundären Spermienanomalien vor und nach 48-stündiger Hodenerwärmung an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, $n = 4$ Bullen).

4.2.3.1. Häufigkeit primärer Anomalien

Bei getrennter Auswertung der Häufigkeit der verschiedene Formen von primären Spermienanomalien zeigte sich schon 7 Tage nach Beginn der 48-stündigen Wärmeapplikation ein signifikanter Anstieg der Schwanzanomalien ($p < 0,05$), während der prozentuale Anstieg von Kopfanomalien erst ab Tag 12 ($p < 0,005$) mit einem Maximum am Tag 23 zu beobachten war (Abb. 16). Prozentuale Anteile wie vor der Wärmeapplikation wurden ab Tag 12 bei den Schwanzanomalien bzw. Tag 33 bei den Kopfanomalien erreicht.

Innerhalb der Bullen unterschied sich der Verlauf im Anteil von Kopfanomalien ab Tag 12 bis Tag 28 (Abb. 16 Ausschnitt) signifikant ($p < 0,05$). Hierbei war der Anstieg der Kopfanomalien bei den Bullen mit maximaler Temperaturerhöhung von 7,1 und 6,9 °C (Bulle 3 und 4) höher als bei den Bullen 1 und 2.

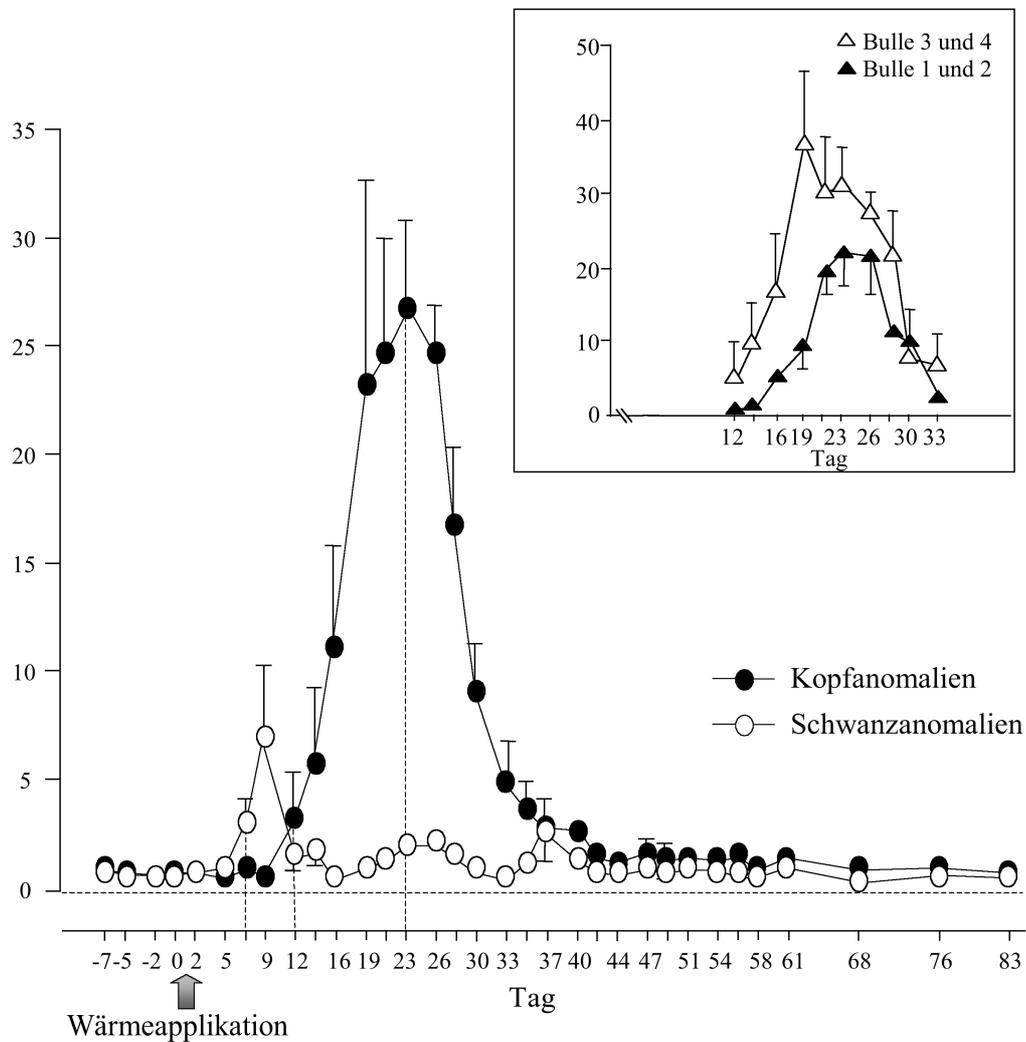


Abb. 16: Anteil von primären Kopf- und Schwanzanomalien an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, $n = 4$ Bullen) vor und nach der 48-stündigen Wärmeapplikation.

Ausschnitt: Anteil der Kopfanomalien von Bullen mit Temperaturerhöhung um 7,1 bzw. 6,9 °C (Bulle 3 und 4) und von Bullen mit Temperaturerhöhung um 6,4 bzw. 6,3 °C (Bulle 1 und 2) zwischen Tag 12 und 33.

4.2.3.2. Häufigkeit sekundärer Anomalien

Unter den sekundären Spermienanomalien, die nach testikulärer Wärmeapplikation zu beobachten waren, dominierten abgelöste Köpfe (Abb. 17). Ab Tag 9 stieg ihr Anteil signifikant an ($p < 0,05$). Am Tag 14 wurden Maximalwerte erreicht. Ab Tag 40 normalisierten sich die Werte auf das Ausgangsniveau. Der prozentuale Anteil der Krümmlinge nahm zwischen Tag 7 und 9 ($p < 0,05$) und am Tag 37 ($p < 0,005$) signifikant, insgesamt gesehen aber nur geringgradig, zu.

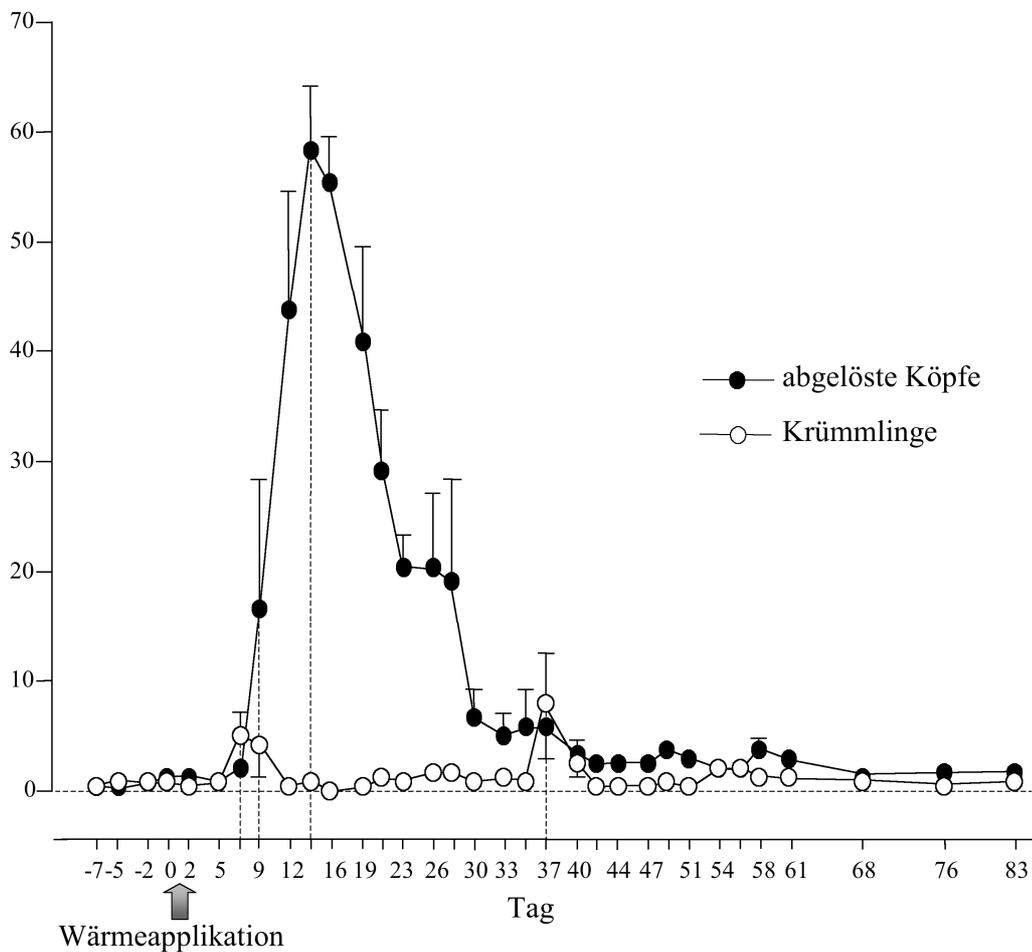


Abb. 17: Anteil abgelöster Köpfe und Krümmlinge (sekundäre Spermienanomalien) an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, n = 4 Bullen) vor und nach 48-stündiger Wärmeapplikation.

4.2.4. Häufigkeit von Spermien mit Zytoplasmatröpfchen

Der Prozentsatz der Spermien mit distalem Zytoplasmatröpfchen im Ejakulat blieb bei allen 4 Bullen über den Versuchszeitraum unverändert ($p > 0,05$). Dagegen vermehrte sich die Anzahl der Spermien mit proximalem Zytoplasmatröpfchen bei allen Bullen zwischen Tag 28 und 33 nach der Wärmeapplikation signifikant ($p < 0,05$). Danach normalisierten sich die Werte ab Tag 35 bis Tag 44 auf das Ausgangsniveau.

Zwischen Tag 47 und 49 kam es erneut zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$). Dieser Anstieg ist auf den Bullen 4 zurückzuführen, bei den übrigen Tieren war praktisch keine Veränderung zu beobachten (Abb. 18 Ausschnitt).

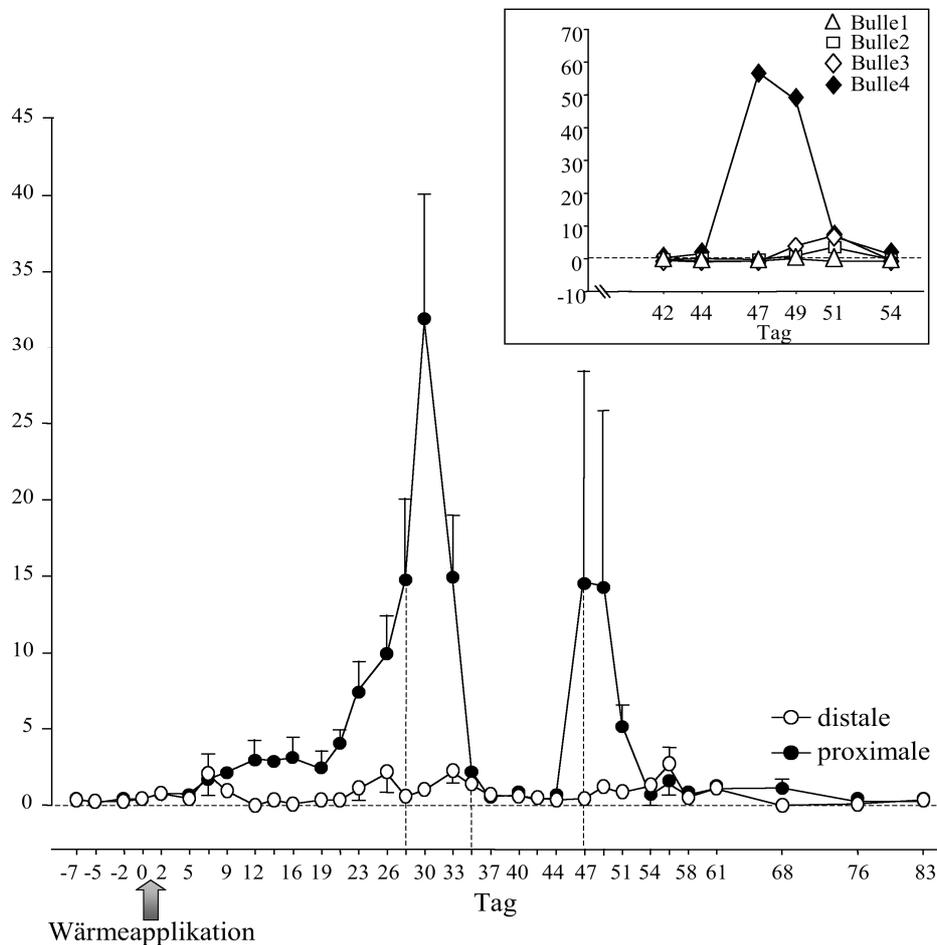


Abb. 18: Anteil der Spermien mit distalem und proximalem Zytoplasmatröpfchen an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, $n = 4$ Bullen) vor und nach der 48-stündigen Wärmeapplikation.

Ausschnitt: Anteil der Spermien mit proximalen Zytoplasmatröpfchen bei den einzelnen zwischen Tag 42 und 54.

4.2.5. Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die konventionellen Spermaparameter

Die statistische Analyse der mit Hilfe der konventionellen Spermauntersuchung erhobenen Befunde zeigte, dass mit Ausnahme von Krümmlingen und distalen Zytoplasmatröpfchen für alle Parameter Unterschiede zwischen den Untersuchungstagen ($p < 0,05$) bestanden. Zudem zeigten sich Unterschiede bezüglich Vitalität, primärer Anomalien, Kopfanomalien und proximaler Zytoplasmatröpfchen ($p < 0,05$) in Abhängigkeit vom Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung. Tierindividuelle Unterschiede waren lediglich bei proximalen Zytoplasmatröpfchen ($p < 0,05$) feststellbar (Tab. 2).

Tab. 2: ANOVA (Analysis of Variance): Abhängigkeit der konventionellen Spermaparameter (p-Werte) von den Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung, Untersuchungstag und Tier. Es wurden die Werte von 4 Bullen während 33 Untersuchungstagen herangezogen (n=132).

	Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung*	Tag	Tier
Spermienanzahl	0,4171	<0,0001	0,4317
Vitalität	0,0008	<0,0001	0,0880
primäre Anomalien	0,0006	<0,0001	0,0534
sekundäre Anomalien	0,3869	<0,0001	0,6679
Kopfanomalien	0,0005	<0,0001	0,0880
Schwanzanomalien	0,4617	0,0211	0,1426
abgelöste Köpfe	0,4002	<0,0001	0,3466
Krümmlinge	0,8469	0,0656	0,2615
proximale Zytoplasmatröpfchen	0,0028	<0,0001	0,0122
distale Zytoplasmatröpfchen	0,8312	0,0926	0,1435

* Gruppe 1: maximale Erhöhung um 6,4 und 6,3 °C (Bulle 1 und 2)

Gruppe 2: maximale Erhöhung um 7,1 und 6,9 °C (Bulle 3 und 4)

4.3. Einfluss der Hyperthermie auf die computergestützten Motilitätsparameter

Mit Hilfe der computergestützten Motilitätsanalyse wurde bei den gewonnenen Ejakulaten sowohl der prozentuale Anteil aller motilen Spermien als auch der prozentuale Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien innerhalb der motilen Spermien bestimmt.

4.3.1. Einfluss der Hyperthermie auf den Anteil motiler Spermien

Ausgehend von einer durchschnittlichen Motilität von ca. 90 % vor der skrotalen Erwärmung nahm der prozentuale Anteil der gesamten motilen Spermien zwischen Tag 9 und 28 ab ($p < 0,05$). Danach kam es zu einem Wiederanstieg bis auf Werte von ca. 70-75%, bei starken individuellen Schwankungen. Erst ab Tag 54 nach Wärmeapplikation wurde bei allen Bullen das Ausgangsniveau von ca. 90 % wieder erreicht (Abb. 19).

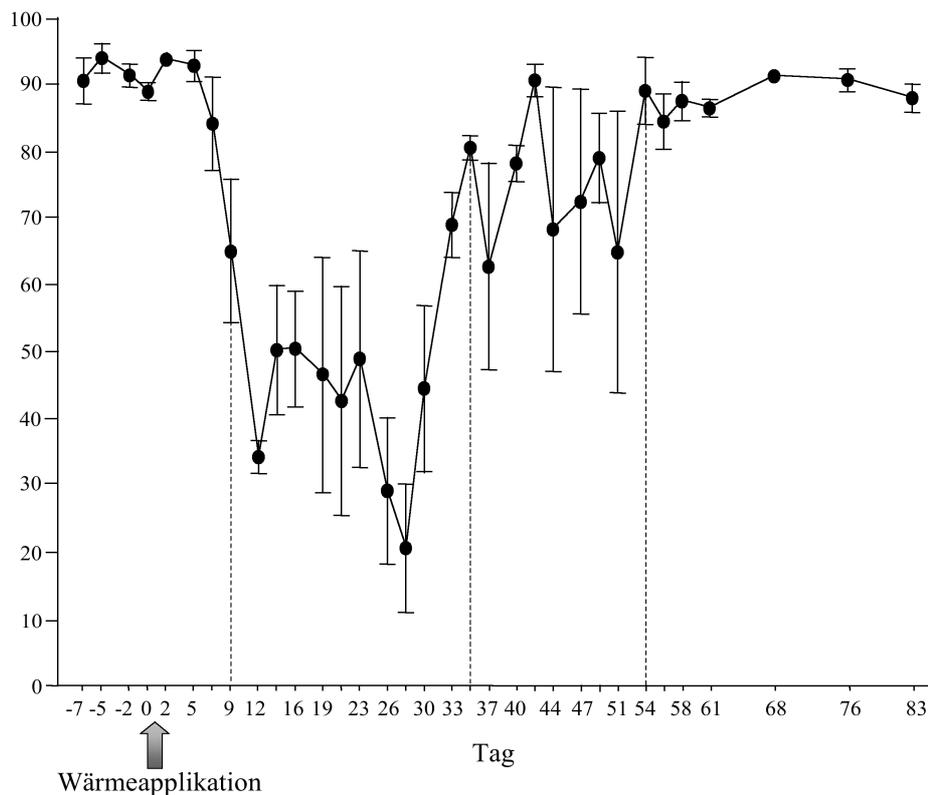


Abb. 19: Anteil motiler Spermien im Ejakulat im Versuchszeitraum vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

4.3.2. Einfluss der Hyperthermie auf den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien

Bei dem prozentualen Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien innerhalb der motilen Spermien wurde bei starken individuellen Schwankungen ein Rückgang ($p < 0,05$) zwischen Tag 12 bis 28 (Abb. 20) beobachtet.

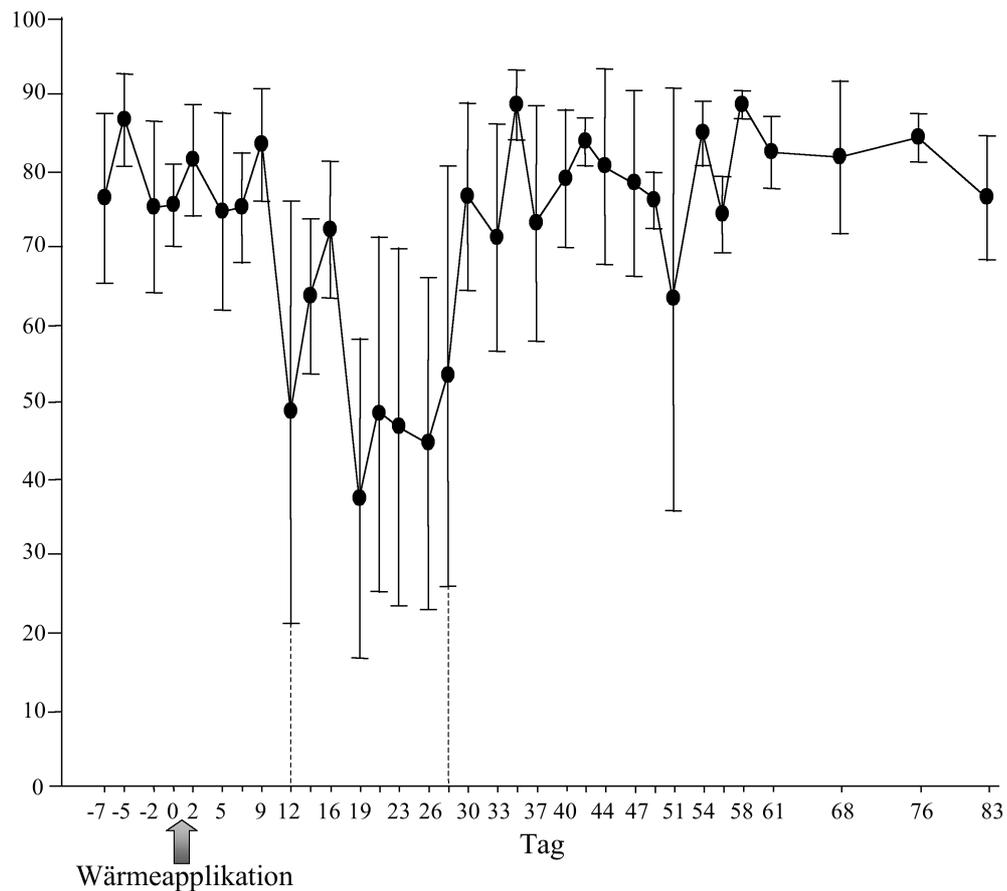


Abb. 20: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien innerhalb der motilen Spermien im Ejakulat im Versuchszeitraum vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

4.3.3. Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die Motilitätsparameter

Die durchgeführte Varianzanalyse zeigte, dass unterschiedliche prozentuale Anteile motiler Spermien auf den Untersuchungstag zurückzuführen ($p < 0,0001$) waren, während der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien innerhalb der motilen Spermien auf die

Unterschiede zwischen niedrigeren (Bulle 1 und 2) und höheren Temperaturerhöhungen (Bulle 3 und 4) sowie auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen waren ($p < 0,0001$) (Tab. 3).

Tab. 3: ANOVA (Analysis of Variance): Abhängigkeit der Motilitätsparameter (p-Werte) von den Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung, Untersuchungstag und Tier. Es wurden die Werte von 4 Bullen während 33 Untersuchungstagen herangezogen (n=132).

	Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung*	Tag	Tier
motile Spermien	0,0840	<0,0001	0,0980
vorwärtsbewegliche Spermien innerhalb der motilen Spermien	<0,0001	0,0815	<0,0001

* Gruppe 1: maximale Erhöhung um 6,4 und 6,3 °C (Bulle 1 und 2)

Gruppe 2: maximale Erhöhung um 7,1 und 6,9 °C (Bulle 3 und 4)

4.4. Einfluss der Hyperthermie auf die druchflusszytometrischen Spermienparameter

4.4.1. Veränderungen von Plasmamembranintegrität und Mitochondrienmembranpotential

Die prozentualen Anteile von Spermien mit intakter Plasmamembran (PMI), gemessen am Prozentansatz der grün angefärbten Spermienköpfe nach SYBR[®] 14/PI-Färbung, und jenen mit einem hohen Mitochondrienmembranpotential (HMMP), d.h. mit hoher Orangefluoreszenz im Spermienmittelstück nach JC-1-Färbung, fielen zwischen Tag 9 und 28 signifikant ($p < 0,005$) ab. Anschließend war ein stetiger Anstieg bis Tag 42, gefolgt von einem zweiten Abfall bis zum Tag 51 ($p < 0,05$), zu beobachten (Abb. 21). Danach kehrten die Werte ab etwa dem 58. Tag nach der Hodenerwärmung auf das Ausgangsniveau zurück.

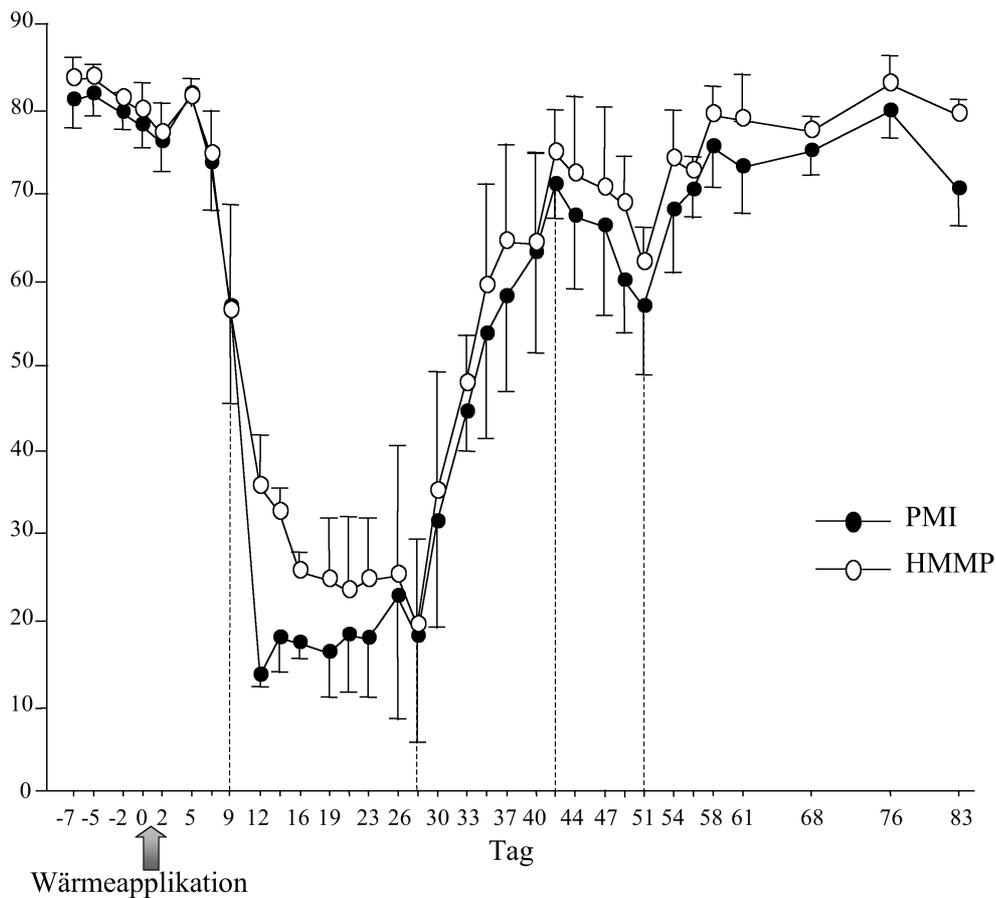


Abb. 21: Anteil der Spermien mit intakter Plasmamembran (PMI) und mit hohem Mitochondrienmembranpotential (HMMP) im Versuchszeitraum vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

4.4.2. Veränderungen des akrosomalen Status

Als Spermien mit geschädigtem akrosomalen Status (AS) wurden die eingeordnet, deren Akrosom nach FITC-PNA / SYTO[®] 17 / PI-Färbung grün fluoreszierten. Ihr Anteil nahm zwischen den Tagen 7 und 21 deutlich zu ($p < 0,005$), um dann wieder bis Tag 47 abzufallen (Abb. 22).

Relativ hohe Standardfehler waren Hinweis für tierindividuelle Schwankungen. Dies zeigte sich auch in einem erneuten Anstieg Akrosomen geschädigter Spermien ab Tag 49 bis Tag 51 ($p < 0,05$), der bei Bulle 3 allerdings nicht zu beobachten war (Abb. 22 Ausschnitt).

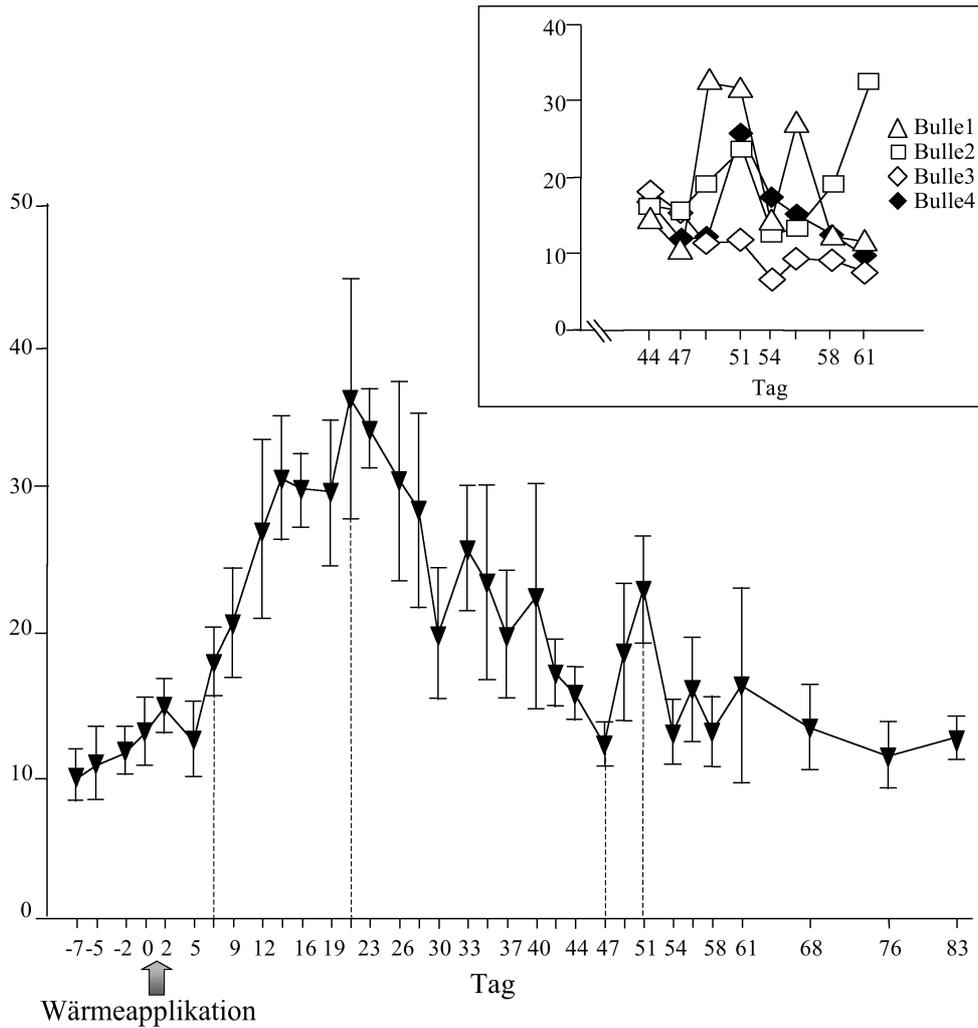


Abb. 22: Auswirkungen der 48-stündigen Hodenerwärmung auf den akrosomalen Status (AS) der Spermien an den verschiedenen Tagen der Ejakulatgewinnung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).
Ausschnitt: Anteil der Spermien mit geschädigtem akrosomalen Status bei den einzelnen Bullen zwischen Tag 44 und 61.

4.4.3. Veränderungen der Spermachromatinstruktur

Der Anteil der Spermien mit vermehrt vorkommender einzelsträngiger DNA, methodisch erfasst mit dem SCSA™-Test als Spermien mit erhöhtem DNA-Fragmentationsindex (DFI) (vgl. Kapitel 2.4.3. Seite 19), stieg zwischen Tag 7 und 23 signifikant ($p < 0,005$) an. Danach war ein Abfall bis Tag 42 zu beobachten. Ab Tag 47 zeigte sich erneut bis Tag 49 ein geringgradiger Anstieg des Anteils der DFI-Spermien ($p < 0,05$). Nach dem Tag 58 normalisierten sich die Werte auf das Ausgangsniveau (Abb. 23).

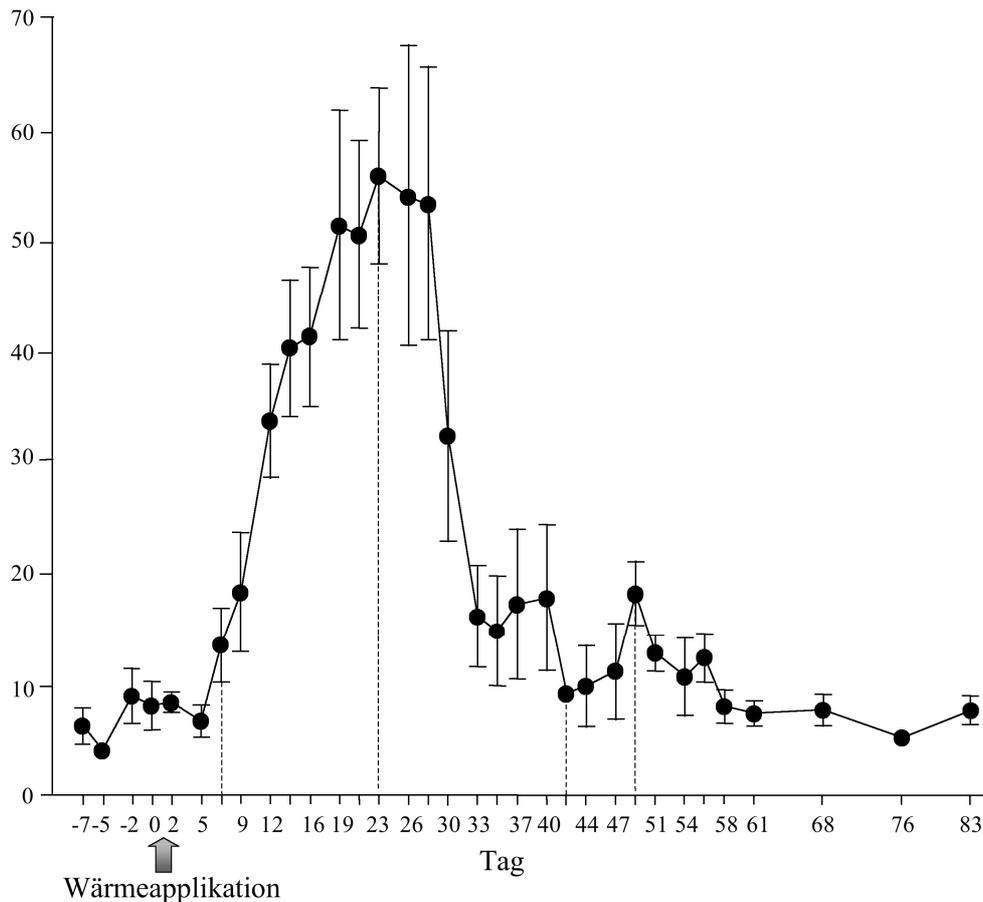


Abb. 23: Anteil der Spermien mit erhöhtem DNA-Fragmentationsindex (DFI) im Versuchszeitraum vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means ± SEM, n = 4 Bullen).

4.4.4. Einfluss der skrotalen Temperaturerhöhung sowie von Untersuchungstag und Tier auf die durchflusszytometrischen Spermienparameter

Die durchgeführte Varianzanalyse ließ erkennen, dass der Untersuchungstag einen signifikanten Einfluss ($p < 0,0001$) auf den ermittelten Anteil bei allen erhobenen durchflusszytometrischen Spermienparameter (Plasmamembranintegrität, Mitochondrienmembranpotential, geschädigter akrosomaler Status und Chromatinstruktur der Spermien) ausübte. Lediglich der Parameter geschädigter akrosomaler Status zeigte sowohl eine Abhängigkeit vom Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung als auch tierindividuelle Unterschiede ($p < 0,05$) (Tab. 4).

Tab. 4: ANOVA (Analysis of Variance): Abhängigkeit der durchflusszytometrischen Spermienparameter (p-Werte) von den Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung, Untersuchungstag und Tier. Es wurden die Werte von 4 Bullen während 33 Untersuchungstagen herangezogen (n=132).

	Ausmaß der skrotalen Temperaturerhöhung*	Tag	Tier
PMI	0,5148	<0,0001	0,1093
HMMP	0,2807	<0,0001	0,1830
AS	0,0042	<0,0001	0,0128
DFI-Spermien	0,5504	<0,0001	0,0631

* Gruppe 1: maximale Erhöhung um 6,4 und 6,3 °C (Bulle 1 und 2)
 Gruppe 2: maximale Erhöhung um 7,1 und 6,9 °C (Bulle 3 und 4)

4.5. Korrelationen der Spermienparameter

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die ermittelten Korrelationen zwischen den konventionellen Spermienparametern, computergestützter Spermienmotilität und den durchflusszytometrisch bestimmten Parametern Plasmamembranintegrität (PMI), Mitochondrienmembranpotential (HMMP), geschädigter akrosomaler Status (AS) und Chromatinstruktur der Spermien (DFI-Spermien).

Mit wenigen Ausnahmen wurden hohe bis sehr hohe Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Parametern ermittelt. Besondere Beachtung verdient hierbei die positive Korrelation zwischen dem konventionellen Parameter Vitalität mit der durchflusszytometrisch erhobenen Kenngröße Plasmamembranintegrität (PMI). Interessant war weiterhin der signifikante Zusammenhang zwischen Motilität der Spermien und dem Mitochondrienmembranpotential (HMMP), sowie die Korrelation der primären Anomalien, hier besonders der Kopfanomalien, mit der Häufigkeit chromatinveränderter Spermien (DFI-Spermien). Die Koeffizienten dieser spermatologisch als auch biologisch besonders relevanten Korrelationen lagen mit 0,77 (Vitalität vs. PMI), 0,81 (Kopfanomalien vs. DFI-Spermien) und 0,83 (motile Spermien vs. PMI, HMMP) z.T. deutlich über den Werten, die für andere Parameter errechnet wurden.

Tab. 5: Korrelationskoeffizienten (r-Wert): Korrelationen zwischen konventionellen Spermienparametern, computergestützter Spermienmotilität und den durchflusszytometrisch bestimmten Parametern Plasmamembranintegrität (PMI), Mitochondrienmembranpotential (HMMP), geschädigter akrosomaler Status (AS) und Chromatinstruktur der Spermien (DFI-Spermien). Spermatologisch besonders relevante Korrelationen sind fettgedrückt.

	PMI	HMMP	AS	DFI-Spermien
Vitalität	0,774***	0,752***	-0,672***	-0,802***
motile Spermien	0,833***	0,830***	-0,536***	-0,796***
Vorwärt. S. motiler S.	0,493***	0,473***	-0,038	-0,514***
primäre Anomalien	-0,679***	-0,725***	0,464***	0,826***
sekundäre Anomalien	-0,767***	-0,720***	0,623***	0,662***
Kopfanomalien	-0,668***	-0,711***	0,501***	0,810***
Schwanzanomalien	-0,183*	-0,206*	0,210*	0,238*
abgelöste Köpfe	-0,763***	-0,716***	0,518***	0,659***
Krümmlinge	-0,009	-0,013	0,176*	0,010
proximale Zyto.	-0,383***	-0,396***	0,298**	0,295**
distale Zyto.	-0,033	-0,046	0,193*	0,041

*p < 0,05; **p < 0,001; ***p < 0,0001

n=132 (4 Bullen; 33 Untersuchungstage)

proximale/distale Zyto.: proximale/distale Zytoplasmatröpfchen

Vorwärt. S. motiler S.: vorwärtsbewegliche Spermien innerhalb motiler Spermien

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer experimentell durchgeführten Erhöhung der Hodentemperatur auf das Sperma mit Hilfe objektiver Spermauntersuchungsmethoden wie der Flowzytometrie und der computergestützten Motilitätsanalyse zu untersuchen. Gleichzeitig sollte die Frage beantwortet werden, ob mit Hilfe der durchflusszytometrischen Spermauntersuchung zusätzliche und zuverlässigere Aussagen über die voraussichtliche Fertilität bestimmter Ejakulate gemacht werden können. Dabei ging die Arbeit von der Vorstellung aus, dass die vermuteten Zusammenhänge zwischen den durchflusszytometrisch ermittelten Parametern und der Fertilität an Ejakulaten mit stark abweichender Qualität, wie sie mit der Hodenerwärmung erzeugt werden können, leichter nachzuweisen sind als in Ejakulaten mit einheitlich guter Qualität.

Die Wärmenoxe wirkte bei der hier gewählten Versuchsanwendung nur kurzfristig auf die Organe ein. So konnten unter Berücksichtigung der Dauer von Spermatogenese und Nebenhodenpassage der Spermien einerseits und des Teilungsmodus der Zellen bei der Spermienbildung andererseits die nach dem Eingriff feststellbaren Auswirkungen im Sperma den zum Zeitpunkt der Schädigung vorliegenden Entwicklungsstufen der Spermatogenese zugeordnet werden. Die Gesamtdauer der Spermatogenese beim Bullen dauert ungefähr 61 Tage, wovon 44 Tage für die Spermatocytogenese und 17 Tage für die Spermiogenese in Anspruch genommen werden. Danach folgt der epididymale Transit, der bis zu 14 Tage dauert (Johnson *et al.*, 1994; Ross and Entwistle, 1979). Im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Acevedo, 2001; Vogler *et al.*, 1991, 1993) wurde im vorliegenden Versuch der Untersuchungszeitraum nach der lokalen Wärmeapplikation am Bullenhoden über Tag 40 hinaus bis zum Tag 83 verlängert. Die gewonnenen Spermien befanden sich zum Zeitpunkt der Skrotumerwärmung in verschiedenen Entwicklungsstadien. Auf Grund der geschilderten Abläufe kann man davon ausgehen, dass sich die am Tag 0 bis ungefähr Tag 14 nach der Wärmenoxe gewonnenen Spermien in der epididymalen Transit-, die von Tag 15 bis 31 in der Spermiogenese- und die von Tag 32 bis 75 in der Spermatocytogenese-Phase befunden hatten.

Die Intensität der Spermatogenesestörung nach testikulärer Wärmeeinwirkung und das Ausmaß der Beeinträchtigung der Spermaqualität hängen von verschiedenen Faktoren ab, in erster Linie von der Höhe der Temperatur (Steinberger und Dixon, 1959) und von der Dauer der Wärmeeinwirkung (El Azab, 1966). In der vorliegenden Studie wurden bereits vor der

Hodenerwärmung individuelle, wahrscheinlich durch jahrszeitlich und Umgebungstemperatur abhängige Unterschiede der skrotalen Oberflächentemperatur festgestellt (Tab. 1). Die Oberflächentemperaturen waren im Winter und Frühjahr um rund 1 °C niedriger als im Sommer. Darüber hinaus war das Ausmaß der Temperaturerhöhung, trotz weitgehender Standardisierung der skrotalen Wärmeapplikation, in den Sommermonaten größer als im Winter und Frühjahr. Diese Unterschiede dürften mit für die später beschriebenen individuellen Unterschiede in der Minderung der Spermaqualität nach der Hodenerwärmung verantwortlich sein.

5.1. Einfluss der Hyperthermie auf die Spermaqualität

5.1.1. Gesamtspermienanzahl und Spermienkonzentration

Das Absinken der Gesamtspermienanzahl und Spermienkonzentration zwischen etwa Tag 12 und 33 nach der Wärmeapplikation bei den Bullen 1, 3 und 4 dürfte die Folge einer Destruktion, wahrscheinlich aber hauptsächlich einer Ablösung von Spermatiden und von primären Spermatozyten sein, die bei intensiverer Wärmeeinwirkung die Tendenz zur Azoospermie erkennen lässt (El Azab, 1966). Bei dem Bulle 2 konnten keine deutlichen Veränderungen der Gesamtspermienanzahl und Spermienkonzentration nach der Wärmeapplikation am Hoden beobachtet werden (Abb. 13). Bei diesem Bullen war die maximale Temperaturerhöhung nach der skrotalen Wärmeapplikation am geringsten (6,3 °C im Vergleich zu 6,4 bis 7,1 bei den übrigen Bullen), doch dürfte dies nicht allein für die unterschiedliche Reaktion verantwortlich sein. VOGLER *et al.* (1991, 1993) hatten nach ähnlichen Hodenerwärmungsversuchen bei Bullen herausgefunden, dass keine Auswirkung der Wärmenoxe auf die Spermienkonzentration stattfindet. Nach Tag 68 war wieder eine deutliche Vermehrung der Gesamtspermienanzahl bei allen Bullen zu beobachten. Diese frühzeitige Regeneration der Spermienkonzentration weist darauf hin, dass Spermatogonien eine relative hohe Thermoresistenz haben (Stolla, 1984).

5.1.2. Motilität und Vitalität

In eigenem Versuch fiel die Spermienmotilität zwischen Tag 9 und Tag 28 ab (Abb. 19). Somit bestätigte sich, dass eine Wärmenoxe nicht nur die Spermatiden in den sehr sensitiven

Zellteilungsphasen der Spermiogenese, sondern auch die reifen Spermien während der Nebenhodenpassage beeinträchtigen kann (Skinner and Louw, 1966; Vogler *et al.*, 1991; 1993; Wildeus und Entwistle, 1983). Darüber hinaus lässt die Spermiovitalität gemessen am Prozentsatz ungefärbter Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung zwischen Tag 12 und Tag 42 nach der Hodenerwärmung (Abb. 14) auf eine Störung der Spermatocytogenese und der Spermiogenese sowie der Nebenhodenpassage schließen (El Azab, 1966; Cassady *et al.*, 1953; Skinner and Louw, 1966; Vogler *et al.*, 1991; 1993; Wildeus und Entwistle, 1983). Von Tag 12 bis Tag 40 (Abb. 14 Ausschnitt) war der Abfall der Spermiovitalität bei den Bullen 3 und 4, bei denen eine maximale Temperaturerhöhung des Skrotums von 7,1 und 6,9 °C erreicht wurde, stärker und länger andauernd als bei den Bullen 1 und 2. Bei diesen hatte die maximale Temperaturerhöhung 6,4 bzw. 6,3 betragen. Die Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der Spermatogenese-störung liegt vermutlich in der Höhe der einwirkenden Temperatur (Steinberger and Dixon, 1959).

5.1.3. Morphologie

Übereinstimmend mit den Beobachtungen anderer Autoren wurde in den eigenen Untersuchungen festgestellt, dass nach einer skrotalen Wärmeapplikation die sekundären Spermienanomalien früher als die primären ansteigen. Neun Tage nach testikulärer Wärmeapplikation trat eine deutliche Vermehrung der sekundären Anomalien auf, unter denen abgelöste Köpfe dominierten. Dies stimmt mit den Beobachtungen von EL AZAB (1966) überein, der nach einer 18-stündigen Hodenerwärmung mittels Wasserbad von 43 °C bei Bullen einen Anstieg der abgelösten Spermienköpfe nach 9 Tagen fand. EL AZAB schließt daraus, dass die Wärmenoxe während der Nebenhodenpassage die Entstehung der abgelösten Köpfe zur Folge hat.

Eine Zunahme des Anteils der Spermien mit primären Anomalien war im eigenen Versuch erst ab Tag 12 bis zum Tag 23 nach der Wärmeapplikation zu beobachten (Abb. 16). Das morphologische Bild war in dieser Zeit hauptsächlich geprägt von birnenförmigen Spermienköpfen. Durch Wärmeapplikation werden vor allem die Spermatidentransformation und die 1. Reifeteilung betroffen, was zu einer vermehrten Bildung primär mißgebildeter Spermien führt, die später im Ejakulat erscheinen als die sekundären (El Azab, 1966; Cassady *et al.*, 1953; Skinner and Louw, 1966; Vogler *et al.*, 1991; 1993; Wildeus und Entwistle, 1983).

5.2. Zusammenhang zwischen Kopfanomalien und Chromatinstruktur der Spermien

Parallel zu der vorher beschriebenen Zunahme der Kopfanomalien ab Tag 12 nach der Hodenerwärmung stieg der Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten an (Abb. 23, 24). Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren berichtet. WILDEUS und ENTWISTLE (1983) und VOGLER *et al.* (1991, 1993) haben herausgefunden, dass es bei Bullen 12 Tage nach einer 48-stündigen skrotalen Isolierung zu einer Vermehrung der Kopfdefekte von Spermien kam. ACEVEDO (2001) entdeckte bei einem ähnlich angelegten Versuch, dass eine hohe Korrelation zwischen Chromatinstrukturveränderung und Kopfdefekten ($p < 0,01$) der Spermien besteht. Auch in dem hier durchgeführten Versuch konnte bei allen 4 Bullen eine sehr hohe Korrelation ($r = 0,81$; $p < 0,0001$) zwischen diesen beiden Spermaparametern beobachtet werden. Interessanterweise war dieser Anstieg der DFI-Spermien viel deutlicher ausgeprägt als der der morphologisch anomalen Spermienköpfe.

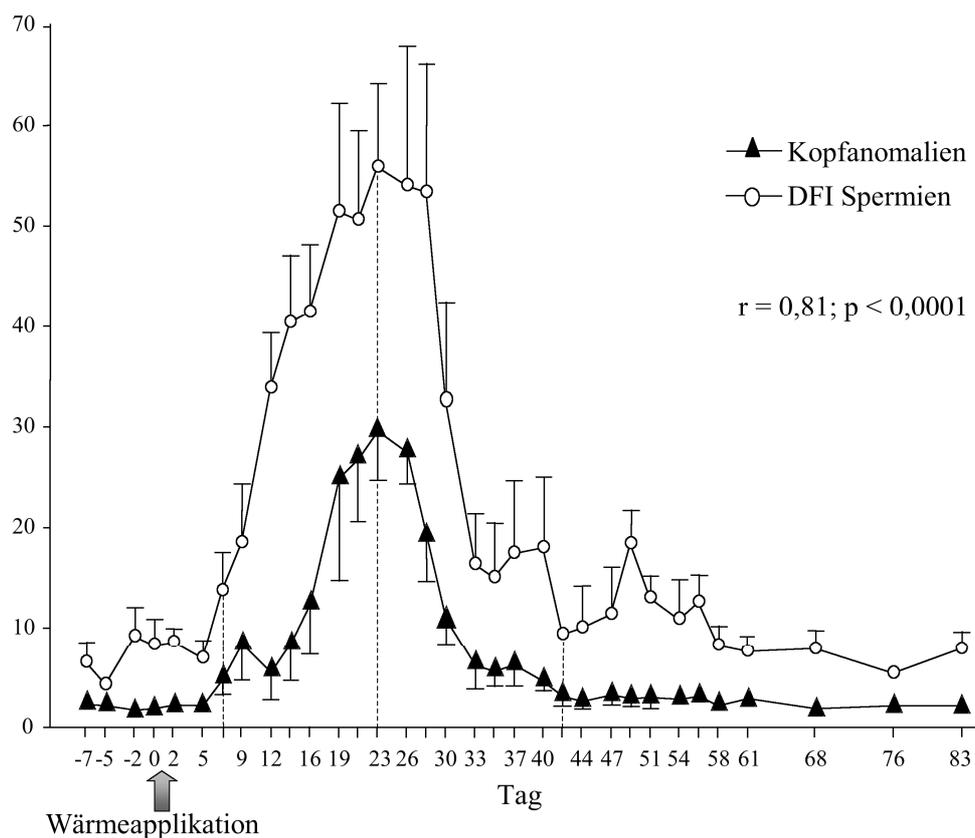


Abb. 24: Anteil der Spermienkopfanomalien und der DFI-Spermien vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

Aus diesen Ergebnissen kann einmal die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die erhöhte Hodentemperatur eine Beeinträchtigung der Spermatozyten in der Meiose der Spermatocytogenese und der Ausstattung des Spermatidenkopfes in der Spermientransformation der Spermiogenese als auch möglicherweise eine Zerstörung der Spermien in der Nebenhodenpassage zur Folge hat (El Azab, 1966).

Zum anderen lässt der zeitgleiche, aber viel höherer Anstieg sog. DFI-Spermien, also der Spermien mit geschädigter Chromatinstruktur, darauf schließen, dass die Wärmenoxe nicht nur in den morphologisch anomalen, sondern auch in den normal erscheinenden Samenzellen zu Chromosomenschäden geführt hat. Dies stimmt mit der Beobachtung vom WIDMANN (1974) überein, der nach einer 4,5-stündigen Hodenerwärmung bei Bullen anomale DNS-Konzentration in morphologisch vollkommen unauffälligen Samenzellen gefunden hatte.

Darüber hinaus stützen die in der eigenen Arbeit beobachteten Zusammenhänge zwischen dem zeitgleichen, aber unterschiedlich stark ausgeprägten Auftreten morphologisch anomaler Spermien und DFI-Spermien die schon früher aufgestellte These, dass morphologische Spermienanomalien, insbesondere die des Kopfes, Ausdruck von Chromosomanomalien auch in den normal erscheinenden Samenzellen eines Ejakulates sein können (Leidl *et al.*, 1971; Stolla, 1984).

5.3. Zusammenhang zwischen Motilität und den Mitochondrienmembranpotential der Spermien

VOGLER *et al.* (1991) haben herausgefunden, dass es ab Tag 15 nach Einwirken einer Wärmenoxe zu einer Beeinflussung der Motilität der Spermien kommt. In der eigenen Arbeit lässt der nach der Wärmeapplikation auftretende signifikante Abfall der Motilität am Tag 9 (Abb. 19, 25), wie auch die Abnahme vorwärtsbeweglicher Spermien innerhalb der motilen Spermien am Tag 12 (Abb. 20) auf eine Störung der Motilitätsentwicklung der Spermien im Nebenhoden schließen. Der parallele Verlauf des Anteils der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (Abb. 21, 25) lässt darüber hinaus den Schluss zu, dass es hier zu einer Störung der Mitochondrienfunktion und in Folge zu einer Reduktion des Energiestoffwechsels der Spermien kommt. Es bestand eine hohe Korrelation zwischen motilen Spermien und den Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential ($r = 0,83$; $p < 0,0001$).

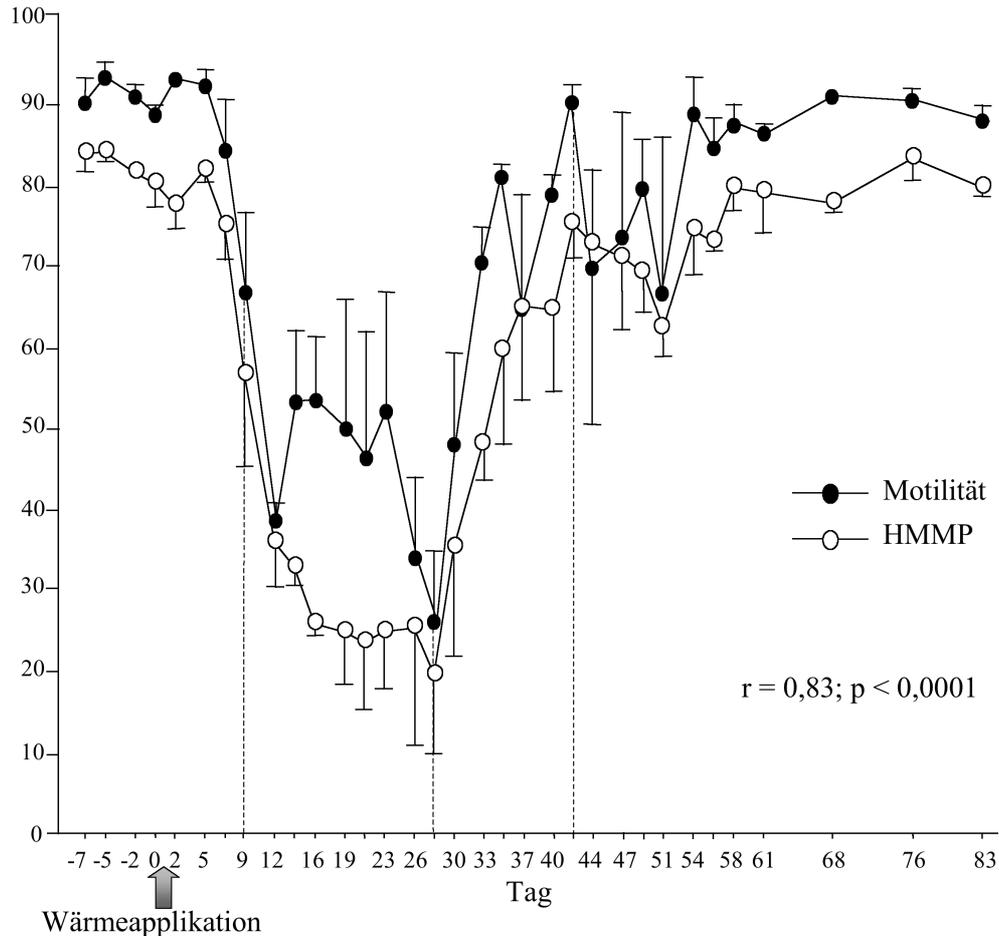


Abb. 25: Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential und motiler Spermien vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

5.4. Zusammenhang zwischen Plasmamembranintegrität und Vitalität der Spermien

Im eigenen Versuch erfolgte ab Tag 9 nach der Hodenerwärmung eine starke Verringerung der nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung unter dem Mikroskop als vital eingestuft Spermien (Abb. 14, 26), die am Tag 19 ihren Tiefpunkt erreichte. Der Anteil der durchflusszytometrisch ermittelten Spermien mit intakter Plasmamembran (PMI) verlief parallel dazu. Daraus kann man schließen, dass es durch die Wärmenoxe zu einem Verlust der Membranfluidität bis hin zur Auflösung der lamellären Doppelmembranstruktur kam und somit die Membranpermeabilität sowie die metabolische Funktionsfähigkeit dieser biologischen Einheit stark gestört wird (Watson, 1981).

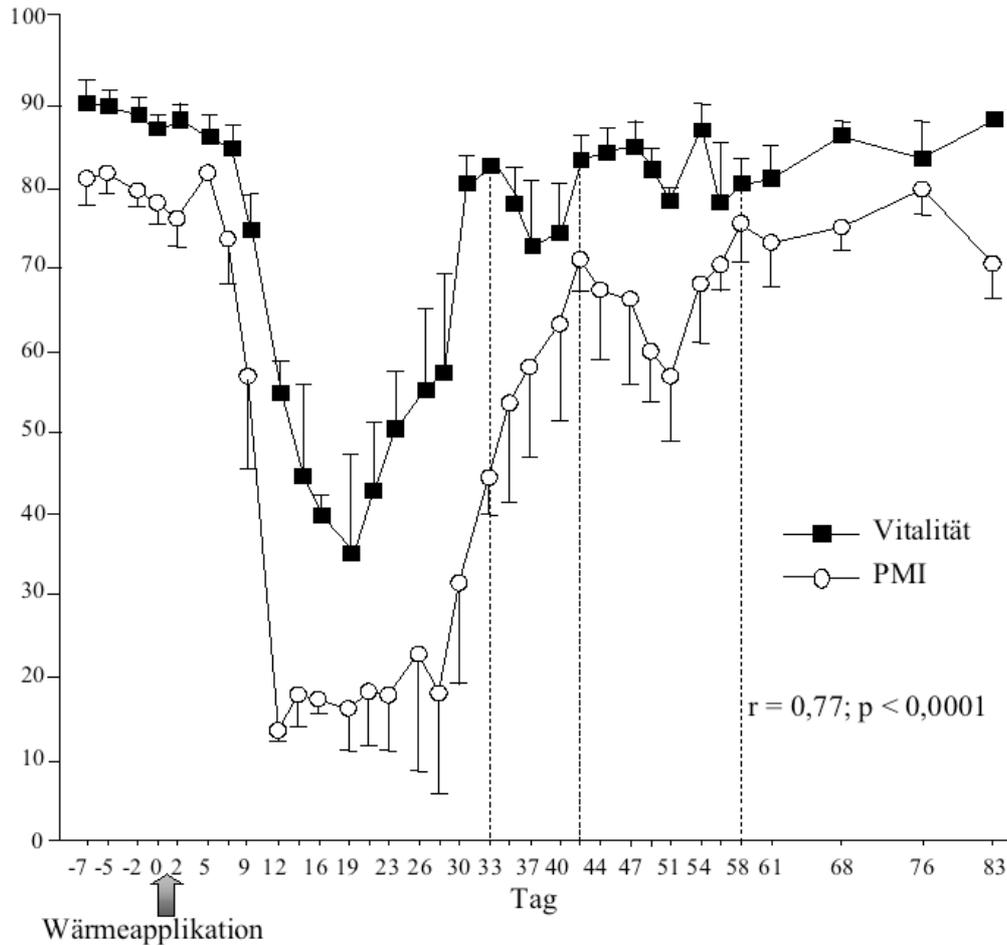


Abb. 26: Anteil der Spermien mit intakter Plasmamembran und der Spermivitalität vor und nach der 48-stündigen Hodenerwärmung (means \pm SEM, n = 4 Bullen).

Aus Abbildung 26 wird weiterhin deutlich, dass das Ausmaß der Schädigungen an der Plasmamembran, gemessen am Anteil der PMI-Spermien, deutlich größer war als der entsprechende Anteil in der Supravitalfärbung mit Bromphenolblau-Nigrosin.

Das durchflusszytometrische Verfahren ist somit sensitiver als die herkömmliche Supravitalfärbung. Da es weitgehend frei von subjektiven Einflüssen der Bewertung ist und darüber hinaus die Erhebung einer repräsentativen Stichprobe (ausgewertete Spermienzahl > 5000) erlaubt, ist es auch objektiver als die konventionellen Verfahren der Spermabeurteilung, wie die hier verwendete Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung.

5.5. Schlussfolgerungen

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Es bestätigte sich, dass mit einer lokalen Hodenerwärmung eine deutliche, zeitlich definierte temporäre Schädigung der Spermatogenese und damit eine wirkungsvolle Beeinträchtigung der Spermaqualität herbeigeführt werden kann.
- Die Auswirkungen der Störung sind im wesentlichen durch eine Abnahme der Spermienkonzentration, eine Reduktion der Motilität sowie durch eine deutliche Zunahme der morphologischen Spermienanomalien gekennzeichnet.
- Es konnten deutliche Zusammenhänge zwischen Kopfanomalien und Chromatinstruktur, Motilität und Mitochondrienmembranpotential sowie zwischen Vitalität und Plasmamembranintegrität der Spermien gezeigt werden.
- In Vergleich zu dem konventionellen Verfahren liefern durchflusszytometrische Untersuchungen zusätzliche Informationen über die Spermaqualität. Darüber hinaus zeichnet sich die Durchflusszytometrie durch eine höhere Sensitivität und Objektivität aus.
- Inwieweit mit diesem Verfahren auch geringere Unterschiede in der Spermaqualität, wie sie bei selektierten Bullen, die in der künstliche Besamung eingesetzt werden, zu erwarten sind, objektiviert werden können, muss durch entsprechenden Untersuchungen überprüft werden, ebenso, ob auf diesem Wege die Vorhersage der Fertilität von Bullen verbessert werden kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Durchflusszytometrische Verfahren zur Beurteilung der Spermaqualität nach einer experimentell induzierten Hyperthermie am Bullenhoden

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob mit Hilfe durchflusszytometrisch erfasster Parameter die Beurteilung der Spermaqualität besser objektiviert und standardisiert werden kann. Als Modell für diese Untersuchung wurden Bullen gewählt, bei denen durch eine experimentell herbeigeführte skrotale Hyperthermie eine temporäre Verschlechterung der Spermaqualität herbeigeführt wurde.

Die skrotale Oberflächentemperatur von vier Bullen wurde während einer 48-stündigen Hodenerwärmung mittels skrotaler Isolierung um 6,4 °C bis 7,1 °C erhöht. In dem Zeitraum von Tag 7 vor der Hodenerwärmung (Tag 0 = Beginn der Wärmeapplikation) bis zum Tag 61 wurde von den Bullen dreimal pro Woche ein Ejakulat gewonnen und untersucht. In dem verbleibenden Versuchszeitraum bis Tag 83 wurde dieser Vorgang noch einmal pro Woche durchgeführt. Jedes Ejakulat wurde sowohl konventionell (Gesamtpermienanzahl, Konzentration, Morphologie, Anteil vitaler Spermien in der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung) sowie mittels computergestützter Spermienmotilitätsanalyse (motile Spermien, vorwärtsbewegliche Spermien innerhalb der motilen Spermien), als auch mit der Durchflusszytometrie (Plasmamembranintegrität nach SYBR[®] 14/PI-Färbung, Mitochondrienmembranpotential nach JC-1-Färbung, akrosomaler Status nach FITC-PNA/SYTO[®] 17/PI-Färbung, Spermienchromatinstruktur mittels SCSA[™]) analysiert und beurteilt.

Die nach der Hodenerwärmung eingetretene Verschlechterung der Spermaqualität entsprach weitgehend den in ähnlichen Versuchen beobachteten typischen Veränderungen der herkömmlich verwendeten Spermparameter. Die Veränderungen bzw. Schädigungen waren in folgender zeitlicher Abfolge zu beobachten. Neun Tage nach testikulärer Wärmeapplikation trat eine deutliche Vermehrung der sekundären Spermienanomalien und ein Abfall der Spermienmotilität auf. Die Spermienvitalität, gemessen am Prozentsatz ungefärbter Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, sowie die Gesamtpermienanzahl und Spermienkonzentration fielen ab Tag 12 nach der Hodenerwärmung ab. Die primären Spermienanomalien,

die hauptsächlich von der morphologisch anomalen Spermienköpfe geprägt waren, nahmen ab Tag 12 nach der Hodenerwärmung zu.

Zeitgleich zu den oben genannten Veränderungen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie folgende Veränderungen festgestellt: Ab Tag 7 nach der Hodenerwärmung nahmen die Spermien mit geschädigtem akrosomalen Status zu. Der Prozentsatz der Spermien mit intakter Plasmamembran und der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential fiel ab Tag 9 nach der skrotalen Wärmeapplikation ab. Zwölf Tag nach der Hodenerwärmung stieg der Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten signifikant an.

Die Beziehungen zwischen den Ergebnissen des mit dem SCSATM-Test ermittelten Anteil der Spermien mit geschädigtem Chromatin und den prozentualen Anteilen der primären Spermienkopfanomalien waren sehr stark ausgeprägt ($r = 0,81$; $p < 0,0001$). Der prozentuale Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential korrelierte positiv mit dem prozentualen Anteil an motilen Spermien ($r = 0,83$; $p < 0,0001$). Zwischen der lichtmikroskopisch beurteilten Spermiovitalität und dem durchflusszytometrisch erfassten prozentualen Anteil an Spermien mit intakter Plasmamembran bestanden hochgradige Korrelationen ($r = 0,77$; $p < 0,0001$).

Der Anstieg der DFI-Spermien war viel deutlicher ausgeprägt als der der morphologisch anomalen Spermienköpfe. Dies Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Wärmenoxe nicht nur in den morphologisch anomalen, sondern auch in den normal erscheinenden Samenzellen zu Chromosomenschäden geführt hat und morphologische Spermienanomalien, insbesondere die des Kopfes, Ausdruck von Chromosomanomalien auch in den normal erscheinenden Samenzellen eines Ejakulates sein können.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die durchflusszytometrische Beurteilung der Qualität von Ejakulaten mit größeren Qualitätsunterschieden eine zuverlässige und objektive Methode darstellt. Sie liefert in Ergänzung zu der herkömmlichen Spermaurteilung weitere wichtige Informationen über die Spermaqualität. Ob mit Hilfe dieses Verfahrens das voraussichtliche Befruchtungsergebnis eines Ejakulates bzw. die Fertilität eines Bullen zuverlässiger vorhergesagt werden kann als mit der konventionellen Spermaurteilung, muss in weiteren Studien geklärt werden.

7. SUMMARY

Flow cytometric examinations for assessing the sperm quality after an experimental induced testicular hyperthermia in bulls

The aim of this study was to examine if the assessments of sperm quality can be better objectified and standardized by using flow cytometric examinations. For this investigation temporary deterioration of sperm quality was induced by a local heating of testes in bulls.

The scrotal surface temperature of 4 bulls was increased during the local heating of testis by enclosing the entire scrotum for 48 hours by 6.4°C to 7.1°C. Semen was collected 3 times a week from Day -7 to Day 61 and once a week from Day 68 to Day 83 (Day 0 = the day of scrotal insulation). Each ejaculate was conventionally examined (numbers of total spermatozoa, sperm concentration, morphology and proportion of vital spermatozoa after staining with bromphenol blue nigrosin). The percentage of motile spermatozoa and progressive motile spermatozoa of motile sperm were determined with a computer-assisted motility analysis. Using flow cytometry the proportions of sperm with the following parameters were examined and analyzed: intact plasma membranes after staining with SYBR[®] 14/PI, high mitochondrial membrane potentials after staining with JC1, damaged acrosome status after staining with FITC-PNA/SYTO[®] 17/PI, and sperm with defective chromatin structure or rather with high DNA fragmentation index (DFI) by SCSA[™].

The deterioration of sperm quality after elevating testicular temperature was correspondent to a large extent to the typical changes of the conventional sperm parameters, which result is in agreement with previous similar studies. After testicular hyperthermia (Day 0) changes of sperm quality occurred in the following sequence. There was a notable increase in secondary sperm abnormalities as well as a decrease in sperm motility on Day 9 after testicular hyperthermia. The proportions of vital spermatozoa after staining with bromphenol blue nigrosin, total sperm count and sperm concentration were decreased on Day 12 for the first time. At the same time the primary sperm abnormalities began to increase. The primary abnormalities most frequently encountered were morphological head defects of spermatozoa.

Concurrent with the changes specified above the following alterations of sperm parameters were observed with flow cytometry. Beginning on Day 7 after testicular hyperthermia sperm with defective acrosome status increased. From Day 9 on sperm with intact plasma membranes and sperm with high mitochondrial membrane potentials began to decrease. On Day 12 after testicular hyperthermia the proportion of sperm with defective chromatin structure (spermatozoa with high DFI) started to increase significantly.

The relationships between the proportions of defective sperm chromatin structure assessed with the SCSA™ test and the proportions of sperm head defects were highly significant ($r = 0.81$; $P < 0.0001$). The proportion of sperm with a high mitochondrial membrane potential correlated positively to the sperm motility ($r = 0.83$; $P < 0.0001$). Significant correlations between the viability assessed by light microscopy and the percentages of spermatozoa with intact plasma membrane obtained by flow cytometry ($r = 0.77$; $P < 0.0001$) occurred.

The increase of the proportion of the sperm with defective chromatin structure (spermatozoa with high DFI) was more clearly pronounced than that of the morphological abnormal sperm heads. This result indicates that heat stress had led to chromosome defects not only in morphologically abnormal but also in normally appearing sperm cells. In addition, morphological sperm abnormalities, especially sperm head defects, may be indicative of chromosome abnormalities also in normally appearing sperm cells of an ejaculate.

This study shows that flow cytometric assessments of the ejaculate is a reliable and objective method in semen investigation. It provides additional important information about the sperm quality. In further studies, it has to be clarified, whether the prospective fertilization capacity from an ejaculate and/or the fertility of a bull can be predicted with this method more reliable than with the conventional sperm evaluation.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Acevedo, H. (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

Amselgruber, W. and F. Sinowatz (1987):

The relation between the testicular artery and the veins of the pampiniform plexus in the bull.

Anat Histol Embryol, **16**:363-70.

Auger, J., X. Ronot and J.P. Daddoune (1989):

Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment.

J Androl, **10**: 439-448.

Ballachey, B.E., W.D. Hohenboken and D.P. Evenson (1986):

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., W.D. Hohenboken and D.P. Evenson (1987):

Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.

Biol Reprod, **36**: 915-925.

Ballachey, B.E., R.G. Saacke and 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):

Untersuchungen über die Spermienreifung im Nebenhoden.

Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Wien, Wien

Barth, A.D. and R.J. Oko (1989):

Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation.

In: Barth, A. D. and R. J. Oko: *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*.

Lowa State University Press, Ames, pp. 19-88.

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

Berndtson, W.E. and C. Desjardins (1974):

The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis.

Am J Anat, **140**: 167-180.

Berndtson, W.E., T.T. Olar and B.W. Pickett (1981):

Correlation between post-thaw motility and acrosomal integrity of bovine sperm.

J Dairy Sci, **64**: 346-349.

Blach, E.L., R.P. Amann, R.A. Bowen and D. Frantz (1989):

Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics.

Theriogenology, **31**: 283-298.

Blix, A.S., F.H. Fay and K. Ronald (1983):

On testicular cooling in phocid seals.

Polar Research, **1**: 231-233.

Blottner, S., I. Wegner, H. Roelants and K. Jewgenow (1998):

Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstpermien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA (peanut agglutinin).

Tierarztl. Umschau, **53**: 441-447.

Buddecke, E. (1980):

Zell- und subzelluläre Strukturelemente.

In: Buddecke, E.: *Grundriss der Biochemie*.

Verlag de Gryter, Berlin, New York, pp. 428-429.

Calvete, J.J., L. Sanz, Z. Dosta'Lova and E. Toepfer-Peterson (1995):

Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding.
Fertilität, **11**: 35-40.

Cassady, R.B., R.M. Mayers and J.E. Legates (1953):

The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull.
J Dairy Sci, **36**: 14-19.

Chandolia, R.K., A. Honaramooz, B.C. Omeke, R. Pierson, A.P. Beard and N.C. Rawlings (1997):

Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes.
Theriogenology, **48**: 1383-1389.

Cheng, F.-P., A. Fazeli, W.F. Voorhout, A. Marks, M.M. Bevers and B. Colenbrander (1996):

Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.
J Androl, **17**: 674-682.

Cooper, T.G. and C.-H. Yeung (1998):

A flow cytometric technique using Peanut Agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa.
J Androl, **19(5)**: 542-550.

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.

Coulter, G.H. (1988):

Thermography of the testes.

Proceedings of the 12th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction,
National Association of Animal Breeders, pp. 58-63.

Coulter, G.H. and J.P. Kastelic (1994):

Testicular thermoregulation in the bulls.

Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction,
National Association of Animal Breeders, pp. 29-34.

Davis, R.O., D.E. Bain, R.J. Siemers, D.M. Thal, J.B. Andrew and C.G. Gravance (1992):
Accuracy and precision of the Cell Form-Human automated sperm morphometry instrument.
Fertil Steril, **58**: 763-769.

Davis, R.O., C.G. Gravance and P.J. Casey (1993):
Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa.
Am J Vet Res, **54**: 1808-1811.

Davis, R.O., C.G. Gravance, D.M. Thal and M.G. Miller (1994):
Automated analysis of toxicant-induced changes in rat sperm head morphometry.
Reprod Toxicol, **8**: 521-529.

Eddy, E.M. and D.A. O'Brien (1994):
The Spermatozoon.
In: Knobil, E. and J. D. Neill: *The Physiology of Reproduction*.
Raven Press Ltd., pp. 29-77.

El Azab, E.A. (1966):
Die Auswirkung lokaler Wärmeapplikation am Skrotum auf Spermatogenese, Reifung der Spermien im Nebenhoden und Spermabeschaffenheit bei Kaninchen und Stieren.
Vet. Med. Diss., Univ. München, München

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.

Esser, P.H. (1932):
Über die Funktion und den Bau des Skrotums.
Zschr. Mikroskop. Anat., **31**: 108.

Evenson, D., L. Jost, D. Gandour, L. Rhodes, B. Stanton, O.P. Clausen, P. De Angelis, R. Coico, A. Daley, K. Becker and T. Yopp (1995):
Comparative sperm chromatin structure assay measurements on epiillumination and orthogonal axes flow cytometers.
Cytometry, **19**: 295-303.

Evenson, D.P. and L. Jost (2000):

Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.

Methods in Cell Science, **0-0**: 1-20.

Evenson, D.P., L.K. Jost, R.K. Baer, T.W. Turner and 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., 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.

Evenson, D.P., L. Thompson and 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.

Gadella, B.M., R. Rathi, J.F. Brouwers, T.A. Stout and B. Colerbrander (2001):

Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.

Anim Reprod Sci, **68(3-4)**: 249-265.

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., 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., C.A. Thomas, C.G. Gravance, C.E. Marshall, J.M. DeJarnette and C.H. Allen (2001):

Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm.

Theriogenology, **56**: 31-40.

Garner, D.L., C.A. Thomas, H.W. Joerg, J.M. DeJarnette and C.E. Marshall (1997):
Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.

Theriogenology, **57**: 1401-1406.

Garrett, C. and H.W. Baker (1995):

A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads.

Fertil Steril, **63**: 1306-1317.

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.

Gravance, C.G. and R.O. Davis (1995):

Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit.

J Androl, **16**: 88-93.

Gravance, C.G., D.L. Garner, J. Baumber and B.A. Ball (2000):

Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.

Theriogenology, **53(9)**: 1691-1703.

Grogan, W. and J. Collins (1990):

Guide to flow cytometry methods.

Marcel Dekker, Inc., New York

Gschwend, H. (1986):

Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien, insbesondere über den Einfluss ihrer Geschwindigkeit auf das Befruchtungsvermögen.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Hancock, J.L. (1951):

A staining technique for the study of temperature shock in semen.

Nature, **167**: 323-324.

Hake, S. (2001):

Computergestützte Untersuchung von Spermienkopfanomalien nach einer induzierten Spermatogenesestörung beim Bullen.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Harrenstein, R.J. (1928):

Über die Funktion des Skrotums und die Behandlung der Retentio testis beim Menschen.

Zbl. f. Chir., **28**: 1737.

Harrison, R.A.P. and S.E. Vickers (1990):

Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.

J Reprod Fert, **88**: 343-352.

Harrison, R.G. and J.S. Weiner (1949):

Vascular patterns of the mammalian testis and their functional significance.

J Exptl Biol, **26**: 304.

Hartig, F. (1954):

Über die Hodenhüllen und ihre funktionelle Bedeutung. (Vorläufige Mitteilung nach Untersuchung bei Stier und Hund.)

Tierärztl. Umsch., **9**: 10.

Hirai, M. (2000):

Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie und -motilität bei Bulle und Eber: Beziehungen zur Fertilität.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Januskauskas, A. and H. Rodriguez-Martinez (1995):

Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen.

Acta Vet Scand, **36**: 571-574.

Jasko, D.J., T.V. Little and K. Smith (1988):

Objective analysis of stallion sperm motility.

Theriogenology, **30**: 1159-1167.

Johnson, L., C.E. Wilker and J.S. Cerelli (1994):

Spermatogenesis in the bull.

Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod., 1994, pp. 9-27.

Kastelic, J.P., R.B. Cook, G.H. Coulter and R.G. Saacke (1995):

Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull.
Theriogenology, **45**: 935-942.

Katz, D.F., R.O. Davis, B.A. Delandmeter and J.W. Overstreet (1985):

Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization.
Comput Methods Programs Biomed, **21(3)**: 173-182.

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.

Kraemer, T. (2000):

Untersuchungen über den Einfluss erhöhter Außentemperaturen auf verschiedene Ejakulatmerkmale sowie biochemische und hormonelle Parameter bei in der Klimakammer und unter subtropischen Klimaverhältnissen gehaltenen Bullen.

Vet. Med. Diss., F.H. Berlin, Berlin

Krienke, M. (2003):

Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstperma.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Kruger, T.F., T.C. du Toit, D.R. Franken, R. Menkveld and C.J. Lombard (1995):

Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS.

Fertil Steril, **63**: 134-141.

Kruger, T.F., T.C. DuToit, D.R. Franken, A.A. Acosta, S.C. Oehninger, R. Menkveld and C.J. Lombard (1993):

A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading.

Fertil Steril, **59**: 202-209.

Kruger, T.F., F.A. Lacquet, C.A. Sarmiento, R. Menkveld, K. Ozgur, C.J. Lombard and D.R. Franken (1996):

A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology as evaluated by computer (IVOS).

Fertil Steril, **66**: 285-291.

Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox (1994):

Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung.

In: Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox: *Prinzipien der Biochemie*.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 644-647.

Leidl, W. (1968):

Steuerung und Beeinflussung der Samenbildungsprozesse.

Z Tierz u Züchtungsbiol, **84**: 273.

Leidl, W, W. Schefels, R. Stolla und E. Metsger (1971):

Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.

Dtsch Tierärztl Wschr, **78**: 129-134.

Leidl, W., P. Riemke and I. Schroepel (1987):

Computergesteuerte Videomikrographie-Auswertung zur Bestimmung der Spermienmotilität am Modell des Bullen.

Dtsch Tierärztl Wschr, **94**: 461-464.

Lodish, L., D. Baltimore, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaria and J. Darnell (1995):

Membrane structure: The plasma membrane.

Scientific American Books Inc., New York, pp. 595-629.

Love, C.C. and 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. and 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.

Magistrini, M., E. Guitton, Y. Levern, J.C. Nicolle, M. Vidament, D. Kerboeuf and E. Palmer (1997):

New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry.

Theriogenology, **48**: 1229-1235.

- Malmgren, L., B. Ob dem Kamp and A. Woeckener (1997):
Motility, velocity and acrosome integrity on equine spermatozoa stored under different conditions.
Reprod Dom Anim, **29**: 469.
- Miyazaki, R., M. Fukuda and H. Takeuchi (1990):
Flow cytometry to evaluate acrosome reacted sperm.
Arch Androl, **25**: 243-251.
- Moore, C.R. (1923):
On the relationship of the germinal epithelium to the position of the testis.
Anat Record, **25**: 142.
- Mortimer, D., E.F. Curtis and 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.
- Nickel, R. (1954):
Zur Topographie der akzessorischen Geschlechtsdrüsen bei Schwein, Rind und Pferd.
Tierärztl Umsch, **9**: 386-388.
- Ombelet, W., R. Menkveld, T.F. Kruger and O. Steeno (1995):
Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility.
Hum Reprod Update, **1**: 534-557.
- Perez-Sanchez, F., J.J. de Monserrat and C. Soler (1994):
Morphometric analysis of human sperm morphology.
Int J Androl, **17**: 248-255.
- Rasshofer, R. (1998):
Computergestützte Spermienskopfmorphometrie beim Bullen mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS.
Vet. Med. Diss., Univ. München, München
- Rathi, R., B. Colenbrander, M.M. Bevers and 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.

Rommel, S.A., G.A. Early, K.A. Matassa, D.A. Pabst and W.A. McLellan (1995):

Venous structures associated with thermoregulation of phocid seal reproductive organs.

Anatomical Record, **243**: 390-402.

Rommel, S.A., D.A. Pabst, W.A. McLellan, J.G. Mead and G.W. Potter (1992):

Anatomical evidence for a counter-current heat exchanger associated with dolphin testes.

Anatomical Record, **232**: 150-156.

Rommel, S.A., D.A. Pabst, W.A. McLellan, T.M. Williams and W.A. Friedl (1994):

Temperature regulation of the testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): evidence from colonic temperatures.

J Comparative Physiology B, **164**: 130-134.

Ross, A.D. and K.W. 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**: 111-121.

Saacke, R.G. and J.O. Almquist (1964):

Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal ejaculated sperm. II. The neck and tail of normal ejaculated sperm.

Am J Anat, **115**: 143-184.

Sailer, B.L., L.K. Jost and D.P. Evenson (1996):

Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility.

Cytometry, **24**: 167-173.

Satori Blanc, N., A. Senn, A. Leforestier, F. Livolant and J. Dubochet (2001):

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

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

Schroepel, I. (1988):

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

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Schuelke, B. (1982):

Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas.

In: Busch, W., K. Lohle and W. Peter: *Künstliche Besamung bei Nutztieren.*

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 159-184.

Schummer, A. and B. Vollmerhaus (1987):

Harn- und Geschlechtsapparat.

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, pp. 300-376.

Setchell, B.P. (1998):

The Parkes Lecture. Heat and the testis.

J Reprod Fertil, **114**: 179-194.

Setchell, B.P. and R. Mieusset (1996):

Testis thermoregulation.

In: Hamamah, S. and R. Mieusset: *Male Gametes Production and Quality.*

INSERM, Paris

Sinowatz, F. (2001):

Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane.

In: Busch, W. and A. Holzmann: *Veterinärmedizinische Andrologie.*

Schattauer, Stuttgart, pp. 1-22.

Sirivaidyapong, S., F.-P. Cheng, A. Marks, W.F. Voorhout, M.M. Bevers and B. Colenbrander (2000):

Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.

Theriogenology, **53(3)**: 789-802.

Skinner, J.D. and G.N. Louw (1966):

Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle.

J Appl Physiol, **21**: 1784-1790.

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, **99**: 3671-3675.

Steinberger, E. and W.J. Dixon (1959):

Some observations on the effect of heat on the testicular germinal epithelium.

Fert Steril, **10**: 578-595

Stolla, R. (1984):

Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Suzuki, H., R.H. Foote and P.B. Farrell (1997):

Computerized imaging and scanning electron microscope (SEM) analysis of co-cultured fresh and frozen bovine sperm.

J Androl, **18**: 217-226.

Thomas, C.A., D.L. Garner, J.M. DeJarnette and C.E. Marshall (1997):

Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.

Biol Reprod, **56**: 991-998.

Uhlenbrock, S. (1999):

Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Hengst mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Vogler, C.J., J.H. Bame, J.M. Dejarnetter, M.L. McGilliard and R.G. Saacke (1993):

Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine.

Theriogenology, **40**: 1207-1219.

Vogler, C.J., R.G. Saacke, J.H. Bame, J.M. Dejarnette and M.L. McGilliard (1991):

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

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

Waites, G.M.H. (1970):

Temperature regulation and the testis.

In: Johnson, A. D., W. R. Gomes and L. Vandemark: *The Testis*.

Academic press, New York, London, pp. 241-279.

Watson, P.F. (1981):

The effect of cold shock on sperm cell membranes.

In: Morris, G. I. and A. Clark: *Effects of low temperature on biological membranes*.

Academic Press, London, pp. 189-218.

Weitze, K.-F. (2001):

Spermatologische Untersuchung.

In: Busch, W. and A. Holzmann: *Veterinärmedizinische Andrologie*.

Schattauer, Stuttgart, pp. 87-118.

Widmann, J. (1974):

Beeinflussung des DNS-Gehaltes bei Bullenspermien nach Störung der Spermatogenese durch Wärme.

Vet. Med. Diss., Univ. München, München

Wildeus, S. and K.W. Entwistle (1983):

Spermiogram and sperm reserves in hybrid *Bos indicus* X *Bos taurus* bulls after scrotal insulation.

J Reprod Fertil, **69**: 711-716.

9. ANHANG

Anhang 1:

Geräteeinstellungen am FACScan in Durchflusszytometer

Bei allen Messungen wurden die folgenden Einstellungen gewählt:

Einteilung des Messbereiches aller Parameter: 1024 Kanäle
 Kompensation: keine
 Probendruck (Flow rate): low (12 $\mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l} / \text{min}$)
 Quantifizierung der Spannungsimpulse: Höhe (Amplitude)

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

Parameter	Detektor	Spannung	Amplitudenzunahme	Modus
P1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P2	SSC	234	1,00	logarithmisch
P3	FL 1	400	4,92	logarithmisch
P4	FL 2	491	4,92	logarithmisch
P5	FL 3	450	4,92	logarithmisch

Schwellenwert: FSC bei 350

2. Spezielle Geräteeinstellung bei der Beurteilung der Spermachromatinstruktur:

Parameter	Detektor	Spannung	Amplitudenzunahme	Modus
P1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P2	SSC	258	1,00	logarithmisch
P3	FL 1	426	2,63	linear
P4	FL 2	659	8,02	linear
P5	FL 3	595	1,00	linear

Schwellenwert: FL 1 bei 60

Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm), FL-2 (585/42 nm) und FL-3 (650LP nm).

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

Anhang 2:**Zusammensetzung des Tyrode-Mediums**

Substan	Menge in g für 1000 ml
Basis Tyrode-Medium	
<i>NaCl</i>	5,844
<i>KCl</i>	0,231
<i>CaCl₂ 2H₂O</i>	0,294
<i>MgCl₂ 6 H₂O</i>	0,081
<i>NaH₂PO₄</i>	0,061
<i>Na Pyruvat</i>	0,11
<i>Na Laktat</i>	2,421
<i>HEPES</i>	2,383
<i>Gentamycin S.</i>	0,05
Zusätzliche Substanzen	
<i>NaHCO₃</i>	2,100
<i>Heparin</i>	0,01
<i>BSA</i>	6,0

Die zusätzliche Substanzen werden ganz zum Schluss der Basis Tyrode-Lösung gegeben. NaHCO₃, Heparin und BSA lösen sich am besten, wenn sie nicht verrührt werden, sondern sich absetzen können.

Vor der Verwendung sollte der pH-Wert auf 7,4 eingestellt werden.

Anhang 3:

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

Einstellungsparameter	Einheit	Wert
Anzahl der Bilder		32
Mindestbildanzahl		15
Vielfaches der Bildfrequenz		1
Minimale Fläche des Objekts	Pixel	40
Maximale Fläche des Objekts	Pixel	300
Schwellwert für Objektsuche		5
Objekte		hell
Geschwindigkeitsklassenbreite	µm/s	5
Geschwindigkeitsgrenze für immobile Objekte	µm/s	30
Geschwindigkeitsgrenze für lokalmobile Objekte	µm/s	30
Tiefe der Messkammer	µm	10
Verdünnung 1/(n)		1
Temperatur der Probe	°C	37
Eichungsfaktor		437
Korrektur		Nein
Richtung		Ja
Zeilensprung		2
Distanz	Pixel	31
Anzahl der Relaxationen		7
Pause		2
Tukeyfenster		4
Maximaler Radius	µm	30
Min. Fläche der unbeweglichen Objekte	Pixel	60
Max. Fläche der unbeweglichen Objekte	Pixel	150
Schwanzdetektion		On
Empfindlichkeit der Schwanzdetektion		1
Messfenster XA, YA, XE, YE		30, 30, 737, 467
Schwanzsuche anwenden auf		immobile Objekte
Größe Fenster		15
Anzahl Dilatationen/Erosion		3
Suchschwelle Schwanz	µm	10
Minimale Schwanzgröße	µm	10
Doppelter Schwellenwert		On
Schwanz		hell
Benutzerklassifikator ausführen		On

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. R. Stolla möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die jede Zeit gewährte und außerordentlich freundliche Unterstützung und die geduldige Korrektur meiner Arbeit danken.

Ein großer Dank geht natürlich auch an die Dr. Dr. h.c. Karl Eibl-Stiftung für das Vertrauen und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei Herrn Prof. Dr. H. Bollwein für die Überlassung des Themas, für sein Engagement und wertvolle Ratschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt bei Herrn Dr. F. Weber für seine Freundlichkeit und seinen unermüdlichen persönlichen Einsatz, durch den er einen wesentlichen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat. Hätte ich ohne dich!!

Außerdem möchte ich mich bei Heidi, Alex, Frank, Karola, Lorenzo, Simone, Sonni, Inge, Sandra, Matthias, Martina, Jasmin, Eva, Johann, Tanja, Caro, Peter, Maria, Alfred, Niko, Kaspar, Roberto und Thorsten am OWF für die schöne Zeit, den Spaß, die Party, die so oft nötige Ablenkung von der Arbeit, den Trost und die himmlische Geduld zu meinem unabsichtlichen sprachlichen Fehler bedanken.

Ganz besonders möchte ich bei Simone, Sonni, Inge, Sandra und Karola für die Mithilfe meiner Vorbereitung auf Hörensverstehensprüfung der DSH-Prüfung, bei Heidi, Karola, Martina, Alex und lieber Frau Wolf für Korrektur meiner Arbeit, bei Heidi und Eva für ihre Freundschaft und die seelische Unterstützung danken.

Nicht zuletzt ein großes Dankeschön meinen Eltern und meinem Bruder in Taiwan für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre große Unterstützung während meines Aufenthalts in München.

LEBENS LAUF

Name:	WU, Chen-ti
Geburtsdatum:	05.11.1975
Geburtsort:	Kaohsiung, Taiwan
Staatsangehörigkeit:	taiwanesisch
Eltern:	WU, Jien-jen Lehrer
Eltern:	LIN, Ui-shei Lehrerin
Familienstand:	ledig
1983-1989	Qi-Xian Grundschule, Kaohsiung, Taiwan
1989-1992	St. Dominic Junior High School, Kaohsiung, Taiwan
1992-1995	St. Dominic High School, Kaohsiung, Taiwan
1995-2000	Studium am "College of Veterinary Medicine" der Chung-Hsing Universität, Taichung, Taiwan Abschlussarbeiten: 1. <i>Edometrial Cysts in a Mare</i> 2. <i>Chip Fractures of the Plantar Aspect of the Bilateral Hind Fetlock Joints in a Horse</i>
Juli-Aug. 1998	Praktikum im städtischen Zoo, Taipei, Taiwan Abschlussarbeit: <i>Analysis of Hematology as Applied to Iguana</i>
Juli-Sept., 1999	Praktikum für sechs Woche an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik sowie der Pferdabteilung der Chirurgischen Tierklinik der Universität München, Deutschland
Okt. 2001	Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang ausländischer Studienbewerber an der Ludwig-Maximilians-Universität München
ab Nov. 2001	Beginn der Doktorarbeit an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München
Sommersemester 2003	Teilzeitige Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiter an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München