

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig–Maximilians–Universität München  
Vorstand: Univ. Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. M. Stangassinger

**Zur experimentellen Darstellung von thermischen Effekten an  
isolierten Zellen: Eine Modellstudie an Rinderspermien**

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

von  
**Michaela Schnabel**  
aus Taipeh/Taiwan

München 2009

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

Dekan: Univ. Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. Stangassinger

Korreferent/en: Univ. Prof. Dr. Handler

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

*Meinen Eltern und Fabian*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>4</b>
2.1	Morphologie der Bullenspermien .....	4
2.1.1	Allgemeiner Aufbau .....	4
2.1.2	Plasmamembran .....	6
2.1.3	Akrosom und Akrosomreaktion .....	7
2.2	Spermatogenese und Spermienreifung .....	8
2.3	Versuchsmodell Spermium .....	10
2.3.1	Vergleich Spermienzelle und somatische Zelle .....	11
2.3.2	Energiestoffwechsel der Spermienzelle .....	12
2.4	Standardparameter der spermatologischen Untersuchung .....	13
2.4.1	Motilität der Spermien .....	13
2.4.2	Lebend-Tot-Färbung .....	15
2.4.3	Morphologische Beurteilung der Spermien .....	15
2.5	Durchflusszytometrie .....	18
2.5.1	Physikalische Grundlagen .....	18
2.5.2	Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status .....	20
2.5.3	Zusammenhang zwischen Membranintegrität und Fertilität .....	21
2.6	Thermische Effekte: eine Literaturübersicht .....	22
2.6.1	Effekte einer Hyperthermie .....	22
2.6.2	Effekte einer Hypothermie .....	24
2.7	Bedeutung der In vitro Produktion (IVP) .....	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	Herkunft der Spermien .....	27
3.2	Spermagewinnung und Kryokonservierung .....	27
3.3	Versuchsaufbau .....	28
3.4	Mikroskopische Untersuchungen .....	29
3.4.1	Motilitätsbestimmung .....	29
3.4.2	Lebend - Tot - Färbung .....	30
3.4.3	Morphologische Beurteilung .....	31

---

3.5	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	32
3.5.1	Geräte und Geräteeinstellungen.....	32
3.5.2	Färbung mittels Propidiumiodid (PI) und Fluorescein- Isothiocyanat/Peanut-Agglutinin (FITC - PNA).....	33
3.6	In vitro Produktion (IVP).....	34
3.6.1	Gewinnung der Oozyten und Maturation .....	34
3.6.2	In-vitro-Fertilisation .....	36
3.6.3	In-vitro-Kultivierung.....	38
3.7	Statistische Auswertung .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1	Motilitätsuntersuchung.....	40
4.2	Lebend-Tot-Färbung.....	45
4.3	Morphologische Untersuchung .....	47
4.4	Durchflusszytometrische Untersuchung .....	50
4.5	Ergebnisse der In vitro Fertilisation .....	56
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
5.1	Untersuchungsmethoden.....	59
5.2	Vergleich mit anderen Studien.....	62
5.2.1	Studien über thermisch bedingte Effekte.....	62
5.2.2	Studien über elektromagnetischer Befeldung in vitro .....	66
5.3	Schlussfolgerung .....	67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>91</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>92</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	92
	Verwendete Materialien.....	94
	Abbildungsverzeichnis.....	99
	Tabellenverzeichnis.....	101
	Lebenslauf.....	103

# 1 Einleitung

Um schädigende Auswirkungen elektromagnetischer Felder (EMF) nachzuweisen, werden laufend auch Befeldungen von isolierten Zellen diversen Ursprungs vorgenommen. So sind z.B. häufig Immunzellen (Tuschl et al., 2006), Lymphozyten (Capri et al., 2004, Vijayalaxmi 2006), Erythrozyten (Chemeris et al., 2003) und Mastzellen (Donnellan et al., 1997), aber gelegentlich auch Keimzellen (Cleary et al., 1989) Gegenstand der Forschung über mögliche durch Strahlung verursachte Schäden.

EMF lassen sich grundsätzlich in ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung einteilen. Letztere unterteilt sich wiederum, wie in Abb. 1.1 dargestellt, in niederfrequente, hochfrequente und optische Strahlung.

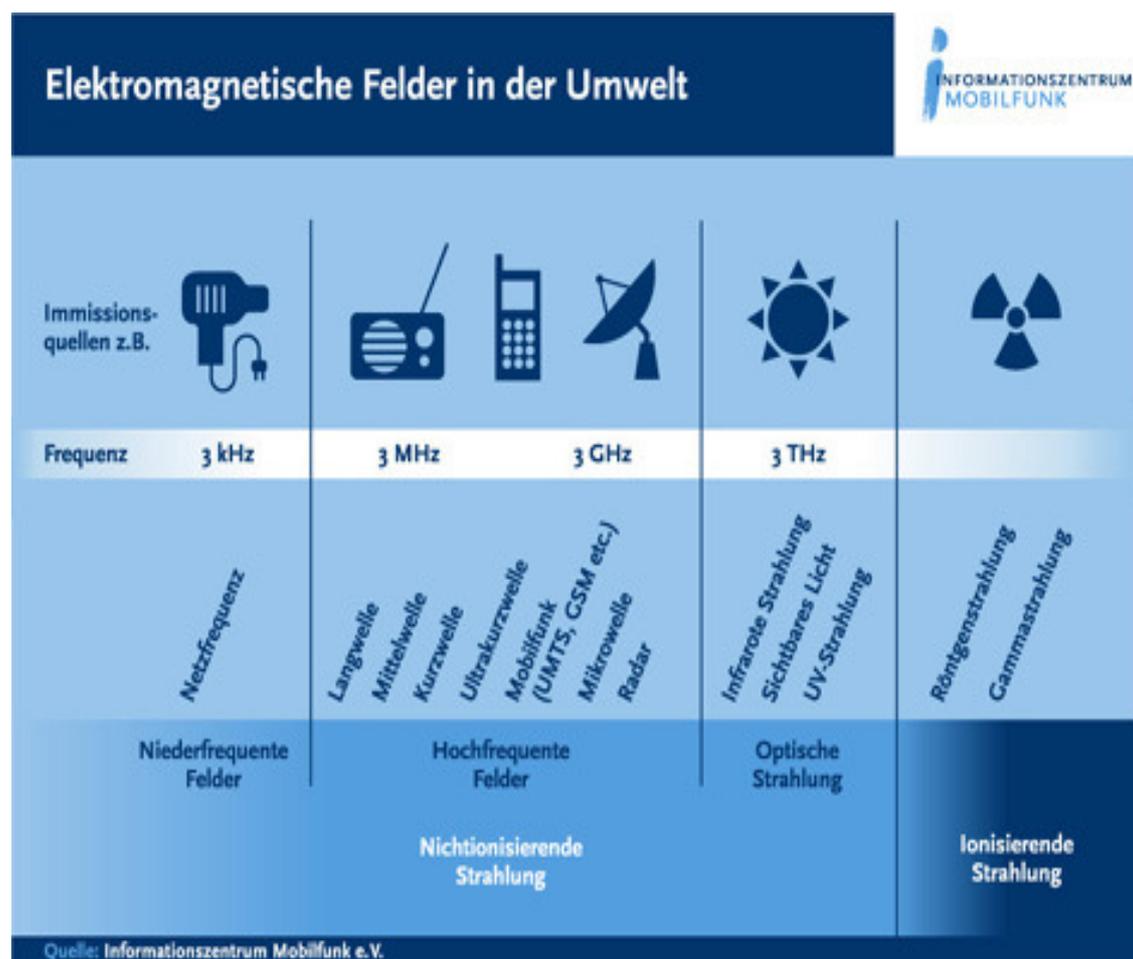


Abb. 1.1: Bandbreite elektromagnetischer Felder ([www.izmf.de](http://www.izmf.de))

Sowohl bei nieder- als auch bei hochfrequenten Feldern werden athermische Effekte vermutet. Zu diesen zählen z.B. die Anregung zellulären Wachstums, die Modulation von biochemischen Reaktionen, der Einfluss auf den Kalziumhaushalt der Zelle, die Beeinflussung des Hormons Melatonin und eine Änderung des Signals beim EEG bzw. EKG. Thermische Effekte, die bei der Befeldung mit hochfrequenten Feldern bereits nachgewiesen sind, erfolgen durch Absorption der Strahlung im betroffenen Gewebe und führen so zu dessen Erwärmung ([www.emf-portal.de](http://www.emf-portal.de)).

Die Frage nach dem Einfluss von EMF auf die männliche Fruchtbarkeit stellt insofern ein interessantes Thema dar, als die bereits isoliert vorliegenden Spermien sich in vielfältiger Hinsicht sowohl morphologisch wie auch funktionell von somatischen Zellen deutlich unterscheiden. Schon Saunders und Kowalczyk (1981) stellten bei kontinuierlicher Befeldung mit 2,45 GHz für 30 min von betäubten Mäusen einen Rückgang der Anzahl von primären Spermatozyten und eine Schädigung des Keimepithels fest. Dies war auf die feldinduzierte schädigende Wärmewirkung, die ab einer Spezifischen Absorptionsrate (SAR)  $\geq 30$  W/kg auftritt, zurückzuführen.

Im Vorgriff auf eine geplante nachfolgende Untersuchung zur Differenzierung und Quantifizierung von thermischen bzw. nicht-thermischen Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder der Mobilfunkkommunikation auf die Integrität und Funktionalität von isoliert lebenden Zellen, sollten mittels der vorliegenden Pilotstudie diverse, auch methodisch orientierte Grundlagen erarbeitet werden. So bestand die zu prüfende Vorstellung, dass mit Spermien, einem physiologischerweise isoliert vorliegendem, sehr einheitlichen und sehr motilem Zellmaterial, besonders prägnant thermisch induzierte funktionelle Befeldungsdefekte nachgewiesen und von nicht-thermischen Schäden abgegrenzt werden können. Es sollte deshalb im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen mit Spermien bei 25°C, 37°C bzw. 42°C und bei unterschiedlichen Inkubationsdauern von 30 und 60 min ausschließlich thermisch induzierte Auswirkungen auf Integrität und Funktionalität nachgewiesen werden.

---

Dabei sollte die Motilität, der Lebend-Tot-Anteil und die morphologischen Veränderungen mikroskopisch erfasst werden. Die Integrität der Akrosom- und der Plasmamembran sollte mittels Durchflusszytometer beurteilt werden. Zur Überprüfung der Befruchtungsfähigkeit einer hochkomplexen physiologischen Funktion der temperaturbehandelten Keimzellen sollte schließlich auch eine In-vitro-Fertilisation durchgeführt werden.

## 2 Literatur

### 2.1 Morphologie der Bullenspermien

#### 2.1.1 Allgemeiner Aufbau

Im Allgemeinen lässt sich die Spermienzelle in Kopf, Mittelstück und Geißel unterteilen, wobei der Kopf in einen akrosomalen und postakrosomalen Abschnitt gegliedert ist (siehe Abb. 2.1).

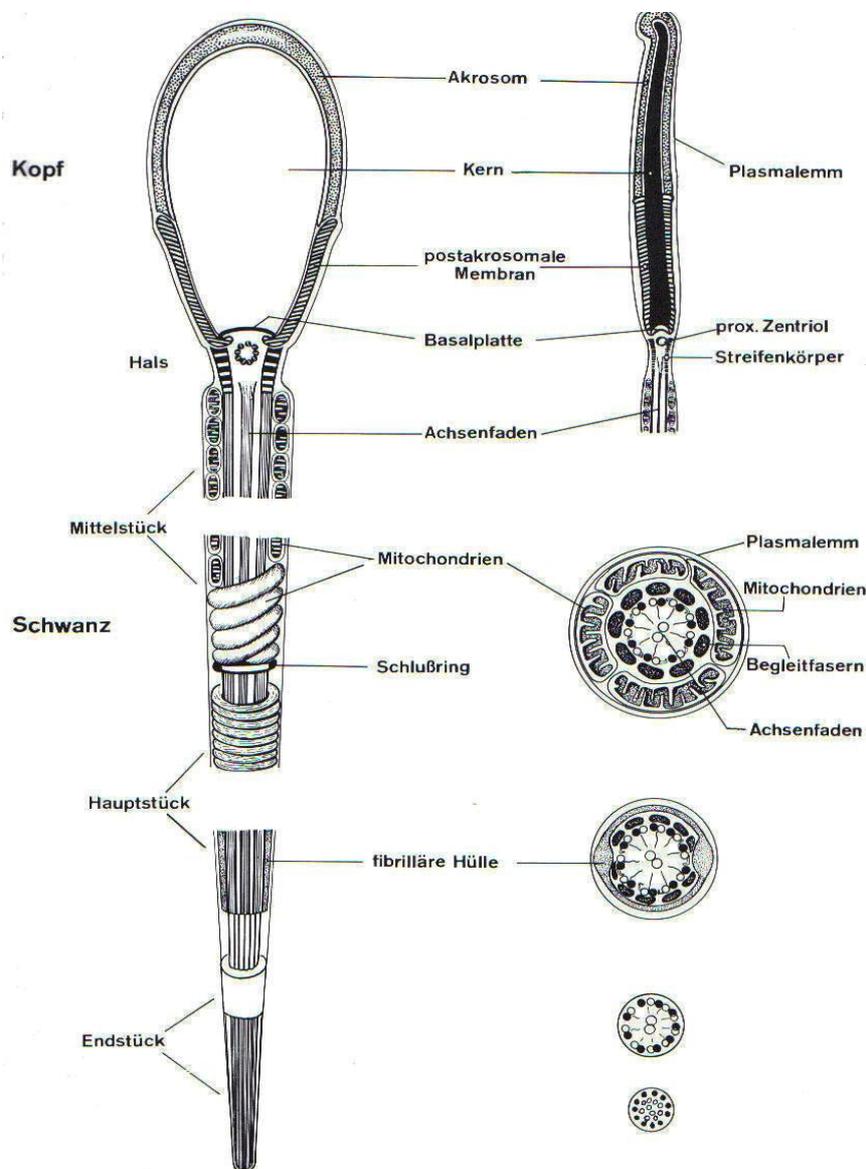


Abb. 2.1: Aufbau eines Bullenspermiums (In: Schnorr, Embryologie der Haustiere, 1996)

Der Kopf hat eine ovale Form und enthält einen stark kondensierten Zellkern mit haploidem Chromosomensatz. Über die vorderen zwei Drittel des Kopfes zieht sich das Akrosom, welches aus einer inneren und äußeren Membran besteht und die für die Akrosomreaktion (s. Kap. 2.1.3) notwendigen Enzyme speichert. Der Kopf wird am distalen Ende von der Basalplatte abgeschlossen und bildet den Übergang zum Schwanz des Spermiums. Dort befinden sich auch Kernporen, da hier die Kernmembran oft vom Karyoplasma abgehoben ist.

Die Geißel unterteilt sich in die Halsregion mit dem Zentriol, in das Mittelstück mit den spiralförmig angelegten Mitochondrien und in das Haupt- und Endstück. Der Hals des Spermiums liegt zwischen Kopf und Schwanzteil und ist beweglich. Es besteht aus einem Streifenkörper, in welchem das proximale Zentriol quer eingebaut ist. Dieses wird bei der Befruchtung an die Eizelle abgegeben und spielt eine wichtige Rolle bei der ersten Furchungsteilung. Das sog. Axonem mit zwei zentralen Tubuli und neun außen liegenden Doppeltubuli, welches sich ursprünglich aus dem distalen Zentriol entwickelte, durchzieht die gesamte Länge des Spermischwanzes. Die Doppeltubuli lassen sich in A- und B-Tubuli unterteilen, wobei die A-Tubuli zwei Dyneinärmchen auf den nächsten Doppeltubulus richten. Durch das Verschieben der Doppeltubuli gegeneinander durch Auf- und Abbau der Dyneinarme wird die wellenförmige Bewegung der Geißel ermöglicht. Man spricht vom „Tubulus-Gleit-Modell“.

Im Mittelstück liegen die Mitochondrien spiralförmig um den axonemalen Komplex und um die neun Mantelfasern. Beim Rind sind ca. 65-75 Windungen vorhanden. Die Mitochondrien produzieren mit Hilfe von Enzymen Energie, die für die Vorwärtsbewegung des Spermiums notwendig ist. Da Säugerspermien eine relativ große Anzahl an Mitochondrien aufweisen, gewährleisten diese eine Überlebensdauer von einigen Tagen. Um eine bewegungsinduzierte distale Verlagerung der Mitochondrien zu vermeiden, befindet sich am Ende des Mittelstücks der Jensen-Ring, ein Schlussring.

Das Hauptstück ist ca. 45-55  $\mu\text{m}$  lang und enthält unter der Zellmembran liegend Ringfasern, die das Axonem und die Mantelfasern umgeben.

Das relativ kurze Endstück, 4-6  $\mu\text{m}$ , enthält keine Mantel- oder Ringfasern mehr. Das Axonem, das sich hier in 20 einzelne Mikrotubuli aufspaltet, wird nur noch von der Zellmembran umgeben (Sinowatz, 2001).

### 2.1.2 Plasmamembran

Die Plasmamembran (PM) von Samenzellen, siehe Abb. 2.2, besteht wie die Membran von somatischen Zellen aus einer Lipiddoppelschicht und dient der Abgrenzung vom äußeren Milieu.

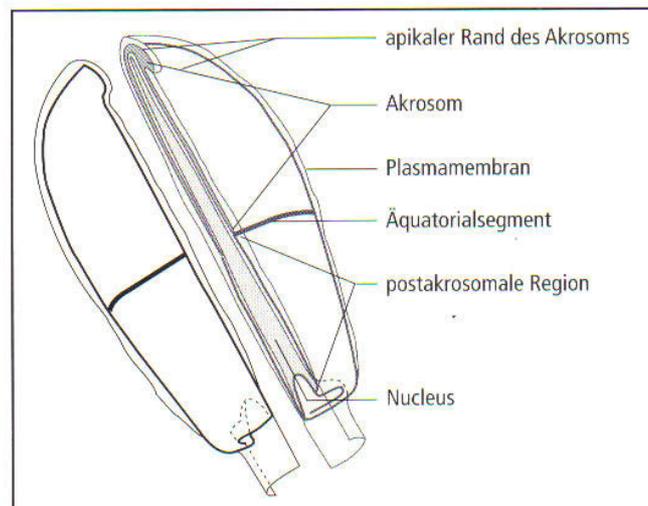


Abb. 2.2: Aufbau eines Spermienkopfes (In: Busch, Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren, 2007)

Zusätzlich ermöglicht sie mit Hilfe spezifischer und unspezifischer Transportmechanismen den Stoffaustausch und ist an der Steuerung des Verhaltens der Zelle durch Empfang und Versand von Signalen beteiligt. Im Unterschied zu Membranen somatischer Zellen enthält die PM eine ungewöhnlich hohe Menge an ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden, welche eine hohe Fluidität ermöglichen, aber auch die Samenzelle für oxidative Einflüsse besonders empfänglich machen. Außerdem unterscheidet sich die Bauweise der Plasmamembran der Spermienzelle je nach Lokalisation im Anteil integraler Membranproteine

erheblich. Diese Membranproteine bilden z.B. Kanalproteine für Wasser- und Ionentransport, Rezeptorproteine für die Kapazitation und Akrosomreaktion, Enzymkomplexe für die Verflüssigung des Samens, für die Penetration der Kumuluszellen, für den Kohlenhydratstoffwechsel bzw. für die Hyperaktivierung. Ebenso finden sich in der Membran Proteine, welche die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida der Eizelle ermöglichen. Von diesen unterscheidet man die Proteine, die von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sezerniert werden. Diese sind notwendig, um z.B. den Energiestoffwechsel der Samenzelle möglichst gering zu halten, die Bewegung des Schwanzes zu hemmen, Sauerstoffradikale abzufangen, ein vorzeitiges Auslösen der Kapazitation und Akrosomreaktion zu verhindern und um Koagula zu lösen bzw. Substrate aus Prostasomen (granuläre Partikel der Prostataepithelien) freizusetzen.

Die so genannten Adhäsine sind spezielle Glykoproteine der Plasmamembran. Diese sind durch ihre Oligosaccharidseitenketten in der Lage, an die Zona pellucida zu binden und sowohl die Akrosomreaktion als auch die Exozytose auszulösen.

Zuletzt existiert noch eine Gruppe von Proteinen, welche vom Genom der Germinalzellen kodiert werden, allerdings umgehend sezerniert, umgebaut und in der PM bzw. an deren Proteinen verankert werden. Die einzelnen Funktionen dieser PM-Proteine für die Samenzelle sind allerdings noch nicht genau erforscht (Busch, 2007).

### 2.1.3 Akrosom und Akrosomreaktion

Das Akrosom liegt am apikalen Ende des Spermienkopfes dem Kern kappenartig auf und bildet mit der äußeren Begrenzung durch die PM den zytoplasmatischen Spalt. Aufgrund der Entwicklung aus dem Golgi-Apparat enthält das Akrosom bestimmte Enzyme, die u.a. der Kapazitation dienen. Die beiden wichtigsten akrosomalen Enzyme sind Akrosin und Hyaluronidase (Morton, 1977).

Die Hauptfunktionen dieser Enzyme sind wie folgt:

- 1) Zerstreuung des Cumulus oophorus
- 2) Auflösung der Zona pellucida an der Eintrittsstelle

Bei der Akrosomreaktion verschmilzt die äußere Akrosommembran (AM) mit dem Plasmalemm, unter Einfluss von intra- und extrazellulären Calciumionen, welche die Exozytose des Akrosomeninhalts ermöglichen (Harrison u. Roldan, 1990).

Die innere AM ist relativ stabil und bleibt nach Akrosomreaktion erhalten. Die Penetration der Zona pellucida und die Fusion mit dem Oolemma ist rezeptorvermittelt, wobei bestimmte Areale des Kopfes sich an Komponenten der Oozyte binden (Wassarman, 1990).

Die Akrosomreaktion wird nur nach Beendigung der Kapazitation eingeleitet. Durch Kanäle im Akrosom, die durch punktuelle Verschmelzung von PM und äußerer AM entstehen, können die Enzyme (Hyaluronidase, Akrosin, saure Hydrolasen, Esterasen) abgegeben werden. Die Hyaluronidase trägt durch Hydrolyse zur Durchdringung der Kumulusmasse bei, wobei Akrosin den Durchtritt durch die Zona pellucida der Eizelle ermöglicht.

Das Akrosom geht schließlich verloren und die innere AM die Abgrenzung nach außen darstellt. Die PM und die äußere AM verschmelzen am Äquatoralsegment, um die Integrität der Zelle zu wahren. Ähnlich der Exozytose somatischer Zellen, spielt bei der Exozytose des Akrosoms der Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts eine wesentliche Rolle (Rovan, 2001).

## 2.2 Spermatogenese und Spermienreifung

Die Geschlechtsreife beim Bullen tritt durchschnittlich im Alter von 8 bis 12 Monaten auf, wobei Milchviehrassen früher geschlechtsreif werden als Fleischrassen.

Ab diesem Zeitpunkt entwickeln sich die Samenzellen im Hoden, die mit der Einwanderung von sog. Primordialkeimzellen (Urkeimzellen) beginnt. Diese

Urkeimzellen besitzen noch einen diploiden Chromosomensatz, der sich während der Weiterentwicklung im keimbildenden Epithel auf einen haploiden Satz reduziert. Die nach der Teilung entstandenen befruchtungsfähigen Keimzellen besitzen 22 Autosomen und das Geschlechtschromosom X oder Y (Dressler, 2002).

Bis zum endgültigen Zustand durchlaufen die Urkeimzellen verschiedene Vermehrungsphasen von Gonozyten über Prospermatogonien bis zu den Spermatogonien (Rüsse u. Sinowatz, 1998). Schließlich setzen in den Samenkanälchen zyklische Samenbildungsprozesse ein und die Zellen vermehren sich durch mitotische Teilung, durchlaufen dann beide Reifeteilungen und differenzieren sich zu Samenzellen. Diese Prozesse finden ab der Pubertät in den Hodenkanälchen statt und unterteilen sich in folgende drei Hauptprozesse:

- 1) undifferenzierte Spermatogonien vermehren und teilen sich mitotisch,
- 2) es erfolgt eine meiotische Reduktion von diploid zu haploid
- 3) postmeiotische Zellen transformieren sich morphologisch zu Spermatozoen, die ins Tubuluslumen abgegeben werden

Akrosomale Bestandteile werden im Golgi Apparat synthetisiert, dessen Vesikel verschmelzen zum Akrosom. Während sich der Nukleus kondensiert, zieht sich das Akrosom über den basalen Pol des Nukleus (Courtens, 1979), gegenüber am Pol bildet sich die Geißel.

Das Intervall zwischen der höchst sensitiven Phase der Spermatogenese, der meiotischen Prophase und der Ejakulation beträgt ca. 30 Tage (Amann und Schanbacher, 1983).

## 2.3 Versuchsmodell Spermium

Die Spermienzelle bietet mehrere strukturelle und funktionelle Parameter, die im Experiment messtechnisch zugänglich sind und möglicherweise empfindlich auf Einflüsse aus der Umwelt reagieren.

So untersuchte z.B. Nagy et al. (2004) an Rinderspermien mittels Durchflusszytometrie Veränderungen der Plasmamembran- und Akrosommembranintegrität während einer vierstündigen Inkubation bei 37°C und Untersuchung der Proben alle 30 min, die mit der Kontrolle (0 min) verglichen wurde, welche direkt nach dem Auftauen untersucht wurde. Sie konnten signifikante Unterschiede zwischen den Bullen feststellen. Auch De Pauw et al. (2003) führte Versuche zur Lagerung von verdünnten bzw. unverdünnten Rinderspermien bei Raumtemperatur durch, wobei die Proben über einen Zeitraum von vier Tagen unter unterschiedlichen Bedingungen (pH-Wert, Osmolarität, Spermienkonzentration, O<sub>2</sub>-Gehalt) gelagert wurden. Es wurden Parameter wie die Membranintegrität, Motilität, Mitochondrienmembranpotential bzw. die DNA-Fragmentation untersucht.

Auch die so genannte Akrosomreaktion wurde mittels Hengstspermien untersucht (Graham, 1996) und deren Beeinflussung durch verschiedene Reagenzien, u.a. des Hormons Progesteron (Fukami et al., 2003), auf diese evaluiert.

Weitere Untersuchungen an Spermien betrafen den Zusammenhang zwischen Fertilität und Alter des Bullen (Karabinus et al., 1990), sowie den Einfluss des Genotyps des Bullen dargestellt anhand der Samenqualität (Asad et al., 2004) oder des Managements auf Parameter wie Spermienvolumen, -konzentration, -gesamtheit und Vitalität (Fürst-Waltl et al., 2006). Karabinus et al. (1990) kamen zu dem Ergebnis, dass das Ejakulat jüngerer Bullen nach Inkubation bei 38,5°C für 180 min stärker chromatingeschädigt war, als jenes der Älteren. Asad et al. (2004) stellten beim Vergleich reinrassiger Holstein-Friesian Bullen mit Kreuzungszüchtungen fest, dass die reinrassigen Bullen ein höheres Ejakulatvolumen, eine bessere Massenbewegung und Vorwärtsbeweglichkeit aufwiesen.

Was offensichtlich bisher fehlt sind zitierbare Untersuchungen, bei denen die Spermien nicht Selbstzweck waren, sondern als in der Handhabung erprobte isolierte „Modellzellen“ zur Überprüfung von äußeren Einflüssen im Sinne der Darstellung von Schadwirkungen auf lebende somatische Zellen eingesetzt wurden. Dies überrascht, denn ein nicht unwesentlicher Vorteil des Einsatzes von Spermien ist die Verfügbarkeit und vielfach erprobte Lagerfähigkeit im Tiefgefrierzustand. So kann das Forschungsobjekt „Zelle“ jederzeit und in großer Zahl von einer Besamungsstation bezogen werden und im Fall von Tiefgefriersperma portioniert über viele Jahre bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert werden und dadurch auch immer wieder für Wiederholungsuntersuchungen genutzt werden. Ein wichtiger Grund für diese experimentelle „Missachtung“ von Spermien könnten zu große Unterschiede in Struktur und Funktion im Vergleich zu somatischen Zellen sein, so dass damit erzielte Ergebnisse zu wenig repräsentativ sind.

### 2.3.1 Vergleich Spermienzelle und somatische Zelle

Bezüglich Entwicklung und Bau unterscheiden sich die Samenzelle und die somatische Zelle in folgenden drei Punkten (Sinowatz, 2001):

1. Keine zytoplasmatische Teilung (sog. Zytokinese) während Mitose und Meiose, daher sind Spermien bis kurz vor Abgabe in das Tubuluslumen durch Interzellularbrücken miteinander verbunden.  
Da jedes in Entwicklung stehende Spermium sich das Zytoplasma mit seinem Nachbarn teilt, wird es mit allen Produkten eines kompletten diploiden Genoms versorgt.
2. Der Chromosomensatz wird während der Meiose von einem diploiden auf einen haploiden Satz reduziert und es erfolgt eine Rekombination des genetischen Materials.
3. Aus rundkernigen Vorstufen entstehen hochdifferenzierte bewegliche Spermien, was mit einer Transformierung von Kern und Zellorganellen einhergeht. Anschließend werden diese aus den Tubuli seminiferi contorti entlassen und sind voll funktionsfähig.

### 2.3.2 Energiestoffwechsel der Spermienzelle

Der Energiestoffwechsel der Spermienzelle erfolgt in den Mitochondrien. Die Energie, die gewonnen wird, wird v.a. für die Geißelbewegung (Schülke, 1991) aber auch für Redox- und Transformationsprozesse in der AM, PM und im Zytoskelett verwendet (Zaneveld et al., 1991). Nur ein geringer Anteil der Energie wird bei der Proteinsynthese in den Ribosomen verbraucht. Um Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) zu erzeugen, kommen folgende zwei Mechanismen zur Anwendung:

- 1) Glykolyse
- 2) Oxidative Phosphorylierung

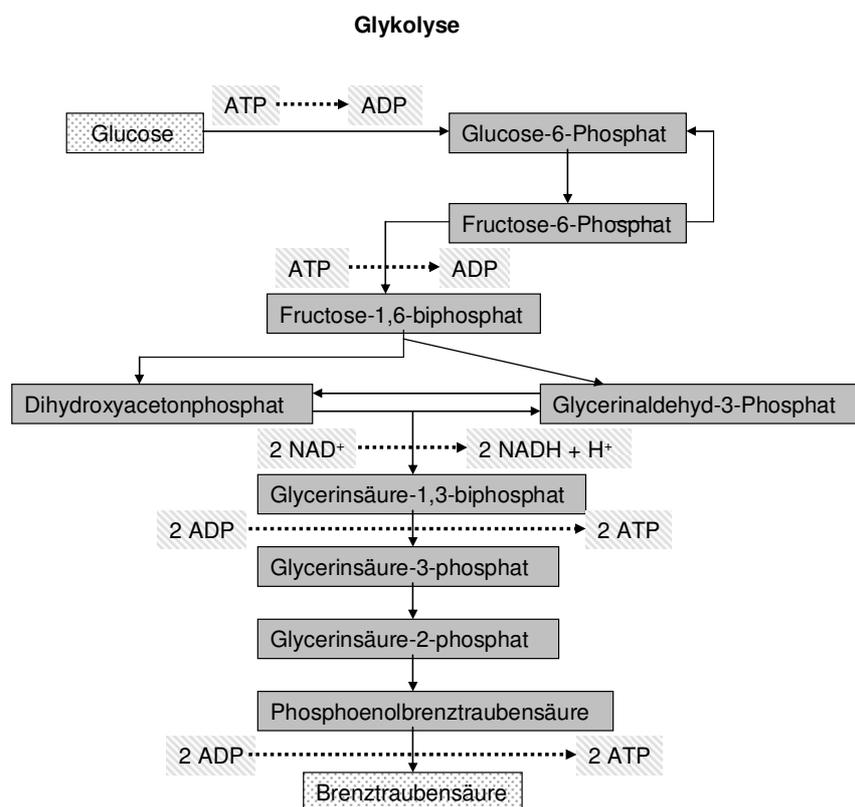


Abb. 2.3: Biochemischer Ablauf der Glykolyse

Die Glykolyse, siehe Abb. 2.3, in Spermienzellen verläuft ähnlich wie in somatischen Zellen (Karlson et al., 1994). Der erste Schritt ist hierbei die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat unter Verwendung des Enzyms Hexokinase. Dieser läuft in der Samenzelle bereits an der PM

bzw. an der „fibrous sheath“ (FS) ab. Im Hauptstück setzt sich die Glykolyse bis zur Entstehung des Laktats ebenfalls an der FS fort, da sich hier das Enzym Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase befindet.

Die Laktatdehydrogenase X ist ein spermienpezifisches Enzym, welches an Strukturproteine der FS gebunden ist (Bradley et al., 1996). Laut Jones (1997) wird ATP im Hauptstück ausschließlich durch Glykolyse gewonnen.

Die oxidative Phosphorylierung ist im Wesentlichen ein aerober Stoffwechsel, welche wiederum dem Abbau des Pyruvats sehr ähnlich ist. Hier gibt es allerdings speziesspezifische Unterschiede, wobei die Überlebensdauer der Spermien von der Anzahl der Mitochondrien und den Substrateigenschaften abhängt. So können auch endogen Enzyme verwendet werden, die im Fall eines Mangels an exogenen Stoffen, z.B. durch die Nutzung einer spezifischen Energiereserve, ein Überleben der Spermienzelle gewährleisten (Carey et al., 1981).

In den Mitochondrien der Samenzelle können zudem  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Phosphationen gespeichert werden, wenn im Zytosol ein Überschuss vorliegt. Zarca et al. (1988) stellten fest, dass die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen u.a. abhängig von der Laktatdehydrogenase X ist, welche bei der Glykolyse die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Das Vorhandensein von Laktat wiederum steigert die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

In Untersuchungen über die Spermienmotilität unter aeroben und anaeroben Bedingungen, kam Krzyzosiak (1999) zum Schluss, dass die Motilität unter anaeroben Konditionen nicht erhalten werden kann, wenn die Glykolyse gehemmt wird.

## **2.4 Standardparameter der spermatologischen Untersuchung**

### **2.4.1 Motilität der Spermien**

Die Beweglichkeit der Spermien, die sog. Motilität, ist die Fähigkeit reifer Samenzellen sich durch Auf- bzw. Abbau bestimmter Molekülverbindungen

fortzubewegen. Die Bewegung der Samenzellen erfolgt positiv rheotaktisch, d.h. entgegen des Flüssigkeitsstromes (Dressler, 2002). Hierfür notwendig ist ein pH-Wert von 6,4-7,0 (Vitt, 1997), sowie ein ausreichend hoher Fruktosegehalt, ca. 0,01 g/ml beim Bullen (Mann, 1948), des umgebenden Milieus. Vorwärtsbeweglichkeit wird durch die koordinierte Wellenbewegung der Geißel erzeugt und basiert auf Kräften zwischen nebeneinander liegenden peripheren Axonempaaen (Satir et al., 1981).

Die Dynein-Arme, welche im Ruhezustand an das benachbarte Axonem gebunden sind, lösen und strecken sich und verbinden sich wieder an einer neuen Stelle entlang des Filaments. Das Lösen der Arme verbraucht ATP und wiederholt sich, was in einem progressiven Krümmen der Geißel resultiert. Die Axonempaare auf einer Seite arbeiten entgegengesetzt zueinander und erzeugen so die wechselnden Bewegungen. Die Anzahl und Amplitude der Bewegungen des Schwanzes steigt nach der Kapazitation und proportional dazu steigt auch der Energieverbrauch (Yanagimachi, 1981). Die Motilität des Spermiums hat wenig Einfluss auf die Passage durch Zervix und Uterus. Für die Überwindung derartig großer Strecken spielen hauptsächlich Kontraktionen des weiblichen Genitaltrakts eine große Rolle (Hunter, 1980). Zusätzlich ist die Bewegung des Spermiums für die Passage notwendig und die gesteigerte Peitschenbewegung der kapazitierten Spermien sorgt für das Eindringen in den Cumulus und die Zona pellucida.

Ein aktuell untersuchtes Thema ist die Chemotaxis von Spermien, welche zunächst an Seeigelspermien erforscht wurde (Vacquier et al., 2004). Bereits 1990 beschrieben Villanueva-Diaz et al., dass die menschliche Follikelflüssigkeit chemische Lockstoffe für Spermien enthält. Sowohl die Oozyte als auch die sie umgebenden Kumuluszellen sezernieren diese Lockstoffe (Sun et al., 2005), wobei der Einfluss von Progesteron, cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  hierauf diskutiert werden (Kaupp et al., 2008).

Auch Thermotaxis spielt bei der Orientierung in Richtung Eizelle eine Rolle. Bahat und Eisenbach (2006) beschreiben die Bewegung kapazitierter Spermien von kühlem zu warmem Milieu, wobei hier der physiologische Temperaturabfall um die Ovulation eine Rolle zu spielen scheint.

Grundsätzlich ist die Bedeutung von Chemo- bzw. Thermotaxis bei Säugetierspermatozoen noch relativ unerforscht und teilweise auch widersprüchlich (Kaupp et al., 2008).

#### 2.4.2 Lebend-Tot-Färbung

Mittels Lebend-Tot-Färbung kann der Anteil der toten bzw. der lebenden Spermien im Ausstrich dargestellt und mikroskopisch erfasst werden.

Hierfür werden mit den zu untersuchenden Proben Ausstriche hergestellt, wofür unterschiedliche Farbstoffe zur Verwendung kommen. Schon 1940 führte Morosow Färbeversuche mit Eosin durch. Bonadonna und Olgiatti beschrieben 1953 die Färbung mittels Bromphenolblau-Nigrosin (BN), wobei Nigrosin als Kontrastfarbstoff dient. Die Anfärbung der Spermien beruht auf der Durchlässigkeit der Membranen (Rauhaus, 1990). Der Farbstoff kann bei toten Spermien durch die Membran durchdringen und diese werden angefärbt, lebende Samenzellen können durch die unversehrte Membran den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben farblos.

Zudem stellte Watson (1981) fest, dass durch einen Kälteschock bei Tiefgefrierkonservierung die Membranstabilität beeinträchtigt wird und der ATP-Gehalt der Zelle sinkt. Zugleich erhöht sich aber die Durchlässigkeit für verschiedene Farbstoffe (Hancock, 1951).

#### 2.4.3 Morphologische Beurteilung der Spermien

Die Beurteilung der Struktur der Spermien erfolgt ebenfalls mittels Phasenkontrastmikroskopie und im Zuge der BN-Färbung. Nach dem Schema von Leidl (1971) wird zwischen primären und sekundären Strukturanomalien unterschieden. Zu Ersteren gehören Missbildungen des Kopfes, des Mittelstücks und des Schwanzes, zu den sekundären Missbildungen zählen Krümmlinge und lose Köpfe bzw. abgelöste Kopfkappen. Abb. 2.4 veranschaulicht die im Ausstrich ersichtlichen, möglichen Spermiendefekte.

---

Primäre Schäden entstehen während der Spermatogenese, sekundäre Anomalien im Nebenhoden.

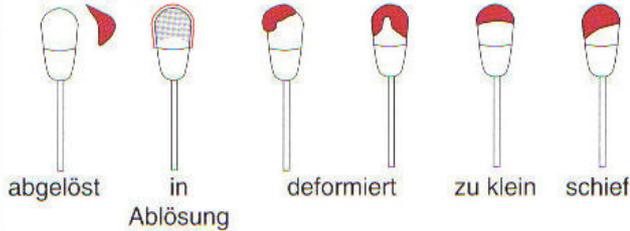
Dott (1975) beschreibt zusätzlich sog. tertiäre Anomalien. Diese Missbildungen entstehen durch äußere Einflüsse, wie z.B. Temperaturveränderungen außerhalb des Körpers. Da diese Anomalien von den sekundären Anomalien schwierig abzugrenzen sind, sieht Würgau (1986) die tertiären Anomalien als eine Steigerungsstufe der Sekundären.

Im Zusammenhang mit den Auswirkungen auf die Fertilität gibt es Angaben zu den maximal tolerierten veränderten Spermien, die 20% des Gesamtbestandes betreffen dürfen.

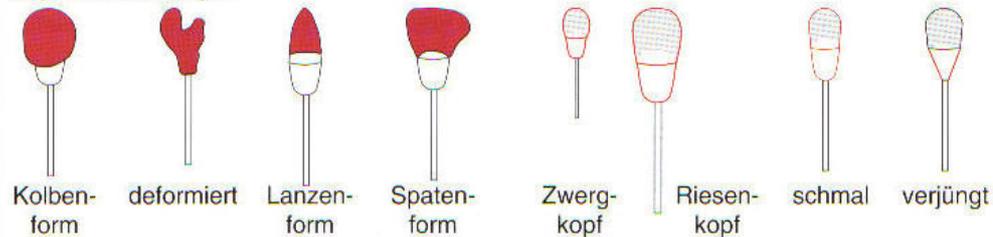
**normale Kopfkappe, normale Kopfform**



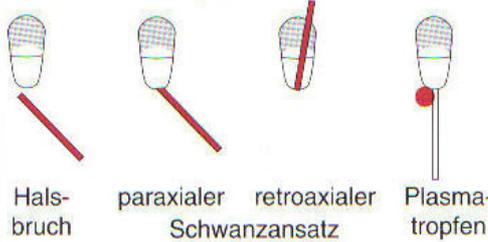
**Kopfkappenveränderungen**



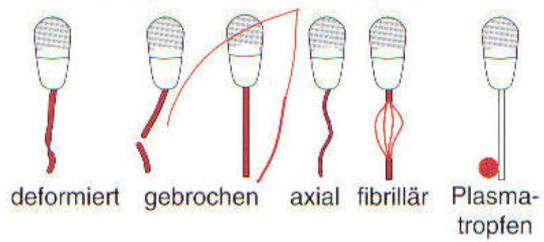
**Kopfveränderungen**



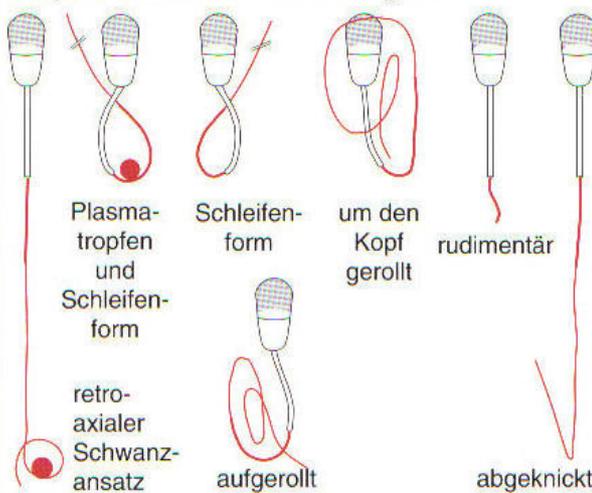
**Halsveränderungen**



**Verbindungsstückveränderungen**



**Haupt- und Endstückveränderungen**



**Doppel- und Mehrfachmissbildungen**

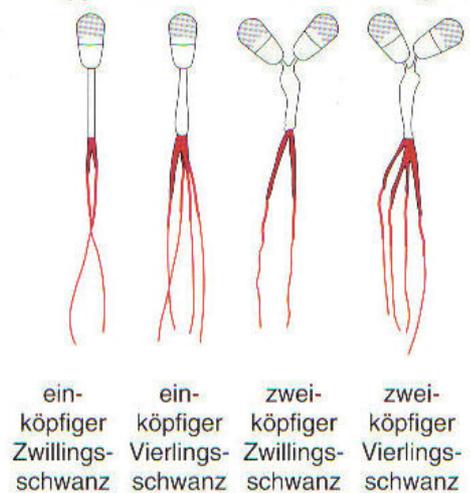


Abb. 2.4: Darstellung der Spermidefekte (In: Busch, Veterinärmed. Andrologie, 2001)

## 2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird bereits seit den 70er Jahren im klinischen Bereich eingesetzt, erlangte aber erst in den 80ern eine größere Bedeutung (McCoy, 2002).

Oftmals wird diese auch als FACS („Fluorescence activated cell sorting“, geschützter Markenname durch Fa. Becton Dickinson) bezeichnet und basiert auf der Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Partikeln ausgesendet werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom einen Lichtstrahl passieren. Die Grundlage der Durchflusszytometrie stellt die Reflektion und Absorption von Licht, sowie die Emission von Fluoreszenz dar. Durch die vollautomatisierte Technik lässt sich die Qualität von Spermien objektiv beurteilen und trägt so zu einer Bereicherung in der Tierzucht bei (Grundler et al., 2001).

### 2.5.1 Physikalische Grundlagen

Ein Durchflusszytometer besteht aus vier Systemen (siehe Abb. 2.5):

- 1) der Optik
- 2) dem Flüssigkeitssystem
- 3) der Elektronik
- 4) dem Computersystem

Die Optik besteht u.a. aus dem Argonionenlaser, der bei einer Wellenlänge  $\lambda = 488 \text{ nm}$  die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Je nach System können mehrere Laser zum Einsatz kommen. Dadurch ist es möglich, gleichzeitig mehrere Parameter einer Zelle zu untersuchen. Weitere Bestandteile der Optik sind Linsen und Spiegel, die die Richtung des Lichtstrahls lenken bzw. an Detektoren weiterleiten.

Das Durchflusszytometer ist ebenso in der Lage, die Streuung von Licht zu messen, die durch Reflektion bzw. Brechung von der jeweiligen Zelle ausgeht. Die Streuung, die im rechten Winkel zur Richtung des Laserstrahls gemessen wird, korreliert mit der Granularität der Zelle und wird als „Side Scatter“ (SSC)

bezeichnet. Das sog. „Forward Scatter“ (FSC) bezeichnet die Streuung des Lichts in geradliniger Richtung, d.h. im  $180^\circ$  Winkel zur Eintrittsstelle des Lasers in die Zelle. Diese korreliert mit der Größe des gemessenen Partikels (McCoy, 2002).

#### SIMPLIFIED LAYOUT OF TYPICAL ANALYTICAL FLOW CYTOMETER

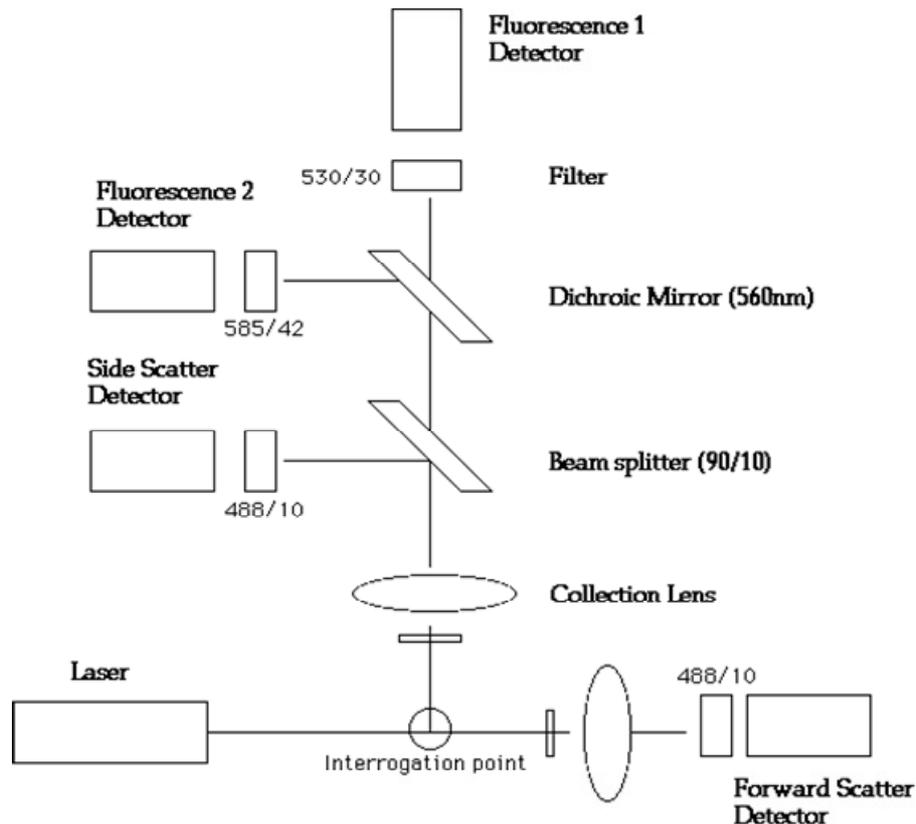


Abb. 2.5: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers  
([www.facslab.unibe.ch/flow.html](http://www.facslab.unibe.ch/flow.html))

Das Flüssigkeitssystem stellt im Grunde die Trägerflüssigkeit dar, welches die zu messenden Partikel mittels hydrodynamischer Fokussierung am Laser vorbeiführt ([www.bdbeurope.com](http://www.bdbeurope.com)).

Das emittierte Licht wird von Photomultiplikatordetektoren aufgefangen, in elektronische Impulse umgewandelt und schließlich von einem Computer analysiert. Die Daten können als Punktwolkendiagramme oder Histogramme dargestellt und mit geeigneter Software kann eine Statistik erstellt werden.

## 2.5.2 Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status

Die Bestimmung der Plasmamembranintegrität (PMI) mittels Durchflusszytometrie erfolgt durch Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI).

Die Messung der Integrität der Akrosommembran (AM) lässt sich mit der Bestimmung der PMI kombinieren. Rathi et al. (2001) beschreiben die kombinierte Färbung mittels Fluorescein-Isothiocyanat Peanut Agglutinin (FITC-PNA) und PI, um Akrosomschäden der Spermienzellen im Durchflusszytometer feststellen zu können.

Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen zusätzlich zur PI-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-PNA gefärbt. Abb. 2.6 zeigt die Subpopulationen der gefärbten Spermien nach Messung im Durchflusszytometer. Hierbei wird PI mittels Rotfluoreszenz, FITC-PNA mittels Grünfluoreszenz gemessen. Die Zellen, die weder Rot- noch Grünfluoreszenz zeigen, besitzen sowohl eine intakte AM, als auch eine intakte PM. Spermien, die eine hohe Rotfluoreszenz aufweisen, allerdings keine Grünfluoreszenz, stellen Zellen dar, deren AM intakt, aber deren PM defekt ist. Durch die gestörte Membranintegrität wird die Durchlässigkeit für in diesem Fall den Farbstoff PI gegeben und führt so zur Anfärbung der Zelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Garner, 1994).

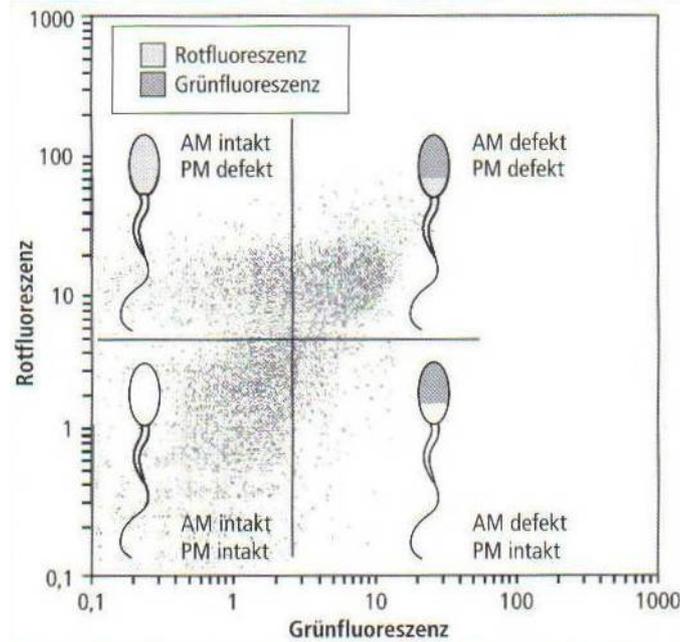


Abb. 2.6: Darstellung der unterschiedlich angefärbten Spermienfraktionen (In: Busch, Künstliche Besamung bei Haustieren, 2007)

Die Akrosommembran ist in der Lage Lektine zu binden, an die wiederum die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind (Blottner et al., 1998). Es werden Lektine wie z.B. PNA oder Pisum sativum (PSA) verwendet. Ersteres stammt von *Arachis hypogea* und bindet selektiv an die äußere Akrosomenmembran (Blottner et al., 1998; Cheng et al., 1996; Gadella et al., 2001; Sirivaidyapong et al., 2000). Häufig ist der Fluoreszenzfarbstoff FITC an PNA gekoppelt, wobei diese Kombination nur durch geschädigte Membranen dringen kann und so binden kann (Cheng et al., 1996).

### 2.5.3 Zusammenhang zwischen Membranintegrität und Fertilität

Amann und Hammerstedt (1993) betrachten die Fertilisation als Wahrscheinlichkeit, dass sich befruchtungsfähige Spermien bei einer Eizelle befinden. Bei der Befruchtung handelt es sich um ein multifaktorielles, komplexes Geschehen, welches von mehreren Parametern abhängig ist. Um eine erfolgreiche Fertilität zu gewährleisten, sei das Vorhandensein von kompetenten Spermien unerlässlich (Watson, 2000).

Bei dem Einsatz von Tiefgefriersperma, im Gegensatz zu Frischsperma, stellte Holt (2000) eine um die Hälfte reduzierte Überlebensrate fest. Dies

könnte zum einen an der verringerten Membranintegrität liegen. Saacke und White (1972) beobachteten bei ihren Untersuchungen einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz des intakten Akrosoms und der Fertilität in vivo. Whitfield und Parkinson (1992) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Non-return-Rate (NRR) von Bullen und der in vitro durch Heparin experimentell ausgelösten Akrosomreaktion. Sie stellten fest, dass der Anstieg der Akrosomreaktionen mit der NRR signifikant korrelierte.

Diesen Effekt konnte den Daas (1997) in ähnlichen Versuchen nicht belegen. Allerdings konnte er trotz nicht signifikantem Effekt im Bezug auf die Unversehrtheit der AM und der Fertilität, einen vom Bullen abhängigen individuellen Effekt beobachten. Garner et al. (1986) versuchten mittels Durchflusszytometrie einen Zusammenhang zwischen Spermienparametern und Fertilität zu finden. Der Vergleich der Non-Return-Rate der verwendeten Bullen mit den analysierten Parametern ergab keine signifikante Korrelation. Allerdings beschrieb Ahuja (1990) die durchaus wichtige Rolle des Spermienmembranaufbaus für die Fusion mit der Eizelle.

Andere Autoren konnten ebenfalls keine Korrelation der Motilität zur Fertilität (Ericsson et al., 1993; Hirai, 2000) feststellen, andere wiederum eine hohe Korrelation (Gschwend, 1986). Es müsste ein Vergleich der Methoden der verschiedenen Autoren erbracht werden, um die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse zu erörtern.

## **2.6 Thermische Effekte: eine Literaturübersicht**

### **2.6.1 Effekte einer Hyperthermie**

Als Hyperthermie wird eine Zunahme der physiologischen Körpertemperatur ohne Sollwertverstellung im hypothalamischen Zentrum bezeichnet (Hildebrandt, 1998). Die physiologische Körpertemperatur des erwachsenen Rindes liegt bei 38,3–38,8°C. Bei längerer Dauer der erhöhten Temperatur können viele Zellen des Körpers beeinflusst werden.

So führten z.B. Untersuchungen über den Einfluss von hohen Umgebungstemperaturen während der Sommerzeit (Mai bis September) auf den Reproduktionstrakt und die physiologische Leistung von Hasen zu den signifikanten Ergebnissen, dass körperliches Wachstum und bestimmte Reproduktionsparameter negativ beeinflusst wurden und auch die Resistenz gegenüber Krankheiten sank (Marai et al., 2002). Auch Hepatozyten erfuhren durch Erhitzung bei 45°C eine Denaturation, die bei einer Erhitzungsrate von 1 °C/min mittels Differentieller Scanning Kalorimetrie erfasst wurde (Lepock et al., 1993).

Bei Untersuchungen der Chromatinstruktur von menschlichen Spermien im Rahmen einer Fallstudie nach einer eintägigen fieberhaften Erkrankung (39,9°C), stellten Evenson et al. (2000a) latente Effekte mit nachfolgender abnormaler Spermienbildung fest. Auch Monterroso et al. (1995) untersuchte den Effekt einer Hyperthermie auf das Auftreten von Defekten des Spermiums, um einen möglichen Einfluss einer erhöhten Temperatur im weiblichen Genitaltrakt nachzuweisen. Mittels in vitro Versuchen stellte er fest, dass die Vitalität durch Inkubation für 1 bis 3 h bei 42 und 43°C im Vergleich zu 39°C etwas abnahm, kam aber zum Schluss, dass Temperaturen von 41 bis 42°C in vivo, wenig Einfluss auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermienzelle haben.

Auch Befruchtungsversuche mittels IVF mit morphologisch veränderten Spermien, die durch eine Erwärmung der Hodentemperatur verursacht wurden, ergaben eine verminderte embryonale Entwicklungsrate (Walters et al., 2005). Jiang M. et al. (2005) überprüften die Effekte von Erhitzen (58°C und 100°C) bzw. von Kühlung (4°C und -196°C) auf die Stabilität von Spermienproteinen und der DNA. Mittels intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) untersuchte die Arbeitsgruppe die Befruchtungsfähigkeit der behandelten Mäusespermien. Temperaturen von 58°C bzw. 100°C wirkten sich negativ auf die Fähigkeit aus, Eizellen zu aktivieren.

Allerdings konnten neben diversen negativen Effekten auch nützliche Aspekte der Hyperthermie festgestellt werden. So kann Hyperthermie als Therapie von

tumorösen Veränderungen der Blutzellen eingesetzt werden und die gestörte Differenzierung von Tumorzellen anregen (Sharif-Khatibi et al., 2007).

Auch Roti Roti (2008) beschreibt den positiven Effekt von erhöhter Temperatur zum Zwecke der Krebsbehandlung. Durch Hyperthermie können so die veränderten Zellen für die Chemotherapie sensibilisiert werden bzw. setzen durch Temperaturen im Bereich von 40-47°C apoptotische Prozesse ein.

### 2.6.2 Effekte einer Hypothermie

Eine Abnahme der physiologischen Temperatur bezeichnet man als Hypothermie. Auch niedrige Temperaturen können Veränderungen in Zellen auslösen bzw. Systeme im Körper drosseln.

So stellten Michelson et al. (1994) eine herabgesetzte Funktion der Thrombozyten und Reed et al. (1992) eine verminderte Aktivität der Gerinnungskaskade fest. Ebenso konnte eine Verlängerung der Prothrombinzeit und der partiellen Thromboplastinzeit, d.h. der Blutgerinnung, nachgewiesen werden (Rohrer et al., 1992).

Anhand von Motilität und Lebend-Tot-Färbung untersuchten Wales und White (1959) die Auswirkungen von 15°C bzw. 50°C auf Spermien unterschiedlicher Haustierarten. Bullenspermien reagierten hierbei empfindlich auf unter 15°C. Auch die Temperatur von 50°C führte trotz kurzer Einwirkung zu einer Abnahme der Motilität. Vishwanath und Shannon (1997) erkannten, dass die Motilität bei Lagerung der Spermien bei Raumtemperaturen zwischen 15 und 21°C graduierlich abnimmt. Dies ist auf die Unfähigkeit der Zellen, ATP durch Atmung zu gewinnen, zurückzuführen (Cummins et al., 1994; Vishwanath and Shannon, 1997).

Eine Absenkung der physiologischen Körpertemperatur hat aber auch therapeutisch nutzbare Auswirkungen:

So gab Polderman (2008) an, dass eine milde Hypothermie, d.h. Temperaturen von 32-35°C, im Fall einer Ischämie, deren Folgen abschwächen bzw. sogar verhindern kann.

## 2.7 Bedeutung der In vitro Produktion (IVP)

Die IVP von Embryonen ist eine reproduktionsmedizinische Verfahrensweise im Bereich der Biotechnologie.

Nach Bavister (1995) unterteilt sich diese in die folgenden drei Schritte:

- 1) In vitro Maturation (IVM)
- 2) In vitro Fertilisation (IVF)
- 3) Kultivierung der befruchteten Eizellen (IVC)

Schon 1959 gelang Chang die erste bei Säugetieren erfolgreiche IVF an Kaninchen- und Mäuseoozyten. 1968 führte Sreenan beim Rind die ersten Versuche mit in vitro gereiften Eizellen durch. 1977 wurde dieses Verfahren von Iritani und Niwa bis zur Entstehung von Embryonalstadien weiterentwickelt. Abb. 2.7 zeigt die Entwicklung der befruchteten Eizelle zur Blastozyste.

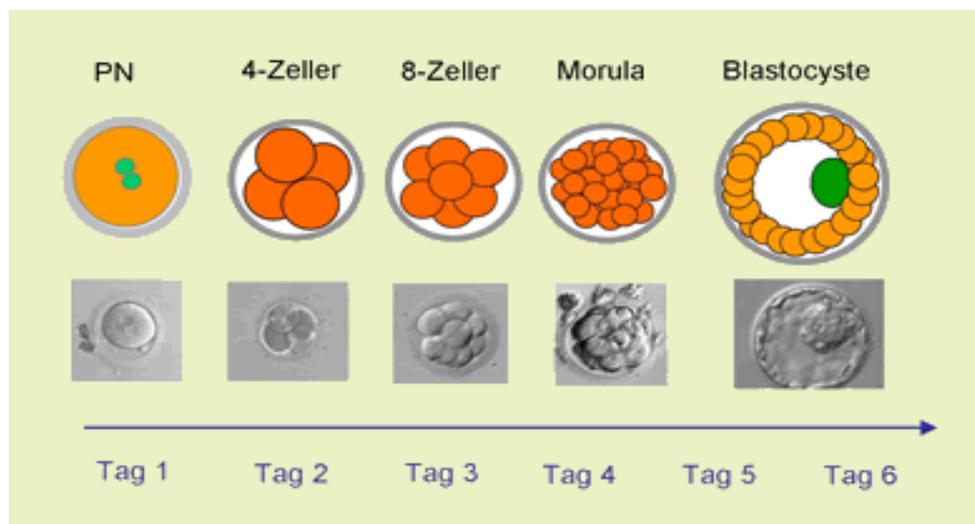


Abb. 2.7: Entwicklungsstadien der Eizelle ([www.embryology.ch](http://www.embryology.ch))

Stephoe und Edwards gelang durch IVF und Embryotransfer (ET) bereits 1978 die Geburt eines Kindes. Im Jahre 1982 wurde dann in den USA das erste Kalb, das durch dieses reproduktionsmedizinische Verfahren entstanden war, geboren (Brackett et al., 1982). Schließlich beschrieben Berg und Brem (1989) als erste ein praktisch nutzbares Verfahren der IVP beim Rind. Bereits 1997

wurden ca. 30.000 in vitro produzierter Embryonen übertragen; diese Zahl stieg im Jahr 2003 auf über 293.000. Die Trächtigkeitsrate beträgt beim Transfer von in vitro produzierten Embryonen durchschnittlich 50%, wobei die Abkalberaten um 5-10% niedriger liegen (Galli et al., 2003; Merton et al., 2003; van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Durch Verbesserung der Kulturmedien hat man heute kaum noch Probleme mit der Entstehung von Kälbern mit dem Large offspring syndrome, wie noch 1996 von Walker und 1997 von Kruip und den Daas festgestellt wurde. Ein wichtiger limitierender Faktor ist zudem, dass sich nicht jeder Bulle bzw. nicht jedes Ejakulat für die IVF eignet. Wrenzycki (2004) beobachtete auch erhebliche Unterschiede zwischen in vitro und in vivo erzeugten Embryonen im Bezug auf Morphologie, Gefriertauglichkeit, Temperaturempfindlichkeit, Trächtigkeitsraten und intermediären Stoffwechsel.

Andererseits bietet die IVP von Embryonen auch einige Vorteile. So können für die Grundlagenforschung größere Mengen an Embryonen produziert werden. Auch eine kostengünstige Produktion von Fleischkälbern aus Milchviehassen ist möglich. Für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen, wie z.B. über die Eizellreifung, Klonierung, intrazytoplasmatische Spermieninjektion, Geschlechtsbestimmung, Präimplantationsdiagnostik und Fertilitätskontrolle von Spermien, stellt sie eine grundlegende Methode dar. Die Anwendung von Biotechnologieverfahren gewährleistet die Anlage von Genreserven, z.B. zur Erhaltung seltener Rassen, eine verbesserte Erbfehlerdiagnostik, sowie die Vermeidung von Zuchttiertransporten, ein wichtiger tierschutzrelevanter Aspekt (Busch und Waberski, 2007).

Außerdem kann durch die IVP das Generationenintervall verkürzt, sowie die Nachkommenzahl genetisch wertvoller Tiere gesteigert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Herkunft der Spermien

Das Sperma, welches in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, stammte von 4 Prüfbullen der Besamungsstation Grub:

- Bulle Marbach (Herdbuchnummer. 185071, geb. 11.12.01)
- Bulle Herberger (Herdbuchnummer 188284, geb. 21.06.02)
- Bulle Reim (Herdbuchnummer 196340, geb. 2002)
- Bulle Zenturio (Herdbuchnummer 426024, geb. 24.08.95)

Sie alle gehörten der Rasse Fleckvieh an. Weder die Allgemein-, noch die Geschlechtsgesundheit der Bullen war zum Zeitpunkt der Ejakulatgewinnung eingeschränkt.

### 3.2 Spermagewinnung und Kryokonservierung

Die Spermagewinnung erfolgte mittels künstlicher Vagina, Modell Hannover, und unter Verwendung eines Phantoms an der Besamungsstation Grub. Anschließend an die Absamung wurde das gewonnene Ejakulat nach den an Besamungsstationen üblichen Verfahren untersucht, mit dem eigelblösen Verdünner Andromed (Fa. Minitüb, Tiefenbach) verdünnt und in 0,25 ml Pailletten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) in einer Konzentration von  $15 \times 10^6$  Spermien abgefüllt.

Die Pailletten wurden dann an der Besamungsstation Grub nach dem dort üblichen Temperaturregime eingefroren und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert.

Der Transport von der Besamungsstation ins Labor erfolgte in einem tragbaren Container mit flüssigem Stickstoff.

### 3.3 Versuchsaufbau

Der gesamte Versuch war, wie in Abb. 3.1 wiedergegeben, in zwei Verfahrensabläufe gegliedert.

Nach dem Auftauen (s. Kap. 3.4) der Spermapailletten wurden diese entweder sofort oder erst nach einer definierten Inkubation (25°C, 37°C bzw. 42°C für 30 und 60 min) untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mikroskopisch und mittels Durchflusszytometer (FACSCalibur™, Fa. Becton-Dickinson Biosciences, San Jose). In einem weiteren Schritt wurde auch mittels eines In vitro Fertilisationsansatzes die Befruchtungsfähigkeit der Spermien kontrolliert.

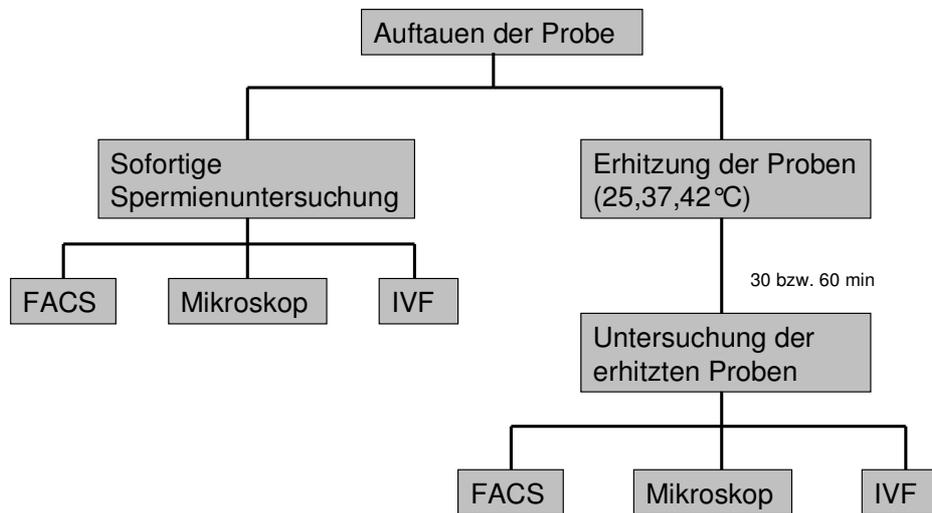


Abb. 3.1: Schema des Versuchsaufbaus

Pro Bulle wurden jeweils zehn tiefgefrorene Spermapailletten à 0,25 ml im Wasserbad bei 37°C, 15 Sekunden aufgetaut und in 10 ml Falcon-Röhrchen zu einem Pool vereint, um vor den Untersuchungen eine Durchmischung der Proben zu gewährleisten.

Schließlich wurden aus diesem Spermepool jeweils 0,25 ml aufgetautes Tiefgefrier (TG)-Sperma in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gefüllt und diese in den Wärmeblock eines Thermomixers (Fa. HLC Biotech, Bovenden) überführt (s. Abb. 3.2).

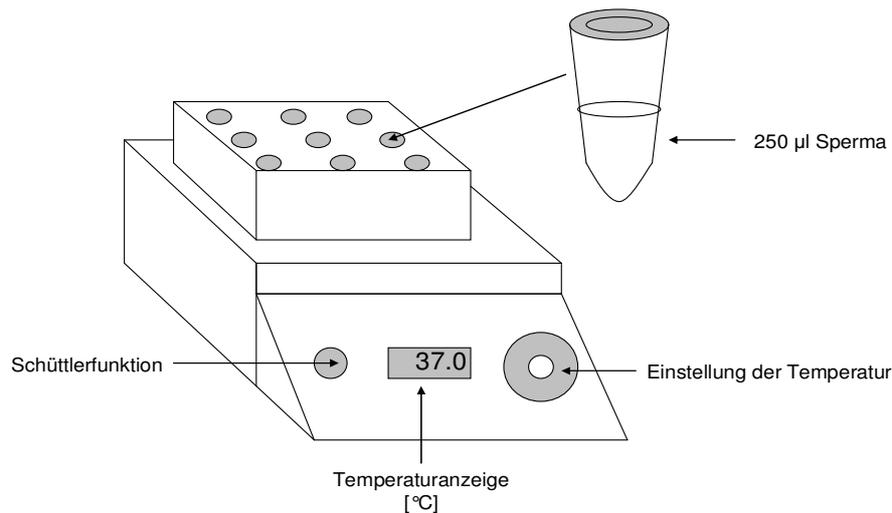


Abb. 3.2: Thermomixer MHR11 mit Blockthermostat TH11 (Fa. HLC Biotech, Bovenden)

Je nach Versuchsablauf wurden die Proben bei konstanten 25 °C, 37 °C oder 42 °C für eine bestimmte Dauer (30 bzw. 60 min) inkubiert und daraufhin sofort einer der vorgesehenen Untersuchungen zugeführt.

## 3.4 Mikroskopische Untersuchungen

### 3.4.1 Motilitätsbestimmung

Da es sich bei den Proben um aufgetaute TG-Spermien handelte, wurde bei der Beurteilung der Motilität nur die Einzelbewegung untersucht. Die Massenbewegung lässt sich lediglich an Frischsamen beurteilen.

Aus jedem Inkubationsgefäß wurden nun 10 µl der Probe auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Dieses wurde anschließend auf den entsprechend vorgewärmten Heiztisch des Mikroskops verbracht und sofort untersucht.

Hierbei wurde der Anteil der vorwärts-, orts- und pathologisch beweglichen Spermien im Präparat geschätzt.

### 3.4.2 Lebend - Tot - Färbung

Die Lebend-Tot-Färbung erfolgte mittels Bromphenolblau-Nigrosin (BN) (Bonadonna u. Olgianti, 1953).

Hierfür wurde von den inkubierten und nicht inkubierten Proben ebenfalls jeweils 10 µl entnommen und auf einen entfetteten Objektträger gegeben. Dann wurde ca. die doppelte Menge an Farbstoff neben der Probe aufgetragen, mit der Kante eines Deckglases vermischt und das Gemisch aus Probe und Farbstoff in einem flachen Winkel entlang eines weiteren entfetteten Objektträgers nach der Blutausstrichmethode ausgestrichen. Die Beurteilung der getrockneten Ausstriche erfolgte bei 1000facher Vergrößerung mittels Ölimmersion.

Es wurden pro Ausstrich insgesamt 300 Spermien mit Hilfe eines für die Spermatologie modifizierten Zellenzählers ausgezählt und schließlich deren Anteil an lebenden Spermien errechnet.

Gezählt wurden sowohl die angefärbten toten Spermien als auch die ungefärbten lebenden Spermien.



Abb. 3.3: a Lebende Spermien (nicht gefärbt)

b Tote Spermien (blau gefärbt)

Abb. 3.3 zeigt das mikroskopische Bild von lebenden (ungefärbten) und toten (blau angefärbten) Spermien nach Färbung mit BN.

### 3.4.3 Morphologische Beurteilung

Die Färbung der Spermien für die Beurteilung der Morphologie erfolgte analog zum Vorgehen bei der Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin (s. Kap. 3.4.2). Wiederum wurden 300 Spermien pro Präparat beurteilt.

Erfasst wurden Spermien mit Kopfanomalien, mit Schwanzanomalien sowie Krümmlinge und lose Köpfe. Abb. 3.4 zeigt Beispiele für Defekte am Kopf von Spermien.

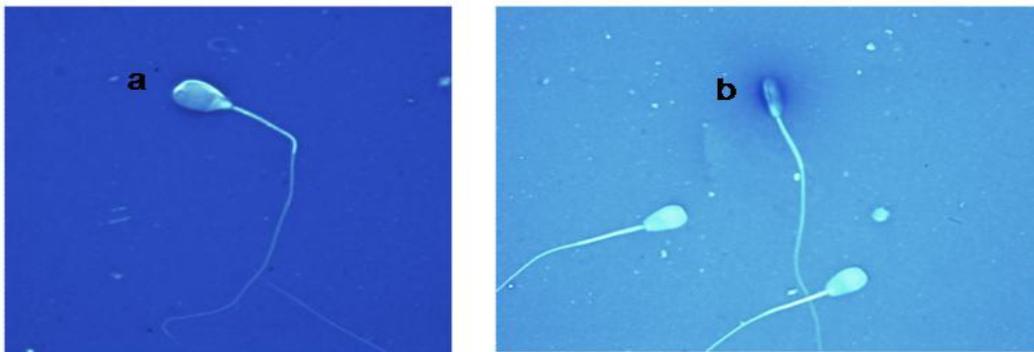


Abb. 3.4: a Spermium mit Defekt an der Kopfkappe  
b Spermium mit veränderter Kopfform

Beispiele für Krümmlinge in den angefertigten Ausstrichen sind in Abb. 3.5 dargestellt.

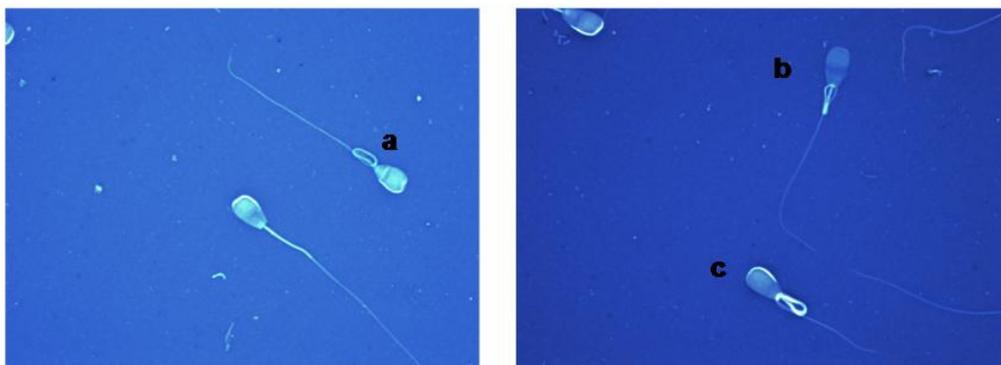


Abb. 3.5: a, b, c Krümmlinge

Bei der Beurteilung der Morphologie wurde jeweils nur eine Veränderung pro Spermium gezählt, wobei die möglichen Anomalien in folgender Reihenfolge zur Kenntnis genommen wurden:

1. Kopfanomalien
2. Schwanzanomalien
3. Krümmlinge
4. lose Köpfe

D.h. lagen mehrere Veränderungen an einem Spermium vor, so hatte z.B. eine Kopfanomalie Priorität gegenüber einer Schwanzanomalie, eine Schwanzanomalie Priorität gegenüber Krümmlingen usw.

## **3.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

### **3.5.1 Geräte und Geräteeinstellungen**

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen der inkubierten und nicht inkubierten Proben wurde das Durchflusszytometer FACScan Calibur™ (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA) verwendet. Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte mittels eines PowerMac G4 Computers (Fa. Apple, Cupertino, USA) und unter Verwendung des Softwareprogrammes „Cell Quest Pro“ (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA).

Es wurde je Probe 10.000 Zellen erfasst, wobei die Grünfluoreszenz auf dem Fluoreszenzkanal FI-1 und die Rotfluoreszenz auf FI-3 gemessen wurde.

### 3.5.2 Färbung mittels Propidiumiodid (PI) und Fluorescein-Isothiocyanat/Peanut-Agglutinin (FITC - PNA)

Um die Integrität der Plasmamembran- und der Akrosommembran von Spermien im Durchflusszytometer darzustellen, erfolgte die Färbung dieser mittels PI und gleichzeitig auch mittels Fluorescein-Isothiocyanat/Peanut-Agglutinin (FITC-PNA). Ein vereinfachtes Schema des Färbeprozesses findet sich in Abb. 3.6.

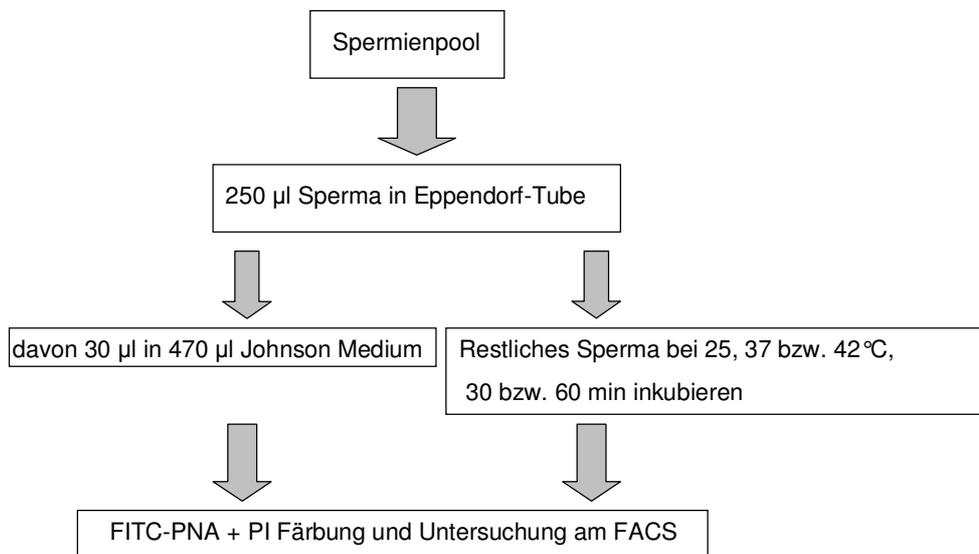


Abb. 3.6: Schema des Versuchsablaufes der Fluoreszenzfärbung

Alle verwendeten Medien und Farbstoffe wurden im Wärmeschrank auf 37°C erwärmt und es wurde auf eine Konstanthaltung dieser Temperatur während der Arbeit geachtet.

Zunächst wurde jeweils 470 µl Johnson Medium (Rezept s. Anhang, Verwendete Materialien) in 1,2 ml FACS-Röhrchen bei 37°C im Brutschrank erwärmt. Das Johnson Medium diente in den weiteren Schritten zur Verdünnung der zu inkubierenden und nicht zu inkubierenden Spermien in der Relation 1:16.

Aus jedem zur Untersuchung anstehendem Gefäß wurden 30 µl Sperma und jeweils 5 µl vorgewärmtes (37°C) FITC-PNA in die vorbereiteten und erwärmten FACS-Röhrchen mit Johnson-Medium gegeben und für 10 min bei

37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 3 µl des auf 37°C erwärmten PI zu den FACS-Röhrchen gegeben und diese wiederum für 5 min im Brutschrank temperiert. Sowohl nach dem ersten Färbevorgang als auch nach dem zweiten wurden die Röhrchen kurz geschüttelt, um eine gleichmäßige Verbreitung der Farbstoffe zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Untersuchung im FACS.

### **3.6 In vitro Produktion (IVP)**

Die für die In vitro Fertilisation (IVF) benötigten Ovarien wurden vom Schlachthof in München in einem Thermogefäß mit 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung in das IVF-Labor der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik transportiert. Anschließend erfolgte dort sofort die Gewinnung der Oozyten. Die Zusammensetzung der für die IVF verwendeten Medien ist im Anhang Verwendete Materialien verzeichnet.

#### **3.6.1 Gewinnung der Oozyten und Maturation**

Zunächst wurde eine Petrischale, Durchmesser 14,5 cm, mit etwas vorgewärmter (38°C) modifizierter phosphatgepufferter Salzlösung (mPBS) benetzt und die Oberfläche des Eierstocks mittels eines Slicing-Gerätes, bestehend aus 3 parallelen Rasierklingen, gleichmäßig an zwei Seiten angeschnitten. Die Oberfläche des angeschnittenen Ovars wurde wiederum mit mPBS gespült und dann an dem Slicing-Gerät ausgedrückt. Anschließend wurde die in der Petrischale aufgefangene Spülflüssigkeit durch ein haushaltsübliches Teesieb in ein 600 ml Becherglas geleert und nochmals mittels mPBS nachgespült.

Die gesamte gesammelte Spülflüssigkeit wurde anschließend durch ein Analysensieb (Maschenweite 75 µm, Durchmesser 100mm) gegossen, um die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) (s. Abb. 3.7) zu isolieren. Nach dem Herunterspülen der Isolate vom Sieb mittels mPBS wurde die entstandene Spülflüssigkeit mit Gewebepartikeln in eine Petrischale mit Raster (90 mm)

überführt. Die Rasterschalen wurden bis zur weiteren Untersuchung auf einer Wärmeplatte bei 37°C aufbewahrt.

Unter dem Stereomikroskop wurden bei 15facher Vergrößerung die COK gesucht und jeweils in eine kleine Petrischale (Ø 40 mm) mit mPBS überführt. Es folgten zwei Waschschrte:

Zunächst in einer kleinen Petrischale mit ca. 3 ml TCM (Tissue Culture Medium) + 10% ECS (Estrus Cow Serum), dann in einer 4-Well-Schale (Fa. Nunc, Dänemark) mit 500 µl TCM + 10% ECS+ 1 IU FSH (Follikel Stimulierendes Hormon) + 1 IU LH (Luteinisierendes Hormon) pro Vertiefung.

Tab. 3.1 zeigt die Einteilung der Oozyten in vier verschiedene Klassen unter Berücksichtigung von morphologischen Gesichtspunkten des Ooplasmas und des Cumulus oophorus.

<b>Klasse 1</b>	dunkles, homogenes Ooplasma u. kompakter Cumulus oophorus
<b>Klasse 2</b>	dunkles, homogenes Ooplasma u. aufgelockerter Cumulus oophorus
<b>Klasse 3</b>	dunkles, homogenes od. granuliertes Ooplasma u. expandierter Cumulus oophorus mit Clusterbildung
<b>Klasse 4</b>	dunkles, homogenes od. granuliertes Ooplasma u. mit geringem od. fehlendem Cumulus oophorus

Tab. 3.1: Klassifizierung der COK

Abb. 3.7 zeigt das Bild der vier verschiedenen Klassen der COK, wie in Tab. 3.1 beschrieben.



Abb. 3.7: Cumulus-Oozyten-Komplexe des Rindes, Klassen I bis IV

Die in der IVF verwendeten COK entsprachen den Klassen 1-2 und wurden nach diversen Waschschritten in eine weitere 4-Well-Schale (Maturationsschale) verbracht und mit 500 µl TCM + 10% ECS + 1 IU FSH + 1 IU LH mit Mineralöl (Fa. Sigma, Steinheim) überschichtet und für 24 Stunden im Brutschrank bei 38,5°C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert.

Das jeweilige Umsetzen der COK erfolgte mit der Pipettierhilfe MicroClassic (Fa. Brand, Wertheim) unter Verwendung von 20 µl Glaskapillaren.

### 3.6.2 In-vitro-Fertilisation

Etwa 3 Stunden vor Ende der Maturationszeit wurden pro IVF-Ansatz jeweils 125 µl der inkubierten bzw. nicht inkubierten Proben am Boden zweier Kryoröhrchen (1,5 ml) unter 1 ml SPERM-Talp abgesetzt. Die Röhrchen wurden für 60 min bei einem Lagerungswinkel von 45° in einem Brutschrank bei 38°C verbracht.

Diese als Swim-Up-Verfahren bezeichnete Methode (Parrish et al, 1986) trennt die motilen Spermien, die zur Oberfläche schwimmen, von den unbeweglichen Spermien, die hierbei auf dem Boden liegen bleiben. Unter Beibehaltung des Winkels wurde dann jeweils 2x400 µl Medium abgezogen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden die COK in einer kleinen Petrischale in 200 µl Fert-Talp gewaschen und in Befruchtungstropfen der vorbereiteten Befruchtungsschale (4 Tropfen, jeweils 60 µl FERT-Talp, mit Mineralöl überschichtet) zugesetzt und wieder im Brutschrank gelagert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium bis kurz über das Spermienpellet abgezogen und wiederum durch dieselbe Menge frisches Medium ersetzt. Die Röhrchen wurden nun noch einmal bei 2000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde erneut der Überstand bis auf das entstandene Spermienpellet abgezogen und dieses mit 40 µl FERT-Talp überschichtet.

Aus dieser Suspension wurden 10 µl zur Dichtebestimmung abgezogen, mit 990 µl Aqua dest. verdünnt und in eine Zählkammer nach Bürker-Türk

gegeben. Die Auszählung erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Olympus) bei 400facher Vergrößerung.

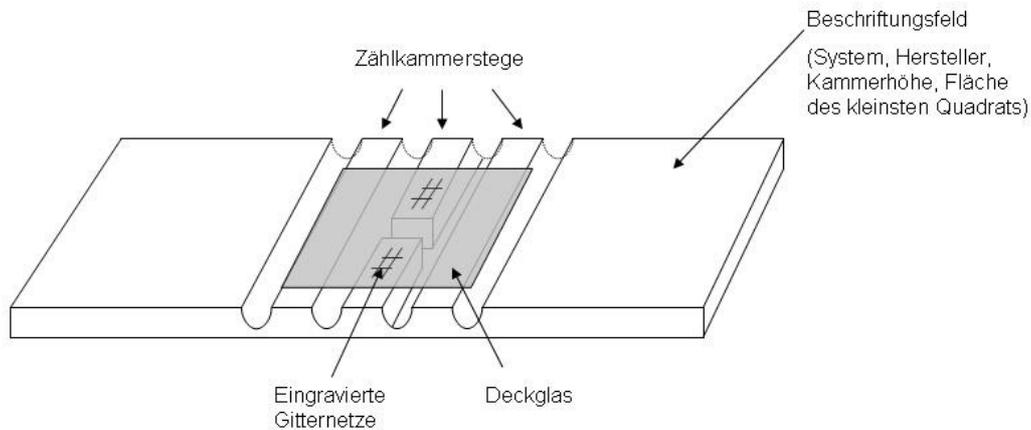


Abb. 3.8: Schema einer Zählkammer

Die Spermien wurden jeweils in den großen Quadraten der Zählkammer (Fläche:  $1/25 \text{ mm}^2$ , Kammerhöhe:  $1/10 \text{ mm}$ ) (Abb. 3.8) ausgezählt, wobei auch die Spermien, die entweder auf der unteren bzw. linken Begrenzungslinie lagen, ebenfalls mitgezählt wurden. Spermien auf der oberen bzw. rechten Begrenzungslinie wurden nicht gezählt.

Anschließend wurde die Spermienkonzentration  $C$  [pro  $\mu\text{l}$ ] mittels folgender Formel ermittelt:

$$C = \frac{n}{V_{\text{ges}}} \cdot \frac{V_{\text{dest}}}{V_{\text{sperm}}}$$

Hierbei stellt  $n$  die Anzahl der gezählten Spermien und  $V_{\text{ges}}$  das Volumen der Zählkammerfelder dar.  $V_{\text{dest}}$  geteilt durch  $V_{\text{sperm}}$  ist die Verdünnung des Spermas mit Aqua dest. im Verhältnis 1:100.

Über die so ermittelte Spermienkonzentration  $C$  und die benötigte Anzahl an Spermien (ca. 100.000 pro Befruchtungstropfen) wurde die erforderliche Befruchtungsdosis als Volumen [ $\mu\text{l}$ ] über einen Dreisatz wie folgt berechnet:

$$x = \frac{100.000}{C}$$

Das so berechnete Volumen der Spermiesuspension wurde dann zu jedem Befruchtungstropfen gegeben. Die Befruchtungsschale wurde dann für 18-22 Stunden im Brutschrank bei 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### 3.6.3 In-vitro-Kultivierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die COK aus der Befruchtungsschale in ein Zentrifugenröhrchen mit 1 ml SOF (Synthetic oviduct fluid) umgesetzt.

Dieses wurde für 3 Minuten geschüttelt, um die Cumuluszellen von den Oozyten zu entfernen. Die gereinigten Oozyten wurden erneut einem Waschschrift unterzogen und schließlich in eine Kultivierungsschale (4-Well-Schale mit 500 µl SOF + 10% ECS mit Mineralöl überschichtet) überführt.

Die Kultivierung galt als Tag 1 des Verfahrens. Am Tag 3 wurde die Befruchtungsrate unter dem Stereomikroskop beurteilt, wobei der Anteil der Blastozysten mit mindestens zwei gleichmäßigen Blastomeren bestimmt wurde.

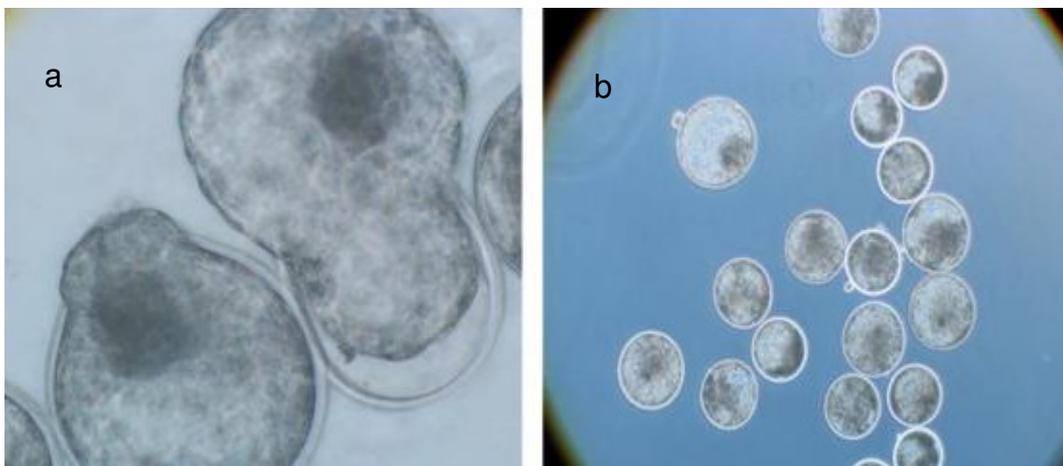


Abb. 3.9: Darstellung der Blastozysten am Tag 8

a) Objektiv 32x b) Objektiv 10x

Am Tag 7, 8 und 9 wurden erneut die Entwicklungsstadien, wie in Abb. 3.9 dargestellt, beurteilt.

### **3.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Beratung im Rahmen der Arbeit erfolgte durch das Statistische Beratungsbüro der LMU München.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS, wobei die univariate Varianzanalyse angewandt wurde. Der sog. p-Wert bezeichnet den Fehler erster Art. Dieser bedeutet, dass die Annahme besteht, dass die Ergebnisse der Untersuchung durch Zufall zustande gekommen sind. Liegt der Fehler erster Art unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, so gelten die Ergebnisse als nicht durch Zufall entstanden und sind somit als signifikant zu werten.

Im Rahmen der univariaten Varianzanalyse vergleicht die sog. Parameterschätzung die Werte eines einzelnen Parameters untereinander, wenn die anderen gegebenen Parameter konstant bleiben.

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse unterteilen sich jeweils in sog. Kontrollwerte zum Zeitpunkt 0 min und in Werte, die nach Inkubation der Proben erzielt wurden. Im Folgenden sind diese in den entsprechenden Kapiteln zum Vergleich zusammenfassend dargestellt.

### 4.1 Motilitätsuntersuchung

Die Motilität der Spermien wurde mikroskopisch durch Schätzung des prozentuellen Anteils vorwärts-, orts- und pathologisch beweglicher Spermien vor und nach der Inkubation erfasst. Die Mittelwerte des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien und deren Standardabweichungen sind in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 für die Inkubationszeiten 30 min und 60 min zu den jeweils geltenden Versuchstemperaturen, dargestellt.

Tab. 4.1: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37, 42 °C

Temperatur [°C]	Vorwärtsbewegung, 0 min [%]	Vorwärtsbewegung, 30 min [%]
25	65,42 $\pm$ 8,33	65,42 $\pm$ 9,32
37	63,33 $\pm$ 9,61	62,59 $\pm$ 9,84
42	70,37 $\pm$ 7,59	57,41 $\pm$ 16,07

Tab. 4.2: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37, 42 °C

Temperatur [°C]	Vorwärtsbewegung, 0 min [%]	Vorwärtsbewegung, 60 min [%]
25	69,58 $\pm$ 8,06	65,00 $\pm$ 9,78
37	66,30 $\pm$ 8,84	58,52 $\pm$ 16,34
42	67,78 $\pm$ 8,92	52,59 $\pm$ 14,57

Der Vergleich der Werte vor und nach Inkubation für 30 min bzw. 60 min bei 25, 37 und 42 °C ist in Abb. 4.1 dargestellt.

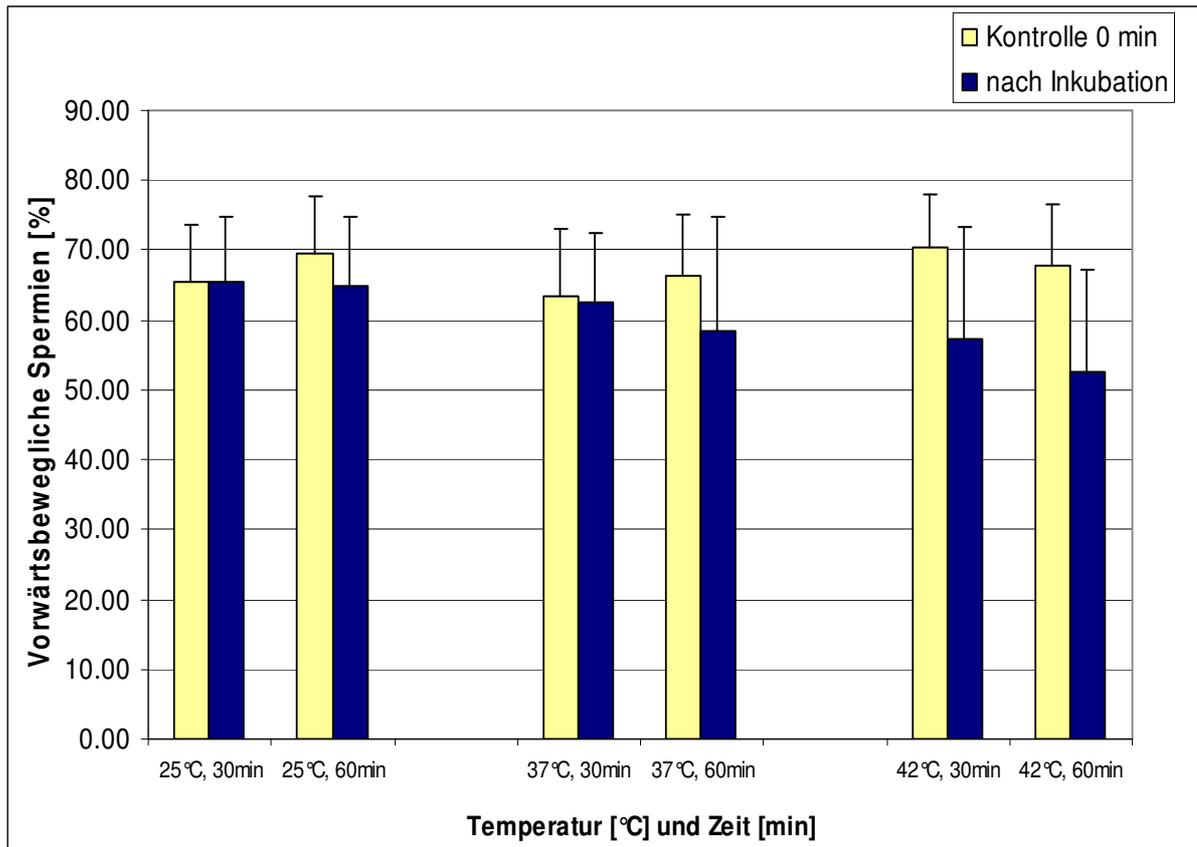


Abb. 4.1: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle) sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C

Die statistische Auswertung mittels univariater Varianzanalyse durch Bildung der Differenz aus dem Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien vor und jener nach Inkubation ergab jeweils einen signifikanten Effekt des Bullen ( $p < 0,001$ ), der Temperatur ( $p < 0,001$ ) und der Zeit ( $p < 0,05$ ).

Verglichen mit dem Bullen Zenturio, waren die Spermien des Bullen Reim um 10,1%, die von Marbach 9,8% und die von Herberger um 9,5% vorwärtsbeweglicher.

Beim Vergleich der drei Temperaturen zeigte sich, dass der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei 25°C um 11,0% und bei 37°C um 9,8% größer war als bei 42°C.

Tab. 4.3 und Tab. 4.4 zeigen die Mittelwerte ( $\pm$  SD) des Anteils ortsbeweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min (Kontrollgruppe) sowie nach 30- und 60-minütiger Inkubation bei den drei vorgegebenen Versuchstemperaturen.

Tab. 4.3: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils ortsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach der Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Ortsbewegung, 0 min [%]	Ortsbewegung, 30 min [%]
25	5,21 $\pm$ 1,02	5,42 $\pm$ 1,41
37	5,74 $\pm$ 1,81	7,96 $\pm$ 4,22
42	5,37 $\pm$ 1,33	9,63 $\pm$ 8,54

Tab. 4.4: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils ortsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach der Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Ortsbewegung, 0 min [%]	Ortsbewegung, 60 min [%]
25	5,42 $\pm$ 1,41	6,04 $\pm$ 2,07
37	6,85 $\pm$ 4,19	14,26 $\pm$ 11,58
42	5,74 $\pm$ 2,28	13,52 $\pm$ 10,54

Abb. 4.2 zeigt die Verteilung der Werte ortsbeweglicher Spermien vor und nach der Inkubation für 30 min und 60 min bei den drei vorgegebenen Temperaturen. Man kann erkennen, dass ihr Anteil mit zunehmender Temperatur und mit zunehmender Inkubationsdauer steigt.

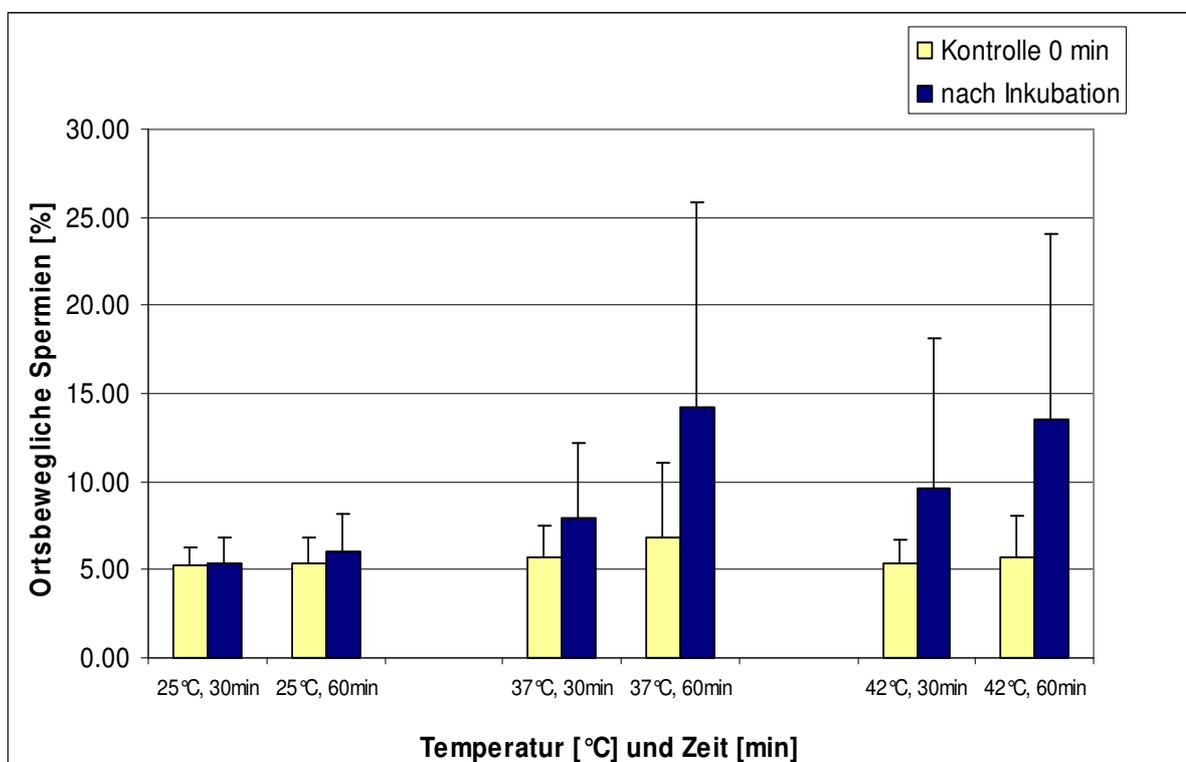


Abb. 4.2: Prozentsatz ortsbeweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Der Anteil ortsbeweglicher Spermien steigt nach 30 min Inkubation bei den gegebenen Temperaturen nicht signifikant an, ebenso nicht signifikant ist der Anstieg des Anteils ortsbeweglicher Spermien nach 60 min. In Tab. 4.4 ist die Erhöhung der Standardabweichung bei den Werten der inkubierten Proben auffällig.

Zusätzlich zu den vorwärts- und ortsbeweglichen Spermien wurde auch der Anteil der pathologisch beweglichen Spermien ermittelt.

Tab. 4.5 gibt die Mittelwerte ( $\pm$  SD) des Anteils der pathologisch beweglichen Spermien vor (Kontrolle) und nach Inkubation für 30 min bei den drei vorgegebenen Temperaturen wieder.

Tab. 4.5: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils pathologisch beweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Pathol. Bewegung, 0 min [%]	Pathol. Bewegung, 30 min [%]
25	7,71 $\pm$ 4,42	7,29 $\pm$ 3,61
37	6,67 $\pm$ 3,40	7,04 $\pm$ 3,47
42	6,11 $\pm$ 2,12	9,44 $\pm$ 3,76

Tab. 4.6 zeigt ebenfalls die ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen des Anteils der pathologisch beweglichen Spermien vor und nach Inkubation bei 60 min auf.

Tab. 4.6: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils pathologisch beweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Pathol. Bewegung, 0 min [%]	Pathol. Bewegung, 60 min [%]
25	7,08 $\pm$ 3,59	7,50 $\pm$ 2,55
37	6,67 $\pm$ 3,40	6,67 $\pm$ 3,40
42	6,11 $\pm$ 2,12	9,44 $\pm$ 4,67

Hierbei kam es nach einstündiger Inkubation bei 25 °C zu einer Erhöhung der pathologischen Bewegung um 0,42%. Während nach Inkubation bei 37 °C der Kontrollwert und der Wert nach 60-minütiger Inkubation identisch waren, stieg der Prozentsatz pathologisch beweglicher Spermien nach 60-minütiger

Inkubation bei 42°C signifikant von durchschnittlich 6,11% auf 9,44%. Dies entspricht einer Zunahme von 3,33%.

Die graphische Darstellung der oben angeführten Werte ist in Abb. 4.3 ersichtlich. Hier ist der signifikante Einfluss der Temperaturerhöhung auf 42°C zu erkennen, mit einem deutlichen Anstieg des Anteils pathologisch beweglicher Spermien nach Inkubation. Bei den Temperaturen 25°C und 37°C ließ sich dagegen kaum eine Veränderung der Werte durch die 30- bzw. 60-minütige Inkubation feststellen.

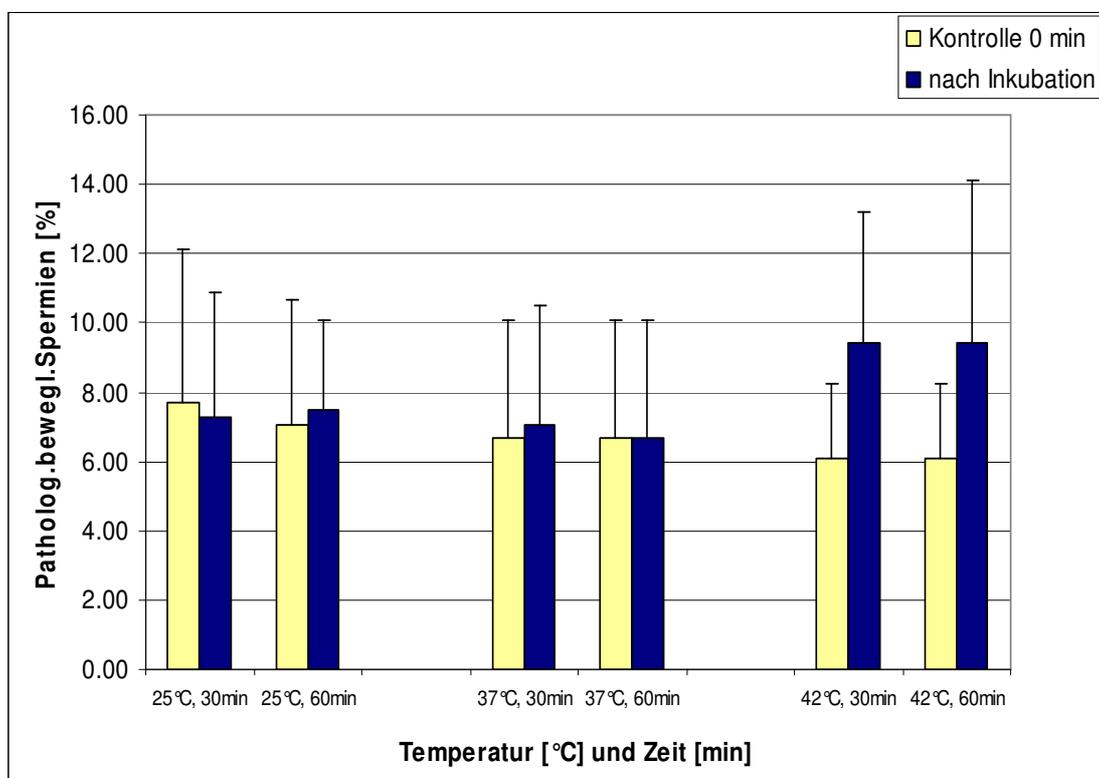


Abb. 4.3: Prozentsatz pathologisch beweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle) sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C

Deutlich höher wurde der Prozentsatz pathologisch beweglicher Spermien bei der Inkubationstemperatur von 42°C und zwar nach 30, als auch nach 60 Minuten.

## 4.2 Lebend-Tot-Färbung

Die Vitalität der Spermien wurde anhand des Prozentsatzes ungefärbter Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung mikroskopisch ermittelt.

In den Tab. 4.7 und Tab. 4.8 sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung für den Anteil der lebenden Spermien in Prozent angegeben. Die Tabellenangaben sind wiederum nach Dauer der Inkubation (0 min = Kontrolle) und den drei vorgegebenen Temperaturbereichen geordnet.

Tab. 4.7: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils lebender Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Lebendanteil, 0 min [%]	Lebendanteil, 30 min [%]
25	63,06 $\pm$ 6,78	65,33 $\pm$ 7,24
37	63,20 $\pm$ 4,76	61,09 $\pm$ 7,18
42	63,28 $\pm$ 4,78	55,17 $\pm$ 3,58

Die Inkubation der Proben bei 37°C und 42°C für 30 min ergab eine signifikante Abnahme des Lebendanteils, im Bezug auf Zeit und Temperatur, die bei 25°C ergab dagegen eine geringgradige Zunahme.

Tab. 4.8: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils lebender Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Lebendanteil, 0 min [%]	Lebendanteil, 60 min [%]
25	64,10 $\pm$ 4,32	66,40 $\pm$ 3,86
37	62,46 $\pm$ 7,60	58,39 $\pm$ 9,23
42	64,28 $\pm$ 5,15	52,28 $\pm$ 11,36

Die einstündige Inkubation der Proben ergab ebenfalls eine Verringerung des Lebendanteils und zwar um ca. 4 % bei 37°C und um ca. 12 % bei 42°C.

Abb. 4.4 veranschaulicht die Verteilung des Anteils der lebenden Spermien vor und nach Inkubation bei 25, 37 und 42°C für 30 bzw. 60 min und gibt außerdem die Standardabweichung der Werte an.

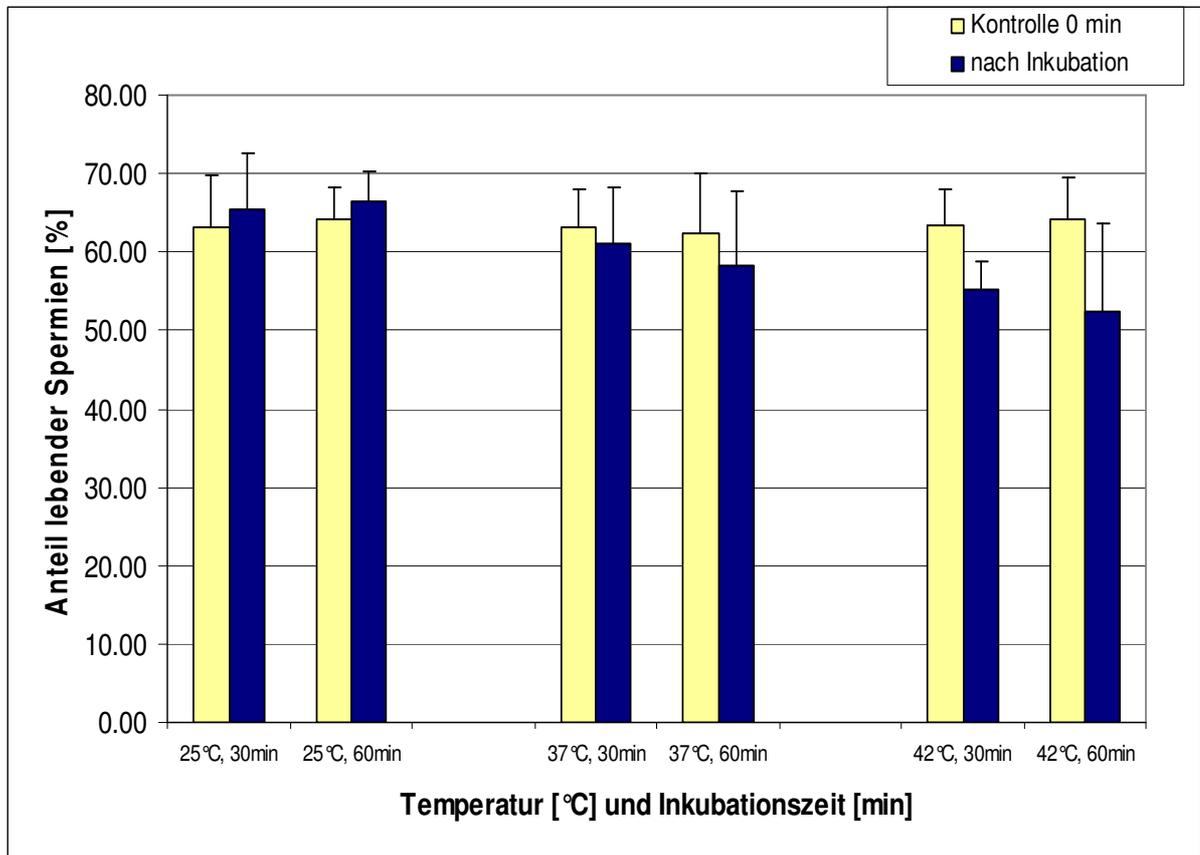


Abb. 4.4: Darstellung des Anteils lebender Spermien [%], geordnet nach Inkubationsdauer und Temperatur

Die statistische Analyse erfolgte durch Bildung der Differenz aus den Werten des Lebendanteils vor und nach den Inkubationen. Mittels univariater Varianzanalyse ergab sich ein nicht signifikanter Einfluss des Bullen ( $p > 0,05$ ), allerdings ließ sich ein signifikanter Einfluss sowohl der Temperatur ( $p < 0,001$ ) als auch der Zeit ( $p < 0,05$ ) nachweisen.

Der Vergleich der Bullen untereinander ergab, dass Bulle Herberger um 0,7 %, und Bulle Marbach um 2,3 % mehr lebende Spermien aufwiesen als der Bulle Zenturio. Bulle Reim hatte dagegen um 0,3 % weniger lebende Spermien nach Inkubation als Bulle Zenturio.

Verglichen mit den Ergebnissen bei 42°C ergab sich bei ansonsten gleich bleibenden Konditionen, dass der Lebendanteil bei 25°C um 12,3 % und bei 37°C um 7,0 % größer war.

Die Verlängerung der Inkubationsdauer von 30 auf 60 min hatte zur Folge, dass 2,0% weniger lebende Spermien im Ausstrich vorhanden waren, vorausgesetzt, die anderen Bedingungen blieben konstant.

### 4.3 Morphologische Untersuchung

Die prozentuellen Anteile der primären, sekundären und tertiären Anomalien der Spermien wurden ebenfalls mikroskopisch mittels der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung ermittelt.

Die errechneten mittleren Anteile in % mit Standardabweichung aller morphologischen Veränderungen der Spermien nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation bei den drei gegebenen Temperaturen sind in Tab. 4.9 und Tab. 4.10 dargestellt. Die Gesamtveränderung setzt sich zusammen aus der Summe von Kopf- und Schwanzanomalien, aus Krümmlingen und losen Köpfen.

Tab. 4.9: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils der morphologischen Gesamtveränderung vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Ges.veränderung, 0 min [%]	Ges.veränderung, 30 min [%]
25	17,77 $\pm$ 4,92	17,90 $\pm$ 4,19
37	18,26 $\pm$ 6,14	18,65 $\pm$ 6,75
42	18,98 $\pm$ 5,31	19,37 $\pm$ 6,07

Nach 30-minütiger Inkubation bei allen vorgegebenen Temperaturen kam es zu einer geringgradigen tendenziellen Zunahme des Anteils morphologisch veränderter Spermien. Aber weder die Zeit, noch die Temperatur, noch der Bulle zeigten hierbei einen signifikanten Einfluss ( $p > 0,05$ ).

Tab. 4.10: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils der morphologischen Gesamtveränderung vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Ges.veränderung, 0 min [%]	Ges.veränderung, 60 min [%]
25	17,73 $\pm$ 3,73	18,13 $\pm$ 4,00
37	20,71 $\pm$ 6,35	21,50 $\pm$ 9,40
42	20,04 $\pm$ 4,97	20,20 $\pm$ 5,92

Ähnlich verhielt es sich bei Inkubation der Proben für die Dauer von 60 min. Auch hier trat bei allen drei Temperaturen eine zahlenmäßig geringgradige Erhöhung der Werte nach der Inkubation auf, für die sich wiederum weder für Zeit, Temperatur, noch Bulle ein signifikanter Einfluss ( $p > 0,05$ ) darstellen ließ.

Tab. 4.11 stellt die prozentuellen Anteile der morphologischen Einzelveränderungen dar, und zwar sowohl für die Dauer 30 und 60 min, wie auch in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die Kontrollwerte sind in dieser Darstellung nicht angezeigt.

Tab. 4.11: Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils einzelner morphologischer Veränderungen bei 30 bzw. 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Kopf-anomalien [%]	Schwanz-anomalien [%]	Krümmlinge [%]	lose Köpfe [%]
25	30	2,10 $\pm$ 1,63	1,65 $\pm$ 1,18	12,52 $\pm$ 2,18	1,63 $\pm$ 0,88
	60	2,13 $\pm$ 1,28	1,50 $\pm$ 0,88	12,69 $\pm$ 2,08	1,81 $\pm$ 1,25
37	30	2,94 $\pm$ 2,30	2,06 $\pm$ 1,25	11,63 $\pm$ 4,32	1,83 $\pm$ 1,07
	60	3,24 $\pm$ 2,10	3,04 $\pm$ 3,03	13,13 $\pm$ 5,24	2,02 $\pm$ 1,10
42	30	2,67 $\pm$ 1,39	2,13 $\pm$ 1,32	12,98 $\pm$ 4,25	2,17 $\pm$ 1,63
	60	2,98 $\pm$ 2,14	2,85 $\pm$ 2,39	13,43 $\pm$ 3,27	1,80 $\pm$ 0,92

Es fällt auf, dass der Anteil der Krümmlinge den größten Anteil an der Gesamtveränderung ausmachen, allerdings bei den drei gegebenen Temperaturen und den beiden Inkubationszeiten kaum schwanken. Allerdings kann man erkennen, dass ihr Anteil mit zunehmender Inkubationsdauer

tendenziell steigt, allerdings ist dies nicht signifikant. Der Anteil der Kopf- und Schwanzanomalien sowie der losen Köpfe ändert sich mit zunehmender Inkubationsdauer und –temperatur nicht signifikant.

Abb. 4.5 zeigt die gesamten morphologischen Veränderungen vor und nach einer 30- bzw. 60-minütigen Inkubation bei 25, 37 und 42 °C.

Diese Art der Darstellung zeigt besonders prägnant, dass es in allen inkubierten Ansätzen zu einer geringgradigen Anhebung der Prozentwerte für Spermien mit morphologischen Anomalien kommt.

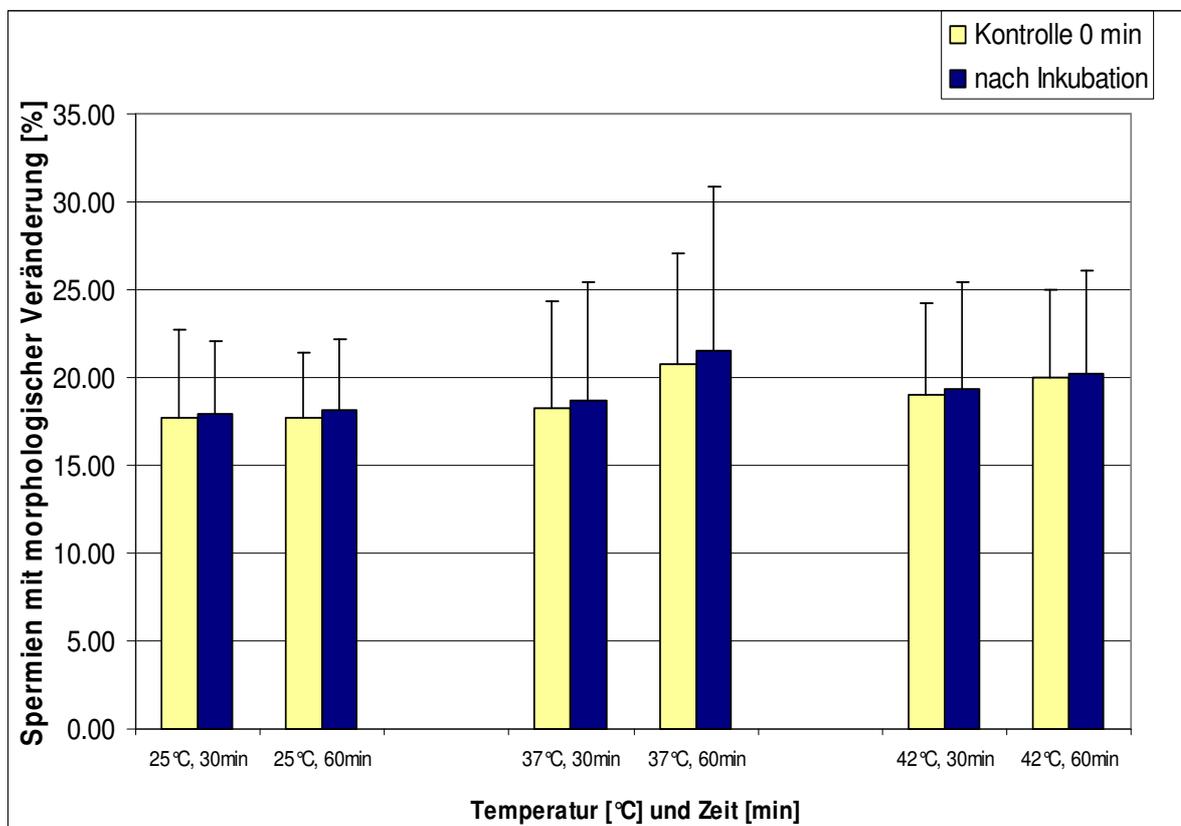


Abb. 4.5: Darstellung der gesamten morphologischen Veränderung [%] vor und nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Basierend auf den in Kap 4.3 dargestellten Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass weder Bulle ( $p > 0,05$ ), noch die Temperatur ( $p > 0,05$ ), noch Zeit ( $p > 0,05$ ) einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung ausübten.

Im Vergleich zum Bullen Zenturio wies Bulle Reim um 2,2%, Bulle Marbach um 0,9% und Bulle Herberger um 1,2% weniger morphologische Veränderungen auf.

#### 4.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

Anhand der Fluoreszenzfärbung mittels Propidiumiodid (PI) und Fluorescein-Isothiocyanat-Peanut-Agglutinin (FITC-PNA) wurde der prozentuelle Anteil der Spermien mit geschädigter Plasmamembran bzw. Akrosommembran im durchflusszytometrischen Verfahren ermittelt. Die Darstellung der Messwerte und deren statistische Auswertung erfolgten mit dem Software-Programm „Cell Quest Pro“ (Fa. Becton-Dickinson, San Jose, USA).

Tab. 4.12 und Tab. 4.13 stellen die Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils der Spermien mit defekter Akrosommembran dar. Messungen zum Zeitpunkt 0 min liefern die Kontrollwerte.

Tab. 4.12: Durchschnittlicher Anteil [%]  $\pm$  SD an Spermien mit defekter AM vor und nach 30-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Defekte AM, 0 min [%]	Defekte AM, 30 min [%]
25	0,10 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,05
37	0,09 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,08
42	0,10 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,11

Nach Inkubation für 30 min bei einer Temperatur von 25 °C blieb der Anteil der Spermien mit defekter AM im Vergleich mit den Kontrollwerten gleich. Bei den Inkubationstemperaturen von 37 °C und 42 °C kam es nach 30 min dagegen zu einer deutlichen Zunahme der Defekte im Bereich der Akrosommembran. Die Temperatur hatte hierbei einen signifikanten Einfluss.

Tab. 4.13: Durchschnittlicher Anteil [%]  $\pm$  SD an Spermien mit defekter AM vor und nach 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Defekte AM, 0 min [%]	Defekte AM, 60 min [%]
25	0,15 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,07
37	0,20 $\pm$ 0,08	0,26 $\pm$ 0,10
42	0,19 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,15

Die Auswirkungen der Inkubationsdauer von 60 min ähneln denen, die bei der Inkubationsdauer von 30 min beschrieben wurden. Auch hier erhöhte sich die Anzahl der membrandefekten Spermien bei 37 °C und 42 °C signifikant.

Abb. 4.6 zeigt den Anteil der Spermien mit defekter Akrosommembran in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit.

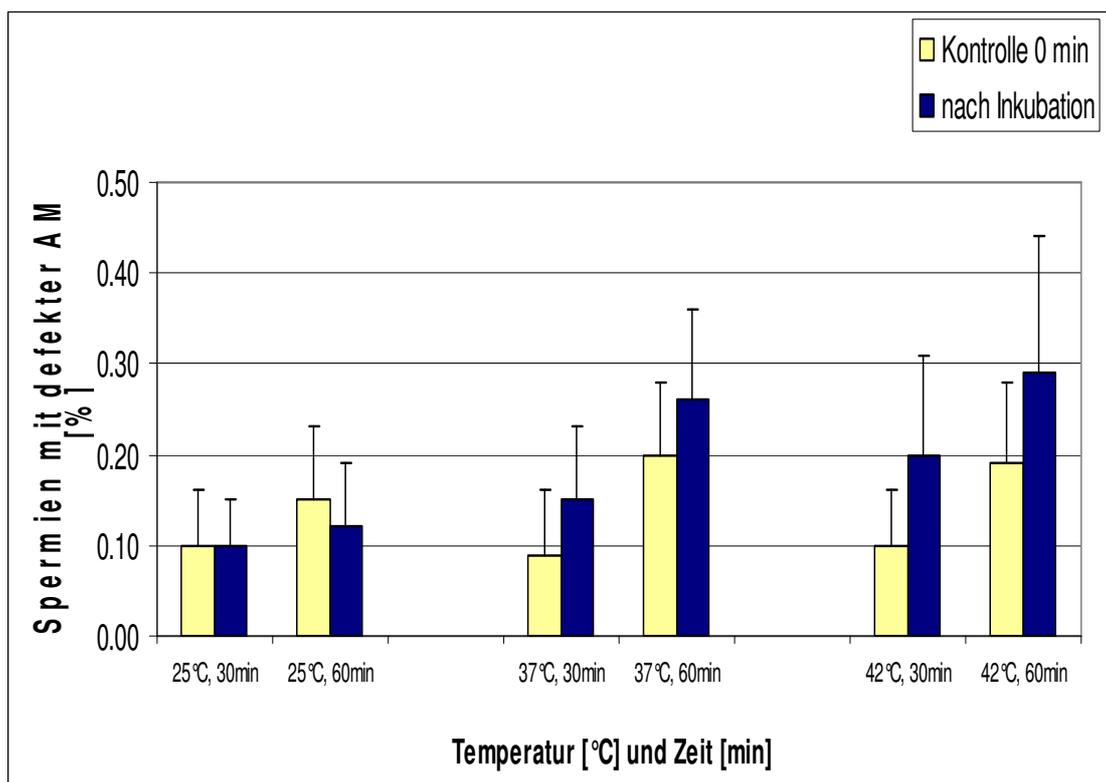


Abb. 4.6: Darstellung des mittleren Anteils [%] der Spermien mit defekter AM in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur und geordnet nach Inkubationsdauer

Die durchflusszytometrische Auswertung der Integrität der Plasmamembran ergab folgende in den Tab. 4.14 und Tab. 4.15 dargestellten Werte:

Tab. 4.14: Durchschnittlicher Anteil [%]  $\pm$  SD an Spermien mit defekter PM vor und nach 30-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Defekte PM,0 min [%]	Defekte PM,30 min [%]
25	30,27 $\pm$ 6,33	30,12 $\pm$ 4,95
37	30,29 $\pm$ 6,03	27,28 $\pm$ 8,31
42	36,10 $\pm$ 8,27	26,17 $\pm$ 11,17

Tab. 4.15: Durchschnittlicher Anteil [%]  $\pm$  SD an Spermien mit defekter PM vor und nach 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Temperatur [°C]	Defekte PM,0 min [%]	Defekte PM,60 min [%]
25	29,52 $\pm$ 7,14	27,41 $\pm$ 7,00
37	32,11 $\pm$ 5,19	25,97 $\pm$ 6,48
42	28,60 $\pm$ 6,34	20,91 $\pm$ 8,28

Aus Tab. 4.14 und Tab. 4.15 ist ersichtlich, dass der prozentuelle Anteil der Spermien mit defekter Plasmamembran nach Inkubation tendenziell abnimmt. Dies ist damit zu erklären, dass die Spermien, die sich vor Inkubation in der Population der plasmamembrandefekten Zellen befanden, nach Inkubation zusätzliche Akrosommembrandefekte aufweisen. Daher färben sich diese Spermien nach Inkubation mit beiden Farbstoffen an und werden nun zu der Population gezählt, die sowohl plasma- als auch akrosommembrandefekte Zellen enthält.

Abb. 4.7 zeigt den prozentuellen Anteil der Spermien mit defekter Plasmamembran zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle) und nach Inkubation bei den gegebenen drei Temperaturen für 30 und 60 min.

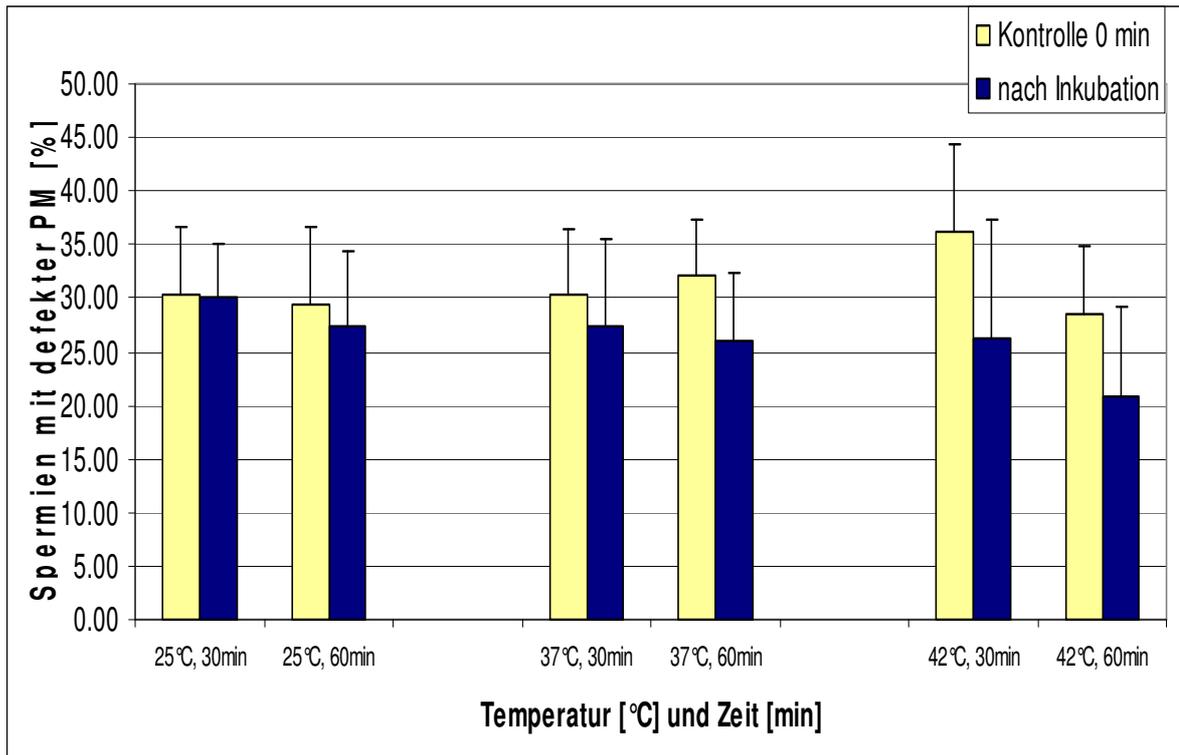


Abb. 4.7: Darstellung des Anteils [%] der Spermien mit defekter PM in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur und geordnet nach Inkubationsdauer

Es fallen die sehr uneinheitlichen Ergebnisse nach Inkubation auf, so kommt es bei allen Temperaturen zu einer Abnahme der Spermien mit defekter Plasmamembran im Vergleich zur Kontrolle.

Die Tab. 4.16 und Tab. 4.17 stellen die Mittelwerte  $\pm$  SD des prozentuellen Anteils der Spermien mit defekter Akrosommembran und mit defekter Plasmamembran dar. Messungen zum Zeitpunkt 0 min liefern die Kontrollwerte.

Tab. 4.16: Durchschnittlicher Anteil [%]  $\pm$  SD an Spermien mit defekter AM und defekter PM vor und nach 30 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Defekte AM & PM, 0 min [%]	Defekte AM & PM, 30 min [%]
25	17,14 $\pm$ 6,73	16,49 $\pm$ 6,29
37	18,23 $\pm$ 4,53	23,49 $\pm$ 9,19
42	15,69 $\pm$ 3,39	29,94 $\pm$ 12,15

Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und 42°C kam es bei gleich bleibender Inkubationsdauer zu einer signifikanten Zunahme der Defekte im Bereich der Akrosom- und der Plasmamembran, die Inkubationsdauer hatte allerdings keinen signifikanten Einfluss.

Tab. 4.17: Durchschnittlicher Anteil an Spermien [%]  $\pm$  SD mit defekter AM und defekter PM vor und nach 60 min Inkubation bei 25, 37 bzw. 42°C

Temperatur [°C]	Defekte AM & PM, 0 min [%]	Defekte AM & PM, 60 min [%]
25	17,85 $\pm$ 6,54	16,44 $\pm$ 7,14
37	17,69 $\pm$ 6,09	24,41 $\pm$ 8,49
42	16,94 $\pm$ 5,69	31,07 $\pm$ 11,56

Wie bei einer Inkubationsdauer von 30 min beschrieben, verhielt es sich bei einer Inkubation von 60 min. Auch hier erhöhte sich die Anzahl der membrandefekten Spermien bei 37°C und 42°C signifikant und reduzierte sich bei einer Inkubationstemperatur von 25°C. Der Parameter Zeit hatte hierbei allerdings keinen signifikanten Einfluss.

Auffallend war eine Zunahme der Spermien mit sowohl defekter AM, als auch PM bei einer Inkubationsdauer von 60 min, bei einer Temperatur von 42°C, wobei lediglich die Parameter Temperatur und Bulle hierbei einen signifikanten Einfluss ausübten.

Abb. 4.8 zeigt den Anteil der Spermien mit defekter AM und mit defekter PM:

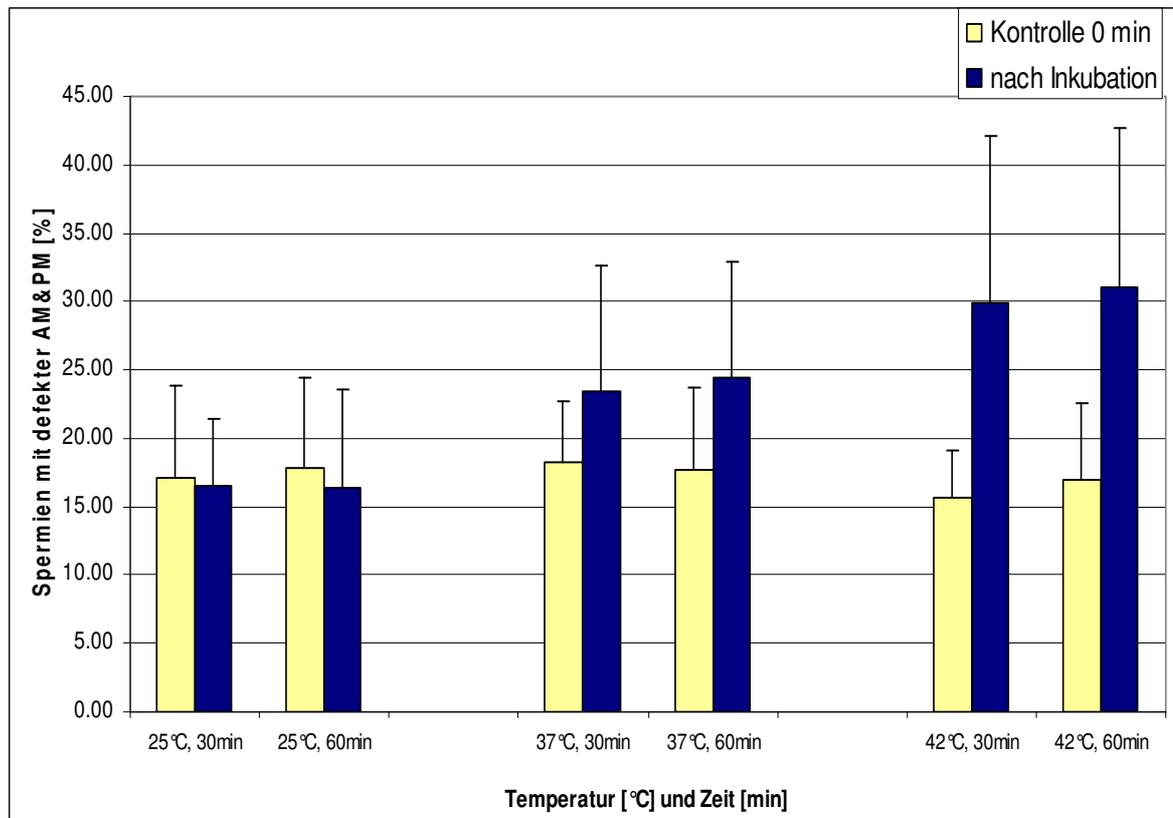


Abb. 4.8: Darstellung des Anteils [%] der Spermien mit defekter AM und defekter PM in Abhängigkeit zur Temperatur und angeordnet nach der Inkubationsdauer

Die statistische Auswertung der Ergebnisse zur Integrität der Plasmamembran ergab ebenfalls für die drei Parameter Zeit, Temperatur und Bulle einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ). Dahingegen übte der Parameter Bulle ( $p > 0,05$ ) bei der Akrosommembranintegrität keinen signifikanten Einfluss aus, Zeit und Temperatur allerdings schon ( $p < 0,05$ ).

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung ergab die Statistik bei der Analyse der Population der Spermien, die sowohl eine defekte AM und eine defekte PM aufwiesen, für die Parameter Bulle und Temperatur eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ . Hiermit ist ein Einfluss dieser Parameter auf die Versuchswerte als signifikant anzusehen. Der Parameter Zeit war jedoch als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) zu werten.

## 4.5 Ergebnisse der In vitro Fertilisation

Vor der Hauptuntersuchung wurden die Spermien der vier Bullen durch IVF-Ansätze, wie in Kap. 3.6 beschrieben, auf ihre Tauglichkeit, Eizellen zu befruchten, untersucht. Hierbei wurde die Befruchtungsfähigkeit für jeden Bullen mindestens drei Mal untersucht. Bulle Zenturio schied aufgrund Befruchtungsunfähigkeit von der Hauptuntersuchung aus.

Die Befruchtungsrate wurde für die Beurteilung des Einflusses der Temperatur auf die Fertilität herangezogen.

Tab. 4.18 zeigt die Durchschnittswerte mit Standardabweichungen der Befruchtungsrate der getesteten Bullen in Abhängigkeit der Temperatur.

Tab. 4.18: Durchschnittliche Befruchtungsrate  $\pm$  SD der drei getesteten Bullen nach 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42°C

Temperatur [°C]	Befruchtungsrate Bulle Marbach [%]	Befruchtungsrate Bulle Reim [%]	Befruchtungsrate Bulle Herberger [%]
25	47,6 $\pm$ 10,2	30,1 $\pm$ 17,0	48,1 $\pm$ 6,3
37	42,3 $\pm$ 15,8	32,3 $\pm$ 7,3	40,7 $\pm$ 6,4
42	53,9 $\pm$ 19,1	27,3 $\pm$ 8,6	27,6 $\pm$ 11,9

Abb. 4.9 stellt die Werte der in Tab. 4.18 aufgeführten Werte der Befruchtungsrate der für die IVF geeigneten Bullen ( $n = 3$ ) graphisch dar. Die dafür eingesetzten Spermien wurden vor der Befruchtung für 60 min bei 25, 37 bzw. 42°C inkubiert. Die Ergebnisse in Bezug auf Temperaturempfindlichkeit sind sehr heterogen. So zeigte der Bulle Marbach bei 42°C die höchste Befruchtungsrate, bei 37°C die geringste, wobei er von den untersuchten Bullen durchschnittlich die höchste Rate aufzeigte.

Die höchste Befruchtungsrate bei Bulle Reim ergab sich nach Inkubation der Spermien bei 37°C, die niedrigste bei 42°C. Im Durchschnitt hatte dieser die geringste Rate aufzuweisen.

Bulle Herberger hatte die höchste Rate bei 25°C und die geringste bei 42°C.

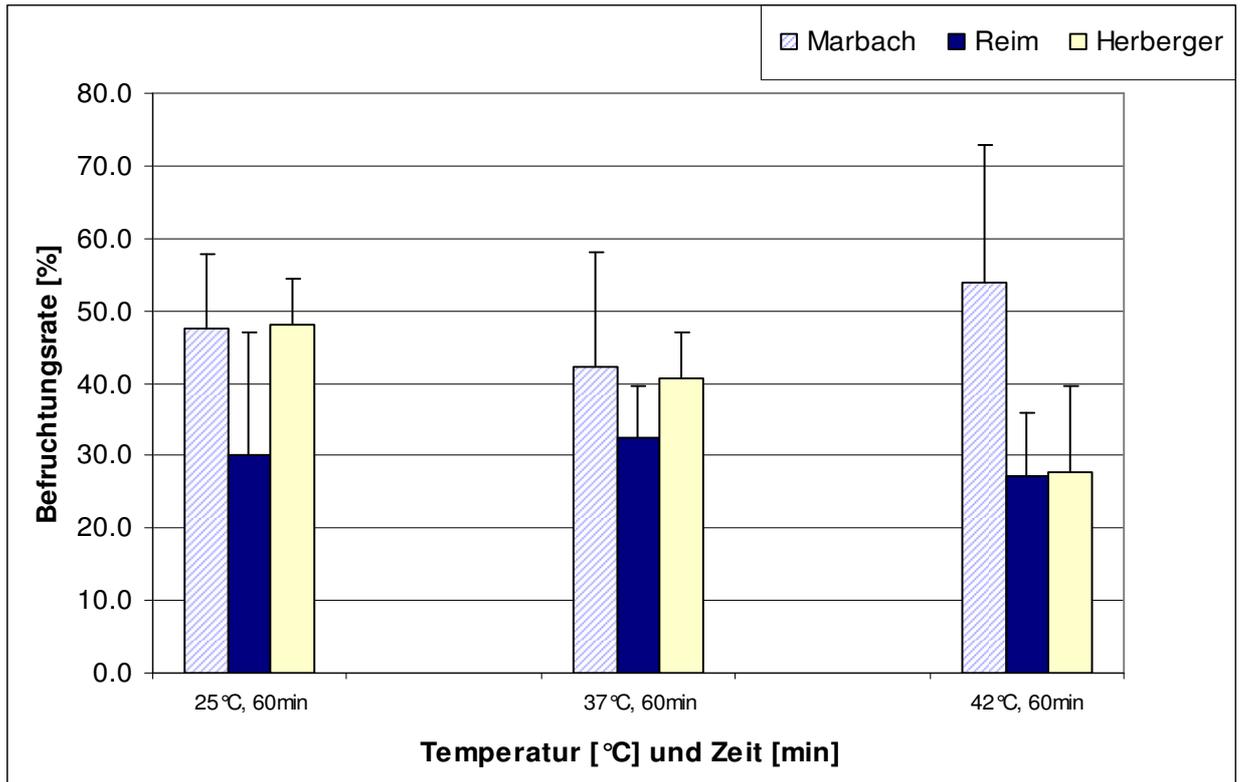


Abb. 4.9: Darstellung der mittleren Befruchtungsrates  $\pm$  SD [%] der Bullen Marbach, Reim und Herberger nach 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42 °C

Die statistische Auswertung mittels univariater Varianzanalyse der In-vitro-Untersuchungen ergab keinen signifikanten Effekt der Temperatur ( $p > 0,05$ ) auf die Befruchtungsrates bei konstanter Inkubationsdauer von 60 min. Allerdings konnte ein signifikanter Einfluss der Bullen ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden. Die Parameterschätzung ergab im Vergleich zum Bullen Reim, bei Bulle Marbach eine um 18,0 % und bei Bulle Herberger eine um 10,4 % höhere Befruchtungsrates, vorausgesetzt, die Parameter Zeit und Temperatur blieben konstant.

## 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse, lässt sich erkennen, dass die Vorwärtsbeweglichkeit von Spermien in signifikanter Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationsdauer steht, aber auch die Qualität des Bullen einen signifikanten Einfluss hat.

Mit zunehmender Temperatur und Inkubationsdauer sinkt der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien im Mittel um 9,31%, die Anzahl der orts- bzw. pathologisch beweglichen nimmt im Mittel um den Faktor 1,5 zu.

Ebenso verhält es sich beim Lebend-Tot-Verhältnis. Der Lebendanteil im Ausstrich sinkt signifikant mit zunehmender Temperatur von 65,33% (25°C) auf 55,17% (42°C) bei einer Inkubationsdauer von 30 min und von 66,40% (25°C) auf 52,28% (42°C) bei einer Dauer von 60 min. Ebenso sinkt der Anteil lebender Spermien signifikant mit Zunahme der Inkubationsdauer, am Beispiel von 42°C von 55,17% (30 min) auf 52,28% (60 min).

Dementsprechend steigt der Anteil der toten Spermien. Bei diesem Ergebnis übt der Parameter Bulle keinen signifikanten Einfluss aus, allerdings sind die Effekte durch Temperatur und Zeit als signifikant ( $p < 0,05$ ) zu werten.

Bei der morphologischen Untersuchung ergaben sich für die Parameter Bulle, Zeit und Temperatur keine signifikanten Effekte, es konnten nur tendenzielle Steigerungen bei den Gesamtveränderungen festgestellt werden.

Als signifikant ( $p < 0,05$ ) anzusehen war die Zunahme der Defekte an Akrosom- und Plasmamembran der Spermien, welche mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurden. Hier spielten alle die Parameter Bulle und Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Membranintegrität, wobei mit zunehmender Temperatur der Prozentsatz der Schäden um den Faktor 1,02 anstieg. Die Inkubationsdauer hatte auf die Zunahme der Defekte keinen signifikanten Einfluss.

Die Befruchtungsfähigkeit der Spermien bei der IVF war durch die Inkubationsdauer nicht eingeschränkt, der Einfluss der Temperatur auf die Befruchtungsrate war trotz deutlicher zahlenmäßiger Veränderungen nicht signifikant. Allerdings konnte ein individueller Einfluss des Bullen nachgewiesen werden, dieser schien einen signifikanten Einfluss auf die Befruchtungsrate in vitro zu haben. Da die Inkubationszeit aufgrund des technischen Aufwandes bei den In-vitro-Versuchen stets 60 min betrug, konnte dieser Parameter statistisch nicht betrachtet werden.

## 5 Diskussion

Die mikroskopische Untersuchung der Motilität ergab verglichen mit der Kontrolle 0 min eine Verminderung der vorwärtsbeweglichen Spermien mit zunehmender Inkubationsdauer (30 bzw. 60 min) und –temperatur (25, 37 und 42°C), der individuelle Einfluss des Bullen spielte hierbei eine signifikante Rolle. Bei der Beurteilung des Lebend-Tot-Verhältnisses hatte der Parameter Bulle keine signifikante Bedeutung. Hier beeinflussten nur Inkubationsdauer und Temperatur die Vitalität der Zellen.

Die Auswertung der Morphologie erfolgte ebenfalls unter dem Mikroskop, allerdings konnte hier keine Einflussgröße, weder Inkubationsdauer, -temperatur, noch Bulle, als signifikanter Einfluss gewertet werden. Die Durchflusszytometrie erfasste mittels Fluoreszenzfärbungen die Population der Spermien mit defekter Plasmamembran und Akrosommembran, die mit zunehmender Temperatur und Dauer signifikant anstiegen, auch der Einfluss des Bullen war hier von signifikanter Bedeutung.

Die Befruchtungsfähigkeit temperaturbehandelter Spermien wurde in einem In vitro Fertilisationsansatz erfasst. Trotz 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C ergab sich keine signifikante Veränderung der Befruchtungsfähigkeit, lediglich die Wahl des Bullen führte zu signifikanten Unterschieden. So zeigte Bulle Marbach bei jeder Inkubationstemperatur die beste Rate mit durchschnittlich 47,7% und Bulle Reim die Schlechteste mit 29,9% (s. Kap 4.5).

### 5.1 Untersuchungsmethoden

Die mikroskopische Untersuchung der Motilität, des Lebend–Tot–Anteils, sowie die Beurteilung der Morphologie der Spermien stellten subjektiv stark geprägte Verfahren dar. Sie sind stark von den Fähigkeiten und Kenntnissen des Untersuchers abhängig. Um möglichst einheitliche Ergebnisse zu erzielen, ist es sinnvoll, dass die gleiche Person sämtliche Untersuchungen durchführt. So lässt sich sicherstellen, dass der personenabhängige Messfehler stets konstant bleibt. Die reguläre Untersuchung der **Motilität** erfolgt durch Aufbringen eines Tropfens des Ejakulats auf einen vorgewärmten

Objektträger und dessen Verbringen auf einen Mikroskopheiztisch bei 37°C. Anschließend werden die Massenbewegung (nur bei Frischsamen) und die Einzelbewegung der Zellen geschätzt. Garner (1986) sah den Nachteil der mikroskopischen Untersuchungen in der nur geringen Teilpopulation, die pro Ejakulat untersucht werden kann und welche schließlich als repräsentative Stichprobe für die Gesamtpopulation dienen soll. Auch sei die Methode im Vergleich zur Durchflusszytometrie (unten erwähnt) sehr zeitaufwendig.

Eine modernere Untersuchungsmethode der Motilität von Spermien wurde 1977 von Liu und Warme vorgestellt. Sie fertigten Filmaufnahmen von Bullenspermien am PC an und konnten diese anschließend auswerten. Diese Technik wurde bis heute ständig verbessert und es sind verschiedene computergesteuerte Videomikrographiesysteme, sog. CASA-Systeme (Computer assisted sperm analysis) auf dem Markt (Riemke u. Leidl, 1985; Rath et al, 1987). Diese sollen der Objektivierbarkeit von Motilitätsmessungen dienen und können zwischen verschiedenen Bewegungsformen von Spermien differenzieren, nämlich der Vorwärts- und Bahngeschwindigkeit (Weitze, 2001) und diese aufzeichnen. Laut Mortimer et al. (1995) ist dieses System aber ausschließlich für Bewegungsstudien einsetzbar, da bei der Interpretation anderer Vitalparameter in der Vergangenheit bereits zahlreiche Fehler aufgetreten sind. Hätte man die Möglichkeit, dieses System in einer breiteren Anwendung zu benützen, wäre dies für weitere Studien sicherlich hilfreich und könnte die mikroskopische Beurteilung ersetzen.

Das **Lebend-Tot-Verhältnis** kann anhand einer Supravitalfärbung evaluiert werden. Diese Methode basiert auf der Anfärbung von toten Spermien, deren Membran für den eingesetzten Farbstoff durchlässig ist. Vitale Spermien bleiben demnach ungefärbt. So wird z.B. die von Blom erstmals 1950 beschriebene Eosin-Nigrosin-Färbung angewendet (Swanson u. Bearden, 1951), aber auch Farbstoffe wie Fast-Green/Eosin, Eosin/Anilinblau, Trypanblau/Giemsa oder Naphthol/Gelb/Erythrosin kommen zum Einsatz bei der Beurteilung des Lebendanteils von Spermien (Way et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ausstriche zur Beurteilung des Lebend-Tot-Anteils mit dem Farbstoff Bromphenolblau-Nigrosin behandelt, der dem

oben genanntem Eosin-Nigrosin ähnlich ist. In beiden Färbungen dient Nigrosin in den Ausstrichen als Hintergrundfärbung, d.h. es fördert den Kontrast der Spermien zum Hintergrund. Sowohl Bromphenolblau als auch Eosin können durch defekte Membranen treten und so tote Spermien anfärben. Mittels Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung wurde in der vorliegenden Untersuchung auch die Morphologie beurteilt.

Die Beurteilung der **Morphologie** ist nicht nur wie in vorliegender Arbeit mittels Ausstrichen mikroskopisch durchzuführen, sondern kann auch mit Hilfe eines sog. Hamilton-Thorne-Analyzers (HTA) vollzogen werden (Rasshofer, 1999). Mit diesem System lassen sich sowohl die Motilität, die Art der Bewegung als auch morphometrische Aspekte, insbesondere des Kopfes, von Spermien beurteilen ([www.hamiltonthorne.com](http://www.hamiltonthorne.com)). Allerdings wurde in einem Vergleich der Auswertungen durch den HTA oder mittels einer technischen Assistentin (TA), die bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der TA festgestellt. Auch bei der Dauer der Analyse von 300 Spermien war die TA bei der subjektiven Auswertung dem HTA um 27 min überlegen (Uhlenbrock, 1999). Es scheint also, dass die mikroskopische Untersuchung durch eine eingeweihte Person vorteilhafter ist als die zur Verfügung stehende automatisierte Technik und zwar insbesondere dann, wenn nur eine geringe Anzahl an Spermien morphologisch ausgewertet werden soll.

Im Gegensatz zu den oben dargestellten mikroskopischen Methoden ist die **Durchflusszytometrie** ein objektives und schnelles Messverfahren, das auf der quantitativen Erhebung von den durch vorhergehende Anfärbung fluoreszierenden Zellen basiert und welches sich kaum durch äußere, menschliche Fehler beeinflussen lässt. Die Möglichkeit eine große Anzahl von Zellen gleichzeitig und in kurzer Zeit analysieren zu können (Evenson und Melamed, 1983) stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber mikroskopischen Methoden dar. So können innerhalb weniger Sekunden verschiedene Eigenschaften von bis zu 10.000 Zellen ausgewertet werden. Aufgrund dieser Vorteile wurde die Durchflusszytometrie bei der Beurteilung von temperaturbehandelten Spermien miteinbezogen.

Um eine Prognose des Effektes variabler Inkubationstemperaturen auf die Fertilität stellen zu können, wurde zusätzlich zu den anderen Methoden die **In vitro Fertilisation**, die beim Rind von Brackett et al. (1982) erstmalig durchgeführt wurde, angewendet. Insbesondere die einfache Beschaffung von Schlachttierovarien zur Gewinnung von Oozyten ist vorteilhaft, um die IVF zu Forschungszwecken nutzen zu können. Im Gegensatz dazu kann eine künstliche Besamung in vivo ebenfalls zur Erfassung der Non-Return-Rate dienen. Diese gibt den Prozentsatz der Rinder an, die bei Erstbesamungen erfolgreich belegt wurden, so dass keine Folgebesamungen mehr notwendig werden.

Allerdings konnte noch kein irgendwie gearteter Zusammenhang zwischen dem Erfolg der NRR bei einer Insemination in vivo und der Befruchtungsrate bei IVF festgestellt werden (Hahn, 2001).

## 5.2 Vergleich mit anderen Studien

### 5.2.1 Studien über thermisch bedingte Effekte

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Einfluss der Parameter Inkubationsdauer, -temperatur und Bulle auf die mikroskopisch ermittelte Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien nachgewiesen werden. Diese war bei einer Inkubationstemperatur von 42°C um 9,8% geringer als bei 37°C und um 11,0% geringer als bei 25°C. Zugleich stieg der Anteil der orts- bzw. pathologisch beweglichen Spermien im Präparat mit zunehmender Inkubationsdauer und Temperatur um den Faktor 1,5. Der geringste Prozentsatz von 52,59% vorwärtsbeweglicher Spermien fand sich nach 60 min Inkubation bei 42°C.

Übereinstimmungen hierzu finden sich bei Bag et al. (2004). Er untersuchte an Schafspermien den Effekt einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C und konnte durch eine stündliche Kontrolle der Proben ebenfalls einen Rückgang der Motilität von 81,4% (zu Beginn der Inkubation) auf 47,9% (nach 4h Inkubation) feststellen. Ebenso verzeichnete er eine signifikante Verringerung

( $p < 0,01$ ) des Prozentsatzes von 65,8 auf 55,7% akrosomintakter Spermien nach beschriebener Inkubation.

Diese Motilitätsverminderung während der Inkubation bei physiologischer Temperatur könnte auf eine Alterung der Mitochondrien zurückgehen, die dann nicht mehr in der Lage sind ATP zu erzeugen (Cummins et al., 1994; Vishwanath u. Shannon, 1997). Auch ein Verbrauch der Energiereserven ist denkbar. DeJarnette et al. (2000) konnte einen Rückgang der Motilität und der Akrosommembranintegrität nachweisen, nachdem die Spermien vor dem eigentlichen Auftauen bei 37°C im Wasserbad Temperaturen von -18, 5 und 22°C für 1 bis 5 min ausgesetzt wurden. Allerdings schien die AM empfindlicher auf den Temperatureinfluss zu reagieren als die Motilität.

Der Einfluss der Inkubationstemperatur und deren Dauer auf morphologische Veränderungen der Spermien waren in der vorliegenden Untersuchung nicht signifikant. Auch hatte der Bulle keinen individuellen Einfluss auf die Morphologie. Thermische Einflüsse auf die Samenqualität scheinen eher während der Spermatogenese stattzufinden. So konnte z.B. Krämer (2000) bei Bullen in den Subtropen einen erhöhten Anteil an Kopfkappenschäden und Geißelschäden nachweisen. Auch die Ejakulatmenge war im Vergleich zur kühleren Jahreszeit vermindert. In histologischen Untersuchungen von Hodengewebe, welches zuvor einer hohen Temperatur ausgesetzt war, konnten Ullner u. Wollrab (1963) nachweisen, dass die Spermatogenese auf der Stufe der Spermatozyten abgebrochen war. Zahlreiche andere Studien konnten diesen thermischen Einfluss auf die Spermatogenese ebenfalls belegen (Wollrab, 1965; El Azab, 1966; Widmann, 1974; Stolla, 1984). Die vorliegenden Ergebnisse würden dagegen bedeuten, dass die Morphologie von ausgereiften Spermien durch eine Inkubation in vitro bei den gegebenen Temperaturen nicht signifikant verändert wird.

Wu (2005) führte bei vier Bullen eine skrotale Temperaturerhöhung für 48h durch, die 6,4 - 7,1°C über der physiologischen Temperatur lag. Anschließend untersuchte er mittels Durchflusszytometrie u.a. die PM-Integrität und den akrosomalen Status des an mehreren Tagen nach lokaler Wärmeapplikation gewonnenen Ejakulates. Ab Tag 7 nach der Hodenerwärmung konnte er eine

Zunahme der akrosomal defekten Spermien verzeichnen, ab Tag 9 stieg auch der Anteil der Spermien mit defekter PM. Die vor Tag 14 gewonnenen Spermien befanden sich in der Nebenhodenpassage und wurden dort durch die skrotale Erwärmung geschädigt.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Untersuchungen über die Integrität der Plasmamembran mittels PI-Färbung und jener der Akrosommembran mittels FITC-PNA Färbung konnte man erkennen, dass der Anteil an Spermien mit Einzeldefekten an Plasmamembran und Akrosommembran nach Inkubation mit steigender Temperatur abnahmen, der prozentuelle Anteil der Gesamtdefekte (Akrosom- und Plasmamembran defekt) mit zunehmender Temperatur aber zunahm. Dies lässt die Vermutung zu, dass Zellen mit defekter Plasmamembran (rotfluoreszierend) im Laufe der Inkubation in die Population der rot- und grünfluoreszierenden Zellen übergingen, also zusätzliche Schäden an der Akrosommembran entstanden. Auch ist es wahrscheinlich, dass bei den Zellen, die anfangs lediglich Schäden am Akrosom aufwiesen (grünfluoreszierend), mit zunehmender Temperatur auch die Plasmamembran (rotfluoreszierend) beschädigt wurde. Dadurch kann es zu einer Verschiebung der prozentuellen Anteile in den vier Subpopulationen (s. Kap. 2.6) kommen, wobei v.a. der Anteil der Spermien mit sowohl Grün- als auch Rotfluoreszenz steigt.

Die statistische Analyse der Gesamtdefekte (also Rot- und Grünfluoreszenz gleichzeitig) ergab einen signifikanten Einfluss der Inkubationstemperatur und des Bullen. Die Inkubationsdauer hatte keinen signifikanten Einfluss.

Auch Nagy et al. (2004) untersuchten den Einfluss einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C auf aufgetaute bovine Spermien. Hierbei kontrollierte er in 30 min Intervallen mittels Durchflusszytometrie die PM- und AM-Integrität. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass der Anteil akrosomgeschädigter Spermien von 3,45% vor Inkubation auf 67% nach 4h Inkubation anstieg.

Eine ähnliche Studie führten Zou und Yang (2000) anhand von Eberspermien durch. Sie lagerten diese für 48h bei 39, 20, 15 und 4°C und kamen zu dem Ergebnis, dass u.a. der Anteil akrosomintakter Spermien, ermittelt durch Fluoreszenzmikroskopie, bei 4,3% (39°C), 43,2% (20°C), 17,3% (15°C) und

14,8% (4°C) lag. Allerdings sind Eber- im Gegensatz zu Bullenspermien wesentlich empfindlicher auf äußere Einflüsse.

Zur Überprüfung des funktionellen Einflusses der mittels Durchflusszytometrie detektierten Schäden an Akrosommembran und Plasmamembran wurde eine IVF durchgeführt. Dies sollte zeigen, ob bei den gegebenen Temperaturen inkubierte Spermien noch in der Lage sind, Oozyten zu befruchten.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Befruchtungsrate dargestellt werden. Bulle Marbach zeigte sogar nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C durchschnittlich die beste Rate. Möglicherweise waren die Spermien, die noch in der Lage waren, die Eizelle zu befruchten, auch allgemein resistenter gegen äußere Einflüsse und konnten so den Kampf gegen Konkurrenten gewinnen. Da bereits tote Spermien durch das Swim-Up-Verfahren (s. Kap.3.6.2) vor der Fertilisation ausschieden, kann davon ausgegangen werden, dass nur motile Spermien eine Chance zur Befruchtung hatten.

Walters et al. (2005) führten IVF-Versuche mit Spermien von vier Bullen durch, die aufgrund 48-stündiger skrotaler Erwärmung morphologisch verändert waren und 13 bzw. 20 Tagen nach Wärmeeinwirkung gewonnen wurden.

Die Spermien von im Versuch als Bulle 1 und 3 bezeichneten Tiere reagierten am stärksten auf die Temperaturerhöhung mit morphologischer Veränderung, Bulle 2 reagierte moderat und Bulle 4 zeigte keine Reaktion. Als Kontrolle diente eine Spermienprobe, die 5 Tage vor der Erwärmung gewonnen wurde. Sie verglichen die Teilungs- und Blastozystenrate mit den Ergebnissen unbehandelter Spermien. Es stellte sich heraus, dass Bulle 2 einen signifikanten Rückgang (um 15% der Teilungsrate bei Bulle 1;  $p < 0,01$ ) der Raten als Reaktion auf die Erwärmung aufwies und auch bei der morphologischen Untersuchung v.a. Defekte an den Spermienköpfen zeigte.

Dies ließ sie vermuten, dass es dadurch zu einem Rückgang der Raten in der IVF kam. Vogler et al. (1993) beschreiben auch eine Zunahme von primären Anomalien (v.a. Kopfanomalien) der Bullen, wenn diese einer skrotalen Erwärmung unterzogen werden. Es war auffällig, dass drei der sechs

untersuchten Tiere einen hohen Prozentsatz an Kopfanomalien aufwiesen und dadurch den Durchschnitt der Ergebnisse anhoben.

Diese Beobachtungen stützen auch die vorliegenden Ergebnisse der IVF-Versuche, da hier nur der Bulle eine signifikante Einflussgröße auf die Befruchtungsrate darstellte. Um diesen Faktor auszuschließen, müsste man aus den zur Verfügung stehenden Ejakulaten verschiedener Bullen eine Mischprobe anfertigen und mit dieser sämtliche Untersuchungen durchführen.

### 5.2.2 Studien über elektromagnetischer Befeldung in vitro

Bereits 1983 führten Hall et al. Versuche zur Befeldung von Truthahnspermien durch. Bei einer Spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 10 mW/g bzw. 50 mW/g und einer Frequenz von 2,45 GHz wurden zunächst die Spermien für 30 min einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt und schließlich die Befruchtungsfähigkeit mittels künstlicher Besamung von Puten überprüft. Während der Befeldungen wurde die Temperatur einer Kammer bei  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  und der zweiten bei  $40,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  konstant gehalten, wobei  $25^\circ\text{C}$  als Optimaltemperatur für in vitro Untersuchungen bei Spermien angegeben wurde (Sexton, 1979). Hall et al. (1982) hatten bereits in vorhergehenden Untersuchungen mit einer Temperatur von  $40,5^\circ\text{C}$  gearbeitet und diese in der beschriebenen Folgeuntersuchung nochmals gewählt, da sie die physiologische Körpertemperatur von Truthähnen darstellt.

Allerdings konnte weder ein Effekt der Temperatur noch der Befeldung auf die Fertilität nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch hier konnte weder bei  $25, 37$  noch bei  $42^\circ\text{C}$  ein signifikanter Einfluss auf die Befruchtungsfähigkeit in vitro erfasst werden.

Positive Effekte einer Befeldung ab 50 W/kg konnten Cleary et al. (1989) feststellen. Sie untersuchten an Mäusespermien bei einer 60-minütigen Befeldung, Morphologie und Motilität sowie die Befruchtungsfähigkeit in vitro bei 0 bis 90 W/kg, bei Frequenzen von 27 MHz und 2450 MHz und unter isothermischen Bedingungen ( $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ). Zur Kontrolle erfolgte eine

Scheinexposition bei 35, 37, 39 und 41 °C für 60 min. Das Ziel dieser Studie war, Veränderungen der Befruchtungsfähigkeit nachzuweisen, die nach Ausschluss von thermischen Effekten, allein durch nichtthermische Wirkungen zustande gekommen waren.

Aktuelle Studien zur Befeldung von Monozyten (Tuschl et al., 2006), isolierten Nebenhodenspermien der Maus (Aitken et al., 2005), humaner Spermien (Iorio et al., 2007) und menschlichen Lymphozyten (Capri et al., 2004; Vijayalaxmi, 2006) jeweils bei konstanter Temperatur von 37 °C ± SD konnten ebenfalls keine bzw. nur fragliche nichtthermische Effekte vorweisen.

### **5.3 Schlussfolgerung**

Die Vergleiche mit experimentell ähnlich ausgerichteten Versuchen (s. Kap 5.2) ergaben keine ernsthaft abweichenden Ergebnisse. Sie bestätigten die Erkenntnisse aus den hier durchgeführten Untersuchungen. So scheint die Spermienzelle von der Handhabung her gesehen durchaus ein geeignetes Versuchsmodell zu sein, um diverse durch Temperatur verursachte strukturelle und funktionelle Schäden aufzudecken, da sie aufgrund ihrer Besonderheiten, wie Motilität, Morphologie bzw. Energiestoffwechsel, sehr sensibel auf äußere Einflüsse mit Funktionsbeeinträchtigungen reagieren könnte.

Thermische und nichtthermische Effekte einer elektromagnetischen Befeldung könnten so anhand der Membranintegrität von Spermienzellen detektiert werden.

Für die geplanten Fortsetzungsuntersuchungen an elektromagnetisch befeldeten Bullenspermien kann die Verwendung der Durchflusszytometrie als Methode der Wahl gesehen werden. Durch ihre Objektivierbarkeit, Zuverlässigkeit und die Möglichkeit, Messungen schnell und in hoher Quantität durchzuführen, stellt sie gegenüber der Mikroskopie einen entscheidenden Vorteil dar. So können bereits geringgradige Defekte in der Membranstruktur der Plasma- bzw. Akrosommembran festgestellt werden und als Maß für die Schädigung dienen. Zusätzlich könnte man die

Chromatinstruktur mittels SCSA<sup>®</sup> (Sperm chromatin structure assay) (Evenson et al., 2000b) und des Farbstoffes Akridinorange untersuchen, um eine durch Befeldung verursachte eventuelle Auflösung der Doppelstrangstruktur der DNA in Einzelstränge feststellen zu können.

Da die Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ für die Funktion der Motilität der Spermien hauptverantwortlich sind (Auger et al., 1989), könnte ein weiterer Untersuchungsparameter das so genannte Mitochondrienmembranpotential (MMP) sein. Mittels JC-1 oder Rhodamin 123 Färbung lässt sich der elektrochemische Gradient (= MMP), der bei der Ausschleusung von Protonen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran entsteht, im Durchflusszytometer erfassen (Krienke, 2003). Nach Cossarizza et al. (1993) lässt sich daraus der energetische Zustand von Spermien bestimmen.

Da Vidament et al. (1998) u. Graham et al. (1990) einen Zusammenhang zwischen lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch ermittelter Vitalität feststellen konnten, könnten zusätzliche mikroskopische Analysen zur Unterstützung der durchflusszytometrischen Daten herangezogen werden.

Zur Darstellung einer sehr komplexen Funktionalität und deren Beeinflussbarkeit ist die IVF als Methode durchaus geeignet, obwohl sie durch diverse Faktoren (durchführende Person, Spermaqualität, Qualität der Eizellen) sehr beeinflussbar ist. Gelingt die Konstanthaltung dieser Faktoren, so können zuverlässige Ergebnisse erzielt werden, deren Schwankungen sich auch relativieren lassen. Eine Alternative zur Überprüfung der Befruchtungsfähigkeit wäre eine Insemination in vivo. Diese ist allerdings auch durch externe Faktoren beeinflussbar. Darüber hinaus weist sie aber auch noch eine tierschutzrelevante Seite auf, wenn mit experimentell veränderten Spermien gearbeitet wird.

Bei allen Untersuchungen zur Befruchtungsfähigkeit von Spermien, ist jedoch zu beachten, dass nicht jeder Bulle für die IVF geeignet ist bzw. ein Bulle eine sehr gute Befruchtungsrate im Labor aufweisen kann, dafür aber eine schlechte Feldfertilität hat (und vice versa). Wenn die IVF in weitergehenden

Versuchen zur Beurteilung der Fruchtbarkeit elektromagnetisch befeldeter Spermien herangezogen werden soll, wäre es sicherlich sinnvoll, nicht nur die Befruchtungsrate, sondern auch die Qualität der dabei erzeugten Embryonen mitzubestimmen. Qualitätsparameter sind z.B. die Entwicklungsstufe und die Kompaktheit der Blastomere, sowie eventuell vorliegender Zelldebris (de Feu et al., 2008). Damit könnten z.B. auch teratogene Effekte von elektromagnetischen Feldern darstellbar werden.

Basierend auf der oben geführten Ergebnisdiskussion sind die experimentellen Empfehlungen für eine geplante Untersuchung unter Einwirkung von elektromagnetischen Feldern auf Spermien in folgenden Punkten wie folgt zusammengefasst:

- 1) Durchflusszytometrische Ermittlung der Membranintegrität
- 2) Weitere Verwendung der Durchflusszytometrie zur Messung des Mitochondrienmembranpotentials und der Spermachromatinstruktur
- 3) Beurteilung der Befruchtungsrate und der Qualität der Embryonen nach IVF

Thermisch und athermisch verursachte Befeldungsschäden können also anhand der Struktur und der Funktion von Spermien überprüft werden. Da die Fruchtbarkeit ein Zusammenspiel zahlreicher Parameter darstellt (Amann u. Hammerstedt, 1993), sollten verschiedene Untersuchungsmethoden kombiniert werden.

Für den Versuchsaufbau einer elektromagnetischen in vitro Befeldung von Zellen sei auf die Literatur von Tuschl et al. (2006) verwiesen. Die technischen Details dieser Anlage sind bei Schuderer et al. (2004) erläutert. Um thermische von nichtthermisch induzierten Effekten unterscheiden zu können, müssen jedoch auch geeignete Methoden einerseits zur Darstellung des induzierten Temperaturanstieges und andererseits zur Abführung der befeldungsbedingt anfallenden Wärme in den befeldeten Zellen geschaffen werden.

## 6 Zusammenfassung

### **Zur experimentellen Darstellung von thermischen Effekten an isolierten Zellen: Eine Modellstudie an Rinderspermien**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob die Spermienzelle ein geeignetes Modell darstellt, um thermisch induzierte strukturelle und funktionelle Veränderungen zu erfassen und quantitativ darzustellen. Wenn dies gelänge, könnten Spermien in Folgeuntersuchungen auch bei der Detektion von Schäden durch hochfrequente elektromagnetische Befeldung als Forschungsobjekt dienen. In der vorliegenden Untersuchung wurden bei Temperaturen von 25, 37 und 42 °C und Inkubationszeiten von 30 und 60 min die Parameter Motilität, Lebend-Tot-Anteil und Morphologie mikroskopisch und die Membranintegrität der Plasma- und der Akrosommembran durchflusszytometrisch ermittelt. Darüber hinaus wurde auch die strukturelle und funktionelle Merkmale zusammenfassend darstellende Befruchtungsfähigkeit von temperaturbehandelten Spermien mittels In vitro Fertilisation beurteilt.

Alle Untersuchungen wurden sofort nach dem Auftauen der Tiefgefrierspermien (= Kontrollgruppe), als auch direkt nach 30- oder 60-minütiger Inkubationsdauer bei der jeweils vorgegebenen Temperatur durchgeführt. Die Motilität der Spermien wurde mikroskopisch ermittelt, wobei zwischen vorwärts-, orts- und pathologisch beweglichen Samenzellen unterschieden wurde. Anhand der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung wurden dann der Lebend-Tot-Anteil und auch die Morphologie der Spermien wiederum unter dem Mikroskop bestimmt.

Die hierbei ungefärbten Spermien stellten die noch vitalen Zellen dar, da der Farbstoff nur durch defekte Membranen diffundieren kann, also nur tote Zellen anfärben kann.

Bei der Beurteilung der Morphologie wurde der Anteil der Spermien mit Anomalien des Kopfes, des Schwanzes und der Anteil der Krümmlinge und lose Köpfe bewertet und die Zahl der Veränderung schließlich zur morphologischen Gesamtveränderung zusammengefasst.

Die Durchflusszytometrie war ein weiteres Untersuchungsverfahren, um mittels Fluoreszenzfarbstoffen die Integrität der Plasma- und der Akrosommembran beurteilen zu können. Hierfür wurden die Spermien vor und nach Inkubation mit dem Farbstoff PI bzw. FITC-PNA angefärbt und im Durchflusszytometer untersucht, welches die prozentuellen Anteile der membrangeschädigten Spermien angab.

Als letztes Untersuchungsverfahren kam die In vitro Fertilisation zum Einsatz, bei der die zur Befruchtung eingesetzten Spermien bei den vorgegebenen Temperaturen zunächst inkubiert wurden und darauf mit zuvor gewonnenen Eizellen in eine Befruchtungsschale gesetzt wurden. Anschließend wurde die Befruchtungsrate berechnet und ausgewertet.

Die Auswertung der Versuche ergab, dass sich der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien mit zunehmender Temperatur und zunehmender Inkubationsdauer signifikant reduzierte und dafür der Prozentsatz der orts- und pathologisch beweglichen Spermien signifikant erhöhte. Hierbei hatte auch der Parameter Bulle einen signifikanten Einfluss. Auch der vitale Anteil der Spermienpopulation, welcher mittels Lebend-Tot-Färbung untersucht wurde, verringerte sich nach Inkubation signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein individueller Einfluss des Bullen konnte hier nicht nachgewiesen werden. Wie erwartet konnten keine signifikanten Effekte bezüglich der Morphologie der Spermien nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass sich eine erhöhte Temperatur lediglich auf die Spermatogenese auswirkt und sich bei bereits ausgereiften Spermien ex vivo strukturell nicht bemerkbar macht.

Mittels der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Membranintegrität der Samenzellen konnte eine Erhöhung der Defekte an PM und AM festgestellt werden, wobei sowohl der Temperatur als auch dem Bullen ein signifikanter Einfluss auf die Resultate zukam. Je höher die Inkubationstemperatur war, desto mehr Membrandefekte konnten gemessen werden. Die Inkubationsdauer hatte keinen signifikanten Einfluss ( $p > 0,05$ ).

Die Fertilität in vitro konnte durch die Temperatur nicht beeinflusst werden, allerdings stellte sich ein signifikanter Einfluss des Parameters Bulle heraus.

Die Inkubationszeit betrug bei den IVF-Versuchen stets 60 min und konnte so als Einflussgröße nicht berücksichtigt werden.

Insgesamt gesehen zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass Spermien sich durchaus als Modellzelle für die geplanten Folgeuntersuchungen eignen, v.a. wenn die Durchflusszytometrie als Methode gewählt wird, da diese bereits minimale Veränderungen u.a. an der Spermienmembran objektiv aufzeigen kann.

## 7 Summary

### **Experimental display of thermal effects on isolated cells: a model study using bovine sperm**

The aim of this study was to assess the suitability of sperm cells as a model, in order to detect thermally induced structural and functional alterations and to display them quantitatively. If this succeeded, sperm cells could be used as an object in further research to detect damages provoked by electromagnetic radiation. In the present study temperatures of 25, 37 and 42°C and incubation times of 30 respectively 60 min were used and the parameters motility, live-dead proportion and morphology were examined microscopically, also the membrane integrity of the plasma- and acrosome membrane was assessed by flow cytometry. Furthermore the ability of fertilization of the temperature treated spermatozoa was evaluated by in vitro fertilization, which combines structural and functional aspects.

All examinations were done immediately after thawing of the frozen sperm (= control group), as well as right after incubation. Motility of the spermatozoa was detected microscopically before and after incubation of the samples, whereas a difference between forward progressive, circular and pathological moving spermatozoa is made. By using the Bromphenol Blue-Nigrosine-Stain the percentage of live and dead cells as well as the morphology of the sperm cells was microscopically estimated.

The unstained cells were counted as vital ones, as the stain can only diffuse through defect membranes, which means it can only dye dead cells.

When assessing the morphology, the proportion of spermatozoa with head and tail anomalies were considered, as well as the proportion of sperm cells with coiled tails and detached heads and thereafter the alterations were summed up to overall morphological change.

Flow cytometry was another method to evaluate the integrity of the plasma and acrosome membrane via fluorescent stains. Therefore the sperm cells were stained with PI respectively FITC-PNA before and after incubation and

were examined by flow cytometry, which calculated the percentage of spermatozoa with membrane defects.

Lastly the incubated sperm cells were used in in vitro fertilization by introducing them to previously collected oocytes. Then the fertilization rate was calculated and analyzed.

The interpretation of the examinations showed that the amount of forward progressive sperm was reduced with increasing temperature and increasing duration of incubation and that in return the amount of non-progressive sperm cells was raised significantly.

Also the vital part of the sperm population was reduced significantly after incubation in comparison with the control group, an individual influence of the bull could not be observed. As expected no significant effects could be proven regarding the morphology of the sperm. A possible explanation could be that an elevated temperature merely has an effect on spermatogenesis and is structurally not visible in matured sperm cells *ex vivo*.

By using Flow cytometry to examine the membrane integrity, an increase of defect plasma and acrosome membranes was revealed, whereas temperature as well as the bull seemed to have significant influence on the results. The higher the temperature the more membrane defects could be detected. The duration of incubation didn't have significant influence ( $p > 0,05$ ).

Fertility in vitro could not be influenced by incubation temperature, but a significant influence of the parameter bull was noticed. The duration of incubation was one hour at all times and therefore could not be included as an influencing factor.

Overall, the conducted studies show that sperm cells are suitable as a model cell for intended further examinations if flow cytometry is chosen as method and hence even small changes in the cell can be detected objectively.

## 8 Literaturverzeichnis

Ahuja K.K. (1990); *Fertilization: changes in sperm and zona carbohydrates*; In: Alexander N.J., Griffin D., Spieler J.M., Waites G.M.H., Gamete interaction: Prospects for immunocontraception, New York: Wiley: 239-258

Aitken R.J., Bennetts L.E., Sawyer D. et al. (2005); *Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline*; In: Int J of Andrology 28: 171-179

Amann R.P., Hammerstedt R.H. (1993); *In vitro evaluation of sperm quality: An opinion*; In: Journal of Andrology 14 (6): 397-406

Asad L., Husain S.S., Rahman M.G.M et al. (2004); *Genetic and non-genetic factors affecting the semen quality of bulls*; In: Pak. J. of Biol. Sci. 7 (11): 1903-1907

Auger J., Ronot X., Dadoune J.P. (1989); *Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment*; In: J. Androl. 10: 439-448

Bag S., Joshi A., Naqvi S.M.K. et al. (2004); *Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws*; In: Theriogenology 62: 415-424

Bahat A., Eisenbach M. (2006); *Sperm thermotaxis*; In: Molecular and Cellular Endocrinology 252, 1-2: 115-119

Berg U., Brem G. (1989); *In vitro production of bovine blastocysts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture*; In: Theriogenology 33: 195

Blottner S., Wegner I., Roelants H. et al. (1998); *Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstspermien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA*; In: Tierärztl. Umschau 53: 441-447

Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L. et al. (1982); *Normal development following in vitro fertilization in the cow*; In: Biol. Reprod. 27: 147-158

Bradley M.P., Geelan A. et al. (1996); *Cloning, sequencing and characterization of LDH-C4 from a fox testis cDNA library*; In: Molecular Reprod. and Dev. 44: 452-459

Busch W., Waberski D. (2007); *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*; Schattauer Verlag, Stuttgart

Busch W., Holzmann A. (2001); *Veterinärmedizinische Andrologie*; Schattauer Verlag, Stuttgart

Capri M., Scarcella E., Fumelli C. et al. (2004); *In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: Studies of Proliferation, Apoptosis and mitochondrial membrane potential*; In: Radiation Research 162: 211–218

Carey J.E., Old-Clarke E. et al. (1981); *Oxidative metabolism of spermatozoa from inbred and random bred mice*; In: Journal of Experimental Zoology 216: 285-292

Chemeris N., Gapeyev A. et al. (2003); *DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field*; In: Mutation Research 558: 27–34

Cheng F.P., Fazelli A., Voorhout W.F. et al. (1996); *Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa*; In: Journal of Andrology 17: 674-682

Cleary S.F., Liu L.M. et al. (1989); *In vitro fertilization of mouse ova by spermatozoa exposed isothermally to radiofrequency radiation*; In: Bioelectromagnetics 10: 361-369

Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G. et al. (1993); *A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)*; In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 197: 40-45

Cummins J.M., Jequier A.M., Kan R. (1994); *Molecular biology of the human male infertility: links with ageing, mitochondrial genetics and oxidative stress*; In: Mol. Reprod. Dev. 37: 345–362

De Feu M.A., Patton J., Evans A.C.O. et al. (2008); *The effect of strain of Holstein–Friesian cow on size of ovarian structures, periovulatory circulating steroid concentrations and embryo quality following superovulation*; In: Theriogenology 70: 1101-1110

DeJarnette J.M., Barnes D.A., Marshall C.E. (2000); *Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen*; In: Theriogenology 53: 1225-1238

De Pauw I.M.C., Van Soom A., Mintiens K. et al. (2003); *In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions*; In: Theriogenology 59: 1093-1107

Den Daas J.H.G (1997); *Prediction of bovine male fertility*; PhD Thesis, Universität Wageningen, Niederlande

Donnellan M., McKenzie D.R. et al. (1997); *Effects of exposure to electromagnetic radiation at 835 MHz on growth, morphology and secretory characteristics of a mast cell analogue, RBL-2H3*; In: Cell Biology Int. 21 (7): 427–439

Dott H.M. (1975); *Morphology of stallion spermatozoa*; In: Journal Reprod. Fertil. Suppl. 22: 41-46

Dressler S., Zink C. (2002); *Pschyrembel®, Wörterbuch Sexualität*; De Gruyter Verlag, Berlin

El Azab E.A. (1966); *Die Auswirkungen lokaler Wärmeapplikation am Skrotum auf Spermatogenese, Reifung der Spermien im Nebenhoden und Spermabeschaffenheit bei Kaninchen und Stier*; Diss.med.vet., LMU München

Evenson D.P. und Melamed M.R. (1983); *Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry*; In: J. Histochem. Cytochem. 31: 248-253

Evenson D.P., Jost L.K., Corzett M., Balhorn R. (2000a); *Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: A case study*; In: Journal of Andrology 21: 739-746

Evenson D.P., Jost L.K. (2000b); *Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment*; In: Methods Cell Sci 22 (2-3): 169-189

Ericsson S.A., Garner D.L., Thomas C.A. et al. (1993); *Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine semen*; In: Theriogenology 39 (5): 1009-1024

Fürst-Waltl B., Schwarzenbacher H., Perner C. et al. (2006); *Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls*; In: Anim. Reprod. Sci. 95, Nr. 1-2, 27-37

Fukami K., Yoshida M., Inoue T. et al. (2003); *Phospholipase Cd4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm*; In: J. Cell Biol. 161: 79-88

Gadella B.M., Rathi R., Brouwers J.F. et al. (2001); *Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm*; In: Animal Reproduction Science 68 (3-4): 249-265

Galli C., Duchi R. et al. (2003); *Bovine embryo technologies*; In: Theriogenology 59 (2): 599-616

Garner D.L., Pinkel D., Johnson L.A. et al. (1986); *Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses*; In: Biology of Reproduction 34 (1): 127-138

Garner D.L., Johnson L.A., YUE S.T. et al. (1994); *Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide*; In: Journal of Andrology 15: 620-629

Graham J.K., Kunze E., Hammerstedt R.H. (1990); *Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry*; In: Biol. Reprod. 43: 55-64

Graham J.K. (1996); *Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa*; In: Reprod. Technol. 12 (1): 111-117

Grundler W., Drscherl P., Beisker W. et al. (2001); *Quantification of temporary and permanent subpopulation of bull sperm treated by an optimised SYBR-14/propidium iodide assay*; Annual Conference of the German Soc. of Cytometry; 14. Heidelberger Zytometrie Symposium, Okt. 18-20, 2001 Heidelberg DKFZ

Gschwend H. (1986); *Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien, insbesondere über den Einfluss ihrer Geschwindigkeit auf das Befruchtungsvermögen*; Diss.med.vet., LMU München

Hahn J. (2001); *Maturationsverfahren und Fertilisationsmethoden von Spermatozoen und Oozyten in vitro*; In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg), *Veterinärmedizinische Andrologie*; Schattauer Verlag, Stuttgart

Hall C.A., Galvin M.J., McRee D.I. et al. (1982); *Interaction of microwave radiation with turkey sperm*; In: *Radiat. Environ. Biophys.* 20: 145-152

Hall C.A., McRee D.I., Galvin M.J. et al. (1983); *Influence of in vitro microwave radiation on the fertilizing capacity of turkey sperm*; In: *Bioelectromagnetics* 4: 43-54

Hancock J.L. (1951); *A staining technique for the study of temperature shock in semen*; *Nature* 167: 323-324

Harrison R., Roldan E. (1990); *Diacylglycerol and phosphatidate production and the exocytosis of the sperm acrosome*; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172 (1): 8-15

Hildebrandt H. (1998), *Pschyrembel®*; 258. Auflage, De Gruyter Verlag, Berlin

Hirai M. (2000); *Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie und -motilität bei Bulle und Eber: Beziehungen zur Fertilität*; Diss.med.vet., LMU München

Holt W.V. (2000); *Basic aspects of frozen storage of semen*; In: Animal Reproduction Science 62: 3-22

lorio R., Scrimaglio R., Rantucci E. et al. (2007); *A preliminary study of oscillating electromagnetic field effects on human spermatozoon motility*; In: Bioelectromagnetics 28: 72-75

Januskauskas A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (2003); *Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility*; In: Theriogenology 60: 743–758

Jiang M., Zhu Y., Zhu Z. et al. (2005); *Effect of cooling, cryopreservation and heating on sperm proteins, nuclear DNA and fertilization capability in mouse*; In: Molecular Reproduction and Development 72: 129-134

Jones A.R. (1997); *Metabolism of lactate by mature spermatozoa*; In: Reprod Fert Dev 9: 227-232

Karabinus D.S., Evenson D.P., Jost L.K. et al. (1990); *Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry*; In: J. Dairy Sci. 73: 2364-2371

Karlson P., Doenecke D. et al. (1996); *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

Kaupp U.B., Kashikar N.D., Weyand I. (2008); *Mechanisms of sperm chemotaxis*; In: Annual Review Physiol 70: 93-117

Krämer 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*; Diss.med.vet, F.H. Berlin

Kräusslich H. (1997); *Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre für Tiermediziner*; Enke Verlag Stuttgart

Krienke M. (2003); *Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonservierten Hengstsperma*; Diss.med.vet., LMU München

Kruip Th. A.M., den Daas J.H.G. (1997); *In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring*; In: *Theriogenology*, Vol. 47, 1: 43-52

Krzyzosiak J., Molan P., Vishwanath R. (1999); *Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions*; In: *Animal Reproduction Science* 55: 163–173

Lebovitz R., Johnson L. (1987); *Effects of pulse-modulated microwave radiation and conventional heating on sperm production*; In: *Journal of Applied Physiology* 62: 245-252

Leidl W., Schefels W. et al. (1971); *Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien*; In: *Deutsche Tierärztl. Wochenschrift* 78: 129-134

Lepock J.R., Frey H.E., Ritchie K.P. (1993); *Protein Denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock*; In: *Journal of Cell Biology* 122 (6): 1267-1276

Liu Y.T., Warme P.K. (1977); *Computerized evaluation of sperm cell motility*; In: *Computers and Biomedical Research* 10: 127–138

Mann T. (1948); *Fructose and Fructolysis in semen in relation to fertility*; In: *The Lancet* 251 (6499): 446-448

Marai I.F.M., Habeeb A.A.M., Gad A.E. (2002); *Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review*; In: *Livestock Production Science* 78: 71-90

McCoy J.P. (2002); *Basic principles of flow cytometry*; In: *Hematology/Oncology Clinics of North America* 16 (2): 229-243

Michelson A.D., MacGregor H., Barnard M.R. (1994); *Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro*; In: *J Thromb Haemost* 71: 633-40

Monterroso V.H., Drury K.C. et al. (1995); *Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa*; In: *Theriogenology* 44: 947-961

Mortimer D., Aitken R.J., Mortimer S.T. et al. (1995); *Workshop report: Clinical CASA – the quest for consensus*; In: 7<sup>th</sup> Int Symposium on Spermatology; Plenary Papers; *Reprod Fert Dev* 7: 951-959

Morton D.B. (1977); *The occurrence and function of proteolytic enzymes in the reproduction tract of mammals*; In: Barrett A.J. (Hrsg.): *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. Res. Monographs in Cell and Tissue Physiology* 2

Nagy S., Hallap T., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (2004); *Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry*; In: *Animal Reproduction Science* 80: 225-235

Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L. et al. (1986); *Bovine in vitro fertilization with frozen–thawed semen*; In: *Theriogenology* 25: 591-600

Polderman K.H. (2008); *Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries*; In: *Lancet* 371: 1955-1969

Rasshofer R. (1999); *Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Bullen mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS*; Diss.vet.med., LMU München

Rath D., Weitze K.F., Armbrecht S. et al. (1987); *A year's experience with a videomicrography system (Cellsoft) for sperm assessment*; In: Dtsch Tierärztl Wochenschr 94 (9): 501-503

Rathi R., Colenbrander B., Bevers M. et al. (2001); *Evaluation of in vitro capacitation o stallion spermatozoa*; In: Biology of Reproduction 65 (2): 462-470

Rauhaus H. (1990); *Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten*; Diss.med.vet., LMU München

Reed L., Johnson T.D., Hudson J.D. et al. (1992); *The disparity between hypothermic coagulopathy and clotting studies*; In: Journal of Trauma 33: 465-470

Riemke P.; Leidl W. (1985); *Motilitätsbeurteilung der Spermien mit Videomikrographie und Computerauswertung*; In: Zuchthygiene 20: 106-107.

Roberts S.J. (1956); *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*; Ithaca, New York

Rohrer M.J., Natale A. (1992); *Effect of hypothermia on the coagulation cascade*; In: Critical Care Med 20: 1402-1405

Roti Roti J. (2008); *Cellular responses to hyperthermia (40-46 °C): Cell killing and molecular events*; In: Int. Journal of Hyperthermia 24: 3-15

Rovan E. (2001); *Biochemie der Spermatozoa*; In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.); *Veterinärmedizinische Andrologie*; Schattauer Verlag, Stuttgart

Rüsse I., Sinowatz F. (1998); *Gametogenese*; In: Rüsse I., Sinowatz F. (Hrsg.)  
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, 2. Auflage Berlin: Blackwell 1998

Saacke R.G., White J.M. (1972); *Semen quality tests and their relationship to fertility*; In: Proc. 4<sup>th</sup> Tech. Conf. A. I. and Reprod., N.A.A.B., Chicago

Saunders R., Kowalczyk C. (1981); *Effects of 2,45 GHz microwave radiation and heat on mouse spermatogenic epithelium*; In: International Journal Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 40: 623-632

Schnorr B. (1996); *Embryologie der Haustiere*; 3. überarbeitete Auflage, Enke Verlag Stuttgart

Schuderer J., Samaras T., Oesch W. et al. (2004); *High peak SAR exposure unit with tight exposure and environmental control for in vitro experiments at 1800 MHz*; In: IEEE Transactions on microwave theory and techniques 52 (8): 2057-2066

Schülke B. (1991); *Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas*; In: Busch W., Löhle, K., Peter W. (Hrsg.); Künstliche Besamung bei Nutztieren; 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Sexton T.J. (1979); *Preservation of poultry semen – A review*; In: Sturkie P.D. (Hrsg.); Avian Physiology; Springer Verlag, New York

Sharif-Khatibi L., Kariminia A., Khoei S. et al. (2007); *Hyperthermia induces differentiation without apoptosis in permissive temperatures in human erythroleukaemia cells*; In: International Journal of Hyperthermia 23: 645-655

Sinowatz F. (2001); *Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane*; In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.); Veterinärmedizinische Andrologie; Schattauer Verlag, Stuttgart

Sirivaidyapong S., Cheng F.P., Marks A. et al. (2000); *Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm*; In: Theriogenology 53(3): 789-802

Sreenan J.M. (1968); *In vivo and in vitro culture of cattle eggs*; In: Proceedings 6th International Congress on Animal Reprod and AI, Paris 1: 577-580

Stolla R. (1984); *Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie*; Enke Verlag, Stuttgart

Sun F. (2005); *Human sperm chemotaxis: Both the oocytes and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants*; In: Human Reproduction 20: 761-767

Swanson E.W., Bearden H.J. (1951); *An Eosin-Nigrosin Stain for differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa*; In: J Anim Sci 10: 981-987

Tuschl H., Mansfeld H., Molla-Djafari M. (2006); *In vitro investigations in immune cells after GSM and UMTS modulated RF exposure*; In: International Conference and Cost 281 Workshop on Emerging EMF Technologies, Potential Sensitive Groups and Health, Graz, April 20/21

Uhlenbrock S. (1999); *Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Hengst mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS*; Diss.med.vet, LMU München

Ullner W., Wollrab J. (1963); *Störungen der Spermiogenese*; In: Schaetz F. (Hrsg), Künstliche Besamung bei Haustieren; Fischer Verlag, Jena

Vacquier V.D., Hirohashi N. (2004); *Sea urchin spermatozoa*; In: Methods Cell Biology 74: 523-544

Van Wagtendonk–de Leeuw A.M. (2006); *Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status*; In: Theriogenology 65 (5): 914-925

Vidament M., Cognard E., Yvon J.M. et al. (1998); *Evaluation of stallion semen before and after freezing*; In: Reprod. Dom. Anim. 33: 271-277

Vijayalaxmi (2006); *Cytogenetic Studies in Human Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to 2.45 GHz or 8.2 GHz Radiofrequency Radiation*; In: Radiation Research 166: 532-538

Vishwanath R., Shannon P. (1997); *Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature*; In: Reprod. Fertil. Dev. 9: 321–331

Vitt U. (1997); *Fruchtbarkeitskriterien aufgetauter Bullenspermien in vitro und die Beeinflussung dieser durch Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung*; Diss.med.vet., FU Berlin

Vogler C.J., Barne J.H., DeJarnette J.M. et al. (1993); *Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine*; In: Theriogenology 40: 1207-1219

Wales R.G., White I.G., Lamond D.R. (1959); *The spermicidal activity of hydrogen peroxide in vitro and in vivo*; In: Journal of Endocrinology 18 (3): 236-244

Walker S.K., Hartwich K.M. et al. (1996); *The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges*; In: Theriogenology 45 (1): 111-120

Walters A.H., Eyestone W.E., Saacke R.G. et al. (2005); *Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology*; In: Theriogenology 63: 1925-1937

Wassarman P.M. (1990); *Profile of a mammalian sperm receptor*; In: Development 108: 1-17

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, 189-218

Watson P.F. (2000); *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*; In: Animal Reproduction Science 60: 481-492

Way A.L., Henault M.A., Kilian G.J. (1995); *Comparison of four staining methods for evaluation of acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa*; In: Theriogenology 43: 1301-1316

Weitze K.F. (2001); *Spermienmotilität*; In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg), Veterinärmedizinische Andrologie; Schattauer Verlag, Stuttgart

Whitfield C.H., Parkinson T.J. (1992); *Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin*; In: Theriogenology 38: 11-20

Widmann J. (1974); *Beeinflussung des DNS-Gehalts bei Bullenspermien nach Störung der Spermatogenese durch Wärme*; Diss.med.vet., LMU München

Wollrab J. (1965); *Ein Beitrag zur Degeneration und Regeneration des Keimepithels beim Bullen nach experimenteller Schädigung*; In: Mhefte Vet Med 20: 709-712

Wu C. (2005); *Durchflusszytometrische Verfahren zur Beurteilung der Spermaqualität nach einer experimentell induzierten Hyperthermie am Bullenhoden*; Diss.med.vet., LMU München

Würgau T. (1986); *Zur Bedeutung der tertären Anomalien für die Beurteilung der Spermienmorphologie*; Diss.med.vet., LMU München

Zaneveld L.J.D., De Jonge C.J., Anderson R.A. et al. (1991); *Human sperm capacitation and the acrosome reaction*; In: Hum. Reprod., 6: 1265-1274

Zarca A., Rubinstein S. et al. (1988); *Transport mechanism for calcium and phosphate in ram spermatozoa*; In: Biochem Biophys Acta 944: 351-358

Zou und Yang (2000); *Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures*; In: Theriogenology 53: 1477-1488

### **Literaturstellen aus dem Internet**

Invitrogen, New Flow Cytometry Tutorials

[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) (Zugang am 19. Oktober 2007)

Online Embryologiekurs für Studierende der Medizin

[www.embryology.ch](http://www.embryology.ch) (Zugang am 5. Februar 2008)

Flow Cytometry Laboratory, Universität Bern

[www.facslab.unibe.ch/flow.html](http://www.facslab.unibe.ch/flow.html) (Zugang am 28. April 2008)

Informationszentrum Mobilfunk

[www.izmf.de](http://www.izmf.de) (Zugang am 5. Mai 2008)

EMF Portal

[www.emf-portal.de](http://www.emf-portal.de) (Zugang 5.Mai 2008)

Becton Dickinson

[www.bdbeurope.com](http://www.bdbeurope.com) (Zugang 3. Juli 2008)

Hamilton Thorne

[www.hamiltonthorne.com](http://www.hamiltonthorne.com) (Zugang 25. Juli 2008)

## Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Stangassinger für die Überlassung des Themas, sowie für seine Unterstützung und konstruktiven Ratschläge während des gesamten Verlaufes der Doktorarbeit danken und dass er immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Weber, Rinderklinik Oberschleißheim, für die Einführung in das Arbeiten mit dem FACS, sowie für das Bereitstellen von Protokollen und Beantworten zahlreicher technischer Fragen in diesem Gebiet.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Braun für die Möglichkeit der Durchführung der IVF in seinem Labor, bei seiner Mitarbeiterin Christiane Otzdorff für die Einführung in die IVF Technik und die tolle fachliche Unterstützung bei den Befruchtungsversuchen, ebenso bei Elke Fink für die Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen, sowie für die nette Aufnahme durch das ganze Team.

Ein großer Dank gilt der Besamungsstation Grub, besonders Frau Eckert, die uns die für die Versuche benötigten Spermienpailletten unentgeltlich zur Verfügung gestellt haben.

Ein weiterer Dank gilt Frau Andrea Ossig vom Statistischen Beratungsbüro der LMU München, die mir einen fundierten Einblick in die Statistik gegeben hat.

Den technischen Mitarbeiterinnen der Physiologie, insbesondere Siglinde Hirmer und Karin Begsteiger, möchte ich ebenfalls für die Hilfe im Labor, sowie für die netten Kaffeepausen danken. An meine Mitdoktoranden Tina Gärtner und Vanessa Schulz geht ebenfalls ein Dankeschön für die gegenseitige Unterstützung und die mittäglichen gemeinsamen Spaziergänge mit unseren Vierbeinern.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich während meiner gesamten akademischen Ausbildung immer unterstützt haben.

Danke auch an Fabian, der mich mental, als auch fachlich unterstützt hat und ohne den ich diese Arbeit nicht so zügig zustande gebracht hätte.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

± SD	Standardabweichung
AM	Akrosommembran
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BN	Bromphenolblau-Nigrosin
cm	Zentimeter
COK	Cumulus-Oozyten-Komplex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroencephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC-PNA	Fluoreszeinisothiocyanat - Peanut Agglutinin
FL 1-3	Fluoreszenzkanäle 1 bis 3
FS	Fibrous sheath
FSC	Forward Scatter
ggr	geringgradig
h	Stunde
hgr	hochgradig
IVF	In vitro Fertilisation
mgr	mittelgradig
mPBS	modifizierte Phosphate Buffered Saline
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben
nm	Nanometer
NRR	Non Return Rate
o.a.	oben angegeben
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline

---

PI	Propidiumiodid
PM	Plasmamembran
s	Sekunde
SOF	Synthetic oviduct fluid
SSC	Side Scatter
TCM	Tissue Culture Medium
vs.	versus

## Verwendete Materialien

### Samenverdünner: Andromed®

Phospholipide

TRIS

Zitronensäure

Zucker

Antioxidantien

Puffer

Glycerin

Reinstwasser

Antibiotika gemäß EU Direktive 88/407 (Tylosin, Gentamycin, Spectinomycin, Lincomycin)

### Bromphenolblau-Nigrosin

2 g	Bromphenolblau
10 g	Nigrosin
100 ml	Aqua dest.

Das Bromphenolblau wird in Aqua dest. gegeben und verrührt.

Danach wird Nigrosin dazugegeben und unter Rühren wird die Mischung gekocht bis sie gelöst ist. Zum Schluss wird die Färbung nach dem Abkühlen filtriert.

**Johnson-Medium**

0,760 g	Natriumchlorid (NaCl)
0,030 g	Kaliumchlorid (KCl)
0,252 g	Fruktose
0,238 g	Hepes
0,015 g	Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
0,010 g	Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )
0,100 g	Bovines Serum Albumin (BSA)
ad 100 ml	Aqua dest.

Anschließend den pH auf 7,4 einstellen.

**Propidiumiodid (Fluoreszenzfärbung)**

1 mg	Propidiumiodid
1 ml	Aqua dest.

Das Propidiumiodid Pulver wird in Aqua dest. gelöst und schließlich bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

**Fluorescein-Isothiocyanat (Fluoreszenzfärbung)**

1 mg	FITC-PNA
1 ml	PBS, pH 7,4

FITC-PNA wird in PBS gelöst und anschließend bis zur Verwendung im Gefrierschrank aufbewahrt.

**Modifizierte PBS- Lösung**

500 ml	Phosphate Buffered Saline (PBS)
500 mg	Glukose
18 mg	Na-Pyruvat
10 mg	Penicillin
20 mg	Streptomycin
5,6 mg	Heparin
150 mg	BSA

**TCM (Maturations- u.Kulturmedium)**

100 ml	Aqua ad inj.
220 mg	Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )
5 mg	Gentamycin-Sulfat
2,2 mg	Na-Pyruvat
1510 mg	Medium 199 HEPES Modification

pH-Wert auf 7,4 einstellen, Lagerung im Kühlschrank bei 7°C

**Sperm-Stock (Stammlösung für Kapazitationsmedium)**

125 ml	Aqua ad inj.
261,15 mg	$\text{NaHCO}_3$
36 mg	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
725 mg	$\text{NaCl}$
28,75 mg	$\text{KCl}$
4,5 mg	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
297,5 mg	Medium 199 HEPES Modification
38,75 mg	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
1,25 mg	Phenolrot
460 µl	Na-Laktat-Sirup 60%

pH-Wert auf 7,4 einstellen und im Kühlschrank bei 7°C lagern

**TL-Stock (Stammlösung für Befruchtungsmedium)**

100 ml	Aqua ad inj.
210 mg	NaHCO <sub>3</sub>
30 mg	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
666 mg	NaCl
23,5 mg	KCl
4 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mg	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
1 mg	Phenolrot
186 µl	Na-Laktat-Sirup

pH-Wert auf 7,8 einstellen und im Kühlschrank bei 7 °C lagern

**SOF–Stammlösung (Kultivierungsmedium)**

100 ml	Aqua ad inj.
53,4 mg	KCl
629,2 mg	NaCl
210,6 mg	NaHCO <sub>3</sub>
9,6 mg	MgCl <sub>2</sub>
24,8 mg	CaCl <sub>2</sub>
47,1 µl	Na-Laktat
500 µl	L-Glutamin
0,14 mg	Phenolrot
16,2 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Zuerst NaHCO<sub>3</sub> und CaCl<sub>2</sub> separat lösen und dann zum restlichen Medium hinzugeben; pH auf 7,4 einstellen und steril filtrieren.

---

Die vorbereitete Stammlösung wird vor Gebrauch mit Folgendem angesetzt:

10 ml	SOF-Stammlösung
100 µl	Gentamycin
1000 µl	ECS
100 µl	nicht – essentielle Aminosäure (MEM)
400 µl	essentielle Aminosäure (BME)
3,6 mg	Na-Pyruvat

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Bandbreite elektromagnetischer Felder ( <a href="http://www.izmf.de">www.izmf.de</a> ) .....	1
Abb. 2.1: Aufbau eines Bullenspermiums (In: Schnorr, Embryologie der Haustiere, 1996) .....	4
Abb. 2.2: Aufbau eines Spermienkopfes (In: Busch, Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren, 2007).....	6
Abb. 2.3: Biochemischer Ablauf der Glykolyse .....	12
Abb. 2.4: Darstellung der Spermiendefekte (In: Busch, Veterinärmed. Andrologie, 2001).....	17
Abb. 2.5: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers ( <a href="http://www.facslab.unibe.ch/flow.html">www.facslab.unibe.ch/flow.html</a> ).....	19
Abb. 2.6: Darstellung der unterschiedlich angefärbten Spermienfraktionen (In: Busch, Künstliche Besamung bei Haustieren, 2007) .....	21
Abb. 2.7: Entwicklungsstadien der Eizelle ( <a href="http://www.embryology.ch">www.embryology.ch</a> ) .....	25
Abb. 3.1: Schema des Versuchsablaufes .....	28
Abb. 3.2: Thermomixer MHR11 mit Blockthermostat TH11 (Fa. HLC Biotech, Bovenden) .....	29
Abb. 3.3: a Lebende Spermien (nicht gefärbt) .....	30
Abb. 3.4: a Spermium mit Defekt an der Kopfkappe .....	31
Abb. 3.5: a, b, c Krümmlinge.....	31
Abb. 3.6: Schema des Versuchsablaufes der Fluoreszenzfärbung.....	33
Abb. 3.7: Cumulus-Oozyten-Komplexe des Rindes, Klassen I bis IV .....	35
Abb. 3.8: Schema einer Zählkammer.....	37
Abb. 3.9: Darstellung der Blastozysten am Tag 8 .....	38
Abb. 4.1: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle) sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42 °C.....	41
Abb. 4.2: Prozentsatz ortsbeweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42 °C .....	42
Abb. 4.3: Prozentsatz pathologisch beweglicher Spermien zum Zeitpunkt 0 min (Kontrolle) sowie nach 30 und 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42 °C ...	44
Abb. 4.4: Darstellung des Anteils lebender Spermien [%], geordnet nach Inkubationsdauer und Temperatur.....	46

---

Abb. 4.5: Darstellung der gesamten morphologischen Veränderung [%] vor und nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42°C.....	49
Abb. 4.6: Darstellung des mittleren Anteils [%] der Spermien mit defekter AM in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur und geordnet nach Inkubationsdauer .....	51
Abb. 4.7: Darstellung des Anteils [%] der Spermien mit defekter PM in Abhängigkeit zur Inkubationstemperatur und geordnet nach Inkubationsdauer .....	53
Abb. 4.8: Darstellung des Anteils [%] der Spermien mit defekter AM und defekter PM in Abhängigkeit zur Temperatur und angeordnet nach der Inkubationsdauer .....	55
Abb. 4.9: Darstellung der mittleren Befruchtungsrate $\pm$ SD [%] der Bullen Marbach, Reim und Herberger nach 60-minütiger Inkubation bei 25, 37 und 42°C.....	57

## Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Klassifizierung der COK.....	35
Tab. 4.1: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37, 42°C .....	40
Tab. 4.2: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37, 42°C .....	40
Tab. 4.3: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils ortsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach der Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C.....	42
Tab. 4.4: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils ortsbeweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach der Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C.....	42
Tab. 4.5: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils pathologisch beweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C.....	43
Tab. 4.6: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils pathologisch beweglicher Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C.....	43
Tab. 4.7: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils lebender Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C.....	45
Tab. 4.8: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils lebender Spermien von vier Bullen vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C.....	45
Tab. 4.9: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils der morphologischen Gesamt-veränderung vor und nach Inkubation für 30 min bei 25, 37 und 42°C .....	47
Tab. 4.10: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils der morphologischen Gesamt-veränderung vor und nach Inkubation für 60 min bei 25, 37 und 42°C .....	48

---

Tab. 4.11: Mittelwerte $\pm$ SD des prozentuellen Anteils einzelner morphologischer Veränderungen bei 30 bzw. 60 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C.....	48
Tab. 4.12: Durchschnittlicher Anteil [%] $\pm$ SD an Spermien mit defekter AM vor und nach.....	50
Tab. 4.13: Durchschnittlicher Anteil [%] $\pm$ SD an Spermien mit defekter AM vor und nach.....	51
Tab. 4.14: Durchschnittlicher Anteil [%] $\pm$ SD an Spermien mit defekter PM vor und nach.....	52
Tab. 4.15: Durchschnittlicher Anteil [%] $\pm$ SD an Spermien mit defekter PM vor und nach.....	52
Tab. 4.16: Durchschnittlicher Anteil [%] $\pm$ SD an Spermien mit defekter AM und defekter PM vor und nach 30 min Inkubation bei 25, 37 und 42°C.....	53
Tab. 4.17: Durchschnittlicher Anteil an Spermien [%] $\pm$ SD mit defekter AM und defekter PM vor und nach 60 min Inkubation bei 25, 37 bzw. 42°C.....	54
Tab. 4.18: Durchschnittliche Befruchtungsrate $\pm$ SD der drei getesteten Bullen nach.....	56

## Lebenslauf

Name: Michaela Schnabel  
Geburtsdatum: 04.07.1982  
Geburtsort: Taipeh, Taiwan  
Staatsangehörigkeit: Deutsch/Österreich  
Eltern: Franz Schnabel  
Barbara Schnabel, geb. Pietsch

### Ausbildung:

#### Schule

1988 – 1990 Deutsche Schule Ryadh  
1990 – 1991 Grundschule Wenzelbach  
1991 – 1992 Grundschule Pettenreuth  
1992 – 1997 Regental - Gymnasium Nittenau  
1997 – 2001 Deutsche Schule Singapur  
Abschluss mit Abitur

#### Studium

2001 – 2007 Veterinärmedizin an der VU Wien  
2005 Auslandssemester an der University of Edinburgh  
März 2007 Approbation zur Tierärztin

#### Promotion

seit Mai 2007 Promotion an der LMU München zum Thema  
„Zur experimentellen Darstellung von thermischen  
Effekten an isolierten Zellen: Eine Modellstudie an  
Rinderspermien“