

7. Summary

The aim of this thesis was to study the functional aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay (HZA) and to evaluate the efficiency of the test to predict boar sperm fertilizing ability.

A first study was conducted in order to investigate the relationship between different conventional semen parameters and sperm binding capacity to the porcine hemizona. Sperm motility of the semen samples was estimated subjectively. Visualization of acrosomal status was carried out using FITC-PNA stain. An Aniline-Blue Eosine stain was used for quantitative assessment of sperm morphology. Sperm membrane integrity (viability) was assessed using a Calcein AM/Ethidium homodimer stain. Twenty two pairs of ejaculates from 24 fertile boars were analysed. 50% of the pairs of ejaculates exhibited significant variation in sperm-hemizona binding capacity. The ability to bind to the hemizona was not correlated with sperm motility, morphology, and level of membrane and acrosome integrity.

A second study was designed to define the variation in sperm-hemizona binding capacity between three ejaculates of six different pairs of boars. The aim of this was to determine the possibility of establishing a ranking of boars on the basis of sperm ability to bind to the hemizona. The results showed that, when three ejaculates are tested, sperm samples differ in their functional capacity to bind to the hemizona. Thus, the HZA does not allow the establishment of a boar ranking on the basis of this sperm function.

A third study was conducted to investigate the *in vivo* fertility of a boar with teratospermic semen (boar 1) in comparison to a boar with proven fertility (boar 2). Two gilts were artificially inseminated with semen from boar 1 while 2 gilts were inseminated as controls with the semen from boar 2. The gilts were slaughtered five days after artificial insemination to determine the fertilization and embryo recovery rates. The number of spermatozoa in the zona pellucida of the embryos were counted using a Hoechst stain (H33342). Semen from the teratozoospermic boar was capable of fertilizing 100% of oocytes, producing viable embryos. However, the number of accessory sperm in the zona pellucida of the day 5 embryos was lower in comparison to the rates seen using normospermic samples for insemination.

Study IV was designed to compare the sperm binding ability to the hemizona from a single boar presenting high percentage of morphological abnormalities (boar 1) to two boars with normal sperm motility and morphology (boars 2 and 3). Two HZAs were performed using 2 different ejaculates from each of the 3 boars. For each HZA experiment, one half of the hemizona pair was coincubated with the sperm from boar 1 (teratospermic semen), while the matching hemizona was coincubated with sperm from boars 2 or 3 (normal semen). Sperm from the teratozoospermic boar was capable of binding to the hemizona at the high rates seen in normal sperm cells.

In study V, heterospermic insemination trials using ejaculates from a boar with teratospermic semen and from two boars with normal morphologic traits were used to evaluate the relationship between the ability of sperm to bind to the hemizona and the *in vivo* fertility of the boars. Fertility was not correlated with the number of sperm bound to the hemizona. Therefore, the actually established HZA cannot be used in practice to evaluate semen fertilizing capacity of individual boars.

9. Erweiterte deutsche Zusammenfassung

Funktionelle Aspekte der Bindung von Eberspermien an die Zona Pellucida im Hemizona Assay

Versuche

Diese Arbeit faßt die Ergebnisse von fünf verschiedenen Versuchsreihen zusammen. Versuch I wurde im Labor des Institutes für Herdengesundheit und Reproduktion der Universität Utrecht in den Niederlanden zwischen Mai und Juni 1996 durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche II, III, IV und V wurden im Schweinelabor des Institutes für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover zwischen September 1996 und Juni 1997 erarbeitet.

Material und Methoden

Allgemeine Verfahren

Samengewinnung und Vorbereitung des Spermias für den Hemizona-Assay (HZA)

Am Versuchstag wurden frische Eber ejakulate gewonnen, nach der Gewinnung mit Beltsville Thawing Lösung (BTS) im Verhältnis 1 : 9 bei 32 °C verdünnt. Zehn ml der verdünnten Samenprobe wurden dreimal für 10 min. bei 900g zentrifugiert und mit PBS resuspendiert. Das Spermienpellet wurde in einem modifizierten Tyrode-Medium auf eine Endkonzentration von 1×10^5 motile Spermien/ml verdünnt.

Vorbereitung und Aufbewahrung der Oozyten

Die verwendeten Ovarien wurden Schlachtsauen unmittelbar im Anschluß an die Tötung auf einem Schlachthof entnommen und in PBS bei +4 °C ins Untersuchungslabor gebracht.

Im Labor wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe durch Punktion und Aspiration der Antralfollikel gewonnen. Die Eizellen wurden in einem Rüttler aufgeschüttelt, um die Kumuluszellen zu entfernen. Die denudierten Oozyten wurden mit PBS gespült und bei 4 °C in gepuffertem Ammoniumsulfat (BAS) gelagert.

Vorbereitung der Hemizonae

Die Hemizonae wurden fünfmal mit PBS gespült und anschliessend unter phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle mit Hilfe eines Mikromanipulators mit einer Mikroklinge in zwei äquivalente Hälften geteilt. Jedes Hemizonae-Paar wurde in ca. 50 µl Inkubationsmedium umgesetzt und wiederum bei 4 °C über Nacht aufbewahrt, um am nächsten Tag für den HZA zur Verfügung zu stehen.

Hemizona-Assay Protokoll

Spermien suspensionen zweier Eber (je 5000 motile Samenzellen in 50 µl) wurden zu jeder Hemizona getropft und bei 38,5 °C in 5%-iger CO₂- Atmosphäre bei 100%-iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach vierstündiger Koinkubation wurden die Spermien-Hemizona-Komplexe entnommen und zehnmal mit PBS gespült, um alle lose anhaftenden Spermien zu entfernen. Die Spermien-Hemizona-Komplexe wurden anschliessend für 10 min in 2,5%-igem Glutaraldehyd fixiert und danach erneut mit PBS gespült sowie schliesslich mit ca. 10 µi/ml Hoechst 33342 zur Darstellung der Spermienköpfe angefärbt. Die Gesamtzahl aller an jede Hemizona gebundenen Spermien wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bestimmt.

Statistische Analyse

Die Unterschiede der Spermienbindungsfähigkeit zwischen den Ebern wurden unter Zuhilfenahme des t-Testes für gepaarte Proben auf Signifikanz überprüft (procedure UNIVARIATE -SAS inc. 1989).

Verlässliche vergleichbare Ergebnisse analoger Hemizonen wurden mittels Hemizona-Index errechnet.

$$\text{Hemizona-Index} = \frac{\text{Anzahl der an Zona 1 gebundenen Spermien (Eber 1)}}{\text{Anzahl der an Zona 2 gebundenen Spermien (Eber 2)}}$$

Ein Hemizona-Index von 1 zeigt die identische Anzahl an analoge Hemizonae gebundener Spermien der verwendeten Eber an.

Meßgrößen für die weiteren Spermienparameter (Motilität, Morphologie, Membranintegrität und Akrosomintegrität) wurden ebenfalls in Indexform errechnet und für die statistische Überprüfung verwendet.

In Versuch I wurden mögliche Beziehung zwischen HZA-Ergebnissen und den weiteren Spermienwerten mit Hilfe der Regressionsanalyse bestimmt (procedure REG SAS inc. 1989).

In Versuch V wurde der prozentuale Anteil der von einem Eber stammenden an die Hemizona gebundenen Spermien in jeder Kombination mittels Wilcoxon signed rank Test auf Signifikanz überprüft.

Versuch I

Bindung von Schweinespermien an die Hemizona in Relation zu anderen funktionalen Parametern in vitro

Ziel dieser Versuche war Beziehungen bzw. Unterschiede zwischen konventionellen in vitro-Samenparametern und HZA-Ergebnissen abzuschätzen.

Der Hemizona-Assay wurde an jeweils 1 oder max. 2 Ejakulaten von 22 verschiedenen Paaren fertiler Besamungsgeber unterschiedlicher Rassen untersucht. Zwischen sechs und zehn verschiedene Hemizona-Paare wurden gleichzeitig mit derselben Spermiesuspension zweier Eber inkubiert. Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurden die Spermien mit Anilinblau-Eosin angefärbt und die Samenausstriche bei 200-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Der Akrosomstatus wurde mittels FITC-PNA-Färbung bestimmt. Die Membranintegrität (Lebensfähigkeit) wurde unter Verwendung einer Calcein AM/Ethidium Homodimerfärbung beurteilt.

Abgesehen von der Einschätzung der Spermienmorphologie, die nur vor der Samenspülung durchgeführt wurde, kamen alle bei der Vorbereitung der Spermien für den HZA üblichen in vitro-Samenanalysen jeweils vor und nach der Samenspülung zur Anwendung.

Ergebnisse und Diskussion

Die üblichen qualitativen Spermienparameter der untersuchten Eber bewegten sich zwischen den Grenzen, die auch bei zur künstlichen Besamung auf Besamungsstationen

verwendeten Ebern zu Anwendung kommen. Ungeachtet der eingeschränkten Variation innerhalb der konventionellen Qualitätsparameter zeigte der Samen fertiler Besamungsgeber eine große Variabilität ihrer Spermien-Hemizona-Bindungs-kapazität.

Die Bindungsfähigkeit unterschied sich signifikant bei 50 % der untersuchten Eberpaare ($p < 0,05$). Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Zonabindung einerseits sowie Motilität vor der Samenspülung ($p = 0,34$); Motilität nach der Samenspülung ($p = 0,99$); Lebensfähigkeit vor der Samenspülung ($p = 0,53$); Lebensfähigkeit nach der Samenspülung ($p = 0,92$); Akrosomintegrität vor der Samenspülung ($p = 0,10$); Akrosomintegrität nach der Samenspülung ($p = 0,44$) und normaler Morphologie andererseits ermittelt werden.

Die Ergebnisse bestätigen, daß routinemäßig ermittelte Spermaparameter ungeeignet sind, um das Spermienbindungspotential an die Hemizona von verschiedenen Ebern einzuschätzen. Es ist nicht auszuschließen, daß die fehlende Korrelation zwischen HZA und funktionellen Samen-charakteristika durch die geringen Unterschiede innerhalb der einzelnen Samenqualitätsmerkmalen der verwendeten Vartiere bedingt ist. Es ist ebenfalls möglich, daß der HZA funktionelle Merkmale von Spermien betrifft, die mit in vorliegender Studie verwendeten konventionellen Samenqualitätsparametern nicht erfaßt werden. Da Spermien-Zona pellucida-Interaktionen biochemische Vorgänge und Unterschiede von Komponenten der Spermienzelloberfläche betreffen, die als Bindungsstellen für Zona pellucida-Glycoproteine in Frage kommen, ist anzunehmen, daß auch hier Variationsursachen der Spermien-Hemizonabindungseigenschaften vorliegen können. Es ist aber auch denkbar, daß die Hemizona-Ergebnisse Unterschiede der in vivo-Fruchtbarkeit der Eber bzw. zwischen Ebern widerspiegeln.

Versuch II

Mögliche Unterschiede des Hemizona-Assays zwischen 3 in Folge gewonnenen Ejakulaten verschiedener Eber

Das Ziel dieser Studie war die Abschätzung der Spermien-Hemizona-Bindungs-fähigkeit von Samenproben aus jeweils 3 Ejakulaten von verschiedenen Ebern, um die Möglichkeit der Rangfolgebildung der Eber hinsichtlich ihrer Spermaqualitätsmerkmale zu untersuchen. Vier Eber (A, B, C, D) wurden in sechs Paarungen aufgeteilt (alle möglichen

Eberkombinationen), so daß drei HZA-Serien mit jeweils verschiedenen Ejakulaten jeder Eberpaarung durchgeführt werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

Die Interejakulat-Variationen der konventionellen Spermienparameter waren gering. Ungeachtet der geringen Variation dieser Spermienwerte konnte eine hohe Variabilität der Spermienbindung innerhalb der Eber derselben Eberpaare im Verlaufe der Wiederholungen beobachten werden. Bei keinem der Eberpaare ergab sich eine über die drei Ejakulate vorhandene Wiederholbarkeit. Darüber hinaus ergaben sich bei drei Paarungen (B-C, B-D, C-D) gegensätzliche Ergebnisse der Bindungsfähigkeit.

Die Ergebnisse zeigen, daß Spermien verschiedener Eber in ihrem Bindungsverhalten an Hemizonae unterschiedlich sind, wenn gleiche Eberpaarungen anhand von drei in Folge gewonnenen Ejakulaten getestet wurden. Hiermit war es nicht möglich, eine potentielle Überlegenheit eines bestimmten Ebers über einen anderen zu ermitteln, um auf dieser Basis ein Ranking der Eber hinsichtlich der Bindungsfähigkeit zu erstellen. Bereits FRANKEN et al. (1991) stellten fest, daß die Spermienbindungsfähigkeit fertiler Männer zwischen und innerhalb der Individuen variierte. Da keine feststellbaren Unterschiede zwischen den Ejakulaten hinsichtlich Motilität und Morphologie der Spermien vorlagen und keine Korrelation dieser Werte zur Bindungsfähigkeit bestand (Versuch I), ist anzunehmen, daß die Unterschiede der Bindungsfähigkeit nicht zu Unterschieden von Motilität und Morphologie in Beziehung stehen.

Da verschiedene Moleküle in Rahmen der Spermien-Zona pellucida-Interaktion beteiligt sind und Polypeptide der porcinen Spermienadhesin-Familie im Zonabindungsprozeß eine Rolle spielen (CALVETE et al. 1995), ist nicht auszuschließen, daß Unterschied in der Hemizona-Bindungsfähigkeit zwischen verschiedenen Ejakulaten eines Ebers ihre Ursache im unterschiedlichen Spermadhesingehalt haben könnten (HARRISON 1997).

Versuch III

Besamungsversuch

Gegenstand dieses Versuches war die Bestimmung der *in vivo*-Befruchtungsfähigkeit eines Ebers (Eber 1) mit Teratozoospermie. Dieses Tier wurde in Versuch IV in direktem Vergleich mit einem fertilen Eber (Eber 2) im HZA untersucht. Ein Ejakulat jedes Ebers wurde mit BTS (2×10^9 Spermien/Portion) verdünnt. 24 Stunden nach Beginn der Duldung wurden zwei Jungsaugen mit Samen von Eber 1 (Teratozoospermie), zwei weitere Saugen als Kontrolle mit Samenportionen eines normospermen Ebers (Eber 2) besamt. Die Saugen wurden fünf Tage im Anschluss an die künstliche Besamung zur Ermittlung von Befruchtungsrate und Embryonenqualität geschlachtet. Die Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida wurde nach Anfärbung mit Hoechst 33342 ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

Ungeachtet des hohen Prozentsatzes formabweichender Spermien im Ejakulat von Eber 1 (Teratozoospermie) wurden die drei besamten Saugen tragend. Die Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida war bei von Eber 1 gezeugten Embryonen geringer (16 und 37) als bei von Eber 2 (normosperm) gezeugten Embryonen (205 und 91)

Es ist bekannt, daß Besamungsergebnisse von der Spermienkonzentration beeinflusst werden. Erhöhte Spermienanzahlen in der Besamungsdosis können unter bestimmten Voraussetzungen Fruchtbarkeitsmängel kompensieren. Es ist anzunehmen, daß die Anzahl lebensfähiger Spermien von Eber 1 (ca. $1,2 \times 10^9$) in der Besamungsportion ausreichend war, um optimale Befruchtungsraten und eine normale Entwicklung der Embryonen bis zum fünften Tag nach der Besamung zu erreichen. Die geringe Anzahl akzessorischer Spermien deutet darauf hin, daß bei eingetretener Befruchtung die Anzahl befruchtungskompetenter Spermien im unteren Eileiter bzw. am Ort der Befruchtung vermindert war, so daß der Befruchtungserfolg zwar eintrat, ohne daß die bei normospermen Verhältnissen vorhandene höhere Anzahl akzessorischer Spermien erreicht wurde.

Versuch IV

Hemizona-Assay und Teratozoospermie

Ziel war, die Hemizona-Spermienbindungsfähigkeit eines Ebers mit Teratozoospermie (hoher Anteil formveränderten Spermien) gegenüber Samen von 2 Ebern mit normospermen Samen-befunden (Eber 2 und 3) zu überprüfen. Bei den HZA -Experimenten wurde Sperma von Eber 1 gegenüber Sperma von Eber 2 bzw. in einem weiteren Ansatz gegenüber Sperma von Eber 3 getestet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Paarung Eber 1 / 2 erbrachte eine identische Bindungsfähigkeit mit einem HZA-Index nahe 1. In der Paarung 1 / 3 zeigte Eber 1 signifikant mehr gebundene Spermien gegenüber Eber 3 (HZA-Index 1,4). Obwohl Eber 1 einen signifikant erhöhten Anteil an formveränderten Spermien aufwies, war seine Bindungsfähigkeit identisch bzw. höher als Samenproben der normospermen Eber 2 und 3.

Da Eber 1 einen hohen Anteil an Spermien mit Halsbrüchen aufwies, ist die Annahme berechtigt, daß abgelöste Spermienköpfe nicht an die Zona pellucida binden können. Da eine nichtlineare positive Beziehung zwischen Spermienzahl im Inkubationstropfen und der Spermienbindungsrate besteht, aus der die Empfehlung zur Verwendung einer konstanten Anzahl von 5000 motilen Samenzellen im HZA- Testansatz abgeleitet wurde (FAZELI et al. 1996), ist nicht auszuschließen, daß die daraus resultierende Erhöhung der Gesamtspermienzahl im Ansatz des Eber 1 zu einer Erhöhung der Bindungsrate führte. Andererseits könnte es auch möglich sein, daß formabweichende Spermien in der Lage sind, an die Hemizona zu binden, wie bereits von KRZANOWSKA u. LORENC (1983) nachgewiesen wurde. Unabhängig von diesem Interpretationsproblem sind die Ergebnisse eine Bestätigung des Versuches I, daß nämlich die Hemizona-Bindung nicht in Abhängigkeit von konventionellen Spermienqualitätswerten (Motilität u. Morphologie) zu sehen ist. Allerdings sind die vorliegende Daten wegen der geringen Tierzahlen mit Einschränkung zu interpretieren, um eine Erklärung für die hohe in vitro-Bindungs Kapazität von Spermaproben mit einem erhöhten Anteil an morphologischen Abnormalitäten zu geben.

Studie V

Heterosperme Besamung

Zehn heterosperme Inseminationen wurden mit 3 Ejakulaten der zuvor verwendeten 3 Eber durchgeführt, um die HZA - Ergebnisse anhand von in vivo-Fruchtbarkeitsergebnissen zu überprüfen. 2 Mischspermapräparationen der Paare Eber 1 / 2 und 1 / 3 wurden mit jeweils 1×10^9 Spermien von jedem der beiden Eber in 100 ml BTS-Medium hergestellt. Zehn puberale Jungsaunen erhielten für 15 Tage je 5ml (20 mg) Allyltrenbolone per os (Regumate® - Roussel- Uclaf, Serum Werke Bernburg -AG) zur Zyklusblockade. 24 h nach Ende der Behandlung erhielten die Tiere 750 IE PMSG (Intergonan®-Intervet GmbH, Tönesevort), 72 h später 500 IE hCG (Ovogest ®-Intervet GmbH, Tönesevort) intramuskulär appliziert.

Die Insemination wurde 24 h nach hCG-Applikation durchgeführt. Fünf Sauen wurden mit Mischsperma von Eber 1 und 2, fünf weitere Tiere mit Sperma der Eber 1 und 3 besamt. Proben der verwendeten heterospermen Inseminate wurden der konventionellen Samenanalyse (Motilität und Morphologie) unterzogen und im Hemizona-Assay beurteilt. Die Sauen wurden 30 Tage nach Inseminationen geschlachtet, die Genitalorgane entnommen und die Feten zur Bestimmung der Abstammung mittels DNA-Markern gewonnen. Die Genanalyse erfolgte in dankenswerter Weise durch das Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Alle Jungsaunen wurden nach heterospermer Insemination mit Mischsperma von Eber 1 und 2 tragend, während 2 der 5 mit Mischsperma der Eber 1 u. 3 trächtig waren. Es ergaben sich signifikante Unterschiede der Befruchtungspotenz zwischen den Ebern. Eber 2 zeigte in allen 5 Anpaarungen signifikant mehr Nachkommen als Eber 1. Hinsichtlich der Abstammung der mit dem Spermepool der Eber 1 und 3 gezeugten Nachkommen stammten alle Feten von Eber 1 ab (Teratozoospermieeber). Im HZA wies dieser Eber eine größere Zahl an die Hemizonen gebundene Spermien auf als der normofertile Eber 2 sowie als Eber 3, dessen Fertilität nicht bekannt war ($P < 0.05$). Damit besteht zwischen den Abstammungsergebnissen der heterospermen (kompetitiven) Besamungsversuche und den Ergebnissen des Hemizona-Assays keine Übereinstimmung. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit vorherigen Untersuchungen an Bullen (FAZELI et al. 1996), Hengst (FAZELI et al. 1993) und Menschen (FRANKEN et al. 1993) überein, bestätigen jedoch kürzlich ermittelte Ergebnisse von BERGER et al. (1996), die keine Korrelation zwischen Spermienbindung an

die Zona intakter Oocyten und in vivo-Fruchtbarkeit von Ebern feststellten. Werden die kompetitiven Befruchtungsergebnisse der Eberpaarung 1 und 3 berücksichtigt, zeugte Eber 1 alle Nachkommen in den Anpaarungen. Eber 3 erscheint spermatologisch fertil (normosperm), wenn die konventionellen Samenparameter berücksichtigt werden, die Ergebnisse der in vivo-Befruchtungen deuten hingegen auf eine infertile Situation hin, da kein Fetus von diesem Eber abstammt. Die Ursache dieser "Unfruchtbarkeit" ist unklar. Interessant ist zumindest die Beobachtung, daß in dieser Eberpaarung eine Übereinstimmung zwischen den Hemizona-Bindungsergebnissen und der in vivo-Befruchtungsleistung vorlag (Eber 1 zeugte alle Nachkommen und zeigte eine größere Zahl an die Hemizona gebundene Spermien). Allerdings ist anzunehmen, daß subfertile oder infertile Vatiertiere nicht sehr geeignet sind, die Befruchtungsfähigkeit in einer Vatiertierpopulation vorherzusagen (AMANN 1989). Insgesamt ist aber festzuhalten, daß die im Hemizona-Assay ermittelte Spermienbindungsfähigkeit nicht als Haupteinflußfaktor für die Variation der Befruchtungspotenz der Spermien anzusehen ist. Es ist daher davon auszugehen, daß der HZA keine ausreichend verlässliche Grundlage für eine Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit von Ebern darstellt.