

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das volumetrische Verhalten der Eberspermatozoen unter isotonen und hypotonen Bedingungen mittels eines biotechnischen Verfahrens gemessen. Zur Anwendung gelangte ein computergesteuertes Analysesystem (CASY®1, Model TTC), das auf dem Prinzip der Widerstandsmessung basiert.

Es wurde die Anwendbarkeit dieses Testes anhand von insgesamt 233 Ebern an einer Besamungsstation überprüft. Die Untersuchungen der Ejakulate fanden zu verschiedenen Jahreszeiten in 3 Meßreihen (Mai/Juni, August/September, November/Dezember) statt. Dabei wurden in den Meßreihen 2 ($n = 200$) und 3 ($n = 184$) die Ejakulate unmittelbar nach der Samenentnahme untersucht, während die Ejakulate in der Meßreihe 1 ($n = 182$) nach einer Lagerung von 3 bis 4 Stunden im Nativsperma zur Messung im computergesteuerten Analysesystem gelangten. Insgesamt wurden aufgrund von Abgängen 128 Eber in allen 3 Meßreihen gemessen.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen den Standardparametern bzw. der Non-Return-Rate und der osmotischen Resistenz der Spermatozoen ermittelt. Die 60-90 Tage Non-Return-Rate wurde den konventionell erfaßten Spermaqualitätsmerkmalen (Volumen und Spermatozoenkonzentration der Ejakulate sowie Motilität der Spermatozoen) gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Standardparameter und der Non-Return-Rate wurden in Korrelation nach Spearman zu der Volumenreaktion der Spermatozoen unter isotonen und hypotonen Bedingungen gesetzt.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Eine hohe, signifikante Korrelation besteht zwischen der Messung der Spermatozoenkonzentration mittels des Photometers und der Messung mittels des computergesteuerten Analysesystems ($r = 0,87$; $p = 0,0001$). Eine ebenfalls hoch signifikante Korrelation existiert zwischen den Messungen mittels Thomazählkammer und mittels computergesteuertem Analysesystem ($r = 0,79$; $p = 0,0001$). Dabei ist das Meßfenster aufgrund der Cursorstellung ($3 \mu\text{m} - 10 \mu\text{m}$) bei der computergesteuerten Messung zu berücksichtigen, da davon ausgegangen werden kann, daß es sich bei den Partikeln unterhalb dieser Meßgrenze um Spermatozoenfragmente sowie um sonstige Verunreinigungen handelt.

2. Spermatozoen aus Ejakulaten mit im Mittelwert guten Standardspermaparametern, ausgedrückt durch die Motilität (Meßreihe 2: $70,8 \pm 11,2$ %; Meßreihe 3: $70,7 \pm 9,3$ %), das Ejakulatvolumen (Meßreihe 2: $197,9 \pm 67,5$ ml; Meßreihe 3: $249,5 \pm 87,8$ ml), die Spermatozoenkonzentration (Meßreihe 2: $0,1307 \pm 0,0498 \times 10^9$ /ml; Meßreihe 3: $0,1196 \pm 0,0480 \times 10^9$ /ml) sowie durch den Anteil pathologischer Formen (Meßreihe 2: $21,5 \pm 12,8$ %; Meßreihe 3: $19,1 \pm 12,6$ %) und persistierender Plasmotropfen (Meßreihe 2: $16,0 \pm 10,3$ %; Meßreihe 3: $13,3 \pm 8,9$ %), zeigen unmittelbar nach der Samenentnahme mit ihren Modalwerten der Spermatozoenvolumina eine deutliche Zunahme im hypotonen Meßmedium (Meßreihe 2: $33,7 \pm 4,7$ fl; Meßreihe 3: $28,9 \pm 7,1$ fl) gegenüber ihren Werten im isotonen Medium (Meßreihe 2: $18,3 \pm 6,2$ fl; Meßreihe 3: $13,8 \pm 5,2$ fl).
3. Nachdem die Spermatozoen 3 bis 4 Stunden im Nativejakulat gelagert wurden, ist bereits eine osmotische Volumenregulation zur Erreichung einer Balance des osmotischen Druckes zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Medium eingetreten, so daß sich deutlich höhere Modalwerte der Spermatozoenvolumina unter isotonen Bedingungen ergeben ($26,1 \pm 4,7$ fl) gegenüber Samenproben, die ebenfalls unter isotonen Bedingungen unmittelbar nach der Samenentnahme gemessen wurden (Meßreihe 2: $18,3 \pm 6,2$ fl; Meßreihe 3: $13,8 \pm 5,2$ fl).
4. Spermatozoen verlieren nach einer Lagerung von 3 bis 4 Stunden im Nativejakulat ihre Fähigkeit der volumetrischen Zunahme im hypotonen Meßmedium ($25,9 \pm 3,4$ fl). Spermien, die unter isotonen Bedingungen unterhalb des Mittelwertes von $26,1 \pm 4,7$ fl liegen, zeigen noch eine Fähigkeit des Expandierens.
5. Die osmotische Volumenveränderung der Spermatozoen tritt nach einer Anpassung an das umgebende Medium (Zeit der Äquilibration) ein. Die Modalwerte der Spermatozoenvolumina nehmen in der Zeit zwischen den Messungen zu, die jeweils nach 1 Minute (Meßreihe 2: $13,7 \pm 4,8$ fl unter isotonen Bedingungen; $32,1 \pm 4,5$ fl unter hypotonen Bedingungen; Meßreihe 3: $12,2 \pm 4,0$ fl unter isotonen Bedingungen; $28,0 \pm 7,1$ fl unter hypotonen Bedingungen) und nach 5 Minuten (Meßreihe 2: $18,3 \pm 6,2$ fl unter isotonen Bedingungen; $33,7 \pm 4,7$ fl unter hypotonen Bedingungen; Meßreihe 3: $13,8 \pm 5,2$ fl unter isotonen Bedingungen; $28,9 \pm 7,1$ fl unter hypotonen Bedingungen) vorgenommen worden sind. Der osmotisch bedingte Wasserinflux in die Spermatozoen ist somit zeitabhängig.

6. Die relative hypoosmotische Spermatozoenschwellrate der Modalwerte (i), ausgedrückt durch den Quotienten der Modalwerte der Spermatozoenvolumina unter hypotonen Bedingungen geteilt durch die Modalwerte unter isotonen Bedingungen, ist größer (Meßreihe 2: $2,22 \pm 1,28$; Meßreihe 3: $2,37 \pm 1,08$) als die relative hypoosmotische Spermatozoenschwellrate der Gesamtspermatozoenfraktion (q) (Meßreihe 2: $1,27 \pm 0,11$; Meßreihe 3: $1,24 \pm 0,14$), in der die Spermatozoen nicht berücksichtigt werden, die aufgrund mangelnder Spermatozoenplasmaintegrität die Fähigkeit der Expansion verloren haben.
7. Signifikante Korrelationen zwischen dem Quotienten der Modalwerte der Spermatozoenvolumina unter hypotonen und isotonen Bedingungen und den Standardspermaparametern wie Motilität (Meßreihe 2: 0,21, $p < 0,01$; Meßreihe 3: 0,12, $p > 0,05$), Ejakulatvolumen (Meßreihe 2: 0,21, $p < 0,01$; Meßreihe 3: 0,13, $p > 0,05$), Spermatozoenkonzentration (im Photometer gemessen: Meßreihe 2: -0,03, $p > 0,05$; Meßreihe 3: -0,19, $p < 0,01$; im CASY gemessen: Meßreihe 2: -0,05, $p > 0,05$; Meßreihe 3: -0,23, $p < 0,01$) sowie pathologischen Formen (Meßreihe 2: -0,11, $p > 0,05$; Meßreihe 3: -0,13, $p > 0,05$) und anhaftenden Plasmatrophen (Meßreihe 2: -0,06, $p > 0,05$; Meßreihe 3: -0,15, $p < 0,05$) konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.
8. Eine enge Korrelation zu dem Quotienten der Modalwerte der Spermatozoenvolumina unter hypotonen und isotonen Bedingungen weist die 60-90 Tage Non-Return-Rate für Ejakulate auf, die sich in der Meßreihe 2 als signifikant darstellte (0,41, $p < 0,05$; $n = 31$ Ejakulate), während die Korrelation in der Meßreihe 3 keine Signifikanz zeigte (0,36, $p > 0,05$; $n = 13$ Ejakulate). Die zur Insemination gelangten Ejakulate waren aufgrund ihrer Standardspermaparameter (Ejakulatvolumen, Spermatozoenkonzentration und Motilität) selektiert worden.
9. Es existieren zwei verschiedene Spermatozoenpopulationen hinsichtlich der graphischen Darstellung der Volumenverteilung. Sie unterscheiden sich in ihrer Ein- bzw. Zweigipfligkeit. Die in allen 3 Meßreihen volumetrisch gemessenen Eber ($n = 128$) zeigen zu 23 % eine für sie charakteristische Gipfelzugehörigkeit (9 % sind eingipflig, während 14 % sich zweigipflig darstellen).

10. Der hypoosmotische Test, der anhand elektronischer Volumenmessung durchgeführt wurde, stellt einen zusätzlichen Qualitätsparameter zur Auswahl des Spermias für den Einsatz in der artifiziiellen Insemination dar, d.h. die Plasmamembranintegrität, die durch die osmotische Belastung der Spermatozoen überprüft wird, ist somit ein weiterer Indikator neben den bisher erfaßten Standardspermaparametern (Ejakulatvolumen, Spermatozoenkonzentration, Motilität sowie pathologische Formen) für die Befruchtungsfähigkeit eines Ejakulates.

Ruth Wellmann:

Measurements on volumetric distributions of boar sperm cells under isotonic and hypotonic conditions by means of a computer-controlled cell analysis system during work routine at an insemination station of boars

7. SUMMARY

By means of a biotechnical procedure the volumetric behaviour of boar sperm cells under isotonic and hypotonic conditions was evaluated using a computer-controlled analysis system (CASY[®]1, Model TTC) based on the principle of electrical resistance measurement.

The applicability of this test was examined with 233 boars of an insemination station. The ejaculates were examined in different seasons on the basis of 3 series of measurements (May/June, August/September, November/December). During series of measurements 2 (n = 200) and 3 (n = 184) semen samples were examined immediately after collecting, whereas the ejaculates of the series of measurements 1 (n = 182) were analysed after a storage period of 3 to 4 hours of the nondiluted semen.

A total of 128 boars were evaluated in all three measurement series.

The relationship between fertility and the osmotic resistance of the spermatozoa was determined by comparing the 60-90 days non-return-rate of the ejaculates to the volumetric reaction of the spermatozoa under isotonic and hypotonic conditions. Further the relationship between quality features of the semen and the volumetric reaction of the spermatozoa was determined.

The following results were obtained:

1. There was a highly significant correlation between the measurement of the spermatozoal concentration by photometer and the measurement by the computer-controlled analysis system ($r = 0.87$; $p = 0.0001$). Also a highly significant correlation between the measurement of spermatozoal concentration by the Thoma counting chamber and by the computer-controlled analysis system ($r = 0.79$; $p = 0.0001$) was found. Because of the cursor position ($3 \mu\text{m} - 10 \mu\text{m}$) at the computer-controlled measurement, the measuring window must be taken into consideration since it can be assumed that particles below this limit are spermatozoal fragments or dust particles.

2. Spermatozoa of ejaculates with an average good standard sperm parameter expressed by motility (series of measurements 2: $70.8 \pm 11.2\%$; series 3: $70.7 \pm 9.3\%$), volume of the ejaculate (series 2: 197.9 ± 67.5 ml; series 3: 249.5 ± 87.8 ml), spermatozoal concentration (series 2: $0.1307 \pm 0.0498 \times 10^9$ /ml; series 3: $0.1196 \pm 0.0480 \times 10^9$ /ml) as well as the pathological abnormalities (series 2: $211.5 \pm 12.8\%$; series 3: $19.1 \pm 12.6\%$) with the adherent cytoplasmic droplets (series 2: $16.0 \pm 10.3\%$; series 3: $13.3 \pm 8.9\%$) are showing immediately after collecting a significant swelling in hypotonic measuring media (modal values of the sperm volumes: series 2: 33.7 ± 4.7 fl; series 3: 28.9 ± 7.1 fl) compared with their values in isotonic measuring media (series 2: 18.3 ± 6.2 fl; series 3: 13.8 ± 5.2 fl).
3. After storage of the native ejaculate for 3 to 4 hours an osmotic regulation of volume had occurred so that much higher modal values of the sperm volumes under isotonic conditions (26.1 ± 4.7 fl) than under isotonic conditions of sperm measured immediately after collecting were found (series of measurements 2: 18.3 ± 6.2 fl; series 3: 13.8 ± 5.2 fl).
4. After storage of the native ejaculate for 3 to 4 hours spermatozoa loose their ability to swell in hypotonic media (25.9 ± 3.4 fl). Spermatozoa which are below the average of 26.1 ± 4.7 fl under isotonic conditions, still show a certain ability to expand as they have still much higher modal values in hypotonic media.
5. The osmotic reaction of the spermatozoa needs a period of equilibration to adapt to the surrounding medium. The values of the sperm volumes with the highest frequency are increasing during the period between the measurements taken each time after 1 minute (series 2: 13.7 ± 4.8 fl under isotonic conditions; 32.1 ± 4.5 fl under hypotonic conditions; series 3: 12.2 ± 4.0 fl under isotonic conditions; 28.0 ± 7.1 fl under hypotonic conditions) and after 5 minutes (series 2: 18.3 ± 6.2 fl under isotonic conditions; 33.7 ± 4.7 fl under hypotonic conditions; series 3: 13.8 ± 5.2 fl under isotonic conditions; 28.9 ± 7.1 fl under hypotonic conditions). Thus the osmotically water influx into the spermatozoa is time-dependent.

6. The relative hypoosmotic spermatozoal swelling rate of the fraction with the highest frequency (i), expressed by the quotient of the modal values of the sperm volumes under hypotonic conditions and by the modal values under isotonic conditions, is greater (series of measurements 2: 2.22 ± 1.28 ; series 3: 2.37 ± 1.08) than the relative hypoosmotic sperm swelling rate of the total sperm fraction (q) (series 2: 1.27 ± 0.11 ; series 3: 1.24 ± 0.14) where those spermatozoa are not taken into consideration which, in consequence of a defective sperm plasma integrity, have lost their ability to expand.
7. Significant correlations between the quotient of the modal values of the sperm volumes under hypotonic and isotonic conditions and the standard sperm parameters, as motility (series of measurements 2: 0.21, $p < 0.01$; series 3: 0.12, $p > 0.05$), volume of ejaculate (series 2: 0.21, $p < 0.01$; series 3: 0.13, $p > 0.05$), spermatozoal concentration (measured by photometer: series 2: -0.03, $p > 0.05$; series 3: -0.19, $p < 0.01$; measured by CASY: series 2: -0.05, $p > 0.05$; series 3: -0.23, $p < 0.01$) as well as pathological forms (series 2: -0.11, $p > 0.05$; series 3: -0.13, $p > 0.05$) and the adherent cytoplasmic droplets (series 2: -0.06, $p > 0.05$; series 3: -0.15, $p < 0.05$) could not be proved in this study.
8. A high correlation is stated at the 60-90 days non-return-rate for ejaculates with the sperm volume quotient under hypotonic and isotonic conditions which was significant in series 2 of measurements (0.41, $p < 0.05$; $n = 31$ ejaculates), whereas in series 3, it did not show any significance (0.36, $p > 0.05$; $n = 13$ ejaculates).
9. There are two different graphical curves of the volume distribution of spermatozoa. They differ by the single or double peak characteristic. All three measurement series of boar spermatozoa per volume indicate in a magnitude of 23 % a characteristic peak for every boar (9 % are single peak, while 14 % are double peak).
10. The hypoosmotic test carried out in this study by means of the electronic measurement of volume with the computer-controlled cell analysis system is an additional quality parameter for the selection of sperm to be used in artificial insemination; i.e. the integrity of the plasma membrane tested by the osmotic stress on the spermatozoa is, besides the standard sperm parameters collected up to now such as motility, spermatozoal concentration, volume of the ejaculate and pathological forms, a further indicator to make a selection concerning possible fertility.