

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Reaktivität auf Kapazitationstimuli
bei hypotherm konservierten Eberspermatozoen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Alex Bauer

geb. Shevchenko

aus Kijewka/Russland

Hannover 2013

Wissenschaftliche Betreuung: Apl.- Prof. Dr. D.Waberski
Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken
Klinik für kleine Klauentiere

1. Gutachterin: Apl.-Prof. Dr. Dagmar Waberski
2. Gutachter/in: Prof. Dr. Harald Sieme

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2013

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Einfluss der Konservierung auf funktionelle Eigenschaften von Eberspermatozoen.	3
2.1.1	Spermienmotilität	3
2.1.2	Kapazitation in vitro	6
3	Material und Methode	12
3.1	Versuchsdesign	12
3.2	Versuchstiere	13
3.3	Samengewinnung	13
3.4	Samenverarbeitung und –lagerung	14
3.5	Spermatologische Parameter	14
3.5.1	Computer-assistierte Spermienanalyse	14
3.5.1.1	Gerät und Software	14
3.5.1.2	Probenaufbereitung und Messung	16
3.5.2	Membranintegrität	17
3.5.2.1	Gerät	17
3.5.2.2	Farbstoffe	17
3.5.2.3	Geräteeinstellung und Fremdpartikelkorrektur	17
3.5.2.4	Messung und Auswertung.....	19
3.5.3	Calciuminflux.....	19
3.5.3.1	Farbstoffe	20
3.5.3.2	Medien und Messzeitpunkte	20
3.5.3.3	Messung und Auswertung.....	21
3.5.3.4	Berechnung der Reaktivitätsparameter	22
3.6	Statistik	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Experiment 1	24
4.1.1	CASA-Motilitätsparameter.....	24
4.1.2	Membranintegrität	26
4.1.3	Calciuminflux.....	27

4.1.3.1	Kurvenverläufe der kinetischen Populationsveränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer	27
4.1.3.2	Allgemeine Reaktivität der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulationen in Abhängigkeit von der Lagerungs- temperatur, -dauer und vom Inkubationsmedium.....	35
4.1.3.3	Spezifische Reaktivität der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulationen auf Bikarbonat und Calcium in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer	36
4.1.4	Varianzkomponenten	38
4.1.4.1	CASA-Motilitätsparameter und Membranintegrität	38
4.1.4.2	Reaktivitätsparameter	40
4.2	Experiment 2	43
4.2.1	CASA-Motilitätsparameter.....	43
4.2.2	Morphologie	44
4.2.3	Allgemeine und spezifische Reaktivität auf Bikarbonat und Calcium in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.....	44
4.2.4	Korrelationen zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat und anderen spermatologischen Parametern	46
5	Diskussion	50
6	Zusammenfassung	57
7	Summary	59
8	Literaturverzeichnis.....	61
9	Anhang	77
9.1	Tabellen	77
9.2	Chemikalien	91
9.3	Zusammensetzung der Tyrode-basierten Medien	92
9.4	Geräte und Verbrauchsmaterial	93
10	Abbildungsverzeichnis	95
11	Tabellenverzeichnis.....	97

Abkürzungsverzeichnis

ALH	gemittelte maximale seitliche Kopfauslenkung von der mittleren Bahn (amplitude of lateral head-displacement)
AOC	durchschnittlicher Richtungswechsel des Spermienkopfes (average orientation change)
ATP	Adenosintriphosphat
BCF	Frequenz des Kreuzens des gewundenen Bewegungspfadens mit der gemittelten Bewegungsbahn (beat cross frequency)
BTS	Beltsville Thawing Solution
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches (cyclic) Adenosin-3',5'-monophosphat
CASA	computer-assistierte Spermienanalyse
DAP	Länge der gemittelten Bahn (distance average path)
DCL	Länge der gewundenen Bahn (distance curvilinear)
Dist_PT	Spermien mit distalem Plasmotropfen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxy ribonucleic acid)
DSL	Länge der direkten Strecke (distance straight-line)
EGTA	Ethylenglycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	et alii
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL 1-3	Filter Nummer 1 bis 3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Erdbeschleunigung (gravitational acceleration)
h	Stunde (hour)
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung (hepes buffered saline)
Hz	Hertz
kDA	Kilo Dalton
LIN	linearity

ml	Milliliter
M	Mol
MAS	morphologisch abweichende Spermien
MAX	Maximum
Memb. Int.	Membranintakte Spermien
min	Minute
MIN	Minimum
Mot. Ges.	Gesamtmotilität
Mot. Prog.	Anteil progressiv motiler Spermien
Mrd.	Milliarde/Milliarden
MW	Mittelwert
n	Probandenzahl
nm	nanometer
neg.	negativ
P	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PI	Propidiumjodid (propidium iodide)
PKA	Proteinkinase A
PNA	peanut agglutin, Lektin der Erdnuss (arachis hypogea)
pos.	positiv
Prox_PT	Spermien mit proximalem Plasmotropfen
PT	Plasmotropfen
s	Sekunde
s.	siehe
sAC	lösliche Adenylatzyklase (soluble adenylyl cyclase)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sog.	so genannt
SSC	Seitwärtstreulicht (side scatter)
STR	straightness
Tyr	Tyrode (oder auf Tyrode basierte Medien)
u.	und
u. a.	unter anderem

VAP	Geschwindigkeit auf der gemittelten Bahn (velocity average path)
VCL	Geschwindigkeit auf der gewundenen Bahn (velocity curvilinear)
VK	Varianzkomponentenschätzung
VSL	Geschwindigkeit auf der direkten Strecke (velocity straight-line)
WOB	wobble
z. B.	zum Beispiel
ZDS	Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion

1 Einleitung

Eberspermatozoen werden auf Grund ihrer ausgeprägten Kälteschocksensibilität bei vergleichsweise hohen Temperaturen (zwischen 15 und 20°C) konserviert. Unter diesen Bedingungen ist Ebersperma für ca. drei Tage haltbar. Niedrigere Lagerungstemperaturen sind wünschenswert, da das Keimwachstum minimiert und die Transportlogistik erleichtert würden. Gleichzeitig wird eine Verlängerung der Lagerungsdauer angestrebt. Verfahren zur Erprobung neuer Konservierungsstrategien benötigen sensitive Testsysteme, die eine Einschätzung befruchtungsrelevanter Spermieigenschaften zulässt. Die klassischen standardspermatologischen Parameter Motilität und Morphologie sind dazu nicht ausreichend (WABERSKI et al., 2011). Basierend auf Grundlagenarbeiten von HARRISON et al. (1993) und PETRUNKINA et al. (2005) wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe dieses Labors ein Assay entwickelt, der einen deutlichen Zusammenhang zwischen Spermienfunktion und in vitro-Lagerungsbedingungen aufzeigt (HENNING et al., 2012, SCHMID et al. 2013a). Dabei wird die Reaktivität der Spermien auf Kapazitationsstimuli mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes ermittelt. Die Fähigkeit von Säugetierspermien zur Kapazitation, d. h. zur Reifung im weiblichen Genitaltrakt, ist ein entscheidender Faktor für den Befruchtungserfolg. Der Assay erwies sich als sensitiv genug, um Einflüsse von Lagerungsdauer, -temperatur und Konservierungsmedium zu detektieren (HENNING et al. 2012, SCHMID et al, 2013 a,b,). Neben diesen Faktoren wird der Konservierungserfolg im Niedrigtemperaturbereich entscheidend durch die eberindividuelle Eignung beeinflusst. Daher wird die Selektion von Ebern hinsichtlich deren Fähigkeit zur Konservierbarkeit der Spermien bei Temperaturen unterhalb von 15°C und zur Langzeitlagerung diskutiert. Bislang ist es unklar, ob der neue Assay das Potenzial hat, solche Eber zu identifizieren. Dazu müsste er sensitiv Unterschiede bei nach Standardkriterien normospermen Ebern aufzeigen können. Voraussetzung für eine Anwendbarkeit in der Praxis ist darüber hinaus, dass der Reaktivitätsparameter eberspezifisch ist. Es war daher das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Reaktivität auf Kapazitationsstimuli einen Parameter darstellt, der eberindividuelle Unterschiede in der Lagerungsfähigkeit von Spermien unter

hypothermen Bedingungen zeigt. Darüber hinaus wurden in einem zweiten Versuchsteil Besamungsportionen verschiedener Eberstationen mit dem Reaktivitätsassay untersucht und die Ergebnisse in Beziehung zu standardspermatologischen Merkmalen gesetzt.

2 Literaturübersicht

2.1 Einfluss der Konservierung auf funktionelle Eigenschaften von Eberspermatozoen

Die Abnahme der Befruchtungsfähigkeit konservierter Eberspermien während der Lagerung wird allgemein als Folge eines in vitro ablaufenden physiologischen Alterungsprozesses betrachtet (WEITZE 1991; JOHNSON et al. 2000).

2.1.1 Spermienmotilität

Da die Motilität (MOT) der Spermien als Indikator für einen intakten Metabolismus angesehen wird, kommt ihr eine besondere Bedeutung bei der Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit zu (JOHNSON et al. 2000). VAN DUJN jr. (1971) bestimmte die potentielle Befruchtungsfähigkeit eines männlichen Tieres nach folgenden primären Sameneigenschaften:

1. Gesamtzahl der ejakulierten Spermatozoen
2. mittlere Geschwindigkeit normal beweglicher Spermatozoen
3. Anteil strukturell und funktionell normaler Spermatozoen
4. Geschwindigkeit, mit der die Spermatozoen altern

SAACKE (1970) nennt zwei essentielle Eigenschaften des Spermiums: die Fähigkeit der Vorwärtsbewegung und die Fähigkeit zur Penetration der Zona pellucida der Eizelle. Wenn eine dieser Fähigkeiten gestört ist, ist das Spermium nicht mehr fruchtbar.

Das Ergebnis der subjektiven Motilitätsschätzung von Spermien ist abhängig von verschiedenen Faktoren: Der Temperatur des Auffanggefäßes, einer Verunreinigung des Ejakulates mit Bulbourethraldrüsensekret, Schmutz, Blut oder Wasser, der Qualität des Verdünners und der Erfahrung des Untersuchers (HURTGEN 1984, DIRKSEN 1991).

Mit zunehmender Lagerungsdauer nimmt die Motilität ab (PAULENZ et al. 2000; KOMMISRUUD et al. 2002; VYT et al. 2004; HENNING et al. 2012). Ein Minimum von 60 bis 70 % motilen Spermien wird als Voraussetzung für einen bedenkenlosen

Einsatz in der künstlichen Besamung gesehen (ALTHOUSE et al. 1998; JOHNSON et al. 2000; VYT et al. 2004). Während einige Autoren berichten, dass dieser Wert in BTS-verdünnten Ejakulaten teilweise schon nach kurzer Zeit unterschritten wird (VYT et al. 2004; PAULENZ et al. 2000; WATERHOUSE et al. 2004), attestierten WABERSKI et al. (1994) auch nach 120 h Lagerung noch eine geschätzte Motilität von > 60 %. Bei HENNING et al. (2012) wurde dieser Wert erst nach 168 h unterschritten; nach 120 h lag die Motilität bei rund 80 %. Als Ursachen für die sinkende Motilität werden die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (GUTHRIE et al. 2008; KUMARESAN et al. 2009), steigende pH-Werte im Verdünnermedium (VYT et al. 2004) oder ein Besatz mit Bakterien infolge suboptimaler Verarbeitungsbedingungen (ALTHOUSE et al. 2000) diskutiert. VYT et al. (2004) fanden in allen getesteten Verdünnermedien Anstiege im pH-Wert zwischen 0,49 und 0,75 Einheiten während einer Lagerung über sieben Tage, wobei sie den höchsten Anstieg in den ersten 48 h registrierten. Die Autoren vermuten, dass die Erhöhung der Werte initial zu einer Aktivierung der Motilität führt, allerdings eine verkürzte Lebensdauer der Spermien nach sich zieht. PAULENZ et al. (2000) sahen dagegen bei Lagerung über 96 h in BTS insgesamt nur einen pH-Anstieg um 0,04 Einheiten. Unter mangelhaften Verarbeitungsbedingungen kann auch ein Besatz mit Bakterien zu einer deutlichen Reduktion der Motilität und Membranintegrität führen.

Neben der subjektiven Motilitätsschätzung werden auch Computerassistierte-Spermienanalyse-Systeme (CASA) zur Erfassung quantitativer und qualitativer Veränderungen in der Motilität eingesetzt (DUBE et al. 2004; DE AMBROGI et al. 2006a; ESTIENNE et al. 2007; YESTE et al. 2008). Sie ermöglichen eine standardisierte und objektive Erfassung einer Vielzahl kinetischer Parameter einschließlich Geschwindigkeit, Geißelschlagfrequenz und lateraler Kopfauslenkung der Spermien. Während in der Studie von ESTIENNE et al. (2007) die Mittelwerte der Geschwindigkeitsparameter der Spermien durch eine Lagerung über sieben Tage beeinflusst waren, war dies in Untersuchungen von DE AMBROGI et al. (2006a) über einen Versuchszeitraum von 96 h nicht der Fall. In beiden Studien konnte kein Einfluss der Lagerung auf weitere Parameter der Spermienbewegung festgestellt werden. VAZQUEZ et al. (1998) verzeichneten dagegen nach 96 h Lagerungsdauer

eine abnehmende Gesamtmotilität der Spermien und gleichzeitig sinkende Geschwindigkeitsparameter im Vergleich zu Messungen nach 48 h Lagerungsdauer. Auch HOLT (1996) beurteilte neben dem Prozentsatz der beweglichen Spermien die Qualität der Bewegung. Der Autor zeigte, dass die computergestützte Auswertung der Spermienmotilität nicht nur Informationen über die Fertilität des Individuums, sondern auch über die Viabilität der Spermien nach Tiefgefrierkonservierung oder Flüssigkonservierung erbringt. In einer Clusteranalyse von CASA-Daten entdeckten HOLT et al. (1997) eine signifikante Beziehung zwischen der Trächtigkeitsrate von Sauen und der Veränderung der Motilität von Eberspermien, welche zwei Stunden in einem Kapazitationsmedium inkubiert worden waren. Die Autoren schlussfolgern, dass das beste Regressionsmodell zur Untersuchung der Beziehung zwischen CASA-Daten und Fertilität bis zu 20 % der Variabilität von Abferkelrate und Wurfgröße zu erklären vermag. Die verbleibenden 80 % der Variationen haben ihre Ursache in anderen Faktoren der Samenqualität, insbesondere in der weiblichen Fertilität und dem Besamungsmanagement (Brunsterkennung und Terminierung der Insemination). Auch FLOWERS (1997) fand eine statistisch nachweisbare Beziehung der Motilität und In-vitro- sowie In-vivo-Befruchtungsparemtern. Diese offenbarte sich jedoch erst ab einer unteren Motilitätsgrenze von 60 %, also in einem Bereich, der unter der Norm für normal befruchtungskompetente Ejakulate liegt; in dem für die Besamungspraxis interessanten Bereich zwischen 70 % und 90 % motiler Spermien ließ sich dagegen kein unmittelbarer Bezug zur Fertilität ermitteln. Das Auftreten individueller Eberffekte innerhalb der Motilitätsgruppen wies darauf hin, dass neben der Vorwärtsbeweglichkeit weitere Faktoren zur Befruchtungskompetenz der Eberspermien beitragen.

TARDIF et al. (1999) beurteilten neben der Motilität auch die Viabilität und den ATP-Gehalt der Spermien vor und nach einem Thermoresistenztest (+42,5 °C, 45 Minuten). Anschließend wurden Besamungen mit je zwei Samendosen von 3×10^9 – als optimale- oder $0,3 \times 10^9$ beweglichen Zellen – als suboptimale Spermienzahl pro Besamung- in 70 ml durchgeführt. Bei den Tieren, bei denen optimale Besamungsportionen eingesetzt wurden, ergab sich keine Wechselbeziehung zwischen der Fertilitätsrate und den in vitro gemessenen Parametern. Wurden jedoch suboptimale, niedrig konzentrierte Samendosen eingesetzt, bestand eine

signifikante Wechselbeziehung zwischen der Fertilitätsrate und der Spermienmotilität vor dem Thermalstress ($r = 0,78$, $p = 0,01$). Die Autoren schlussfolgern, dass die Spermienmotilität ein brauchbarer Indikator für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien in vivo ist, wenn im unteren Bereich der optimalen Spermienzahl pro Besamungsdosis gearbeitet wird.

Auch die Tiefgefrierung reduziert die Qualität konservierter Eberspermien maßgeblich. HUANG et al. (1999) vermuteten, dass dies auf eine Veränderung intrazellulärer Proteine zurückzuführen sei. Im Vergleich mit frischem Samen (vor dem Abkühlen), war der Gehalt des Proteins HSP90 (90 kDa-Hitzeschockprotein) nach dem Auftauen in den Spermien um 64 % reduziert. Die Untersuchung des Zeitverlaufs zeigte, dass die HSP90-Abnahme der Spermien während der Abkühlung auf +5 °C geschah; dagegen waren die Motilität und der Anteil morphologisch intakter Spermien nach diesen Verarbeitungsschritten nicht signifikant reduziert. Nach dem Auftauen waren beide Parameter deutlich reduziert, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass die HSP90-Abnahme der Abnahme der mikroskopisch feststellbaren Spermieigenschaften vorangeht. Die Zeit zwischen einer HSP90-Abnahme und der Reduktion des Anteils motiler Spermien wurde auf 2 bis 3 Stunden bestimmt (Huang et al. (1999).

Unterschiedliche Haltetemperaturen beeinflussen die Motilität des flüssigkonservierten Eberspermas (PAULENZ et al. 1998; 2000). Die optimale Konservierungstemperatur für mit BTS verdünnten Ebersamen lag bei +20°C, während bei Konservierungstemperaturen von +25°C, +15°C oder +10°C die Motilität der Eberspermien reduziert war.

2.1.2 Kapazitation in vitro

Bevor frisch ejakulierte Spermatozoen eine Eizelle befruchten können, müssen sie eine Reihe physiologischer Umbauprozesse durchlaufen, die unter dem Begriff Kapazitation zusammengefasst werden (YANAGIMACHI 1994). Kapazitierte Spermien zeichnen sich durch eine veränderte Architektur und Permeabilität der Plasmamembran, eine gesteigerte Motilität und eine erhöhte fusogene Eigenschaften von Plasma- und Akrosommembran aus (HARRISON u. GADELLA 2005).

Bikarbonat gilt als stärkster Promotor der Kapazitation (HARRISON u. GADELLA 2005). Auf welchem Weg das Molekül in die Zelle kommt, ist bislang noch nicht geklärt; es werden jedoch die Beteiligung eines $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporters (DEMARCO et al. 2003) oder die Diffusion von CO_2 über die Plasmamembran (FLESH u. GADELLA 2000) in diesem Zusammenhang diskutiert. Im Spermium wird durch Bikarbonat eine lösliche Adenylatcyclase (sAC) aktiviert (LITVIN et al. 2003, HARRISON u. GADELLA 2005), wodurch der Gehalt an cyclischem Adenosin 3',5'-monophosphat (cAMP) ansteigt. Dadurch wird wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche zu einer Phosphorylierung von Proteinen führt (GADELLA u. HARRISON 2002, OKAMURA et al. 1985, VISCONTI et al. 1998). Letztere wirken als Initiatoren verschiedenster Signalkaskaden (HARRISON u. MILLER 2000, HARRISON 2004). Der Anstieg an cAMP und die PKA-abhängige Proteinphosphorylierung beginnen bereits wenige Sekunden nach Kontakt mit Bikarbonat. Nach dem initialen Anstieg sinkt der cAMP-Level jedoch zunächst wieder, um nach einigen Minuten erneut langsam anzusteigen. Auch die Proteinphosphorylierung folgt einem ähnlichen kinetischen Verlauf, wenn auch zeitversetzt (HARRISON u. GADELLA 2005). Als Grund für den vorübergehenden Abfall der cAMP-Konzentration werden Rückkopplungsmechanismen diskutiert, wobei die PKA durch Phosphorylierung einer Phosphodiesterase deren Aktivität steigert, so dass mehr cAMP abgebaut wird (MEHATS et al. 2002). Die gleichzeitige Phosphorylierung der Adenylatcyclase vermindert wiederum die Aktivität der Phosphodiesterase (HANOUNE et al. 2001) und der cAMP-Gehalt steigt wieder. Über den sAC/cAMP/PKA Signalübertragungsweg bewirkt Bikarbonat auch Veränderungen in der Lipidarchitektur der Plasmamembran (GADELLA u. HARRISON 2000). Während der Kapazitation kommt es zum Zusammenbruch der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide in der Lipiddoppelschicht, vor allem durch eine gesteigerte Exposition von Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) im äußeren Blatt der Zellmembran (GADELLA u. HARRISON 2002). Als Ursache für diesen als „phospholipid scrambling“ bezeichneten Vorgang wird gemeinhin eine Aktivierung der Scramblase angenommen; dieses Protein ist für die Translokation von Phospholipiden zwischen

den Lipiddoppelschichten von Zellmembranen verantwortlich (GADELLA u. HARRISON 2000).

Eine direkte Folge der Bikarbonat-induzierten Umverteilung der Phospholipide ist ein Efflux von Cholesterol aus der Spermienmembran (GADELLA u. HARRISON 2002, FLESH et al. 2001). Dieser findet in zwei Phasen statt. Zunächst kommt es zu einer Cholesterolkonzentration im Bereich der apikalen Kopfmembran, im zweiten Schritt wird das Cholesterol in Anwesenheit von Akzeptoren -wie Albumin- aus der Membran ausgeschleust (HARRISON u. GADELLA 2005, VAN GESTEL et al. 2005). Infolge des Cholesteroleffluxes nimmt die Membranfluidität zu, was eine Aggregation von sog. „lipid rafts“ im Bereich der apikalen Plasmamembran, dem Bereich der initialen Erkennung und Bindung an die Zona pellucida der Eizelle (VAN GESTEL et al. 2005, CROSS 2004), bewirkt. Lipid rafts sind funktionelle Mikrodomänen der Spermienmembran, die neben Cholesterol, Glykosphingolipiden und Sphingomyelin auch Proteine wie Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine, Calveolin und Flotillin enthalten (VADNAIS et al. 2007). Darüberhinaus reichern sich im Zuge der Kapazitation diverse Zona-bindende Proteine in den lipid rafts an (VAN GESTEL et al. 2005, 2007). Wie unlängst gezeigt wurde, kommt es ebenfalls zu einer Umverteilung von an der Akrosomreaktion beteiligten SNARE-Proteinen (MAYORGA et al. 2007, TOMES 2007) im Bereich der raft-Aggregation (TSAI et al. 2007, 2010).

Weiterhin wird vermutet, dass Phospholipidumverteilung und Cholesterolefflux im Rahmen der Umorganisation und -verteilung der lipid rafts, die Bindungsstärke diverser protektiver Membranproteine herabsetzen. Dabei kommt es zum Verlust von Dekapazitationsfaktoren, was an der Plasmamembran eine erhöhte Fusionsbereitschaft auslöst und zur Freilegung von Rezeptorproteinen führt, die an der Zonaerkennung und -bindung sowie der Akrosomreaktion beteiligt sind (HARRISON und GADELLA 2005).

In diesem Zusammenhang ist auch ein spermienpezifisches Glycolipid, das Seminolipid, zu erwähnen. Bei unkapazitierten Spermien befindet es sich im äußeren Blatt der apikalen Plasmamembran (VOS et al. 1994) zur Stabilisierung, um dadurch eine Akrosomreaktion in Gegenwart niedriger Bikarbonatkonzentrationen zu verhindern (GADELLA et al. 1995). Unter dem Einfluss von Bikarbonat wandert es jedoch aus diesem Bereich in die Äquatorialregion des Spermienkopfes (GADELLA

et al. 1994, 1995) und ein Zusammenspiel aus der verminderten protektiven Wirkung im apikalen Bereich mit lokalen Destabilisierungsprozessen führt zu einer erhöhten Fusionsbereitschaft (GADELLA et al. 1995).

Eine weitere mögliche Folge der veränderten Lipidarchitektur der Spermienmembran und des Cholesterolefflux' ist eine Änderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen, entweder durch Leckströme über die permeabler werdende Membran oder durch die Aktivierung spezifischer Ionenkanäle (HARRISON u. GADELLA 2005, LITVIN et al. 2003). Die Ionenkonzentration steht in engem Zusammenhang mit dem Plasmamembranpotential, welches wiederum die Aktivität von spannungs-abhängigen Ionenkanälen beeinflussen kann (VISCONTI et al. 2002). So wird ein Anstieg des intrazellulären Calciumgehaltes u. a. auf eine Aktivierung niedrigspannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle durch eine Hyperpolarisation der Plasmamembran zurückgeführt (VISCONTI et al. 2002, ARNOULT et al. 1999). Darüber hinaus werden jedoch auch die Inaktivierung der Ca^{2+} -ATPase, die Calcium aktiv aus den Zellen transportiert, sowie die Beteiligung der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe ursächlich diskutiert (FLORMAN et al. 1992, JAGANNATHAN et al. 2002).

Ein weiteres spätes Ereignis im Rahmen der Kapazitation ist die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen, welche durch die Aktivierung von Tyrosinkinase zu Stande kommt (VISCONTI et al. 1999a, b, FICARRO et al. 2003) und an einer Reihe von Proteinen beobachtet werden kann. Im Gegensatz zur Umorganisation von Lipiden sind diese Veränderungen im Bereich des Spermischwanzes am deutlichsten (CARR et al. 2001, FICARRO et al. 2003, DE VRIES et al. 2003). In diesem Zusammenhang wird eine Phosphorylierung von Scheidenproteinen vermutet (GADELLA u. VAN GESTEL 2004), die bekanntermaßen an der Induktion der Hypermotilität beteiligt ist (TURNER et al. 1999).

Für den Ablauf der Kapazitation bestehen innerhalb der Spezies Schwein inter- und intraindividuelle Unterschiede hinsichtlich des Anteils an Spermien, welche die beschriebenen Veränderungen durchführen können (HARRISON u. GADELLA 2005, HARRISON et al. 1996, HOLT u. HARRISON 2002, GADELLA u. HARRISON 2002, FLESCHE et al. 2001). Selbst innerhalb eines Ejakulates reagiert nur ein Teil der Spermien auf Kontakt mit Bikarbonat, eine andere Population des Ejakulates zeigt

auch nach verlängerter Inkubation geringe oder keine Antwort (HARRISON u. GADELLA 2005). Ein Zusammenhang mit dem Auftreten unreifer Spermatozoen, also Spermien mit Plasmatropfen, ist bereits nachgewiesen (FLESCH et al. 2001), jedoch werden auch Unterschiede im intrazellulären Gehalt der Komponenten des Signalübertragungsweges (sAC, Phosphodiesterasen) aufgrund variierender Expression von Genen diskutiert (HARRISON u. GADELLA 2005, HERRMANN et al. 1999).

Die Kapazitation *in vitro* findet während der Inkubation bei Körpertemperatur in speziell konzipierten Medien statt. Diese enthalten u.a. Bikarbonat, welches bei Eberspermien als essentieller Promotor der Kapazitation identifiziert wurde. Auch Calcium, Albumin (als Cholesterolakzeptor) und Energielieferanten wie Glukose, Laktat und Pyruvat wirken als Promotoren (HARRISON et al. 1996, WATSON u. GREEN 2000, VISCONTI u. KOPF 1998, VADNAIS et al. 2007). Zunächst werden eine Reihe von aus Nebenhodenschwanz und Seminalplasma stammende Proteine, sog. Dekapazitationsfaktoren (SUZUKI et al. 2002), von der Spermienoberfläche entfernt, was *in vitro* durch Wasch- und Zentrifugationsschritte oder durch Dichtegradientenzentrifugation -z. B. Percoll- (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2007, ASHWORTH et al. 1995, FLESCH u. GADELLA 2000) simuliert werden kann. Bereits nach wenigen Sekunden im Kapazitationsmedium kann ein Anstieg an cAMP nachgewiesen werden, der nach etwa 60 s ein Maximum erreicht (HARRISON u. MILLER 2000). Die Proteinphosphorylierung ist bereits nach etwa 90 s erstmals mittels eines Antikörpers detektierbar und folgt einer ähnlichen Kinetik wie der Anstieg des cAMP (HARRISON 2004). Eine Umverteilung der Phospholipide ist bereits nach 2 Minuten Inkubation mittels des lipophilen Farbstoffs Merocyanin 540 (M540) nachweisbar, nach 5-minütiger Inkubation wird das Maximum M540-positiver Spermien erreicht. Alternativ sind auch die infolge der Phospholipidumordnung im äußeren Blatt der Zellmembran exponierten Phospholipide PE (durch Fluorescein-konjugiertes Streptavidin/biotinyliertes Ro09-0198) und PS (mittels Fluorescein-konjugiertem Annexin V) direkt anfärbbar (GADELLA u. HARRISON 2002). Die Detektion von PE erreicht nach 20 Minuten ein Maximum, während dies bei PS deutlich länger dauert, wobei als Ursache ein unterschiedlicher Anfärbemechanismus vermutet wird (HARRISON u. GADELLA 2005). Die Färbung mit Fluo-3 wird zur

Darstellung erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentrationen benutzt und kann bereits nach 20-minütiger Inkubation beobachtet werden (HARRISON et al. 1993, HENNING et al. 2012). Die Tyrosinphosphorylierung ist unter Verwendung spezieller Antikörper, Antiphosphotyrosinen, nachweisbar; sie tritt bei Eberspermien jedoch erst nach ca. 60 Minuten auf (HARRISON u. GADELLA 2005). Mittels Filipin können die laterale Reorganisation des Cholesterols innerhalb der Plasmamembran sowie der Cholesterolefflux dargestellt werden. Weiterhin dienen Flotillin und Caveolin als Markerproteine für Lipid rafts; im Laufe einer 2-stündigen Inkubation kann eine Konzentration dieser Proteine im apikalen Bereich der Plasmamembran beobachtet werden, während sie zu Beginn gleichmäßig in der vorderen akrosomalen Region verteilt sind (VAN GESTEL et al. 2005). Auch die Chlortetracyclin-Färbung sowie die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion werden als Marker für eine abgelaufene Kapazitation betrachtet.

3 Material und Methode

3.1 Versuchsdesign

Experiment 1: Eberspezifität der Reaktivität auf Bikarbonat bei flüssig-konservierten Eberspermatozoen

Über einen Untersuchungszeitraum von sechs Wochen wurde wöchentlich je ein Ejakulat von sieben institutseigenen Ebern untersucht (n=42 Ejakulate). Alle Ejakulate wurden mit kommerziell erhältlicher Beltsville Thawing Solution (BTS, Fa. Minitüb, Tiefenbach) verdünnt.

Anschließend wurde jedes Ejakulat in zwei Portionen aufgeteilt und diese jeweils bei 17°C und bei 5°C gelagert. Folgende Untersuchungen wurden am Tag der Verdünnung bei Raumtemperatur und nach 24, 72 und 120 Stunden Lagerung durchgeführt:

- Membranintegrität (Plasma- und Akrosommembran) mittels Durchflusszytometrie.
- Spermienmotilität mittels computergestützter Spermienanalyse (CASA) .
- Kinetik des Calciuminflux mittels Durchflusszytometrie.

Experiment 2: Bezug zwischen der Reaktivität auf Bikarbonat und anderen spermatologischen Parametern bei einer Stichprobe von Eberspermaportionen aus Besamungsstationen

Je sechs mit BTS verdünnte Ejakulate aus 13 Besamungsstationen (n=78 Ejakulate) wurden wie folgt untersucht:

- Membranintegrität (Plasma- und Akrosommembran) mittels Durchflusszytometrie nach 24 h und 96 h.
- Spermienmotilität mittels computergestützter Spermienanalyse (CASA) nach 24 h und 72 h.
- Kinetik des Calciuminflux mittels Durchflusszytometrie, nach 24 h und 96 h.

Alle verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Chemikalien inklusive der Bezugsquellen sowie die Gebrauchslösungen sind ebenfalls im Anhang aufgeführt.

3.2 Versuchstiere

Für Experiment 1 wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen jeweils ein Ejakulat/Woche von sieben klinisch gesunden institutseigenen Ebern im Alter von zwei bis sieben Jahren der Rassen Pietrain und Deutsche Landrasse gewonnen (n=42).

Die Ejakulate (n=78) für Experiment 2 stammten von 78 Ebern der Rasse Pietrain aus 13 verschiedenen Besamungsstationen.

Die Tiere wurden ein- bis zweimal pro Woche zur Samengewinnung herangezogen. Vor Versuchsbeginn waren alle Eber durch spermatologische Untersuchung mehrerer Ejakulate als normosperm im Sinne der Gewächrschaftsbestimmungen des Zentralverbandes der deutschen Schweineproduktion (ZDS) aus dem Jahr 2005 eingestuft worden. Nach diesen Vorgaben lag der Anteil motiler Spermien im nativen Sperma bei mind. 70 % und der Anteil morphologisch abweichender Spermien bei maximal 25 %. Der Transport von den Besamungsstationen in das Labor der Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken erfolgte durch einen Kurierdienst, so dass gewährleistet war, dass die Besamungstuben am Tag nach der Gewinnung im Labor eintrafen. Direkt nach Erhalt des Samens wurde eine Temperaturkontrolle durchgeführt. Das Sperma wurde anschließend bis zur Untersuchung in einem Klimaschrank (Fa. Minitüb, Landshut) bei +17°C gelagert. Es wurde nur Sperma verwendet, das bei Ankunft eine Temperatur von +15°C bis +25°C aufwies.

3.3 Samengewinnung

Die Ejakulate (spermienreiche und –arme Phase ohne Bulbourethraldrüsensekret) wurden am Phantom mittels der sogenannten „Handmethode“ in einen auf +38°C vorgewärmten Samenauffangbecher (Fa. Minitüb, Landshut) aufgefangen, welcher mit einem ebenfalls auf +38°C vorgewärmten Samenauffangbeutel (US Bag™, Fa. Minitüb, Landshut) ausgekleidet war. Das Sperma wurde unmittelbar danach in einer auf ca. +35°C vorgewärmter Styroporkiste ins Labor transportiert.

3.4 Samenverarbeitung und –lagerung

Das Ejakulat aus dem Samenauffangbeutel wurde in einen sterilen, vorgewärmten Glasmesszylinder (500 ml) umgefüllt und bis zur endgültigen Verdünnung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Vom nativen Sperma wurden die standardspermatologischen Parameter Volumen, Farbe, Konsistenz, Konzentration, Spermiengesamtzahl, pH-Wert, Motilität sowie der Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS) bestimmt. Der Prozentsatz motiler Samenzellen wurde an einem Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch (+38°C, Fa. Zeiss, Jena) bei 160-facher Vergrößerung geschätzt. Die Bestimmung der Spermienkonzentration erfolgte nach KRAUSE (1966) mit der Zählkammer „Thoma-neu“. Der pH-Wert wurde mittels eines pH-Meters (Multiplex 3000/pMX, Fa WTW, Weilheim) bestimmt.

Der Anteil morphologisch abweichender Spermien wurde an einer mit 4%-igem Formolcitrat fixierten Probe bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Zeiss, Jena) nach KRAUSE (1966) ermittelt. Dazu wurden jeweils 200 Spermien einer Probe beurteilt. Von jedem Ejakulat wurden vier Besamungsportionen mit je 100 µl Volumen und einer Konzentration von 20×10^6 Spermien / ml in Besamungsflaschen abgefüllt. Nach Entfernung von Restluft und Verschluss wurden die Flaschen für 90 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) belassen. Danach erfolgte eine Umlagerung der Proben in einen auf +17°C temperierten Klimaschrank (Fa. Minitüb, Tiefenbach). 60 Minuten später wurden zwei Besamungsflaschen in einen anderen, auf +10°C eingestellten Klimaschrank verbracht. Nach Ablauf weiterer 60 Minuten wurden die Proben in einen auf +5°C temperierten Klimaschrank umgesetzt. Zur Resuspendierung sedimentierter Spermien wurden die Flaschen täglich vorsichtig geschwenkt. An jedem der beiden Untersuchungstage wurde eine Flasche pro Lagertemperatur neu geöffnet und die entsprechende Probenmenge entnommen.

3.5 Spermatologische Parameter

3.5.1 Computer-assistierte Spermienanalyse

3.5.1.1 Gerät und Software

Für die computergestützte Spermienanalyse (CASA) wurde das SpermVision®-System (Version 3.5, Fa. Minitüb, Tiefenbach) bestehend aus einem Mikroskop

(BX41TF, Fa. Olympus, Hamburg) mit beheizbarem Objektisch und automatisch fahrendem Kreuztisch, verwendet. In das System war eine beheizbare Arbeitsplatte (HT 300, Fa. Minitüb, Tiefenbach) integriert, die gleichzeitig als Steuereinheit für die Heizung des Objektisches diente. Die Darstellung der Spermien erfolgte bei 200-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv 20x) im negativen Phasenkontrast. Mittels eines TV-Adapters (U-PMTVC tv-0,75, Fa. Olympus, Hamburg) war eine Digitalkamera (AccuPIXEL TM6760 CL, Fa. JAI A/S, Glostrup, Dänemark) an das Mikroskop gekoppelt. Die Bilder der Kamera (Auflösung: 800 x 600 Pixel) wurden zur Verarbeitung an einen angeschlossenen Computer weitergeleitet. 30 Einzelbilder pro 0,5 Sekunden wurden in zehn aufeinander folgenden Messpositionen auf der zentralen Längsachse einer Leja-Messkammer mit 20 µm Schichtdicke (SC 20-01-04-B, Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, The Netherlands) aufgenommen und analysiert. Für jede als progressiv motil identifizierte Samenzelle wurden die in Tab. 1 bezeichneten Parameter erhoben.

Tab. 1: Definition der erhobenen CASA-Parameter

Zurückgelegte Wegstrecken [μm]:	
DSL	distance straight-line
DCL	distance curvilinear
DAP	distance average path
Geschwindigkeiten [$\mu\text{m/s}$]:	
VSL	velocity straight-line
VCL	velocity curvilinear
VAP	velocity average path
Gemittelte maximale seitliche Kopfauslenkung von der mittleren Bahn [μm]:	
ALH	amplitude of lateral head-displacement
Frequenz des Kreuzens des gewundenen Bewegungspfades mit der gemittelten Bewegungsbahn (Geißelschlagfrequenz) [Hz]	
BCF	beat cross frequency
Gerichtetheit der Bewegung	
WOB	wobble (VAP / VCL)
STR	straightness (VSL / VAP)
LIN	Linearity (VSL / VCL)
Durchschnittlicher Richtungswechsel des Spermienkopfes	
AOC	average orientation change

Spermien mit AOC < 2,5 wurden als immotil eingestuft. Spermien mit AOC > 2,5 und DSL < 4,5 wurden von der Software als lokal motil klassifiziert. Spermien, die keiner dieser beiden Klassifizierungen angehörten, wurden als progressiv motil eingestuft.

3.5.1.2 Probenaufbereitung und Messung

Arbeitsplatte, Objektisch, Messkammern und Pipettenspitzen (Microman CP10, Gilson, Middleton, U.S.A.) wurden auf +38°C erwärmt. Je 2 ml der verdünnten Samenprobe wurden in ein Reagenzglas überführt und für 15 min im Wasserbad bei +38°C inkubiert. Nach gründlichem Schwenken der Probe wurde ein Aliquot von 2,7 μl entnommen und die Messkammer befüllt. Dabei wurde die Pipettenspitze im

90°-Winkel zum Objektträger positioniert, so dass der Tropfen durch Kapillarkräfte eingesogen wurde. Nach Fokussierung und Einstellung der Lichtintensität wurde der automatisierte Messvorgang gestartet. Das Intervall zwischen Kammerbefüllung und Ende der Messung betrug maximal 60 Sekunden.

3.5.2 Membranintegrität

3.5.2.1 Gerät

Ein Durchflusszytometer der Baureihe „Galaxy“ (Fa. Partec, Münster) wurde verwendet. Dieses ist mit einem Argonionenlaser (488 nm; 20 mW) zur Anregung der Farbstoffe sowie drei verschiedenen Filtern: FL-1 (537,5/22,5 nm) für grünes Fluoreszenzlicht, FL-2 (590/25 nm) für oranges Fluoreszenzlicht und FL-3 (630 nm LP) für rotes Fluoreszenzlicht ausgestattet. Die Steuerung erfolgte über die Software FloMax 2.0 (Fa. Partec, Münster).

3.5.2.2 Farbstoffe

Plasmamembrandefekte Spermien wurden durch rote Anfärbung mit dem zellimpermeablen DNA- und RNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) identifiziert (TAS u. WESTERNENG 1981). Akrosomdefekte Spermien wurden nach grüner Anfärbung mit Peanut Agglutinin, welches an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC-PNA, Axxora GmbH, Lörrach) gekoppelt war, ermittelt (FLESCH et al. 1998).

3.5.2.3 Geräteeinstellung und Fremdpartikelkorrektur

Die Grundeinstellung der Signalverstärkungen aller relevanten Parameter erfolgte zu Beginn eines jeden Versuchsabschnittes wie bei Henning (2009) beschrieben. Sie wurde für die gesamte Versuchsdauer beibehalten. Dabei wurden die Verstärkung der Vorwärtsstreuung (FSC = forward scatter) als Maß für die Partikelgröße und die Seitwärtsstreuung (SSC = side scatter) als Maß für die Komplexität bzw. Granularität der Partikel auf linearen Skalen festgelegt. Dazu wurde eine ungefärbte Probe, d.h. 10 µl verdünntes Sperma mit 890 µl HBS (pH 7,4, 300 mOsmol) verwendet. Es wurde darauf geachtet, im FCS-Histogramm eine glockenförmige Verteilungskurve abzubilden. In einem Punktwolkendiagramm (dotplot) wurden FSC (Abszisse) und

SSC (Ordinate) gegeneinander aufgetragen; die Spermisignale sollten eine „L“-Form oder Dreiecksform abbilden. Anschließend wurde die Verstärkung so reguliert, dass Signale von Schmutzpartikeln und Zelldetritus ausgeschlossen werden konnten. Für die Einstellung des Rotsignals (FL-3-Kanal) und Grünsignals (FL-1-Kanal) wurden je 497,5 µl verdünntes Sperma mit 2,5 µl PI-Stammlösung (500 µg/ml) bzw. 495 µl verdünntes Sperma mit 5 µl FITC-PNA-Stammlösung (300 µg/ml) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 10 µl der gefärbten Probe wurden in 890 µl HBS überführt und gemessen. Während des Messvorgangs wurde die Verstärkung einreguliert, so dass PI- und FITC-PNA-positive Ereignisse eine mindestens um den Faktor 10 erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu PI- bzw. FITC-PNA-negativen Ereignissen aufwiesen.

Die Feineinstellung der Verstärkung wurde über eine Doppelfärbung einer verdünnten Samenprobe wie folgt durchgeführt: 2,5 µl PI-Stammlösung (Endkonzentration: 2,7 µg/ml) und 5 µl FITC-PNA-Stammlösung (Endkonzentration: 3 µg/ml) wurden in 492,5 µl verdünntes Sperma überführt und für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Spermisuspension in 890 µl HBS überführt und analysiert. Die Einstellung der Verstärkungen wurde an jedem Untersuchungstag überprüft und gegebenenfalls erneut angepasst. Das Gerät war für alle Messungen auf den Parameter FSC getriggert. Sämtliche Messungen erfolgten mit einer Flussrate zwischen 400 und 800 Partikeln pro Sekunde. Zwischen den Analysen wurde das Gerät mit Sheathflüssigkeit gespült. Pro Messung wurden 10.000 Ereignisse erfasst.

Zur Korrektur der Fremdpartikel wurde weiterhin in Anlehnung an PETRUNKINA et al. (2010) nach 12 h Lagerungsdauer eine Bestimmung des Fremdpartikelgehaltes in jeder Spermaprobe vorgenommen. Dazu wurden 985 µl destilliertes Wasser mit 5 µl PI-Stammlösung (Endkonzentration: 2,7 µg/ml) und 10 µl verdünntem Sperma gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (Henning, 2009) und mit den genannten Geräteeinstellungen gemessen. Über eine Korrekturformel (PETRUNKINA u. HARRISON 2010) wurden Nicht-DNA-haltige Ereignisse von der Auswertung eliminiert.

3.5.2.4 Messung und Auswertung

Der Anteil plasma- und akrosommembranintakter Spermien wurde wie bei Henning (2009) beschrieben, bestimmt. Dazu wurden 492,5 µl verdünntes Sperma mit 2,5 µl PI-Stammlösung (Endkonzentration: 2,7 µg/ml) und 5 µl FITC-PNA-Stammlösung (Endkonzentration: 3 µg/ml) vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Spermisuspension in 890 µl HBS überführt und analysiert.

Die Auswertung erfolgte nach mathematischer Kompensation sich überlagernder Emissionspektren an Hand des FL-1/FL-3-dotplots. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der Ereignisse in folgenden vier Spermienpopulationen durch Setzen einer vertikalen und einer horizontalen Grenzlinie („gate“) differenziert:

1. = Plasmamembran defekt und Akrosommembran intakt
(PI-positiv/FITC-PNA-negativ)
2. = Plasmamembran defekt und Akrosommembran defekt
(PI-positiv/FITC-PNA-positiv)
3. = Plasmamembran intakt und Akrosommembran intakt
(=membranintakte Spermien; PI- negativ/FITC-PNA-negativ)
4. = Plasmamembran intakt und Akrosommembran defekt
(PI-negativ/FITC-PNA-positiv)

Für den gesamten Versuchszeitraum wurden, soweit möglich, eine einheitliche Kompensation und identische Grenzlinien verwendet.

3.5.3 Calciuminflux

Der intrazelluläre Calciumgehalt wurde zu definierten Zeitpunkten der Inkubation in drei Varianten von Tyrodemedien in Anlehnung an Henning (2009) nach einem vereinfachtem Protokoll gemessen. Es wurde dasselbe Durchflusszytometer wie unter Kap. 3.5.2.1 beschrieben verwendet.

3.5.3.1 Farbstoffe

Der selektiv an Calciumionen bindende Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3/AM (Fa. Alexis, Lausen, Schweiz) wurde genutzt. Nach Komplexbildung des Farbstoffes mit zytosolischen Calciumionen wird bei Anregung mit Laser grünes Fluoreszenzlicht mit dem Emissionmaximum der Wellenlänge 526 nm emittiert. Fluo-3-positive Spermien stellen daher Spermien mit hohem zytosolischen Calcium-Gehalt dar. An derselben Probe erfolgte parallel eine Differenzierung in Spermien mit intakter und defekter Plasmamembran mittels Propidiumjodid (PI). Auf diese Weise ließen sich vier Spermienpopulationen differenzieren:

1. = Plasmamembran defekt und niedriger intrazellulärer Calciumgehalt
(PI-positiv/Fluo-3-negativ)
2. = Plasmamembran defekt und hoher intrazellulärer Calciumgehalt
(PI-positiv/Fluo-3-positiv)
3. = Plasmamembran intakt und niedriger intrazellulärer Calciumgehalt
(PI-negativ/Fluo-3-negativ)
4. = Plasmamembran intakt und hoher intrazellulärer Calciumgehalt
(PI-negativ/ Fluo-3-positiv)

3.5.3.2 Medien und Messzeitpunkte

Das gelagerte Sperma wurde in Anlehnung an die Versuche von Henning (2009) vor Beladung mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen in drei verschiedenen Medien inkubiert:

1. Tyr_{BikCa} = Tyrode Medium mit 15 mM $NaHCO_3$ und 2 mM $CaCl_2$:
= vollständiges Kapazitationsmedium
2. Tyr_{Ca} = Tyrode Medium ohne $NaHCO_3$, mit 2 mM $CaCl_2$
3. $Tyr_{Kontrolle}$ = Tyrode Kontrolle ohne $NaHCO_3$ und ohne $CaCl_2$ (plus 1mM EGTA)

Mit diesem Versuchansatz ließ sich die Reaktion der Spermien auf spezifische Stimuli differenzieren. Als der entscheidende Kapazitationsstimulus gilt bei Eberspermien das Bicarbonat ($NaHCO_3$). Die Medien wurden wie bei Henning (2009) beschrieben, hergestellt. Zum Messzeitpunkt wiesen sie eine Osmolarität von 300

mOsmol und einen pH von 7,4 bei 38°C und 5% CO₂ auf. Die vollständige Zusammensetzung der Medien ist dem Anhang zu entnehmen.

Den Medien wurde 3,7 µM Propidiumjodid (PI) als Marker für plasmamembran-defekte Spermien zugesetzt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an jedem Untersuchungstag nach 3, 20, 40 und 60 min Inkubation in den unterschiedlichen Medien. Als Sheathflüssigkeit wurde HBS 300 auf einen pH-Wert von 7,55 bei Raumtemperatur (= 7,4 bei 38°C) und eine Osmolalität von 300 ± 5 mOsmol/kg eingestellt.

3.5.3.3 Messung und Auswertung

An jedem Untersuchungstag wurden die Grundeinstellungen überprüft sowie die erfolgreiche Beladung der Spermien mit Fluo-3 überprüft. Letzteres erfolgte durch Einsatz des Calcium-Ionophors A23187. Dabei wurde geprüft, ob der durch Zugabe des Calcium-Ionophors induzierte intrazelluläre Calciumeinstrom über ein positives Fluo-3-Signal sichtbar gemacht werden konnte. Details des Vorgehens sind bei Henning (2009) beschrieben.

30 min nach Fluo-3-Beladung des konservierten Spermas wurden die Inkubationsreihen zeitversetzt im Abstand von 2 min gestartet. Dazu wurden jeweils 5 µl Spermien suspension mit ca. 1,0 – 1,5 x 10⁵ Spermien/ml zu 995 µl Medium der Tyrodevarianten pipettiert und bei 38°C inkubiert. Bikarbonatfreie Medien (Ty_rKontrolle) wurden abgedeckt im Wärmeschrank inkubiert, während bikarbonathaltige Medien (Ty_rBikCa; Ty_rCa) offen im CO₂-Brutschrank inkubiert wurden. Von der Entnahme der Messgefäße aus dem CO₂-Inkubator/Wärmeschrank bis zur Beendigung der Analyse wurde eine Zeitspanne von maximal 30 Sekunden eingehalten. Zwischen den einzelnen Messungen wurde das Durchflusszytometer mit HBS gespült.

Anhand der Histogramme nach 3 min Inkubationsdauer wurde die Spermienpopulation mittels Grenzlinien („ranges“) von Debris und Agglutinationen abgegrenzt sowie die Grenze zwischen Fluo-3-negativen und -positiven, sowie PI-negativen und -positiven Signalen festgelegt. Die Einstellung der Kompensation für die Überlagerung des grünen und roten Spektrums erfolgte im FL-3/FL-1 Dotplot an Proben, die in Ty_rBikCa inkubiert worden waren und eine deutliche Zunahme der

Fluoreszenzintensität im Kanal FL-1 aufwiesen. Ein Fremdpartikelgehalt der Proben wurde wie unter 3.5.2.3 beschrieben korrigiert.

3.5.3.4 Berechnung der Reaktivitätsparameter

Die Berechnung der Reaktivitätsparameter erfolgte wie bei HENNING (2009) beschrieben. Dazu wurden zunächst Verlaufskurven der einzelnen Spermienpopulationen in den verschiedenen Medien nach unterschiedlicher Lagerungsdauer erstellt. Anhand dieser Kinetiken wurde ein repräsentativer Inkubationszeitpunkt aus den Verlaufskurven bestimmt, welcher zum Vergleich innerhalb einer Spermienpopulation zwischen Medien und Lagerungszeitpunkten diente. Die Reaktivitätswerte wurden errechnet, um dynamische Veränderungen des Anteils einer Spermienpopulation während der Inkubation zu erfassen. Sie beschreiben die Differenz zwischen dem Prozentsatz einer Spermienpopulation zum ausgewählten, repräsentativen Zeitpunkt und dem relativen „Nullwert“ nach 3 min Inkubation. Durch einen Vergleich der Reaktivitätswerte zwischen Tyr_{BikCa} und Tyr_{Ca} kann auf mögliche lagerungsabhängige Veränderungen der Reaktivität gegenüber Bikarbonat geschlossen werden. Zur Beschreibung calcium-abhängiger Destabilisierungsvorgänge („Reaktivität auf Calcium“) wurde dies durch einen Vergleich zwischen den Medien Tyr_{Ca} und $Tyr_{Kontrolle}$ erreicht. Nachfolgend sind die Berechnungen für 60 Min. Inkubationsdauer angegeben, die sich analog zu HENNING (2009) als repräsentativer Zeitpunkt in den kinetischen Messungen ergaben:

Allgemeine Reaktivität nach 60 min Inkubationsdauer = R_{60}

$$R_{60} = \%Spermien (60 \text{ min}) - \%Spermien (3 \text{ min})$$

Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat nach 60 min Inkubation = R_{60Bik}

$$R_{60Bik} = R_{60} (Tyr_{BikCa}) - R_{60} (Tyr_{Ca})$$

Spezifische Reaktivität auf Calcium nach 60 min Inkubation = R_{60Ca}

$$R_{60Ca} = R_{60} (Tyr_{Ca}) - R_{60} (Tyr_{Kontrolle})$$

3.6 Statistik

Die Daten wurden mit dem Programm SAS (Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary/NC, USA) und dem Programm Microsoft Excel ausgewertet. Die einzelnen Parameter wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet (PROC UNIVARIATE). Weil nicht alle Parameter normalverteilt waren, wurden alle paarweisen Vergleiche mit dem Wilcoxon signed-rank-test durchgeführt (PROC UNIVARIATE). Damit wurde für alle Vergleiche die gleiche Fehlerwahrscheinlichkeit sichergestellt. Um die Eberspezifität einzelner Parameter zu testen, wurde mit der Methode MIVQUE0 (minimum variance unbiased quadratic estimation) eine Varianzkomponentenschätzung für die Faktoren „Eber“ und „Ejakulat“ durchgeführt. In Experiment 2 wurden Zusammenhänge zwischen einzelnen Parametern mit Korrelationsberechnungen geprüft (PROC CORR).

Alle Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Ein Unterschied wurde als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Experiment 1

4.1.1 CASA-Motilitätsparameter

Alle erhobenen Motilitätsparameter waren durch die Lagerungstemperatur beeinflusst ($p < 0,05$; Tabelle 2). Mit Ausnahme von VSL [$\mu\text{m/s}$], LIN, STR, WOB und ALH [μm] wurden alle anderen erhobenen Motilitätsparameter durch die Lagerungsdauer beeinflusst ($p < 0,05$; Tabelle 2). Nach 24 h Lagerung waren die Gesamtmotilität und nahezu alle anderen kinetischen Parameter in den bei 5°C gelagerten Proben signifikant verringert, während sie bei den 17°C gelagerten Proben konstant blieben. Signifikante Lagerungseinflüsse zeigten sich für die meisten kinetischen Parameter bei den 17°C-Proben nach 120 h.

Ergebnisse

Tab. 2: CASA-Motilitätsparameter (MW± SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Lagerungsdauer Lagerungstemperatur	6 h 20°C	24 h 17°C	72 h 17°C	120 h 17°C	24 h 5°C	72 h 5°C
Gesamtmotilität [%]	90,1±1,16 ^a	89,3±1,28 ^a	89,0±1,86 ^a	84,8±2,76 ^d	58,3±6,35 ^b	53,8±6,74 ^c
progr. Motilität [%]	81,1±1,67 ^a	80,5±1,97 ^a	79,0±3,87 ^a	73,4±5,02 ^d	47,6±7,33 ^b	41,5±7,93 ^c
VAP [$\mu\text{m/s}$]	55,1±1,61 ^a	55,1±2,39 ^a	52,7±2,23 ^b	53,7±2,43 ^{a,b}	51,4±1,90 ^b	52,0±2,19 ^b
VCL [$\mu\text{m/s}$]	89,6±3,99 ^{a,d}	91,0±4,15 ^{c,d}	86,9±2,84 ^{b,d}	86,6±3,01 ^{a,b,d}	86,8±4,11 ^{a,b}	93,6±5,23 ^{a,c}
VSL [$\mu\text{m/s}$]	44,8±0,93 ^a	44,8±1,75 ^a	43,0±2,03 ^a	44,0±2,16 ^a	39,5±1,37 ^b	38,5±1,61 ^b
LIN	0,81±0,01 ^a	0,81±0,01 ^a	0,81±0,01 ^a	0,81±0,01 ^a	0,76±0,01 ^b	0,74±0,02 ^c
STR	0,50±0,02 ^a	0,49±0,01 ^a	0,49±0,02 ^a	0,51±0,02 ^a	0,46±0,01 ^b	0,42±0,02 ^c
WOB	0,62±0,02 ^a	0,60±0,01 ^a	0,60±0,02 ^{a,b}	0,62±0,01 ^a	0,59±0,01 ^b	0,56±0,01 ^c
ALH [μm]	2,59±0,17 ^a	2,64±0,12 ^a	2,60±0,15 ^a	2,68±0,26 ^a	2,65±0,14 ^a	3,05±0,14 ^b
BCF [Hz]	32,08±0,73 ^a	31,85±0,73 ^a	30,82±0,72 ^c	28,98±1,02 ^b	27,24±0,96 ^b	25,60±0,91 ^d

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

VAP = velocity average path
 STR = straightness (VSL/VAP)
 ALH = amplitude of lateral head-displacement
 progr.Motilität = progressive Motilität

VCL = velocity curved line
 LIN = linearity (VAP/VCL)
 BCF = beat cross frequency

VSL = velocity straight-line
 WOB = wobble (VAP/VCL)

Ergebnisse

4.1.2 Membranintegrität

Der Anteil PI- und FITC-PNA-negativer (membranintakter) Spermien (Abbildung 1) wurde von der Temperatur und der Lagerungsdauer beeinflusst ($p < 0,05$). Der Prozentsatz membranintakter Spermien sank signifikant nach 24 h Lagerung bei 5°C bzw. nach 72 h bei 17°C im Vergleich zu der frischverdünnten Probe (6 h, 20°C). Der Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen war an jedem Untersuchungstag signifikant. Innerhalb der Temperaturstufen zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Lagerungsdauer.

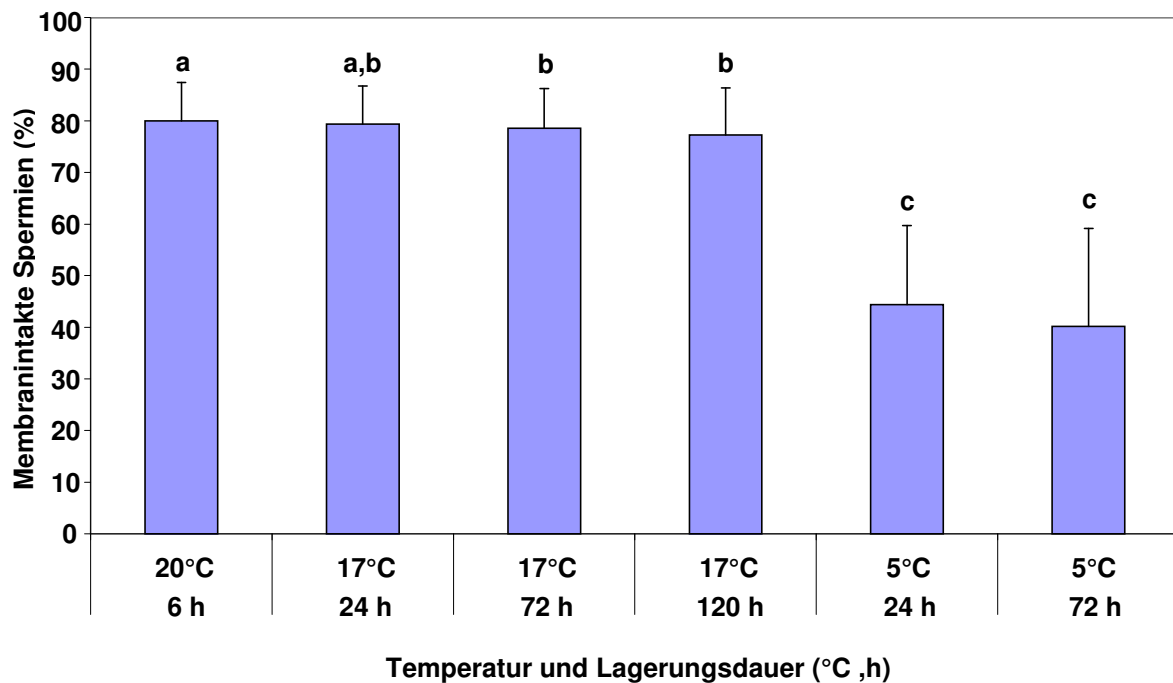


Abb. 1: Prozentualer Anteil membranintakter (Propidiumjodid- und FITC-PNA-negativer) Spermien an der Gesamtpopulation (MW \pm SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur ($n = 7$ Eber, $n = 42$ Ejakulate). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Bei Betrachtung der einzelnen Eber ist bei allen Lagerungszeitpunkten eine absteigende Tendenz der Membranintegritätswerte festzustellen, die jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Abbildung 2). Eberunterschiede zeigten sich besonders bei den 5°C gelagerten Proben.

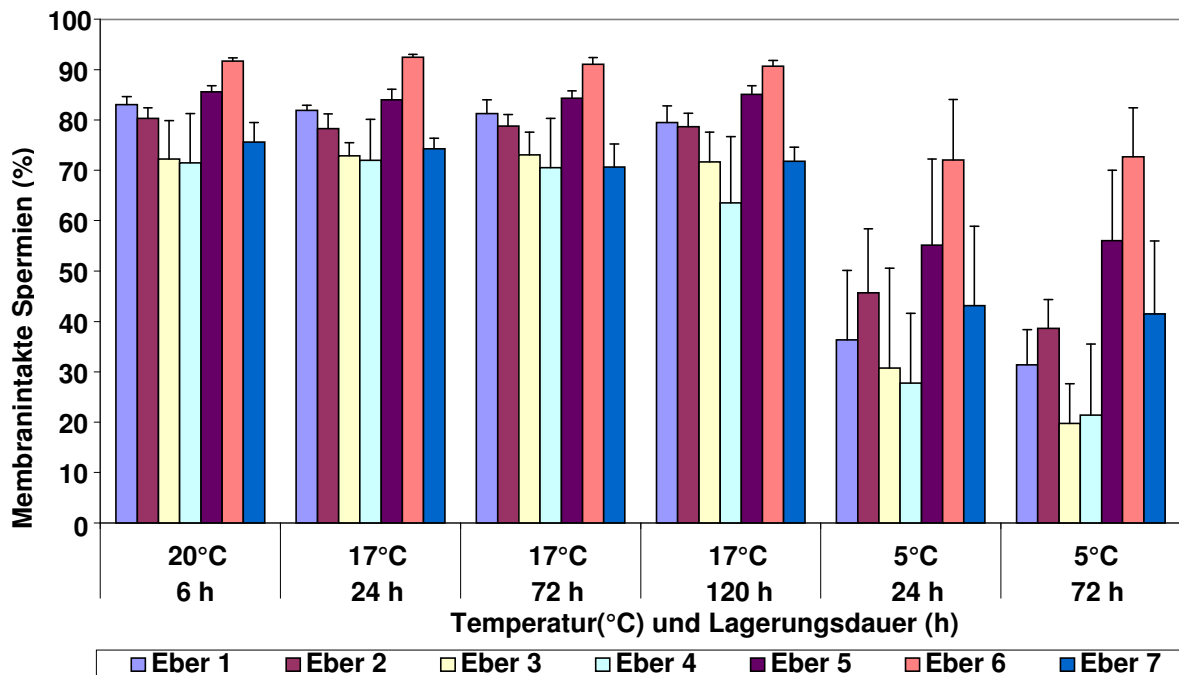


Abb. 2: Prozentualer Anteil membranintakter (Propidiumjodid- und FITC-PNA-negativer) Spermien für einzelne Eber (MW \pm SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur (n = 6 Ejakulate je Eber).

4.1.3 Calciuminflux

4.1.3.1 Kurvenverläufe der kinetischen Populationsveränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer

Die Ergebnisse des Calciuminflux sind für die verschiedenen Lagerungs- und Temperaturgruppen den Abbildungen 3A bis F zu entnehmen. Dargestellt sind kinetische Verlaufskurven für drei Spermisubpopulationen nach Inkubation in drei Varianten des Tyrode-Mediums. Die drei Subpopulationen (PI- /Fluo-3-negativ, PI-negativ / Fluo-3-positiv, PI-positiv) ergeben sich aus den Kombination der Anfärbung mit Propidiumjodid (Marker für Membranintegrität) und Fluo-3 (Marker für

Ergebnisse

intrazellulären Calciumgehalt). Die zugehörigen Daten (Mittelwerte und Standardabweichungen) befinden sich im Anhang (Tabellen 11 – 19).

6 h Lagerungsdauer bei 20°C Lagerungstemperatur

In Tyr_{BikCa} sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $83,1 \pm 2,4 \%$ nach 3 min Inkubationsdauer auf $18,9 \pm 6,1 \%$ nach 60 min ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $8,4 \pm 1,6 \%$ (3 min) auf $38,6 \pm 4,3 \%$ (60 min) an ($p < 0,05$). Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von $8,5 \pm 1,4 \%$ (3 min) auf $42,5 \pm 5,7 \%$ (60 min) an ($p < 0,05$).

In Tyr_{Ca} nahm die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien während der Inkubation von $84,9 \pm 2,5 \%$ (3 min) auf $70,6 \pm 3,0 \%$ (60 min) ab ($p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg über die gesamte Inkubationsdauer von $7,9 \pm 1,6 \%$ (3 min) auf $18,3 \pm 3,2 \%$ (60 min) an ($p < 0,05$). Die Population PI-positiver Spermien nahm von $7,2 \pm 1,2 \%$ (3 min) auf $11,1 \pm 1,2 \%$ (60 min) zu ($p < 0,05$).

In $Tyr_{Kontrolle}$ sanken die Werte für die PI- und Fluo-3-negative Spermienpopulation von $89,0 \pm 1,7 \%$ (3 min) auf $80,7 \pm 1,9 \%$ (60 min; $p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien nahm von $3,3 \pm 0,7 \%$ (3 min) auf $8,0 \pm 2,1 \%$ (60 min; $p < 0,05$) zu.

Die Population PI-positiver Zellen stieg von $7,8 \pm 1,2 \%$ (3 min) auf $11,4 \pm 1,2 \%$ (60 min) an ($p < 0,05$).

24 h Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C Lagerungstemperatur

In Tyr_{BikCa} sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien für Proben, die bei 17°C gelagert worden waren, von $78,5 \pm 4,8 \%$ nach 3 min Inkubationsdauer auf $17,2 \pm 5,1 \%$ nach 60 min ($p < 0,05$). Für Proben die bei 5°C gelagert worden waren sank diese Population von $44,1 \pm 7,7 \%$ nach 3 min Inkubationsdauer auf $10,6 \pm 4,4 \%$ nach 60 min ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $13,7 \pm 4,4 \%$ nach 3 min auf $41,5 \pm 1,9 \%$ nach 60 min an (17°C Lagerungstemperatur; $p < 0,05$) aber sank von $42,5 \pm 6,0 \%$ nach 3 min

Ergebnisse

Inkubationsdauer auf $22,8 \pm 6,5$ % nach 60 min ab (5°C Lagerungstemperatur; $p < 0,05$). Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von $7,8 \pm 1,2$ % (3 min) auf $41,3 \pm 3,7$ % (60 min) an (17°C Lagerungstemperatur; $p < 0,05$) bzw. von $13,4 \pm 2,8$ % (3 min) auf $66,6 \pm 8,2$ % (60 min) an (5°C Lagerungstemperatur; $p < 0,05$).

In Tyr_{Ca} nahm die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien während der Inkubation von $79,3 \pm 5,1$ % (3 min) auf $60,7 \pm 5,5$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ab ($p < 0,05$) und von $43,3 \pm 8,5$ % (3 min) auf $22,4 \pm 4,8$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $13,1 \pm 4,7$ % (3 min) auf $26,5 \pm 3,2$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$) und nahm von $43,8 \pm 7,8$ % (3 min) auf $21,0 \pm 5,9$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) ab. Die Population PI-positiver Spermien nahm von $7,6 \pm 1,0$ % (3 min) auf $12,8 \pm 1,4$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $12,9 \pm 2,7$ % (3 min) auf $56,6 \pm 10,1$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) zu.

In $\text{Tyr}_{\text{Kontrolle}}$ sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $85,9 \pm 2,9$ % (3 min) auf $76,2 \pm 5,0$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $83,5 \pm 2,2$ % (3 min) auf $40,8 \pm 7,1$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $6,6 \pm 2,6$ % (3 min) auf $11,2 \pm 3,9$ % (60 min) auf (17°C Lagerungstemperatur; $p < 0,05$) und von $3,4 \pm 1,2$ % (3 min) auf $7,1 \pm 3,4$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$) an. Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von $7,5 \pm 1,2$ % (3 min) auf $12,1 \pm 1,3$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$) und von $13,1 \pm 2,7$ % (3 min) auf $52,1 \pm 9,9$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$).

72 h Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C Lagerungstemperatur

In $\text{Tyr}_{\text{BikCa}}$ sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $79,2 \pm 2,1$ % (3 min) auf $21,6 \pm 3,7$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $42,7 \pm 7,2$ % (3 min) auf $12,9 \pm 4,8$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $12,6 \pm 1,6$ %

Ergebnisse

(3 min) auf $37,1 \pm 2,2$ % (60 min) an bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) aber sank von $41,4 \pm 3,6$ % (3 min) auf $24,2 \pm 7,3$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$). Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von $8,2 \pm 1,4$ % (3 min) auf $41,3 \pm 3,0$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$) und von $15,9 \pm 3,9$ % (3 min) auf $62,9 \pm 8,0$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$).

In Tyr_{Ca} nahm die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien während der Inkubation von $81,7 \pm 2,6$ % (3 min) auf $61,7 \pm 4,8$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ab ($p < 0,05$) und von $41,4 \pm 7,3$ % (3 min) auf $19,4 \pm 4,0$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $10,1 \pm 1,3$ % (3 min) auf $24,1 \pm 5,0$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$) und nahm von $42,4 \pm 4,1$ % (3 min) auf $23,2 \pm 7,7$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) ab. Die Population PI-positiver Spermien nahm von $8,2 \pm 1,4$ % (3 min) auf $14,2 \pm 1,7$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $16,7 \pm 4,0$ % (3 min) auf $57,4 \pm 9,4$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) zu.

In Tyr_{Kontrolle} sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $87,1 \pm 2,1$ % (3 min) auf $77,3 \pm 2,7$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $79,2 \pm 2,8$ % (3 min) Inkubationsdauer auf $37,2 \pm 6,3$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $5,0 \pm 1,0$ % (3 min) auf $10,2 \pm 3,7$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur ($p < 0,05$) und von $4,7 \pm 2,2$ % (3 min) auf $8,6 \pm 4,2$ % (60 min) bei 5°C ($p < 0,05$) an. Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von $7,9 \pm 1,4$ % (3 min) auf $12,5 \pm 1,5$ % (60 min) bei 17°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$) und von $16,1 \pm 3,7$ % (3 min) auf $54,2 \pm 9,9$ % (60 min) bei 5°C Lagerungstemperatur an ($p < 0,05$).

120 h Lagerungsdauer bei 17°C Lagerungstemperatur

In Tyr_{BikCa} sank die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $75,7 \pm 3,5$ % (3 min) auf $20,0 \pm 3,5$ % (60 min) ($p < 0,05$). Die Population PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von $14,2 \pm 2,1$ % (3 min) auf

Ergebnisse

35,0 ± 1,9 % (60 min) an ($p < 0,05$). Der Anteil PI-positiver Spermien stieg während der Inkubation von 10,1 ± 1,9 % (3 min) auf 45,1 ± 2,7 % (60 min) an ($p < 0,05$).

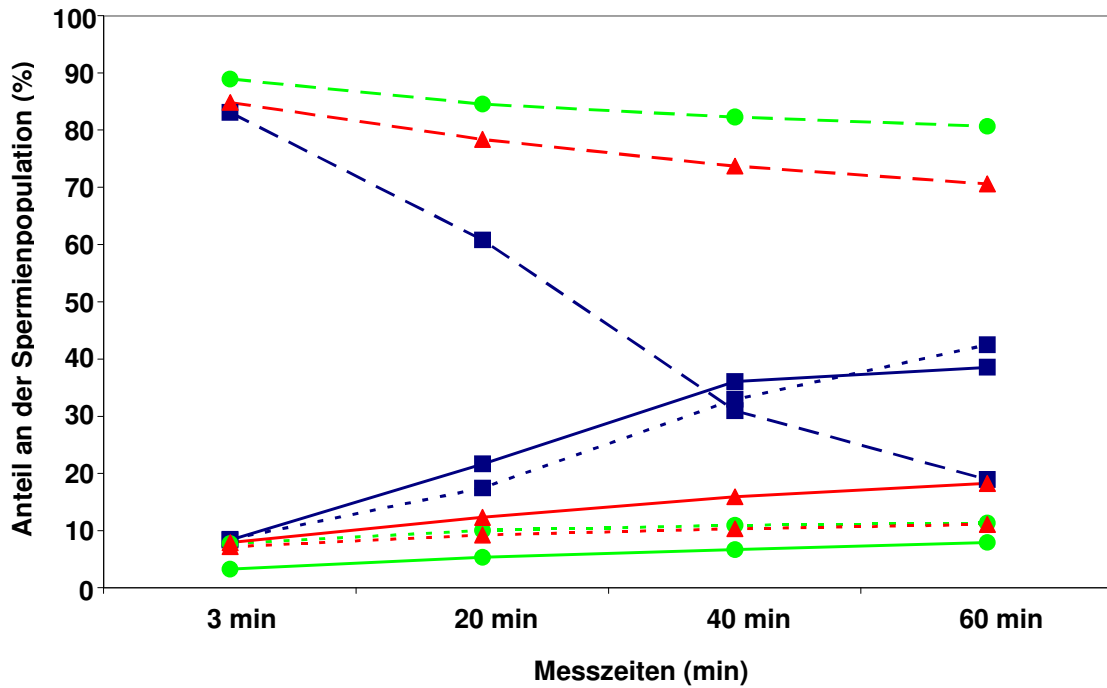
In Tyr_{Ca} nahm die Population der PI- und Fluo-3-negativen Spermien während der Inkubation von 79,4 ± 3,6 % (3 min) auf 51,3 ± 4,6 % (60 min) ab ($p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien stieg von 11,3 ± 1,7 % (3 min) auf 30,2 ± 5,5 % (60 min) an ($p < 0,05$). Die Population PI-positiver Spermien nahm von 9,3 ± 2,1 % (3 min) auf 18,5 ± 2,8 % (60 min) zu ($p < 0,05$).

In Tyr_{Kontrolle} sanken die Werte für die PI- und Fluo-3-negative Spermienpopulation von 85,2 ± 2,8 % (3 min) auf 71,1 ± 3,8 % (60 min; $p < 0,05$). Der Anteil PI-negativer und Fluo-3-positiver Spermien nahm von 5,8 ± 1,1 % (3 min) auf 13,3 ± 4,5 % (60 min; $p < 0,05$) zu.

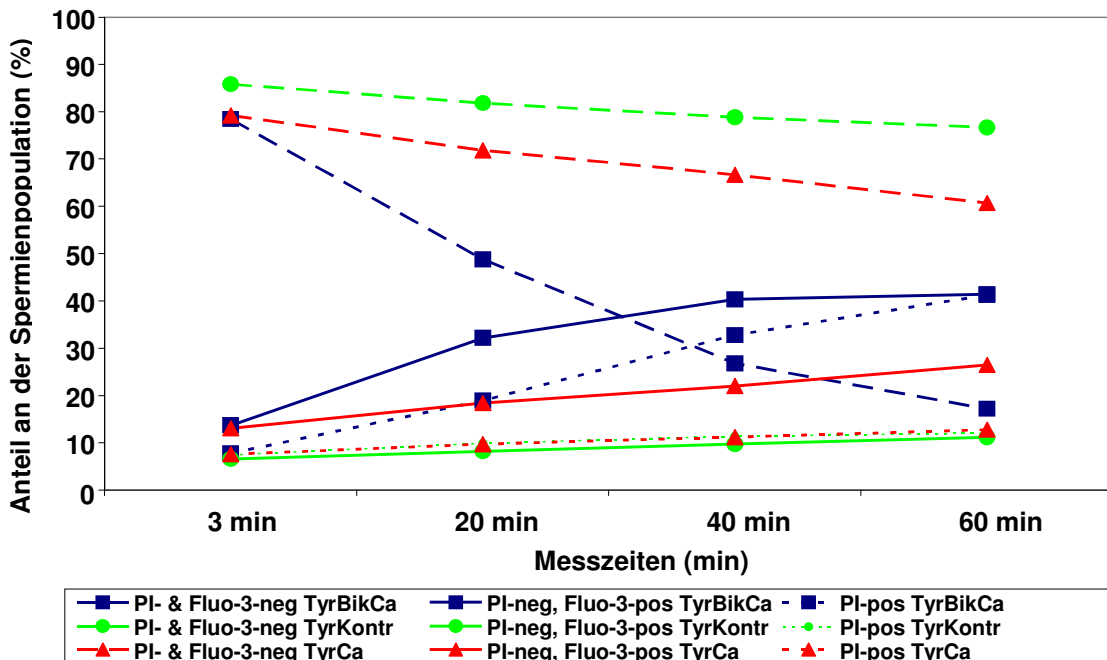
Die Population PI-positiver Zellen stieg von 9,1 ± 2,0 % (3 min) auf 15,6 ± 2,7 % (60 min) an ($p < 0,05$).

Ergebnisse

3A): 20°C, 6 h



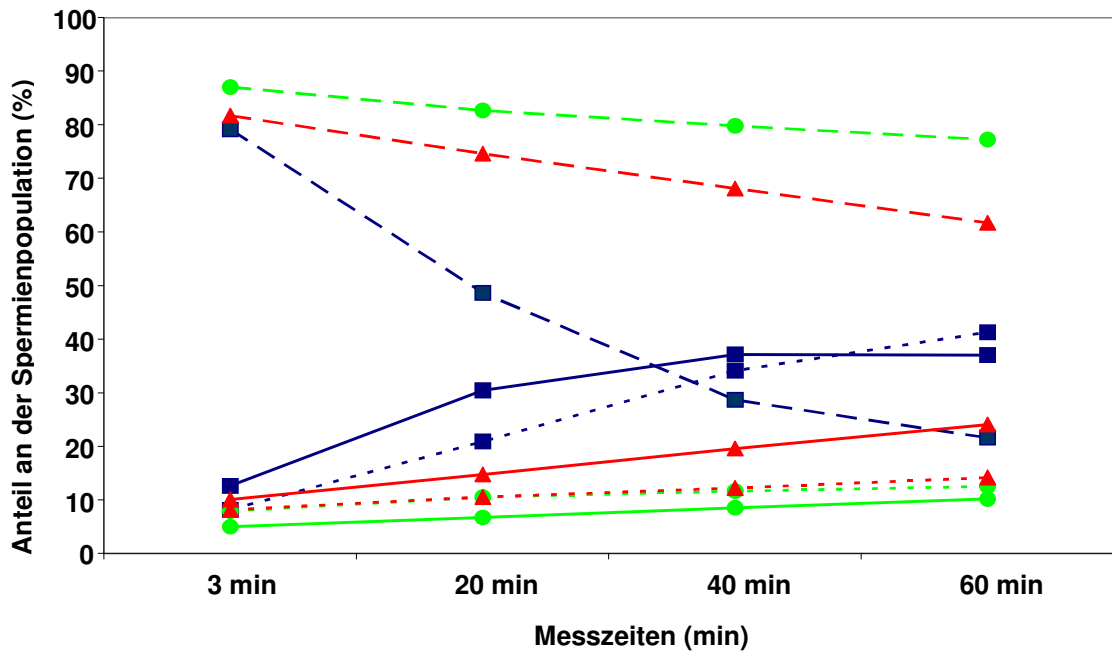
3 B): 17°C, 24 h



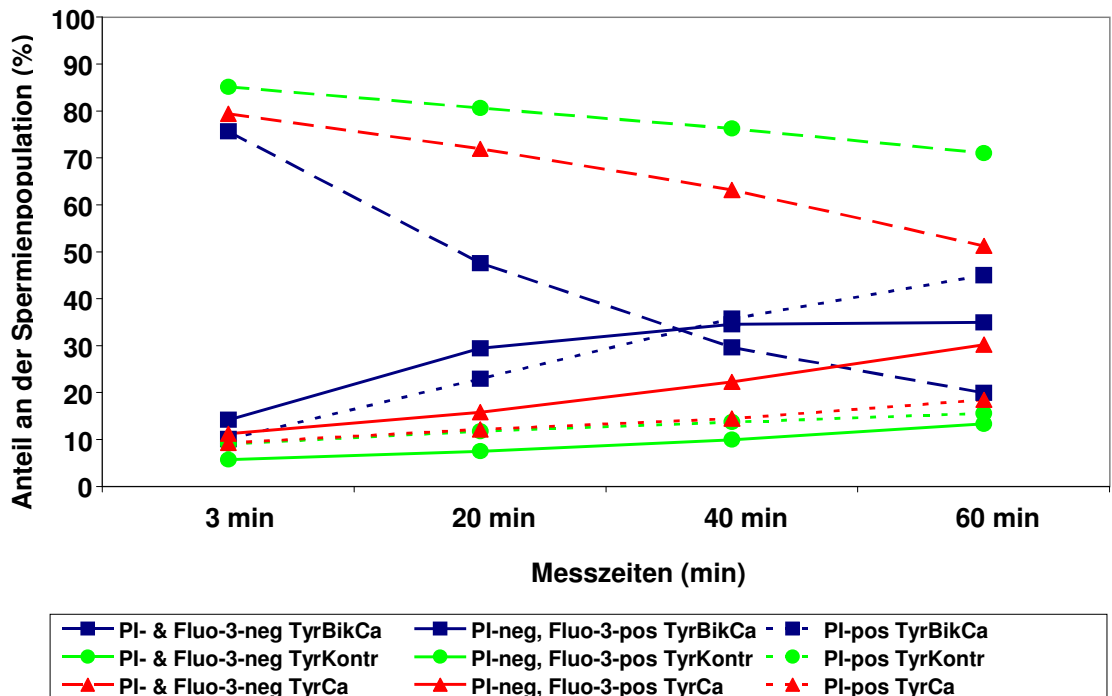
Die Legende zu den Grafiken 3A bis 3F befindet sich auf Seite 34.

Ergebnisse

3 C): 17°C, 72 h



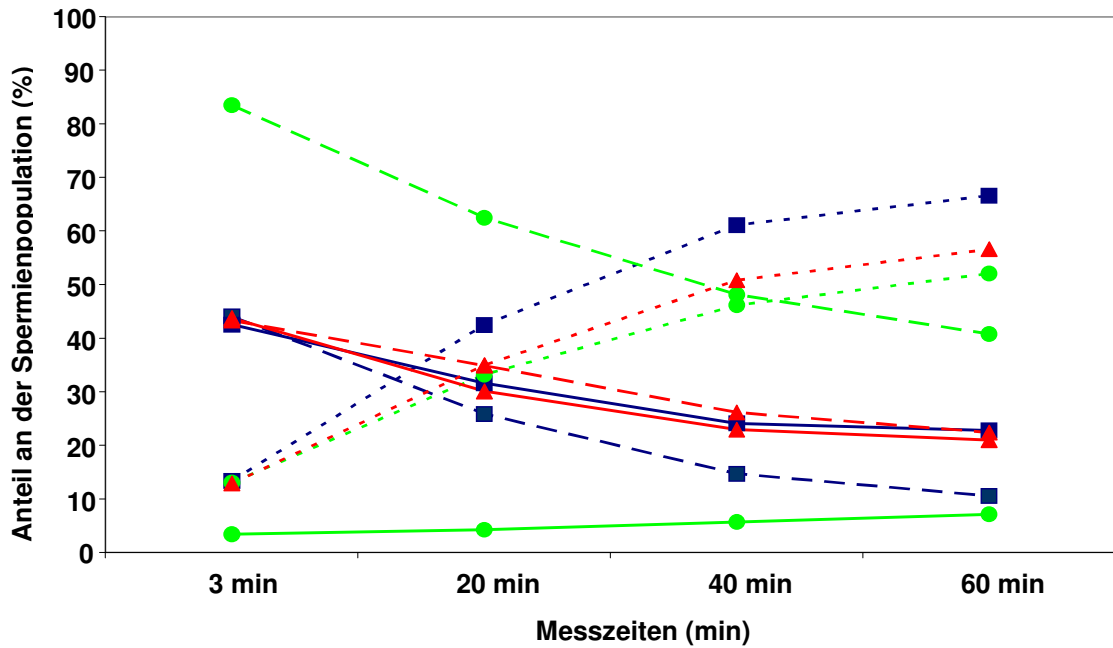
3 D): 17°C, 120 h



Die Legende zu den Grafiken 3A bis 3F befindet sich auf Seite 34.

Ergebnisse

3 E): 5°C, 24 h



3 F): 5°C, 72 h

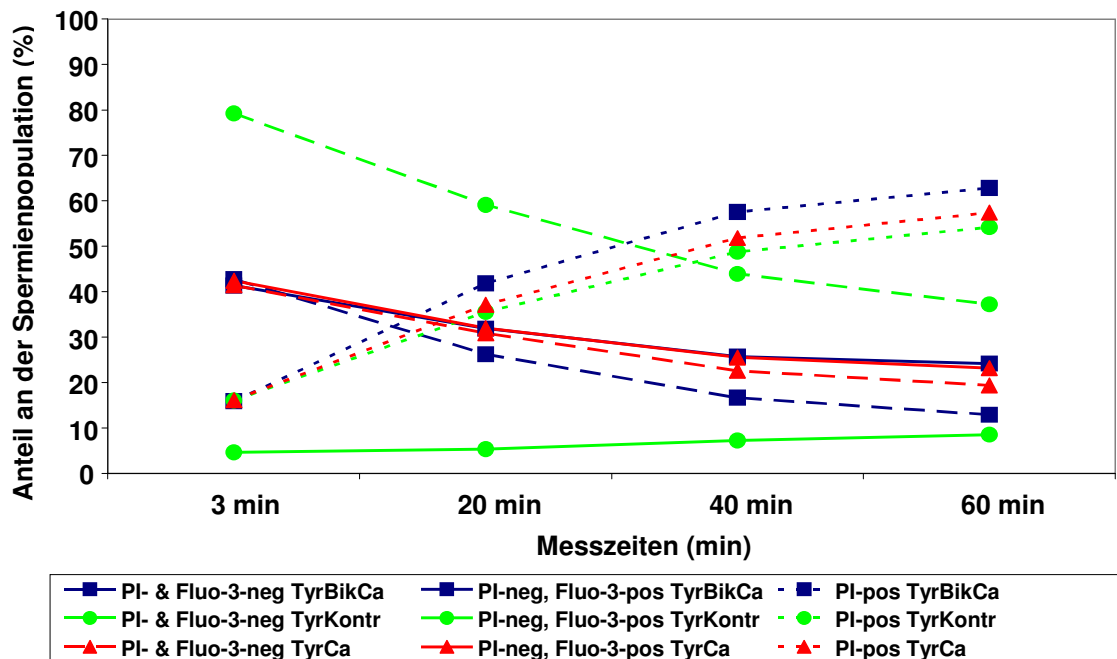


Abb. 3 :Veränderung des prozentualen Anteils der PI-neg. /Fluo-3-neg. (---), sowie PI-neg. / Fluo-3-pos. (—) und der PI-pos. (.....) Spermien-population während der Inkubation in Tyr_{BikCa} (■), Tyr_{Ca} (▲) und Tyr_{Kontr} (●) nach 6 h, 24 h, 72 h und 120 h Lagerungsdauer und-temperatur (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

4.1.3.2 Allgemeine Reaktivität der PI-negativen/Fluo3-negativen Spermienpopulationen in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur, -dauer und vom Inkubationsmedium

Zur Erfassung der absoluten Veränderung des intrazellulären Calciumgehaltes einer Zellpopulation zu einem ausgewählten Zeitpunkt der Inkubation in drei verschiedenen Medien (hier: 60 min) gegenüber dem Ausgangswert (3 min) wurden Reaktivitätswerte bestimmt (s. Kap. 3.5.3.4). (nach PETRUNKINA et al. 2005c, HENNING, 2009).

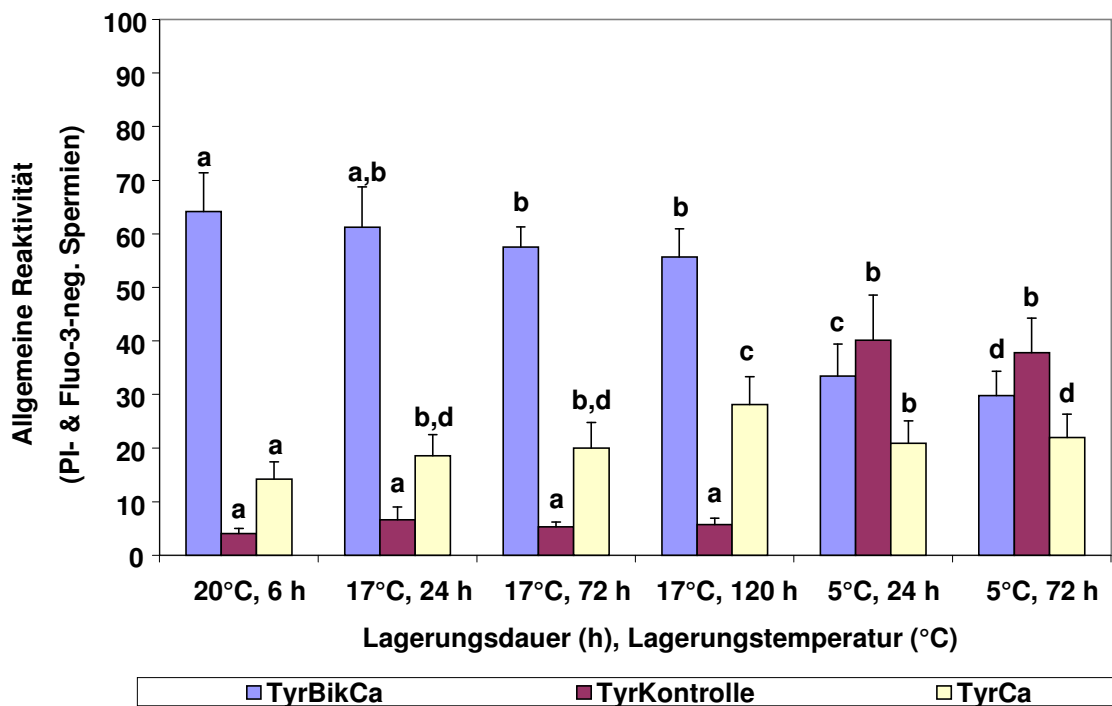


Abb. 4: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) auf Basis der P/-negativen/ Fluo-3-negativen (Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte ($MW \pm SD$) in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und Inkubationsmedium ($n = 7$ Eber). Die Spermien wurden in Tyrode-basierten Medien inkubiert, die entweder 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium (Tyr_{BikCa}) oder 2 mM Calcium ohne Bikarbonat (Tyr_{Ca}) oder weder Bikarbonat noch Calcium ($Tyr_{Kontrolle}$) enthielten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Werte innerhalb eines Mediums ($p < 0,05$).

Ergebnisse

In Tyr_{BikCa} sank die R_{60} auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien von $64,2 \pm 7,2 \%$ nach 6 h (20°C) auf $55,7 \pm 5,3 \%$ nach 120 h (17°C) und auf $29,8 \pm 4,6 \%$ nach 72 h (5°C) Lagerungsdauer.

In Tyr_{Ca} stieg entgegengesetzt zu den Verhältnisse in Tyr_{BikCa} die R_{60} von $14,3 \pm 3,2 \%$ 6 h (20°C) auf $28,1 \pm 5,2 \%$ nach 120 h (17°C) und auf $22,0 \pm 4,4 \%$ nach 72 h (5°C) Lagerungsdauer an.

In $Tyr_{Kontrolle}$ stieg die R_{60} von $4,1 \pm 0,9 \%$ 6 h (20°C) auf $5,8 \pm 1,2 \%$ nach 120 h (17°C) und auf $37,8 \pm 6,4 \%$ nach 72 h (5°C) Lagerungsdauer an.

4.1.3.3 Spezifische Reaktivität der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulationen auf Bikarbonat und Calcium in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und -dauer

Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat nach 60 min (R_{60Bik}) beschreibt die Veränderung einer Spermienpopulation innerhalb eines definierten Zeitraumes während der Inkubation (hier: 60 Min), die auf Bikarbonat zurückzuführen ist. Sie wird aus den Differenzen der R_{60} einer Spermienpopulation zwischen Tyr_{BikCa} und Tyr_{Ca} gebildet (s. Kap. 3.5.3.4)

Die R_{60Bik} sank von $49,9 \pm 5,6 \%$ 6h (20°C) auf $27,6 \pm 3,2 \%$ nach 120 h (17°C) und auf $7,8 \pm 1,2 \%$ nach 72 h (5°C) Lagerung (Abbildung 5).

Analog zur R_{60Bik} wurde für die oben genannte Spermienpopulation die spezifische Reaktivität der Spermien auf Calcium nach 60 min (R_{60Ca}) definiert. Sie ergibt sich aus der Differenz der R_{60} zwischen Tyr_{Ca} und $Tyr_{Kontrolle}$ (s. Kap. 3.5.3.4)

Die R_{60Ca} stieg von $10,2 \pm 3,1 \%$ 6 h (20°C) auf $27,6 \pm 3,2 \%$ 120 h (17°C) an. Für die Proben, die bei 5°C gelagert wurden, wurde die R_{60Ca} nicht berechnet, da im calciumhaltigen Kontrollmedium bereits nach drei Minuten Inkubationsdauer die Population der PI-negativen/ Fluo-3-negativen Spermien im Mittel um ca. 40 %

Ergebnisse

unterhalb des Wertes dieser Population in $Tyr_{\text{Kontrolle}}$ lag. Eine sinnvolle Berechnung der R_{60Ca} war dadurch nicht möglich.

Mittelwerte und Standardabweichungen aller Reaktivitätswerte sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

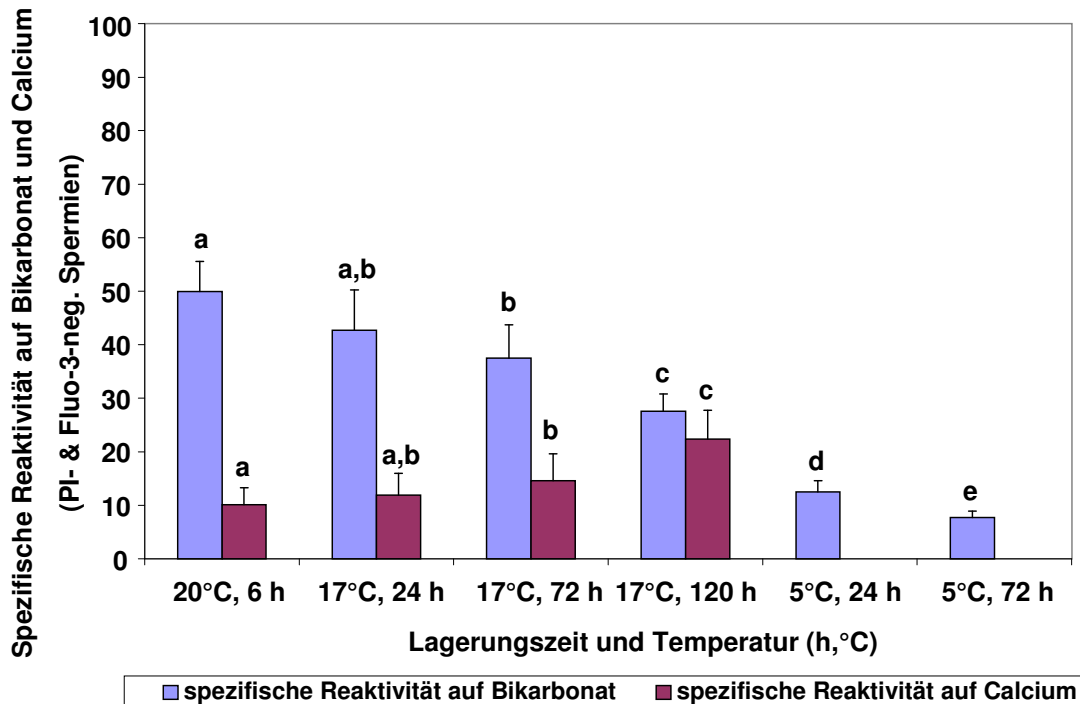


Abb. 5: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/ Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubation (R_{60Bik}) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur. Betrag der spezifischen Reaktivität auf Calcium berechnet anhand der PI-negativen/ Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer (R_{60Ca}) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur. Deskriptiver Vergleich zwischen einzelnen Ebern ($n = 7$ Eber, $n = 42$ Ejakulate). Alle Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Werte innerhalb eines Mediums ($p < 0,05$).

4.1.4 Varianzkomponenten

4.1.4.1 CASA-Motilitätsparameter und Membranintegrität

Die Varianzen für die einzelnen spermatologischen Parameter wurden für drei (Ejakulat 1 bis 3) sowie für drei weitere, d.h. sechs Ejakulate (Ejakulat 1 bis 6) bestimmt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, weil saisonale Effekte nicht ausgeschlossen werden konnten. Sowohl bei Betrachtung von drei als auch von sechs konsekutiven Ejakulaten wurde eine Eberspezifität für den Parameter Membranintegrität festgestellt.

Die Eberspezifität hinsichtlich der Membranintegrität (n= 3 Ejakulate) stieg von 63 % 6h (20°C) auf 75 % nach 24 h (17°C) und auf 86 % nach 24 h (5°C). Nach 72 h Lagerungszeit war es bei 58 % 72 h (17°C) und 84 % 72 h (5°C) und bei 68 % nach 120 h (17°C).

Eberspezifität bei Membranintegrität (n = 6 Ejakulate) stieg von 67 % 6h (20°C) auf 80 % nach 24 h (17°C), war aber nur 46 % nach 24 h (5°C). Nach 72 h Lagerungszeit war es bei 72 % 72 h (17°C) und 74 % 72 h (5°C) und bei 69 % nach 120 h (17°C).

Von den CASA-Parametern waren nur die Gesamtmotilität und Progressivmotilität der Proben, die bei 5°C gelagert worden waren, eberspezifisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3A (n = 3 Ejakulate) und 3B (n = 6 Ejakulate) dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 3A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für Membranintegrität und CASA- Parameter für den Faktor Eber (n = 21 Ejakulate; je 3 Ejakulate (Nr. 1 bis 3) von 7 Ebern).

Ejakulat 1 bis3	Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
	20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
Memb.int.	63	75	58	68	86	84
Mot. ges.	0	0	23	11	60	68
Mot. prog.	19	15	36	10	63	72
VAP	16	36	16	25	36	16
VCL	6	2	0	14	4	0
VSL	0	37	20	25	36	18
LIN	3	0	18	0	0	10
STR	1	0	12	0	0	0
WOB	0	0	17	0	0	0
ALH	1	20	25	29	7	0
BCF	10	0	3	0	37	9

Memb.int. = Anteil membranintakter Spermien

Mot. ges. = Gesamtmotilität

Mot. prog. = Anteil progressiv motiler Spermien

VAP = velocity average path

VCL = velocity curvilinear

VSL = velocity straight-line

LIN = linearity (VSL/VCL)

STR = straightness (VSL/VAP)

WOB = wobble (VAP/VCL)

ALH = amplitude of lateral headdisplacement

BCF = beat cross frequency

Ergebnisse

Tab.3B Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für Membranintegrität und CASA- Parameter für den Faktor Eber (n = 42 Ejakulate; je 6 Ejakulate (Nr. 1 bis 6) von 7 Eber).

Ejakulat 1 bis 6	Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
	20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
Memb.int.	67	80	72	69	46	74
Mot. ges.	0	0	14	0	12	11
Mot. prog.	0	0	9	0	13	16
VAP	0	11	0	0	6	0
VCL	0	0	0	0	1	0
VSL	0	6	3	0	0	0
LIN	0	0	0	0	0	8
STR	0	0	0	0	0	0
WOB	0	0	0	0	0	0
ALH	0	0	0	8	0	0
BCF	0	0	0	0	0	0

Memb.int. = Anteil membranintakter Spermien

Mot. ges. = Gesamtmotilität

Mot. prog. = Anteil progressiv motiler Spermien

VAP = velocity average path

VCL = velocity curvilinear

VSL = velocity straight-line

LIN = linearity (VSL/VCL)

STR = straightness (VSL/VAP)

WOB = wobble (VAP/VCL)

ALH = amplitude of lateral headdisplacement

BCF = beat cross frequency

4.1.4.2 Reaktivitätsparameter

Die Eberspezifität für die R_{60} auf Basis der PI-negativen/ Fluo-3-negativen Spermien in Tyr_{BikCa} (3 Ejakulate) liegt bei 67 % nach 6 h (20°C) und 70 % nach 24 h (17°C) Lagerungsdauer. Die restlichen Werte bei 17°C Lagerungstemperatur sind nicht eberspezifisch. Bei 5°C Lagerungstemperatur war die Eberspezifität in Tyr_{BikCa} bei 65 % nach 24 h und 58 % nach 72 h Lagerungsdauer, in Tyr_{Kontrolle} bei 76 % nach 24 h und 64 % nach 72 h Lagerungsdauer und in Tyr_{Ca} bei 76 % nach 24 h und 71 % nach 72 h Lagerungsdauer.

Eine Eberspezifität für die R_{60} auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei sechs Ejakulaten war nur in Tyr_{Ca} mit 75 % nach 24 h (5°C) und 60 % nach 72 h (5°C) vorhanden. Die restlichen Werte waren nicht eberspezifisch (Tabelle 4).

Ergebnisse

Tab. 4A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die Allgemeine Reaktivität (R_{60}) für den Faktor Eber. (n = 21 Ejakulate; je 3 Ejakulate (Nr. 1 bis 3) von 7 Ebern).

Ejakulat 1 bis 3		Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
		20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
PI-neg.	Tyr _{BikCa}	67	70	49	55	65	58
Fluo-3- neg	Tyr _{Kontroll}	0	15	37	34	76	64
	Tyr _{Ca}	52	84	52	12	76	71

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontrolle} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Tab. 4B: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die Allgemeine Reaktivität (R_{60}) für den Faktor Eber. (n = 42 Ejakulate; je 6 Ejakulate (Nr. 1 bis 6) von 7 Ebern).

Ejakulat 1 bis 6		Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
		20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
PI-neg.	Tyr _{BikCa}	50	62	13	28	32	31
Fluo-3- neg	Tyr _{Kontroll}	0	32	5	12	43	43
	Tyr _{Ca}	36	47	56	36	75	60

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontrolle} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R_{60Bik}) berechnet auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien war zu keinem Zeitpunkt eberspezifisch. Dagegen war die spezifische Reaktivität auf Calcium (R_{60Ca}) nach 24 und 72 h der Lagerung bei 5°C Lagerungstemperatur zum Teil eberspezifisch. Berechnet anhand der ersten drei Ejakulate lag sie bei 84 % nach 24 h und 79 % nach 72 h Lagerungsdauer. Bei der Betrachtung von sechs Ejakulaten lag sie bei 64 % nach 24 h und 55 % nach 72 h Lagerungsdauer (Tabelle 5).

Ergebnisse

Tab. 5A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R_{60Bik}) und Calcium (R_{60Ca}) für den Faktor Eber (n = 21 Ejakulate; je 3 Ejakulate (Nr. 1 bis 3) von 7 Eber).

Ejakulat 1_3		Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
		20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
PI-neg. Fluo-3- neg	R_{60Bik}	45	57	20	0	5	0
	R_{60Ca}	37	57	65	25	84	79

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tab. 5B: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R_{60Bik}) und Calcium (R_{60Ca}) für den Faktor Eber (n = 42 Ejakulate; je 6 (Nr. 1 bis 6) Ejakulate von 7 Ebern).

Ejakulat 1 bis 6		Lagerungstemperatur (°C), Lagerungsdauer (h)					
		20°C, 6h	17°C, 24h	17°C, 72h	17°C, 120h	5°C, 24h	5°C, 72h
PI-neg. Fluo3- neg	R_{60Bik}	36	50	32	0	0	0
	R_{60Ca}	28	46	65	47	64	55

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

4.2 Experiment 2

4.2.1 CASA-Motilitätsparameter

Der Median der Gesamtmotilität verringerte sich von 90,7 % (Min: 70,9 %, Max: 98,4 %) bei 24 h bis auf 88,6 % (Min: 35,9 %, Max: 97,7 %) bei 72 h.

Die Progressivmotilität sank von 87,4 % (Min: 42,4 Max: 96,2) bei 24 h bis auf 83,1 % (Min: 20,1 %, Max: 97,1 %) bei 72 h (Tabellen 6 und 7).

Tab. 6: CASA-Motilitätsparameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) bei 17°C Lagerungstemperatur und 24 h Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern).

24 h	Mot.ges.	Mot.prog	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF
Median	90,7	87,4	67,1	122,9	52,3	3,1	34,0
Min	70,9	42,4	25,0	43,8	19,7	1,0	17,6
Max	98,4	96,2	94,2	166,4	80,9	5,0	42,2
MW	89,9	85,3	66,5	117,9	51,3	3,1	33,5
SD	4,2	6,6	8,3	18,8	6,3	0,6	3,6

Mot.ges = Gesamtmotilität

Mot.prog = Anteil progressiv motiler Spermien

VSL = velocity straight-line

VCL = velocity curvilinear

VAP = velocity average path

ALH = amplitude of lateral head displacement

BCF = beat cross frequency

Tab. 7: CASA-Motilitätsparameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) bei 17°C Lagerungstemperatur und 72 h Lagerungsdauer (n = 78Ejakulate von 78 Ebern).

72h	Mot.ges	Mot.prog	VAP	VCL	VSL	ALH	BCF
Median	88,6	83,1	65,6	116,6	48,8	3,3	32,2
Min	35,9	20,1	27,3	42,0	22,1	1,5	14,4
Max	97,7	97,1	91,6	203,2	69,4	5,6	36,9
MW	83,2	78,6	63,9	118,1	48,5	3,3	30,9
SD	9,9	10,6	9,4	23,5	6,2	0,6	3,5

Mot.ges = Gesamtmotilität

Mot.prog = Anteil progressiv motiler Spermien

VSL = velocity straight-line

VCL = velocity curvilinear

VAP = velocity average path

ALH = amplitude of lateral head displacement

BCF = beat cross frequency

4.2.2 Morphologie und Membranintegrität

Der Median PI- und FITC-PNA-negativer Spermien (Tab 8) bei 17°C gelagerten Proben nach 24 h Lagerung lag bei 76,3 % (Min 39,8 Max 91,9).

Der Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS) lag bei 15,8 % (Min: 1,5 %, Max: 54,0 %) und der Anteil an Spermien mit Plasmotropfen bei 4,5 % (Min: 0,5 %, Max: 37,0 %).

Tab. 8: Membranintegrität und morphologische Parameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) bei 17 °C Lagerungstemperatur und 24 h Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern)

24h	Prox_PT	Dist_PT	PT	MAS	Memb.int.
MW	5,2	2,8	8,1	18,0	74,8
SD	5,3	2,3	6,5	9,6	8,68
Median	2,0	1,8	4,5	15,8	76,3
Min	0,0	0,0	0,5	1,5	39,8
Max	33,5	19,0	37,0	54,0	91,9

Prox_PT = Spermien mit proximalen Plasmotropfen (%)
 Dist_PT = Spermien mit distalen Plasmotropfen (%)
 PT = Plasmotropfen Gesamtzahl (%)
 MAS = Morphologisch abweichende Spermien (%)
 Memb.int. = Membranintakte Spermien (%)

4.2.3 Allgemeine und spezifische Reaktivität auf Bikarbonat und Calcium in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer

Die Reaktivität wurde anhand der PI- und Fluo-3-negativen Spermien in den einzelnen Medien berechnet.

In Tyr_{BikCa} stieg der Median der R₆₀ auf Basis der PI-negativen und Fluo-3-negativen Spermienpopulation (Tabelle 9) von 56,2 % (Min: 16,5 %, Max: 74,4%) nach 24 h auf 57,5 % (Min: 18,9 %, Max: 78,1 %) nach 96 h Lagerungsdauer (p < 0,05) an. In Tyr_{Ca} stieg der Median von 7,9 % (Min: -1,8 %, Max: 23,0 %) nach 24 h auf 21,3 % (Min: 4,5 %, Max: 65,1 %) nach 96 h Lagerungsdauer an (p < 0,05; Tabelle 9).

Der Median der R_{60Bik} sank von 48,1 % (Min: 3,4 %, Max: 69,3 %) nach 24 h auf 31,4 % (Min: 3,1 %, Max: 57,2 %) nach 96 h Lagerung (p < 0,05; Tabelle 10).

Ergebnisse

Der Median der R_{60Ca} stieg von 3,8 % (Min: -4,1 %, Max: 16,1 %) nach 24 h auf 13,0 % (Min: -12,1 %, Max: 41,8 %) nach 96 h Lagerung ($p < 0,05$; Tabelle 10).

Tab. 9: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) berechnet anhand der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) in Abhängigkeit von Inkubationsmedium und Lagerungsdauer ($n = 78$ Ejakulate von 78 Ebern).

R_{60}	Tyr _{BikCa}		Tyr _{Kontr}		Tyr _{Ca}	
	24h	96h	24h	96h	24h	96h
MW	53,7	54,6	4,6	11,4	9,0	24,9
SD	11,0	10,8	2,8	8,5	4,3	10,1
Median	56,2	57,5	3,8	6,8	7,9	21,3
Min	16,5	18,9	-5,1	-0,3	-1,8	4,5
Max	74,4	78,1	17,7	72,3	23,0	65,1

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontrolle} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Tab. 10: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat und Calcium berechnet anhand der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer (R_{60Bik} & R_{60Ca}). Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C. ($n = 78$ Ejakulate von 78 Ebern)

Spezifische Reaktivität	R_{60Bik}		R_{60Ca}	
	24h	96h	24h	96h
MW	44,7	29,7	4,4	13,5
SD	12,1	13,3	3,5	7,3
Median	48,1	31,4	3,8	13,0
Min	3,4	3,1	-4,1	-12,1
Max	69,3	57,2	16,1	41,8

4.2.4 Korrelationen zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat und anderen spermatologischen Parametern

Eine vollständige Auflistung aller Korrelationen ist in den Tabellen 22 und 23 im Anhang der Arbeit dargestellt. Im Folgenden sind einige ausgewählte Ergebnisse aufgeführt.

Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermienpopulation bei 24 h korrelierte nur schwach positiv mit der Progressivmotilität ($r = 0,26$, $p < 0,05$; Abbildung 6) und der Membranintegrität nach 24 h ($r = 0,27$, $p < 0,05$; Abbildung 7).

Eine deutlich negative Korrelation bestand zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermienpopulation bei 24 h und dem Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS) in der Besamungsportion zu diesem Zeitpunkt ($r = -0,70$, $p < 0,0001$; Abbildung 8). Eine ähnlich hohe negative Korrelation bestand zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermienpopulation bei 24 h und dem Anteil Spermien mit Plasmotropfen ($r = -0,61$, $p < 0,0001$; Abbildung 9).

Der Wert für die spezifische Reaktivität der Spermien auf Bikarbonat nahm mit der Lagerung signifikant ab. Es bestand eine mäßig positive Korrelation für diesen Parameter bei 96 h und bei 24 h ($r = 0,54$, $p < 0,0001$; Abbildung 10).

Ergebnisse

Abb. 6: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und der Progressivmotilität bei 24 h (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern)

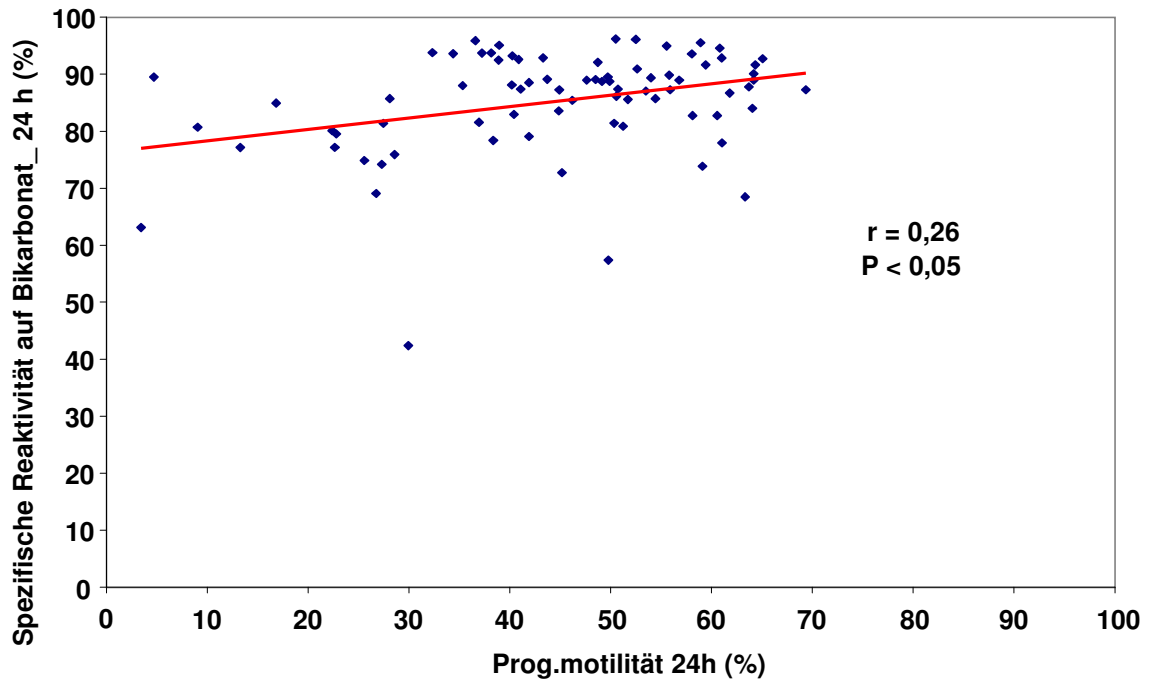
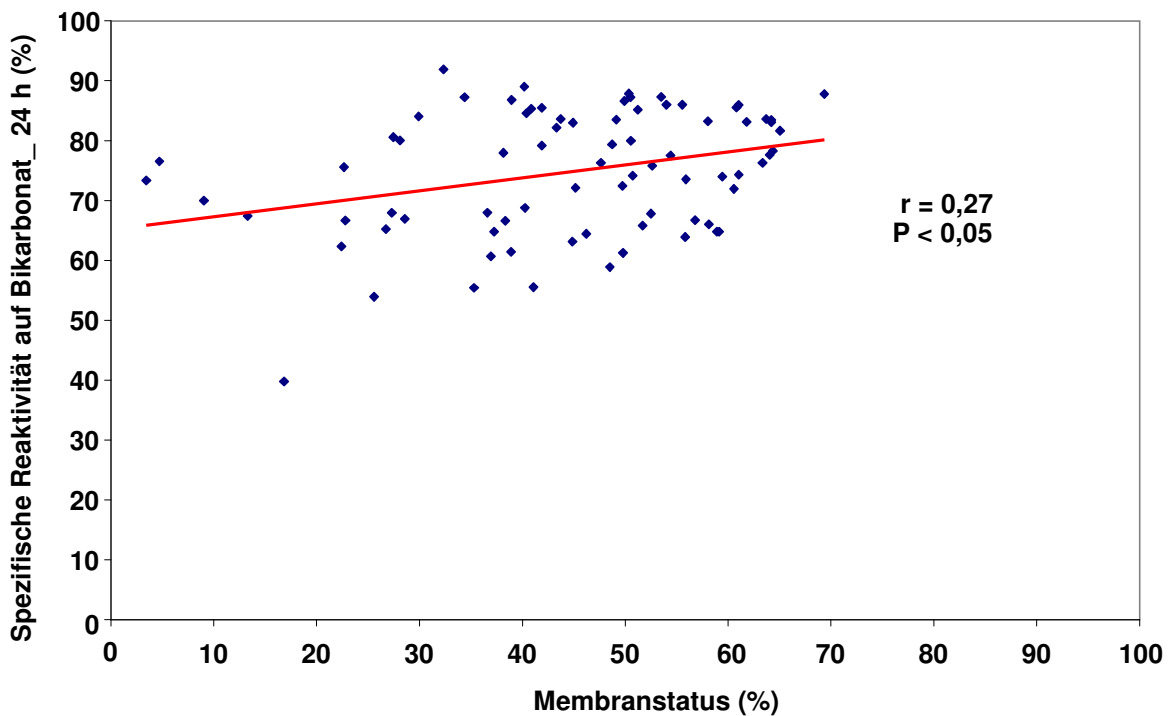


Abb. 7: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und der Membranintegrität bei 24 h (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern)



Ergebnisse

Abb. 8: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und dem Anteil morphologisch abweichender Spermien bei 24 h (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern)

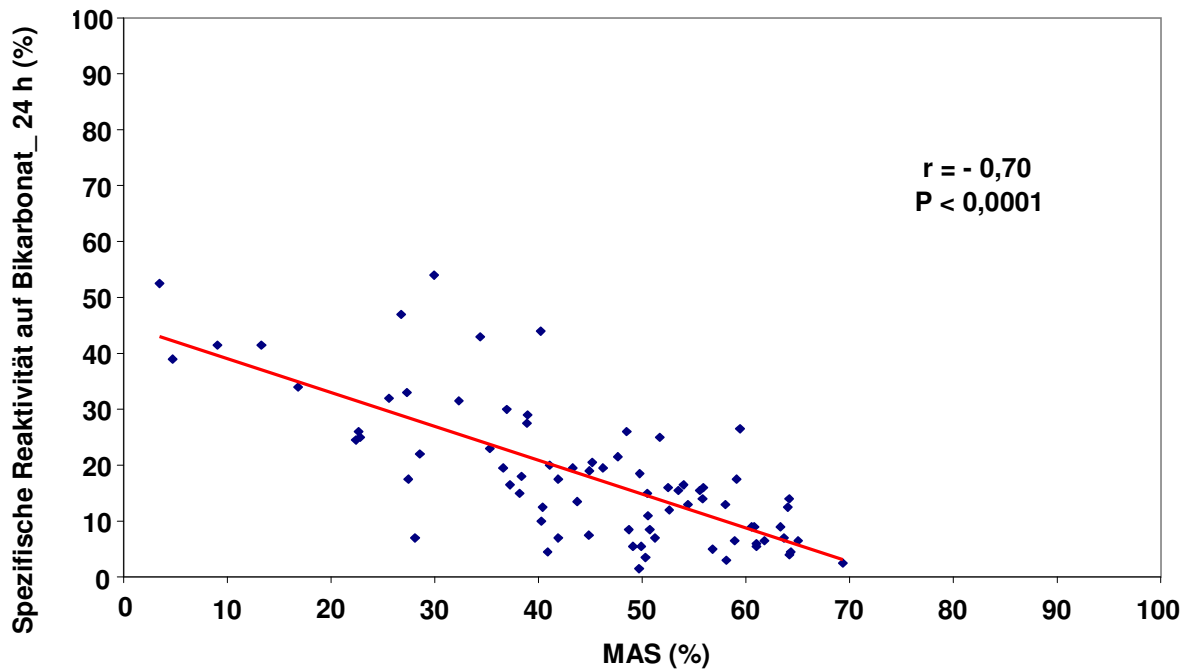
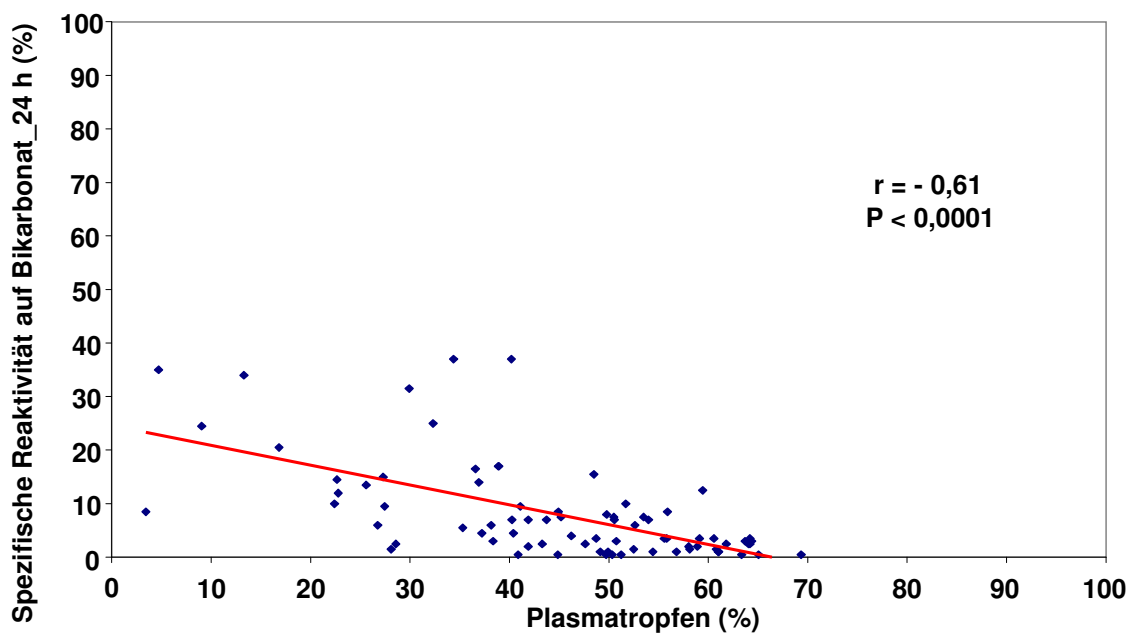
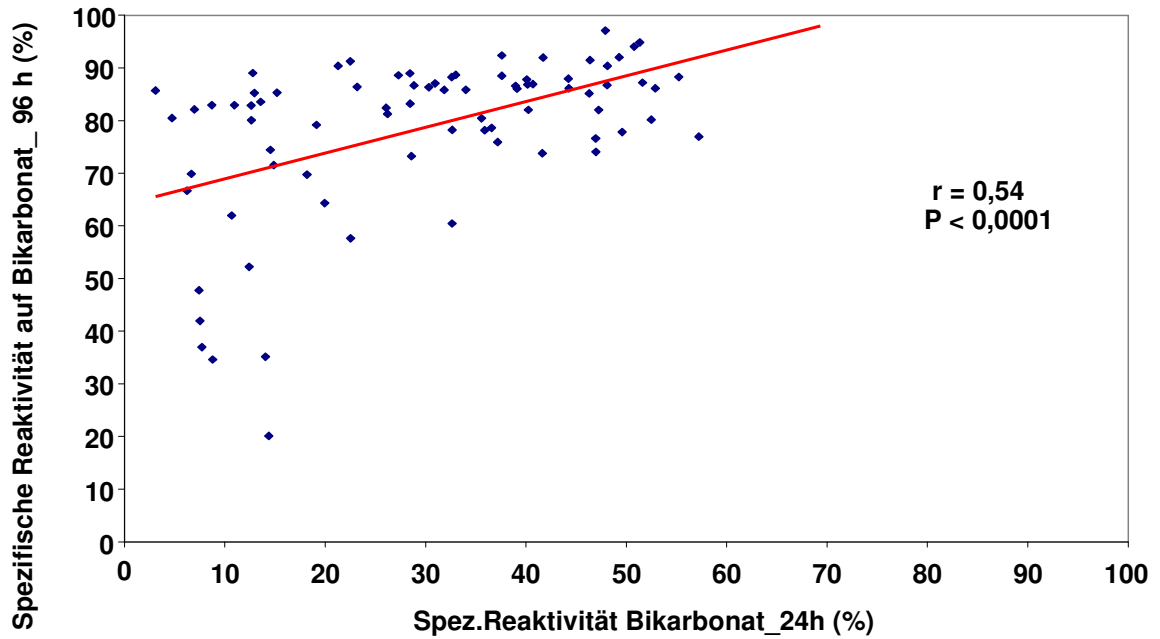


Abb. 9: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und dem Anteil an Spermien mit Plasmotropfen bei 24 h (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern)



Ergebnisse

Abb. 10: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und bei 96 h (n = 78 Ejakulate von 78 Ebern).



5 Diskussion

Standardspermatologische Parameter gelten als nicht ausreichend empfindlich, um funktionelle Veränderungen konservierter Eberspermien nach Lagerung und Abkühlung aufzuzeigen. Kürzlich wurde in dem Labor der Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken ein Assay entwickelt, der Konservierungseinflüsse auf gelagerte Eberspermien sensitiv darstellt (HENNING et al. 2012, SCHMID et al. 2013a). Dabei wird die Reaktivität von Eberspermien auf Kapazitationsstimuli, vor allem auf Bikarbonat, untersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es, mit einem vereinfachten Assay zu untersuchen, ob die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat einen Parameter darstellt, der eberindividuelle Unterschiede in der Lagerfähigkeit von verdünntem Ebersamen erfasst (Experiment 1). Im zweiten Versuchsteil wurde anhand eines großen Probenpools aus Besamungsportionen von Stationsebern Daten für diesen Parameter für fertile, im Besamungseinsatz stehende Eber erhoben und geprüft, ob der Parameter der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat mit Parametern der Standardspermatologie korreliert (Experiment 2).

Eines der wesentlichen Kennzeichen befruchtungsfähiger Eberspermien ist die Fähigkeit zur Kapazitation, welche *in vitro* u. a. durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen während der Inkubation in einem kapazitationsfördernden Medium gemessen werden kann (HARRISON et al. 1993). Bikarbonat wird sowohl *in vivo* (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 2005, GADELLA u. VAN GESTEL 2004) als auch *in vitro* (HARRISON u. GADELLA 2005) eine wesentliche Rolle bei der Induktion der Kapazitation beigemessen. Das Fortbestehen der Ansprechbarkeit der Spermien auf Bikarbonat während der Lagerung gilt daher als essentiell für die Befruchtungsfähigkeit des verdünnten und konservierten Samens (HARRISON et al. 1996). Durch die parallele Inkubation in unterschiedlichen Kapazitations- und Kontrollmedien lässt sich die spezifische Reaktivität der Spermien auf Bikarbonat und/oder Calcium auf Subpopulationsebene unter Berücksichtigung der Membranintegrität bestimmen (HENNING 2009).

In dieser Studie nahm die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat, berechnet anhand der Population der plasmamembranintakten Spermien mit niedrigem Calciumgehalt

(PI-negativ/ Fluo-3-negativ), mit sinkender Lagerungstemperatur ab ($p < 0,05$). Eine zunehmende Lagerungszeit bewirkte ebenfalls einen Abfall der spezifisch auf Bikarbonat reagierenden Spermienpopulation. Dies manifestierte sich bei 17 °C Lagertemperatur zwischen 72 und 120 Stunden und bei 5 °C bereits zwischen 24 und 72 Stunden Lagerung ($p < 0,05$). Die spezifische Reaktivität ist somit stärker von der Lagerungstemperatur als von der Dauer der Lagerung beeinflusst. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit der Studie von HENNING et al. (2012), die ebenfalls einen deutlichen Einfluss der Lagerungszeit bei 17 °C beschreiben. Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat sank kontinuierlich zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (12, 24, 72, 120 und 168 h). SCHMID et al. (2013) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Lagerungstemperaturen auf die spezifische Reaktivität auf Kapazitationsstimuli bei gleichzeitiger Anwesenheit von Bikarbonat und Calcium im Medium. Dabei beobachteten sie ebenfalls eine temperaturabhängige Reduktion dieses Parameters, während die Lagerungsdauer weniger Einfluss zeigte.

Die Abkühlung und Lagerung flüssig konservierten Ebersamens werden mit einer steigenden Permeabilität der Plasmamembranen für Calciumionen assoziiert (GREEN u. WATSON 2001). Durch die Berechnung der spezifischen Reaktivität auf Calcium konnte in der vorliegenden Arbeit die spezifisch auf Calcium reagierende Spermienpopulation von einer unspezifisch, d.h. unabhängig von Kapzitationsstimuli erfolgenden, destabilisierenden Population abgegrenzt werden. Mit zunehmender Lagerdauer reagierten in einem Calcium-haltigen Medium in Abwesenheit von Bikarbonat (Tyr_{Ca}) mehr Spermien mit einem Anstieg des intrazellulären Calciumgehaltes; somit nahm die destabilisierende Spermienpopulation in Anwesenheit von Calcium („spezifische Reaktivität auf Calcium“) berechnet anhand der PI- und Fluo-3-negativen Spermien mit steigender Lagerungsdauer zu, was in Übereinstimmung mit der Studie von HENNING et al. (2012) steht.

In der vorliegenden Studie kam ein vereinfachtes Protokoll des Ca^{2+} -Influx zur Anwendung, das sich im Vergleich zum Originalprotokoll (HARRISON et al. 1993) durch den Verzicht auf die Zentrifugation durch den PercollTM-Gradienten sowie auf den anschließenden Waschschrift in einem Saccharose-Medium auszeichnete. Während die Kurvenverläufe bei 17 °C Lager-temperatur dabei qualitativ den

Ergebnissen von HARRISON et al. (1993) und HENNING et al. (2012) entsprachen, wiesen in den bei 5 °C gelagerten Proben bereits zu Beginn der Inkubation in Tyr^{BikCa} und Tyr^{Ca} über 40 % der Spermien einen erhöhten intrazellulären Calciumgehalt bei gleichzeitiger Membranintegrität auf. SCHMID et al. (2013) beschreiben ebenfalls eine mit Absenken der Lagerungstemperatur zunehmende Population an destabilisierten Spermien zu Beginn der Inkubation in Tyrode-basierten Medien. Zwar war diese Population zahlenmäßig deutlich kleiner als in der vorliegenden Studie, jedoch führten die Autoren vor der Inkubation eine Zentrifugation durch einen PercollTM-Gradienten durch. In wie weit der Verzicht auf die Zentrifugation der Proben durch PercollTM einen Einfluss auf die initial höheren Werte an PI-negativen und Fluo-3-positiven Spermien hatte, kann nur vermutet werden. Für Bullenspermien ist jedoch beschrieben, dass nach der Zentrifugation durch PercollTM weniger membrandefekte Spermien im Pellet vorhanden waren (SUZUKI et al. 2003, RODRIGUEZ VILLAMIL et al. 2012), zudem war der Anteil motiler und morphologisch intakter Spermien erhöht (RODRIGUEZ VILLAMIL et al. 2012). Auch die Zentrifugation von frischem - oder aufgetauten Tiefgefrier-Ebersperma durch PercollTM führte zu einer Selektion motiler und membranintakter Spermien (MATAS et al. 2011, NOGUCHI et al. 2013). Somit ist es durchaus vorstellbar, dass in der vorliegenden Studie durch Verzicht auf die PercollTM-Zentrifugation auch membrandefekte bzw. -fragile Spermien verwendet wurden, die eine höhere Neigung zur Destabilisierung zeigen, als membranintakte Spermien.

Eine Begründung für den initial hohen intrazellulären Ca²⁺-Gehalt bei 5 °C gelagerten Spermien, könnte darin begründet liegen, dass die Spermien vor der Inkubation im Kapazitationsmedium bei 38 °C zweimal den Temperaturbereich der Phasentransition durchlaufen mussten. Der Phasenübergang der Spermienmembranen von der flüssigen in die Gelphase findet beim Eber im Bereich zwischen 30 °C und 10 °C statt (SCHMID et al. 2013, DROBNIS et al. 1993). Da die Membran aus unterschiedlichen Lipiden besteht, die unterschiedliche Transitionstemperaturen besitzen, kommt es während des Phasenübergangs zu Phasenseparation (Ausschluss von Lipiden mit niedrigeren Transitionstemperaturen aus Bereichen, die sich bereits in der Gelphase befinden) und Clusterung von Proteinen (DROBNIS et al. 1993), welche in der Folge ihre Funktion teilweise oder

ganz verlieren können. In diesem Zusammenhang ist es durchaus vorstellbar, dass Calciumkanäle ihre spezifische Permeabilität verlieren oder dass die Calcium-ATPase, die Calcium aktiv aus den Zellen befördert, ihre Funktion nicht mehr ausüben kann. Bei Wiedererwärmen sind diese Veränderungen nur teilweise reversibel (HOLT u. NORTH 1984), weshalb bei einzelnen Spermien Veränderungen in der Funktionalität, speziell der Fluidität und der Permeabilität der Plasmamembran für Ionen u. a. auch Calcium (MAXWELL u. JOHNSON 1997, DROBNIS et al. 1993, WATSON 1981) auftreten. GREEN und WATSON (2001) beobachteten, dass das ganze Ausmaß der abkühlungsbedingten Veränderungen erst nach Wiedererwärmen auf Körpertemperatur, wie es für die Messung der Kapazitation in vitro erforderlich ist, erkennbar wird.

Die Sensitivität der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat, lagerungsbedingte Veränderungen der Spermien darzustellen, geht über die der konventionellen Qualitätsparameter hinaus (HENNING et al. 2012, SCHMID et al. 2013); dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Membranintegrität und Motilität zeigten keine signifikanten Abnahmen während der Lagerung; lediglich die Lagerungstemperatur hatte einen signifikanten Einfluss.

Hinsichtlich der Fähigkeit Langzeitlagerung oder Abkühlung zu überstehen, scheinen zwischen den einzelnen Ebern standardspermatologisch erkennbare Unterschiede zu bestehen. In der Studie von HENNING et al. (2012) konnten auf der Basis von drei konsekutiven Ejakulaten rund 70 % der Varianz für das Merkmal der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat dem Faktor Eber zugeordnet werden. In der vorliegenden Studie ergab sich auf Basis der Standardspermatologie eine Eberspezifität für alle Lagerungsbedingungen für die Membranintegrität. Zusätzlich waren die Gesamt- und Progressivmotilität bei den bei 5°C gelagerten Proben eberspezifisch, sofern die Varianzkomponentenschätzung auf Basis von drei Ejakulaten je Eber durchgeführt wurde; wurden dagegen alle sechs über einen Zeitraum von sechs Wochen gewonnenen Ejakulate je Eber in die Berechnung mit einbezogen, konnte keine Eberspezifität nachgewiesen werden. Saisonale Effekte könnten hier eine Rolle spielen. Eine Eberspezifität für die R_{60} auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien in Tyr_{BikCa} (n= 3 Ejakulate) lag nach 6 h (20°C) und nach 24 h (17°C) Lagerungsdauer vor; die restlichen Zeitpunkte bei 17°C waren nicht

eberspezifisch. Bei 5°C Lagerungstemperatur war die Eberspezifität in allen drei Tyrode-basierten Medien nach 24 und 72 h vorhanden. Auf der Basis von sechs Ejakulaten lag eine Eberspezifität für die R_{60} auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien nur in Tyr_{Ca} bei 5°C Lagertemperatur vor; die restlichen Werte waren nicht eberspezifisch. Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R_{60Bik}) berechnet auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien war zu keinem Zeitpunkt eberspezifisch. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Varianzkomponentenschätzung auf der Basis von drei bzw. sechs Ejakulaten könnte darin begründet liegen, dass es eine relativ kleine, homogene Eberpopulation mit geringer Varianz war. Auffällig ist, dass eberindividuelle Unterschiede häufiger bei einer Lagerungstemperatur von 5°C auftraten, die eine stärkere Herausforderung für die Überlebensfähigkeit der Spermien darstellt. Eine eberindividuell unterschiedliche Sensitivität für Kälteschock ist seit längerem bekannt. Als ursächlich könnten Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas zum Tragen kommen, die zwischen den einzelnen Tierarten sowie zwischen Individuen innerhalb einer Tierart bestehen (STRZEZEK et al. 2005). Eine protektive Wirkung von Seminalplasma nutzten HERNANDEZ et al. (2007) zur Verbesserung der Spermatiefgefrierergebnisse. Sie gewannen Seminalplasma von Ebern, welche den Tiefgefrierprozess gut überstanden und fügten es dem Gefrierverdüner von Ebern zu, welche moderate oder schlechte Überlebensraten nach dem Auftauen hatten. Sie konnten damit die Auftauergebnisse signifikant verbessern.

Auch im zweiten Experiment, für das 78 Einzelejakulate aus insgesamt 13 Besamungsstationen untersucht wurden, konnten mit standardspermatologischen Parametern keine Unterschiede zwischen den Lagerungszeitpunkten detektiert werden. Die Reaktivität, berechnet anhand der PI- und Fluo-3-negativen Spermien, stieg in allen drei Tyrode-basierten Medien (Tyr_{BikCa} , $Tyr_{Kontrolle}$, Tyr_{Ca}), mit zunehmender Lagerungszeit an ($p < 0,05$), am deutlichsten war der Anstieg jedoch in Tyr_{Ca} . In Einklang mit den Ergebnissen aus Experiment 1 sank die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat nach der Lagerung; während die spezifische Reaktivität auf Calcium anstieg.

Die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI-negativen/Fluo-3-negativen Spermienpopulation bei 24 h korrelierte nur schwach positiv mit der Progressivmotilität und der Membranintegrität nach 24 h. Dagegen fand sich eine deutlich negative Korrelation für diesen Parameter und dem Anteil von Spermien mit Plasmatrophen. Generell besitzen alle Spermien einen proximalen Zytoplasmatropfen, wenn sie aus dem Hoden in den Nebenhodenkopf wandern. Während der Nebenhodenpassage reifen die Spermien und der Zytoplasmatropfen wandert entlang des Verbindungs- und Hauptstücks des Spermischwanzes nach distal. Schließlich wird er ganz abgestreift, während die Spermien ihre Fähigkeit zur aktiven Bewegung erhalten (ORGBIN-CRIST u. OLSON 1984, PRUNEDA et al. 2005). Im Ejakulat sind dann vorwiegend ausgereifte Spermien ohne Plasmatrophen enthalten (PRUNEDA et al. 2005). Die funktionelle Eigenschaften und die Bedeutung für die Fruchtbarkeit plasmatrophentragender Spermien werden in Literatur seit längerem kontrovers diskutiert. Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Resultate von FLESCHE et al. (2001), die durch die Anfärbung mit dem lipophilen Farbstoff Merocyanin 540 ein dem Calcium-Influx vorgeschaltetes Ereignis der Kapazitation, die Neuordnung der Lipide, untersuchten. Sie inkubierten Eberspermien ebenfalls in einem Bikarbonat-haltigen Kapazitationsmedium; Spermien mit Plasmatrophen zeigten im Gegensatz zu morphologisch unauffälligen Spermien jedoch keine Umverteilung der Lipide. Weiterhin stellten die Autoren nach Zellsortierung im Durchflusszytometer fest, dass in der Merocyanin-positiven Subpopulation keine Spermien mit Plasmatrophen vorhanden waren. Auch bei anderen Spezies ist die Funktionalität Plasmatrophen-tragender Spermien untersucht worden. So konnte gezeigt werden, dass humane Spermien mit Zytoplasmatropfen nach Inkubation in einem Kapazitationsmedium zwar meist eine intakte Plasmamembran besaßen, jedoch nicht in der Lage gewesen waren, Phosphatidylserin oder Phosphatidylethanolamin im Bereich der apikalen Plasmamembran zu exponieren (DE VRIES et al. 2003). In einer weiteren Studie war die Anzahl der Spermien, die an die Zona pellucida gebunden hatten bei drei Bullen mit einem erhöhten Anteil Spermien mit persistierenden proximalen Plasmatrophen (45-86 %) signifikant herabgesetzt im Vergleich zu Sperma eines Kontrollbullens ohne persistierende Plasmatrophen (THUNDATHIL et al. 2001). Interessanterweise wies keines dieser

gebundenen Spermien einen proximalen Plasmatrophen auf. Spermien eines Rüdenejakulates mit 96 % proximalen Zytoplasmatropfen banden signifikant schlechter an kanine Oozyten als die nicht plasmatrophen-tragenden Spermien eines Kontrollejakulates (PENA et al. 2007), obwohl in diesem Experiment einige Spermien mit persistierenden Zytoplasmatropfen an der Eizellenbindung beteiligt waren.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass die mit dem verwendeten Assay bestimmte spezifische Reaktivität auf Bikarbonat geeignet ist, lagerungsbedingte – insbesondere temperaturabhängige- funktionelle Unterschiede bei konservierten Eberspermien zu detektieren, die standardspermatologisch nicht erkennbar sind. Eine Eberspezifität war in der vorliegenden Studie bei einem vergleichsweise hohen Reaktivitätsniveau der normospermen Ejakulate nicht nachweisbar; allerdings wird empfohlen, Versuche unter Verwendung einer höheren Probandenzahl mit stärker streuenden Reaktivitätswerten durchzuführen. Interessanterweise bestand eine deutlich negative Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität und dem Anteil an Spermien mit Plasmatrophen, die auf eine beeinträchtigte Kapazitationsfähigkeit dieser als unreif angesehenen Spermienpopulation hinweist.

6 Zusammenfassung

Alex Bauer (2013):

Untersuchungen zur Reaktivität auf Kapazitationsstimuli bei hypotherm konservierten Eberspermatozoen

Standardspermatologische Parameter sind häufig zu unempfindlich, um Konservierungseinflüsse auf Eberspermien zu diagnostizieren. Kürzlich wurde daher in hiesigem Institut ein Assay etabliert, der die Reaktivität von Eberspermien auf Kapazitationsstimuli erfasst und sich als sensitiv zur Darstellung von Lagerungseinflüssen erwies. Der Reaktivitätsassay beruht auf der mehrmaligen Messung des intrazellulären Calciumgehaltes mittels Durchflusszytometrie während einer 60-minütigen Inkubation in drei Varianten eines kapazitationsfördernden Tyrode-Mediums. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Eberspezifität für diesen spermatologischen Parameter bei hypotherm langzeitkonserviertem Sperma besteht (Experiment 1) und in welchen Bereichen die Reaktivitätswerte bei in Besamungsstationen aufbereitetem Sperma 24 Std. nach der Verdünnung liegen (Experiment 2). Darüber hinaus wurde die Beziehung zu standardspermatologischen Kriterien ermittelt.

An sechs in wöchentlichen Abständen gewonnenen und mit BTS – Medium verdünnten Spermaproben von sieben institutseigenen Ebern ($n = 42$ Ejakulate) wurden folgende Ergebnisse erzielt (Experiment 1): Lagerung bis zu 120 Std. führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Abnahme der spezifisch auf den Kapazitationsstimulus Bikarbonat reagierenden Spermienpopulation. Dies zeigte sich bei einer Lagerungstemperatur von 17°C nach 72 Std. ($R_{60\text{Bik}} = 37,5 \%$), während bei 5°C bereits nach 24 Std. signifikant niedrigere Werte ($R_{60\text{Bik}} = 12,6 \%$) als bei frisch verdünntem Sperma ($R_{60\text{Bik}} = 49,9 \%$) beobachtet wurden. Generell hatte die Lagerungstemperatur einen stärkeren Effekt als die Lagerungsdauer, dies galt auch für die mittels computer-gestützter Spermienanalyse erhobenen kinetischen Parameter. Die Varianzkomponentenschätzung ergab keine Eberspezifität hinsichtlich des spezifischen Reaktivitätsparameters $R_{60\text{Bik}}$. Lediglich die Membranintegrität war eberspezifisch sowie die Motilitätswerte einer Untergruppe von Ejakulaten (Nr. 1 bis

3), die bei 5°C gelagert wurden. Zu berücksichtigen ist, dass alle Ejakulate normosperm waren und die Versuchseber eine relativ kleine Varianz in den spermatologischen Merkmalen aufwiesen. Eine lagerungsdauer-abhängige Reduktion der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat und anderer Reaktivitätsparameter wurde auch bei 78 verdünnten und 17°C gehaltenen Besamungsportionen aus 13 Eberstationen festgestellt (Experiment 2). Die spezifische Reaktivität war mit Motilität und Membranintegrität nur schwach korreliert ($r = 0,26$ bzw. $0,27$, $p < 0,05$), während eine deutliche negative Korrelation zu dem Anteil morphologisch abweichender Spermien ($r = -0,7$, $p < 0,001$), insbesondere zum Anteil an Spermien mit Plasmotropfen ($r = -0,61$, $p < 0,001$) bestand.

Schlussfolgernd wird festgestellt, dass die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat einen sensitiven Parameter zur Erkennung von Lagerungseinflüssen auf konserviertes Ebersperma darstellt, der bei normospermen Tieren mit geringer Varianz keine Eberspezifität aufweist. Besonders Ejakulate mit erhöhtem Vorkommen an plasmatrophen Spermien erscheinen in ihrer Fähigkeit auf Kapazitationsstimuli zu reagieren, beeinträchtigt.

7 Summary

Alex Bauer (2013):

Investigations on the responsiveness to capacitation stimuli in hypothermically stored boar spermatozoa

Standard spermatology is not sensitive enough to indicate storage influences on liquid preserved boar spermatozoa. Recently, an assay was established in this institute which measures the reactivity of boar sperm to capacitation stimuli. The assay proved to be a sensitive tool for detection of storage-dependent alterations of sperm function. Semen samples are incubated for 60 minutes in three variants of capacitating Tyrode's medium and assessed for intracellular calcium concentration using a flow cytometer. The aim of the present study was to examine whether the reactivity assay yields boar specific results (Experiment 1), and to evaluate the specific reactivity to capacitation stimuli in a larger number of diluted semen samples from 13 commercial artificial insemination (AI) centers (Experiment 2). Moreover, the relationship between the reactivity values and conventional spermatology was determined.

Six ejaculates were collected from each of seven boars in weekly intervals and diluted with BTS extender ($n = 42$ ejaculates; Experiment 1). Specific reactivity to bicarbonate as a capacitation stimulus decreased significantly ($p < 0.05$) during storage for 120 h. Compared to fresh semen ($R_{60\text{Bik}} = 49.9\%$), reactivity decreased after 72 h for samples stored at 17°C ($R_{60\text{Bik}} = 37.5\%$), and after 24 h for samples stored at 5°C ($R_{60\text{Bik}} = 12.6\%$); $p < 0.05$. Generally, storage temperature showed a stronger effect than the duration of storage; this held true also for kinetic measures determined by computer-assisted sperm analysis. The reactivity parameter $R_{60\text{Bik}}$ was not boar specific. Boar specificity was only found for membrane integrity and for motility in a subgroup of ejaculates (No. 1 to 3) stored at 5°C . It has to be considered, however, that only normospermic ejaculates with little variance in sperm measures were used. Similar to results from experiment 1, in experiment 2 specific reactivity to bicarbonate decreased during long-term storage of 78 diluted semen samples at 17°C . The reactivity parameter showed only low correlation with motility ($r = 0.26$;

P<0.05) and membrane integrity ($r = 0.27$; $P<0.05$). In contrast, this parameter revealed a clear negative correlation with the proportion of morphological abnormal sperm ($r = -0.7$, $P<0.001$), particularly with the proportion of sperm bearing cytoplasmic droplets ($r = -0.61$, $P<0.001$).

In conclusion, the assessment of the specific responsiveness to capacitating stimuli proved to be a sensitive tool for detection of storage-dependent alterations in functionality of liquid preserved boar spermatozoa. Boar specificity for the reactivity parameter in normospermic males is low. An enhanced incidence of cytoplasmic droplets is accompanied by a reduced responsiveness indicating the importance of sperm maturation for capacitation-associated events.

8 Literaturverzeichnis

ALTHOUSE, G. C., M. E. WILSON, C. KUSTER u. M. PARSLEY (1998):

Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen.

Theriogenology 50, 535-543

ALTHOUSE, G. C., C. E. KUSTER, S. G. CLARK u. R. M. WEISIGER (2000):

Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen.

Theriogenology 53, 1167-1176

ARNOULT, C., I. G. KAZAM, P. E. VISCONTI, G. S. KOPF, M. VILLAZ u. H. M. FLORMAN (1999):

Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation.

Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 6757-6762

ASHWORTH, P. J. C., R. A. P. HARRISON N. G. A. MILLER, J. M. PLUMMER u. P. F. WATSON (1995):

Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectinbinding in boar and ram sperm populations.

Mol. Reprod. Dev. 40. 164-176

CARR, D. W., A. FUJITA, C. L. STENTZ, G. A. LIBERTY, G. E. OLSON u. S. NARUMIYA (2001):

Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA.

J. Biol. Chem 276, 17332-17338

CROSS, N. L. (2004):

Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm.

Biol. Reprod. 71, 1367-1373

DE AMBROGI, M., M. SPINACI, G. GALEATI u. C. TAMANINI (2006a):

Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa.

Theriogenology. 66, 1994-2000

DEMARCO, I. A., F. ESPINOSA, J. EDWARDS, J. SOSNIK, J.L. DE LA VEGA-BELTRAN, J. W. HOCKENSMITH, G. S. KOPF, A. DARSZON u. P. E. VISCONTI (2003):

Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation.

J. Biol. Chem. 278, 7001-7009

DE VRIES, K. J., T. WIEDMER, P. J. SIMS u. B. M. GADELLA (2003):

Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells.

Biol. Reprod. 68, 2122-2134

DIRKSEN, G. (1991):

Langzeiteinsatz von Eberflüssigsperma unter besonderer Berücksichtigung von Lagerungsdauer, Verdünnermedium und Samenspender.

Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover

DROBNIS, E. Z., L. M. CROWE, T. BERGER, T. J. ANCHORDOGUY, J. W. OVERSTREET u. J. H. CROWE (1993):

Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model.

J. Exp. Zool. 265, 432-437

DUBE, C., M. BEAULIEU, C. REYES-MORENO, C. GUILLEMETTE u. J. L. BAILEY (2004):

Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation.

Theriogenology 62, 874-886

ESTIENNE, M. J., A. F. HARPER u. J. L. DAY (2007):

Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 degrees C.

Reprod. Biol. 7, 221-231

FICARRO, S., O. CHERTIHIN, V. A. WESTBROOK, F. WHITE, F. JAYES, P. KALAB, J. A. MARTO, J. SHABANOWITZ, J. C. HERR, D. F. HUNT u. P. E. VISCONTI (2003):

Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation.

J. Biol. Chem. 278, 11579-11589

FLESCH, F. M., W. F. VOORHOUT, B. COLENBRANDER, L. M. VAN GOLDE u. B. M. GADELLA (1998):

Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity.

Biol. Reprod. 59, 1530-1539

FLESCH, F. M. u. B. M. GADELLA (2000):

Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.

Biochim. Biophys. Acta 1469, 197-235

FLESCH, F. M., J. F. BROUWERS, P. F. NIEVELSTEIN, A. J. VERKLEIJ, L. M. VAN GOLDE, B. COLENBRANDER u. B. M. GADELLA (2001):

Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane.

J. Cell. Sci. 114, 3543-3555

FLORMAN, H. M., M. E. CORRON, T. D. KIM u. D. F. BABCOCK (1992):

Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis.

Dev. Biol. 152, 304-314

FLOWERS, W.L. (1997):

Management of boars for efficient semen production.

J. Reprod. Fert. (suppl. 52): 67-78

GADELLA, B. M., T. W. Jr. GADELLA, B. COLENBRANDER, L. M. VAN GOLDE u. M. LOPES-CARDOZO (1994):

Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon.

J. Cell. Sci. 107, 2151-2163

GADELLA, B. M., M. LOPES-CARDOZO, L. M. VAN GOLDE, B. COLENBRANDER u. T. W. Jr. GADELLA (1995):

Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa.

J. Cell. Sci. 108, 935-946

GADELLA, B. M. u. R. A. HARRISON (2000):

The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane.

Development 127, 2407-2420

GADELLA, B. M. u. R. A. HARRISON (2002):

Capacitation induces cyclic adenosine 3'5' monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells.

Biol. Reprod. 67, 340-350

GADELLA, B. M. u. R. A. VAN GESTEL (2004):

Bicarbonate and its role in mammalian sperm function.

Anim. Reprod. Sci. 82-83, 307-319

GREEN, C. E. u. P. F. WATSON (2001):

Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation.

Reproduction 122, 889-898

GUTHRIE, H. D., G. R. WELCH u. J. A. LONG (2008):

Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility.

Theriogenology 70, 1209-1215

JAGANNATHAN, S., S. J. PUBLICOVER u. C. L. BARRATT (2002):

Voltage-operated calcium channels in male germ cells.

Reproduction. 123, 203-215

HANOUNE, J. u. N. DEFER (2001):

Regulations and role of adenylyl cyclase isoforms.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 41, 145-174

HARRISON, R. A. (1996):

Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals.

Reprod. Fertil. Dev. 8, 581-594

HARRISON, R. A. (2004):

Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate.

Mol. Reprod. Dev. 67, 337-352

HARRISON, R. A. P., B. MAIRET u. N. G. A. MILLER (1993):

Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca²⁺ influx in boar sperm populations.

Mol. Reprod. Dev. 35, 197-208

HARRISON, R. A., P. J. ASHWORTH u. N. G. MILLER (1996):

Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes.

Mol. Reprod. Dev. 45, 378-391

HARRISON, R. A. u. N. G. MILLER (2000):

cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm.

Mol. Reprod. Dev. 55, 220-228

HARRISON, R. A. P. u. B. M. GADELLA (2005):

Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation.

Theriogenology 63, 342-351

HENNING, H. (2009):

Charakterisierung der funktionellen Integrität konservierter Eberspermatozoen in dynamischen Testsystemen

Dissertationsschrift, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover

HENNING, H., A. M. PETRUNKINA, R. A. P. HARRISON u. D. WABERSKI (2012):
Bivalent response to long-term storage in liquid-preserved boar semen: A flow
cytometric analysis.

Cytometry A 81 (7), 576-587

HERRMANN, B. G., B. KOSCHORZ, K. WERTZ, K. J. MC LAUGHLIN u. A.
KISPERT (1999):

A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian
inheritance.

Nature 402, 141,146

HERNANDEZ, M. H., J. ROCA, J. J. CALVETE, L. SANZ, T. MUINO-BLANCO, J. A.
CEBRIAN-PEREZ, J. M. VAZQUEZ u. E. A. MARTINEZ (2007):

Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar
spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars.

J. Androl. 28, 689-697

HOLT, W.V. (1997):

Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa.

Reprod. Fertil. Dev. 9 (3):309-19.

HOLT W. V. u. R. D. NORTH (1984):

Partially irreversible cold-induced lipid phasetransitions in mammalian sperm plasma
membrane domains: freeze-fracture study.

J. Exp. Zool. 230, 473-483

HOLT, W. V. u. R. A. HARRISON (2002):

Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent
pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies
in protein kinase A activation.

J. Androl. 23, 557-565

HOLT, W. V. u. A. MEDRANO (1997):

Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage.

J. Reprod. Fertil. 52, 213-222

HURTGEN, J.P. (1984):

Reproductive examination of the boar.

J. Soc. Theriogenol. 8, 1-48

JOHNSON, L. A., K. F. WEITZE, P. FISER u. W. M. C. MAXWELL (2000):

Storage of boar semen.

Anim. Reprod. Sci. 62, 143-172

KOMMISRUUD, E., H. PAULENZ, E. SEHESTED u. I. S. GREVLE (2002):

Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days.

Act. Vet. Scand. 43, 49-55

KRAUSE, D. (1966):

Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Habil-Schr.

KUMARESAN, A., G. KADIRVEL, K. M. BUJARBARUAH, R. K. BARDOLOI, A. DAS, S. KUMAR u. S. NASKAR (2009):

Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa.

Anim. Reprod. Sci. 110, 162-171

LITVIN, T. N., M. KAMENETSKY, A. ZARIFYAN, J. BUCK u. L. R. LEVIN (2003):

Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate.

J. Biol. Chem. 278, 15922-15926

MATAS, C., L. VIEIRA, F. A. GARCIA-VAZQUEZ, K. AVILES-LOPEZ, R. LOPEZ-UBEDA, J. A. CARVAJAL u. J. GADEA (2011):

Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function.

Anim. Reprod. Sci. 127, 62-72

MAXWELL, W. M. u. L. A. JOHNSON (1997):

Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation.

Mol. Reprod. Dev. 46, 408-418

MAYORGA, L. S., C. N. TOMES u. S. A. BELMONTE (2007):

Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion.

IUBMB Life 59, 286-292

MEHATS, C., C.B. ANDERSEN, M. FILOPANTI, S.L. JIN u. M. CONTI (2002):

Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling.

Trends Endocrinol. Metab. 13 (1), 29-35

NOGUCHI, M., K. YOSHIOKA, H. HIKONO, G. IWAGAMI, C. SUZUKI u. K. KIKUCHI (2013):

Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm.

Zygote 1-8

OKAMURA, N., Y. TAJIMA, A. SOEJIMA, H. MASUDA u. Y. SUGITA (1985):

Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase.

J. Biol. Chem 260, 9699-9705

ORGEBIN-CRIST, M. C. u. G. E. OLSON (1984):

The male in farm animal reproduction.

n: Courot, M. (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 80-102

PAULENZ, H., E. KOMMISRUUD u. P. O. HOFMO (2000):

Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen.

Reprod. Domest. Anim. 35, 83-87

PENA, A.I., M. BARRIO, J.J. BECERRA, L.A. QUINTERA, P.G. HERRADON (2007):

Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate: investigation of the significance for sperm functionality in vitro.

Reprod Domest Anim 42, 471-8.

PETRUNKINA, A. M., G. VOLKER, K. F. WEITZE, M. BEYERBACH, E. TÖPFER-PETERSEN u. D. WABERSKI (2005):

Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions.

Theriogenology 63, 2278-99.

PETRUNKINA, A. M., G. VOLKER, K. F. WEITZE, M. BEYERBACH, E. TÖPFER-PETERSEN u. D. WABERSKI (2005c):

Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions.

Theriogenology 63, 2278-2299

PETRUNKINA, A. M. u. R. A. P. HARRISON (2010):

Systematic misestimation of cell subpopulations by flowcytometry: a mathematical analysis.

Theriogenology 73, 839-847

PRUNEDA, A., E. PINART, M. D. BRIZ, S. SANCHO, N. GARCIA-GIL, E. BADIA, E. KADAR, J. BASSOLS, E. BUSSALLEU, M. YESTE u. S. BONET (2005):

Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars.

Theriogenology 63, 2219-2232

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., F. SARAVIA, M. WALLGREEN, P. TIENTHAI, A. JOHANNISSON, J. M. VAZQUEZ, E. MARTINEZ, J. ROCA, L. SANZ u. J. J. CALVETE (2005):

Boar spermatozoa in the oviduct.

Theriogenology 63, 514-535

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. and A. D. BARTH (2007):

In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility.

Soc Reprod Fertil Suppl 6, 39-54

RODRIGUEZ VILLAMIL, P., H. WEI, G. MOREIRA, M. CACCIA, M. FERNANDEZ TARANCO u. G. A. BO (2012):

Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll.

Theriogenology 78, 165-171

SAACKE, R. G. (1970):

Morphology of the sperm and its relationship to fertility.

Prec. Third Technical Conf. on Artif. Insem. and Reprod. p. 17

SCHMID S., H. HENNING, H. OLDENHOF, W. F. WOLKERS, A. PETRUNKINA, and D. WABERSKI. (2013a):

The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermally stored boar spermatozoa.

Andrology 1; 376-386

SCHMID S., HENNING H., PETRUNKINA A., WEITZE K. F., and D. WABERSKI (2013b):

Response to capacitating stimuli indicates extender-related differences in boar sperm function.

J. Anim. Sci. 91, 1-9. doi:10.2527/jas2013-6287

STRZEZEK, J., P. WYSOCKI, W. KORDAN, M. KUKLINSKA, M. MOGIELNICKA, D. SOLIWODA u. L. FRASER (2005):

Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction.

Reprod. Biol. 5, 279-290

SUZUKI, K., A. ASANO, B. ERIKSSON, K. NIWA, T. NAGAI u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2002):

Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte complexes conditioned medium and hyaluronan.

Int. J. Androl 25, 84-93

SUZUKI, K., M. GESHI, N. YAMAUCHI, T. NAGAI (2003):

Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll.

Anim. Reprod. Sci. 77, 157-172

TARDIF, S., M.A. SIRARDMA, R. SULLIVAN, JL BAILEY (1999):

Identification of capacitation-associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated with ATP-gamma-(32) P.

Mol. Reprod. Dev. 54 (3):292-302.

TAS, J. u. G. WESTERNENG (1981):

Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nuclei acids studied in a model system of polyacrylamide films.

J. Histochem. Cytochem. 29, 929-936

TOMES, C. N. (2007):

Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis.

Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 65, 275–291

THUNDATHIL, J., A. T. PALASZ, A. D. BARTH u. R. J. MAPLETOFT (2001):

The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets.

Anim. Reprod. Sci. 65, 181-192

TSAI, P. S., K. J. DE VRIES, M. DE BOER-BROUWER, N. GARCIA-GIL, R. A. VAN GESTEL, B. COLENBRANDER, B. M. GADELLA u. T. VAN HAEFTEN (2007):

Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells.

Mol. Membr. Biol. 24, 313-324

TSAI, P. S., N. GARCIA-GIL, T. VAN HAEFTEN u. B. M. GADELLA (2010):

How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane.

PLoS ONE 5(6): e11204. doi:10.1371/journal.pone.0011204

TURNER, R. M., R. L. ERIKSSON, G.L. GERTON u. S. B. MOSS (1999):

Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro hAKAP82 and hAKAP82.

Mol. Hum. Reprod. 5, 816-824

VADNAIS, M. L., H. L. GALANTINO-HOMER u. G. C. ALTHOUSE (2007):

Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation.

Arch. Androl. 53, 109-123

VAN DUIJN, C jr. (1971):

Relationship between seminal characteristics and fertilization capacity.

Dtsch Tierarztl Wochenschr. 78 (4), 134-9

VAN GESTEL, R. A., I. A. BREWIS, P. R. ASHTON, J. B. HELMS, J. F. BROUWERS
u. B. M. GADELLA (2005):

Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells.

Mol. Hum. Reprod. 11, 583-590

VAN GESTEL, R. A., I. A. BREWIS, P. R. ASHTON, J. F. BROUWERS u. B. M.
GADELLA (2007):

Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte.

Mol. Hum. Reprod. 13, 445-454

VAZQUEZ, J. M., E. A. MARTINEZ, J. ROCA, C. MATAS u. O. BLANCO (1998):

The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen.

Repr. Dom. Anim. 33, 267-270

VISCONTI, P. E. u. G. S. KOPF (1998):

Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation.

Biol. Reprod. 59, 1-6

VISCONTI, P. E., X. P. NING, M. W. FORNES, J. G. ALVAREZ, P. STEIN, S. A.
CONNORS u. G. S. KOPF (1999a):

Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation.

Dev. Biol. 214, 429-443

VISCONTI, P. E, H. GALANTINO-HOMER, X. P. NING, G. D.MOORE, J. P. VALENZUELA, C. J. JORGEZ, J. G. ALVAREZ u. G. S. KOPF (1999b):

Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation.

J. Biom. Chem. 274, 3235-3242

VISCONTI, P. E., V. A. WESTBROOK, O. CHERTIHIN, I. DEMARCO, S. SLEIGHT u. A. B. DIEKMAN (2002):

Novel signalling pathways involved in spermacquisition of fertilizing capacity.

J. Reprod. Immunol. 53, 133-150

VYT, P., D. MAES, E. DEJONCKHEERE, F.CASTRYCK u. A. VAN SOOM (2004):

Comparative study on five different commercial extenders for boar semen.

Reprod. Domest. Anim. 39, 8-12

VOS, J. P., M. LOPES-CARDOZO u. B. M. GADELLA (1994):

Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids.

Biochim. Biophys. Acta 1211, 125-149

WABERSKI, D., K. F. WEITZE, C. LIETMANN, W. L. ZURLAGE, F. P. BORTOLOZZO, T. WILLMEN u. R. PETZOLDT (1994):

The Initial Fertilizing-Capacity of Long-Term-Stored Liquid Boar Semen Following Preovulatory and Postovulatory Insemination.

Theriogenology 41, 1367-1377

WABERSKI D., H. HENNING, and A.M. PETRUNKINA (2011):

Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen.

Reprod. Domest. Anim. 46 Suppl 2: 45-48.

WATERHOUSE, K. E., P. M. DE ANGELIS, T. HAUGAN, H. PAULENZ, P. O. HOFMO u. W. FARSTAD (2004):

Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry.

Theriogenology 62, 1638-1651

WATSON, P. F. (1981):

The effects of cold shock on sperm cell membranes.

In: Effects of low temperatures on biological membranes, Eds. G. J. Morris u. A. Clarke. Academic Press, London, 189-218

WATSON, P. F. u. C. E. GREEN (2000):

Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common?

In: L. A. Johnson u. H. D. Guthrie (Hrsg.): Boar Semen Preservation IV53-60

WEITZE, K. F. (1991):

Long-term storage of extended boar semen.

Repr. Dom. Anim. Supl. 1, 231-253

YANAGIMACHI, R. (1994):

Mammalian Fertilization.

In: E Knobil u. J.D. Neill (Hrsg.):The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, 2. Ausgabe, S. 189-317

YESTE, M., M. BRIZ, E. PINART, S. SANCHO, N. GARCIA-GIL, E. BADIA, J. BASSOLS, A. PRUNEDA, E. BUSSALLEU, I. CASAS u. S. BONET (2008):

Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C.

Anim. Reprod. Sci. 109, 236-250

9 Anhang

9.1 Tabellen

Tab. 11: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{BikCa} PI & Fluo3 neg (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	83,11 ^{a,A}	2,59	60,83 ^{b,A}	5,82	30,96 ^{c,A}	7,49	18,93 ^{d,A}	6,10
24h_17°C	78,46 ^{a,B,C}	4,76	48,81 ^{b,B}	5,78	26,84 ^{c,A}	4,51	17,21 ^{d,B}	5,13
72h_17°C	79,18 ^{a,B}	2,06	48,64 ^{b,B}	6,07	28,67 ^{c,A}	4,16	21,63 ^{d,A}	3,68
120h_17°C	75,69 ^{a,C}	3,46	47,61 ^{b,B}	6,70	29,64 ^{c,A}	5,37	19,97 ^{d,A}	3,47
24h_5°C	44,06 ^{a,D}	7,72	25,87 ^{b,C}	5,21	14,72 ^{c,B}	4,35	10,57 ^{d,C}	4,40
72h_5°C	42,73 ^{a,D}	7,17	26,24 ^{b,C}	5,69	16,69 ^{c,B}	4,96	12,94 ^{d,D}	4,81

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-D}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 12: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Kontr} PI & Fluo3 neg (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h 20°C	88,95 ^{a,A}	1,69	84,57 ^{b,A}	1,65	82,31 ^{c,A}	1,22	80,68 ^{c,A}	1,86
24h 17°C	85,88 ^{a,B,E}	2,85	81,86 ^{b,B,C}	2,98	78,87 ^{c,B,C}	3,11	76,71 ^{d,B,C}	3,00
72h 17°C	87,07 ^{a,C,E}	2,07	82,71 ^{b,B}	1,27	79,81 ^{c,B}	2,15	77,25 ^{d,B}	2,68
120h 17°C	85,17 ^{a,B}	2,75	80,67 ^{b,C}	2,10	76,29 ^{c,C}	2,48	71,05 ^{d,C}	3,75
24h 5°C	83,49 ^{a,B}	2,22	62,5 ^{b,D}	2,51	48,13 ^{c,D}	6,13	40,78 ^{d,D}	7,11
72h 5°C	79,24 ^{a,D}	2,75	59,11 ^{b,E}	4,47	43,93 ^{c,E}	5,65	37,23 ^{d,E}	6,32

^{a - d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

^{A - E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Anhang

Tab. 13: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Ca} Pi & Fluo3 neg (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h 20°C	84,87 ^{a,A}	2,54	78,38 ^{b,A}	3,41	73,72 ^{c,A}	3,47	70,62 ^{d,A}	2,99
24h 17°C	79,26 ^{a,B,C}	5,14	71,86 ^{b,B,C}	6,42	66,70 ^{c,B,C}	5,94	60,71 ^{d,B,C}	5,51
72h 17°C	81,72 ^{a,B}	2,64	74,65 ^{b,B}	2,91	68,13 ^{c,B}	3,56	61,71 ^{d,B}	4,84
120h 17°C	79,42 ^{a,C}	3,56	71,98 ^{b,C}	3,80	63,21 ^{c,C}	2,28	51,29 ^{d,C}	4,63
24h 5°C	43,32 ^{a,D}	8,45	34,90 ^{b,D}	7,42	26,17 ^{c,D}	5,78	22,40 ^{d,D}	4,80
72h 5°C	41,41 ^{a,D}	7,31	30,89 ^{b,E}	6,22	22,59 ^{c,E}	4,92	19,39 ^{d,D}	4,01

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-neg. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-negativer Spermien

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 14: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{BikCa} Pi-neg,Fluo3-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	8,38 ^{a,A}	1,55	21,68 ^{b,A}	3,99	36,08 ^{c,A,D,C}	4,03	38,57 ^{c,A,D,C}	4,33
24h_17°C	13,72 ^{a,B}	4,41	32,20 ^{b,B}	3,23	40,36 ^{c,D}	2,37	41,5 ^{c,D}	1,90
72h_17°C	12,64 ^{a,B}	1,62	30,45 ^{b,B}	3,53	37,18 ^{c,C}	2,40	37,06 ^{c,C}	2,16
120h_17°C	14,22 ^{a,B}	2,06	29,45 ^{b,B}	3,22	34,57 ^{c,A}	2,18	34,98 ^{c,A}	1,88
24h_5°C	42,54 ^{a,C}	5,95	31,60 ^{b,B}	2,38	24,14 ^{c,B}	5,82	22,81 ^{c,B}	6,51
72h_5°C	41,35 ^{a,C}	3,63	31,90 ^{b,B}	4,22	25,72 ^{c,B}	6,86	24,21 ^{c,B}	7,33

^{a-c}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-D}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-pos. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-positiver Spermien

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 15: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Kontr} Pi-neg,Fluo3-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	3,29 ^{a,A}	0,67	5,36 ^{b,A,C}	1,19	6,71 ^{c,A,C}	1,92	7,95 ^{c,A,C}	2,13
24h_17°C	6,63 ^{a,B,D,C}	2,64	8,22 ^{b,B,D,E}	2,85	9,73 ^{c,A,B,D}	3,32	11,22 ^{d,A,B,C}	3,92
72h_17°C	5,00 ^{a,D}	0,95	6,74 ^{b,D}	1,29	8,55 ^{c,B,D}	2,84	10,21 ^{d,A}	3,73
120h_17°C	5,75 ^{a,C}	1,07	7,54 ^{b,E}	1,50	9,97 ^{c,D}	2,80	13,34 ^{d,B}	4,51
24h_5°C	3,44 ^{a,b,A,B}	1,17	4,29 ^{a,A,B}	1,91	5,70 ^{b,A}	2,93	7,14 ^{c,C}	3,44
72h_5°C	4,68 ^{a,A,C,D}	2,17	5,36 ^{a,C,D}	2,23	7,29 ^{b,B,C}	3,73	8,56 ^{c,A,C}	4,18

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-pos. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-positiver Spermien

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Anhang

Tab. 16: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Ca} Pi-neg,Fluo3-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	7,92 ^{a,A}	1,59	12,35 ^{b,A}	2,97	15,93 ^{c,A}	2,87	18,27 ^{c,A,C}	3,18
24h_17°C	13,11 ^{a,B}	4,73	18,40 ^{b,B}	6,07	22,06 ^{c,A,B,C}	5,32	26,50 ^{d,B,D,E}	5,91
72h_17°C	10,11 ^{a,B}	1,32	14,77 ^{b,B}	2,66	19,62 ^{c,B}	3,95	24,09 ^{d,B,D}	5,00
120h_17°C	11,28 ^{a,B}	1,68	15,85 ^{b,B}	2,14	22,33 ^{c,C}	3,42	30,22 ^{d,E}	5,52
24h_5°C	43,78 ^{a,C}	7,78	30,11 ^{b,C}	2,98	22,97 ^{b,B,C}	3,90	20,99 ^{b,B,C}	5,86
72h_5°C	42,43 ^{a,C}	4,14	31,97 ^{b,c,C}	1,88	25,56 ^{b,B,C}	5,99	23,18 ^{c,A,D}	7,66

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-neg. & Fluo-3-pos. = Anteil PI-negativer & Fluo-3-positiver Spermien

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 17: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{BikCa} PI-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	8,51 ^{a,A}	1,44	17,48 ^{b,A,C}	3,33	32,97 ^{c,A}	4,74	42,50 ^{d,A,D}	5,65
24h_17°C	7,81 ^{a,B}	1,15	18,99 ^{b,A}	3,61	32,80 ^{c,A}	3,80	41,30 ^{d,A,D}	3,68
72h_17°C	8,18 ^{a,B}	1,38	20,91 ^{b,A,C}	4,07	34,15 ^{c,A}	3,13	41,32 ^{d,A}	2,98
120h_17°C	10,08 ^{a,E}	1,88	22,95 ^{b,C}	5,25	35,79 ^{c,A}	5,72	45,05 ^{d,D}	2,67
24h_5°C	13,40 ^{a,C}	2,84	42,53 ^{b,B}	5,09	61,14 ^{c,B}	7,69	66,62 ^{d,B}	8,15
72h_5°C	15,92 ^{a,D}	3,87	41,86 ^{b,B}	5,48	57,58 ^{c,C}	7,70	62,85 ^{d,C}	7,96

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

min = Minuten

PI-pos. = Anteil PI- positiver Spermien

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 18: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Kontr} Pi-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h 20°C	7,76 ^{a,A}	1,20	10,08 ^{b,A}	1,12	10,98 ^{c,A}	1,32	11,37 ^{c,A}	1,23
24h_17°C	7,49 ^{a,A}	1,22	9,92 ^{b,A}	1,37	11,40 ^{c,A}	1,52	12,07 ^{d,B}	1,32
72h_17°C	7,93 ^{a,A}	1,39	10,56 ^{b,A}	1,37	11,64 ^{c,A}	1,51	12,54 ^{d,B}	1,47
120h_17°C	9,07 ^{a,D}	1,99	11,79 ^{b,C}	2,38	13,75 ^{c,D}	2,62	15,61 ^{d,E}	2,74
24h_5°C	13,07 ^{a,B}	2,69	33,22 ^{b,B}	4,31	46,16 ^{c,B}	8,90	52,07 ^{d,C}	9,90
72h_5°C	16,08 ^{a,C}	3,70	35,53 ^{b,B}	6,55	48,78 ^{c,C}	8,82	54,21 ^{d,D}	9,89

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

min = Minuten

PI-pos. = Anteil PI-positiver Spermien

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Anhang

Tab. 19: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)- positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

Tyr _{Ca} PI-pos (%)	3 min		20 min		40 min		60 min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
6h_20°C	7,21 ^{a,A}	1,19	9,27 ^{b,A}	1,16	10,35 ^{c,A}	1,42	11,11 ^{d,A}	1,19
24h_17°C	7,63 ^{a,A,B}	1,01	9,74 ^{b,B}	1,16	11,23 ^{c,B}	1,24	12,79 ^{d,B}	1,44
72h_17°C	8,17 ^{a,B}	1,41	10,58 ^{b,D}	1,57	12,26 ^{c,D}	1,50	14,20 ^{d,D}	1,68
120h_17°C	9,30 ^{a,E}	2,07	12,16 ^{b,E}	2,42	14,47 ^{c,F}	2,99	18,49 ^{d,E}	2,80
24h_5°C	12,90 ^{a,C}	2,65	34,99 ^{b,C}	4,99	50,85 ^{c,C}	8,88	56,60 ^{d,C}	10,05
72h_5°C	16,16 ^{a,D}	3,97	37,14 ^{b,C}	6,66	51,85 ^{c,E}	8,76	57,43 ^{d,C}	9,62

^{a-d}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

^{A-E}) Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte unterscheiden sich signifikant (p < 0,05).

min = Minuten

PI-pos. = Anteil PI-positiver Spermien

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Anhang

Tab. 20: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) auf Basis der Propidiumjodid (PI)-negativen und Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungsdauer und Inkubationsmedium (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

R_{60}		6h_20°C	24h_17°C	72h_17°C	120h_17°C	24h_5°C	72h_5°C
Tyr _{BikCa}	MW	64,19	61,26	57,55	55,73	33,49	29,79
	SD	7,20	7,52	3,80	5,25	5,96	4,58
Tyr _{Ca}	MW	14,25	18,55	20,01	28,13	20,92	22,02
	SD	3,20	3,96	4,83	5,21	4,18	4,37
Tyr _{Kontr}	MW	4,09	6,62	5,35	5,76	40,17	37,83
	SD	0,94	2,41	0,85	1,22	8,42	6,41

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

Anhang

Tab. 21: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat ($R_{60\text{Bik}}$) und Calcium ($R_{60\text{Ca}}$) berechnet auf Basis der Propidiumjodid (PI)-negativen und Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungsdauer (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).

		0h_20°C	24h_17°C	72h_17°C	120h_17°	24h_5°C	72h_5°C
$R_{60\text{Bik}}$	MW	49,94	42,71	37,55	27,60	12,58	7,77
	SD	5,60	7,56	6,18	3,24	2,07	1,17
$R_{60\text{Ca}}$	MW	10,16	11,93	14,66	22,37	-19,26	-15,81
	SD	3,12	4,07	4,95	5,40	12,47	10,79

$$R_{60\text{Bik}} = R_{60}(\text{Tyr}_{\text{BikCa}}) - R_{60}(\text{Tyr}_{\text{Ca}})$$

$$R_{60\text{Ca}} = R_{60}(\text{Tyr}_{\text{Ca}}) - R_{60}(\text{Tyr}_{\text{Kontrolle}})$$

Anhang

Tab. 22: Korrelationen zwischen ausgewählten Parametern des Calcium-Influx nach 24 h Lagerung und verschiedenen spermatologischen Parametern (n = 78 Ejakulate).

	R _{60_Tyr_{BikCa}_24 h}	R _{60_Tyr_{Kontrolle}_24 h}	R _{60_TyrCa_24 h}	R _{60Bik_24 h}	R _{60Ca_24 h}
MAS_24 h	-0,74 ****	-0,10	0,07	-0,70 ****	0,15
PT ges_24 h	-0,69 ****	-0,18	-0,07	-0,61 ****	0,06
PT prox_24 h	-0,58 ****	-0,12	-0,10	-0,51 ****	-0,02
PT dist_24 h	-0,53 ****	-0,24 *	-0,05	-0,45 ****	0,17
Memb.int_24 h	0,20	-0,42 ****	-0,24 *	0,27 *	0,06
Mot.ges_24 h	0,17	-0,47****	-0,44****	0,30 **	-0,15
Mot.prog_24 h	0,13	-0,47****	-0,44****	0,26 *	-0,16
VAP_24 h	0,03	-0,25 *	-0,18	0,07	-0,04
VCL_24 h	-0,24 *	-0,08	0,09	-0,26 *	0,15
VSL_24 h	0,24 *	-0,28 *	-0,28 *	0,30 **	-0,12
ALH_24 h	-0,32 **	0,00	0,16	-0,37 ***	0,16
BCF_24 h	0,23 *	-0,33 **	-0,34 **	0,35 **	-0,18

*) p<0,05 **)p<0,01 ***)p<0,001 ****)p<0,0001

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

R₆₀ = %Spermien (60 min) - %Spermien (3 min)

R_{60Bik} = R₆₀ (Tyr_{BikCa}) - R₆₀ (Tyr_{Ca})

R_{60Ca} = R₆₀ (Tyr_{Ca}) - R₆₀ (Tyr_{Kontrolle})

MAS = Morphologisch abweichende Spermien

PT prox = Spermien mit proximalen Plasmotropfen

Memb.int = Membranintakte Spermien

Mot.prog. = Anteil progressiv motiler Spermien

VCL = velocity curvilinear

ALH = amplitude of lateral head displacement

PT ges = Plasmotropfen Gesamtzahl

PT dist = Spermien mit distalen Plasmotropfen

Mot.ges. = Gesamtmotilität

VAP = velocity average path

VSL = velocity straight-line

BCF = beat cross frequency

Anhang

Tab. 23: Korrelationen zwischen ausgewählten Parametern des Calcium-Influx nach 96 h Lagerung und verschiedenen spermatologischen Parametern und Parametern des Calcium-Influx nach 24 h (n = 78 Ejakulate).

	R _{60_Tyr_{BikCa}_96 h}	R _{60_Tyr_{Kontrolle}_96 h}	R _{60_Tyr_{Ca}_96 h}	R _{60Bik_96 h}	R _{60Ca_96 h}
MAS_24 h	-0,22	0,14	0,07	-0,30 **	-0,24 *
PT ges_24 h	-0,13	0,06	0,09	-0,24 *	-0,17
PT prox_24 h	-0,16	0,10	0,11	-0,27 *	-0,14
PT dist_24h	-0,05	0,02	0,01	-0,05	-0,10
Memb.int._24 h	0,23 *	-0,14	0,02	0,19	0,11
Mot.ges_72 h	0,47 ****	-0,38 ***	-0,11	0,49 ****	0,23 *
Mot.prog._72 h	0,56 ****	-0,29 **	-0,01	0,47 ****	0,24 *
VAP_72 h	0,18	-0,33 **	-0,21	0,27 *	0,02
VCL_72 h	0,12	-0,28**	-0,25 *	0,22 *	-0,10
VSL_72 h	0,34 **	-0,26 *	-0,04	0,30 **	0,19
ALH_72 h	0,12	-0,17	-0,22	0,20	-0,18
BCF_72 h	0,30 **	-0,44****	-0,12	0,39 ***	0,27 *
R _{60_Tyr_{BikCa}_24 h}	0,37 ***	-0,02	0,04	0,34 **	0,31 **
R _{60_Tyr_{Kontrolle}_24 h}	-0,31 **	0,37 ***	0,14	-0,37 ***	-0,05
R _{60_Tyr_{Ca}_24 h}	-0,35 **	0,39 ***	0,37 ***	-0,60 ****	0,10
R _{60Bik_24 h}	0,47 ****	-0,19	-0,10	0,54 ****	0,26 *
R _{60Ca_24 h}	-0,15	0,18	0,41 ***	-0,43 ****	0,22 *

*) p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

Anhang

Tyr_{BikCa} = Tyrode mit 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium

Tyr_{Ca} = Tyrode ohne Bikarbonat, mit 2 mM Calcium

Tyr_{Kontr} = Tyrode ohne Bikarbonat und Calcium

R_{60} = %Spermien (60 min) - %Spermien (3 min)

$R_{60Bik} = R_{60}(Tyr_{BikCa}) - R_{60}(Tyr_{Ca})$

$R_{60Ca} = R_{60}(Tyr_{Ca}) - R_{60}(Tyr_{Kontrolle})$

MAS = Morphologisch abweichende Spermien

PT prox = Spermien mit proximalen Plasmotropfen

Memb.int = Membranintakte Spermien

Mot.prog. = Anteil progressiv motiler Spermien

VCL = velocity curvilinear

ALH = amplitude of lateral head displacement

PT ges = Plasmotropfen Gesamtzahl

PT dist = Spermien mit distalen Plasmotropfen

Mot.ges. = Gesamtmotilität

VAP = velocity average path

VSL = velocity straight-line

BCF = beat cross frequency

9.2 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle	Artikelnummer
A23187 (Calimycin)	Axxora GmbH, Lörrach	450-001
BSA (Cohn's Fraction V)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A3803
CaCl ₂	Merck, Darmstadt	2389
EGTA	Roth, Karlsruhe	3054
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe	4979
FITC-PNA	Axxora GmbH, Lörrach	VC-FL-1071
Fluo-3/AM	Axxora GmbH, Lörrach	ALX-620-003
Gentamycinsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	22185
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe	6780
HCl	Merck, Darmstadt	9057
HEPES	Roth, Karlsruhe	9105
KCl	AppliChem, Darmstadt	A1039
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt	104873
KOH	Merck, Darmstadt	105033
Na-(DL)-lactat 60% (w/w)	Sigma-Aldrich, Steinheim	L1375
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim	M5921
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt	106448
NaCl	Roth, Karlsruhe	3957
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim	S5761
NaOH	Merck, Darmstadt	106462
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Roth, Karlsruhe	4984
Phenolrot	Roth, Karlsruhe	T1271
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim	P 4170
Na-pyruvat	Merck, Darmstadt	106619

9.3 Zusammensetzung der Tyrode-basierten Medien

Chemikalien		Tyrode _{BikCa}	Tyr _{Ca}	Tyr _{Kontrolle}
NaCl	mmol	96,0	111,0	112,0
NaHCO ₃	mmol	15,0	-	-
CaCl ₂	mmol	2,0	2,0	-
EGTA	mmol	-	-	1,0
HEPES	mmol	20,0	20,0	20,0
Glucose*H ₂ O	mmol	5,0	5,0	5,0
KCl	mmol	3,1	3,1	3,1
MgSO ₄ *7H ₂ O	mmol	0,4	0,4	0,4
KH ₂ PO ₄	mmol	0,3	0,3	0,3
Genamycinsulfat	µg/ml	100,0	100,0	100,0
Phenolrot	µg/ml	20,0	20,0	20,0
Na-Pyruvat	mmol	1,0	1,0	1,0
Na-Lactat	mmol	21,7	21,7	21,7
BSA	mg/ml	3,0	3,0	3,0
Aqua dest.		ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

9.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

Phantom für Eber	Fa. Minitüb, Landshut
Samenauffangbeutel, US-bag	Fa. Minitüb, Landshut
Samenauffangbecher	Fa. Minitüb, Landshut
Samenflaschen mit Verschluss	Fa. Minitüb, Landshut
Klimaschränke mit Digitalregler	Fa. Minitüb, Landshut
Zählkammer nach Thoma, "neu"	Fa. Jürgens, Hannover
Objektträger (76 x 26 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler (IDL) GmbH & Co. KG, Nidderau
Deckgläser (18 x 18 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler (IDL) GmbH & Co. KG, Nidderau
Lejakammer "standard count" 20 micron, 4-chamber slide	Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, The Netherlands
Phasenkontrastmikroskope mit/ohne Heiztisch	Fa. Zeiss, Jena
Magnetrührer, MR3001K	Fa. Heidolph, Schwabach
pH-Meter Multiplex 3000/pMX Gefrierpunktsmometer "Osmomat 030"	Fa. WTW, Weilheim Fa. Gonotec, Berlin
pH-Meter, Multiplex 3000/pMX	Fa. WTW, Weilheim
Einmalspritzen, steril, 20 ml	Fa. Braun, Melsungen
Spritzenfilter, PES-membran, 0,22 µm Porendurchmesser, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vortex, Reax top	Fa. Heidolph, Schwabach
Durchflusszytometer "Galaxy"	Partec GmbH, Münster
Wasserbäder:	

Typ 1013 WNB 745	Fa. GFL, Burgwedel Fa. Memmert, Schwabach
Heiztische (incl. Steuereinheit)	Fa. Mintüb GmbH & Co KG, Tiefenbach
Wärmeschränke:	Fa. Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator, MCO-17AIC	Fa. Sanyo, Bad Nenndorf
Variable Einkanalpipetten: 0,5 – 10 µl 2,0 – 20 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessich Oldendorf
Pipettenspitzen (100 und 1000 µl)	Landgraf Laborsysteme GmbH, Langenhagen
Parafilm	Landgraf Laborsysteme GmbH, Langenhagen
Laborwaage (PT 12)	Sartorius AG, Göttingen
Laborwaage (ALC-80.4)	Sartorius AG, Göttingen
Polypropylenröhren mit Schraubverschluss, konischer Boden, 15 und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reagenzröhren (3,5 und 11,5 ml) z.T. mit Verschluss	Fa. Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml,	Landgraf Laborsysteme GmbH, Langenhagen

10 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Prozentualer Anteil membranintakter (Propidiumjodid- und FITC-PNA-negativer) Spermien an der Gesamtpopulation (MW + SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich ($p < 0,05$)... 26
- Abb. 2: Prozentualer Anteil membranintakter (Propidiumjodid- und FITC-PNA-negativer) Spermien für einzelne Eber (MW + SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C (n = 6 Ejakulate je Eber). 27
- Abb. 3 : Veränderung des prozentualen Anteils der PI-neg. und Fluo-3-neg. (---), sowie PI-neg. und Fluo-3-pos. (—) und der PI-pos. (.....) Spermienpopulation während der Inkubation in Tyr_{BikCa} (■), Tyr_{Ca} (▲) und Tyr_{Kontr} (●) nach 6 h, 24 h, 72 h und 120 h Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate)..... 34
- Abb. 4: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) auf Basis der Propidiumiodid-negativen (PI-neg.) und Fluo-3-negativen (Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (MW ± SD) in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und Inkubationsmedium (n = 7 Eber). Die Spermien wurden in Tyrode-basierten Medien inkubiert, die entweder 15 mM Bikarbonat und 2 mM Calcium (Tyr_{BikCa}) oder 2 mM Calcium ohne Bikarbonat (Tyr_{Ca}) oder weder Bikarbonat noch Calcium (Tyr_{Kontrolle}) enthielten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Werte innerhalb eines Mediums ($p < 0,05$)..... 35

- Abb. 5: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat berechnet anhand der Propidiumiodid-negativen (PI-neg.) und Fluo-3-negativen (Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubation (R_{60Bik}) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C. Betrag der spezifischen Reaktivität auf Calcium berechnet anhand der Propidiumiodid-negativen (PI-neg.) und Fluo-3-negativen (Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer (R_{60Ca}) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C. Deskriptiver Vergleich zwischen einzelnen Ebern ($n = 7$ Eber, $n = 42$ Ejakulate). Alle Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen unterschiedliche Werte innerhalb eines Mediums ($p < 0,05$)..... 37
- Abb. 6: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und der Progressivmotilität bei 24 h ($n = 78$ Ejakulate)..... 47
- Abb. 7: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und der Membranintegrität bei 24 h ($n = 78$ Ejakulate)..... 47
- Abb. 8: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und dem Anteil morphologisch abweichender Spermien bei 24 h ($n = 78$ Ejakulate). 48
- Abb. 9: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und dem Anteil an Spermien mit Plasmotropfen bei 24 h ($n = 78$ Ejakulate)..... 48
- Abb. 10: Korrelation zwischen der spezifischen Reaktivität auf Bikarbonat auf Basis der PI- und Fluo-3-negativen Spermien bei 24 h und bei 96 h ($n = 78$ Ejakulate)..... 49

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Definition der erhobenen CASA-Parameter.....	16
Tab. 2: CASA-Motilitätsparameter (MW± SD) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C und 5°C (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).....	25
Tab. 3A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für Membranintegrität und CASA- Parameter für den Faktor Eber (n = 21 Ejakulate; je 3 Ejakulate von 7 Ebern).	39
Tab. 3B: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für Membranintegrität und CASA- Parameter für den Faktor Eber (n = 42 Ejakulate; je 6 Ejakulate von 7 Ebern).	39
Tab. 4A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die Allgemeine Reaktivität (R ₆₀) für den Faktor Eber. (n = 21 Ejakulate; je 3 Ejakulate von 7 Ebern).	41
Tab. 4B: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die Allgemeine Reaktivität (R ₆₀) für den Faktor Eber. (n = 42 Ejakulate; je 6 Ejakulate von 7 Ebern).	41
Tab. 5A: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R _{60Bik}) und Calcium (R _{60Ca}) für den Faktor Eber (n = 21 Ejakulte; je 3 Ejakulate von 7 Eber).....	42
Tab. 5B: Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung (VK in %) für die spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R _{60Bik}) und Calcium (R _{60Ca}) für den Faktor Eber (n = 42 Ejakulte; je 6 Ejakulate von 7 Eber).....	42

Tab. 6: CASA-Motilitätsparameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) bei 17°C Lagerungstemperatur und 24 h Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate).....	43
Tab. 7: CASA-Motilitätsparameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) bei 17°C Lagerungstemperatur und 72 h Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate).....	43
Tab. 8: Membranintegrität und Morphologische Parameter (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) bei 17 °C Lagerungstemperatur und 24 h Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate)	44
Tab. 9: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) berechnet anhand der Propidiumjodid- und Fluo-3-negativen (PI- & Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) in Abhängigkeit von Inkubationsmedium und Lagerungsdauer (n = 78 Ejakulate).....	45
Tab. 10: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat und Calcium berechnet anhand der Propidiumjodid- und Fluo-3-negativen (PI- & Fluo-3-neg.) Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer (R_{60Bik} & R_{60Ca}). Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max)) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei 17°C. (n = 78 Ejakulate).....	45
Tab. 11: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate).....	7777

Tab. 12: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 78

Tab. 13: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-negativer Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 79

Tab. 14: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 80

Tab. 15: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 81

Tab. 16: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-negativer und Fluo-3-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 82

Tab. 17: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{BikCa} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 83

Tab. 18: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)-positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Kontrolle} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 84

Tab. 19: Prozentualer Anteil Propidiumjodid (PI)- positiver Spermien (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungszeit und Inkubationsdauer in Tyr_{Ca} (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 85

Tab. 20: Allgemeine Reaktivität (R_{60}) auf Basis der Propidiumjodid (PI)-negativen und Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungsdauer und Inkubationsmedium (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 86

Tab. 21: Spezifische Reaktivität auf Bikarbonat (R_{60Bik}) und Calcium (R_{60Ca}) berechnet auf Basis der Propidiumjodid (PI)-negativen und Fluo-3-negativen Spermienpopulation nach 60 min Inkubationsdauer. Darstellung der Werte (Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD)) in Abhängigkeit von Lagerungstemperatur, Lagerungsdauer (n = 7 Eber, n = 42 Ejakulate). 87

Tab. 22: Korrelationen zwischen ausgewählten Parametern des Calcium-Influx nach 24 h Lagerung und verschiedenen spermatologischen Parametern (n = 78 Ejakulate). 88

Tab. 23: Korrelationen zwischen ausgewählten Parametern des Calcium-Influx nach 96 h Lagerung und verschiedenen spermatologischen Parametern und Parametern des Calcium-Influx nach 24 h (n = 78 Ejakulate). 889

Danksagung

Mein Dank geht in erster Linie an Frau Prof. Dr. Dagmar Waberski für die Überlassung des interessanten Themas, das Vertrauen und ihre stetige fachliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Heiko Henning für viele konstruktive Diskussionen und Anregungen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche, für die Unterstützung und Motivation bei der Anfertigung der Manuskripte.

Ich danke herzlichst Dr. Carola Urhausen. Durch ihre Freundschaft und selbstlose Unterstützung war sie mir in den letzten Jahren eine sehr große Hilfe. Dank ihr habe ich diesen Schritt überhaupt gewagt und durch ihre Begleitung kann ich mich über das Ergebnis der Arbeit heute freuen.

Ebenso möchte ich Dr. Susanne Schmid für ihre fachliche Hilfe und ihren Rückhalt danken.

Ein großer Dank geht an alle Mitdoktoranden während der Zeit in der Reproduktionsmedizinischen Einheit. Insbesondere Alexandra, Jana, Karo, Annett und Julia danke ich für ihre Motivation und Hilfsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Martin Beyerbach gilt mein Dank für die kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Reproduktionsmedizinischen Einheit, insbesondere VMTA Anja Lübcke für das freundschaftliche Arbeitsklima.