

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Chromatinstatus von Hundespermien unter Berücksichtigung
der Genitalgesundheit und der Ejakulatbeschaffenheit sowie
externer Einflussfaktoren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
-Doctor medicinae veterinariae-
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Marta Anna Strotmann, geb. Gosk

Bromberg

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel

Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken, Klinik für Kleintiere

1. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. A.-R. Günzel-Apel

2. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. S. Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2009

Meinen Eltern

gewidmet

Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Tagungen veröffentlicht:

Jahrestagung 2007 der European Society For Domestic Animal Reproduction
(ESDAR)

19.-23. September 2007 in Celle

(Vortrag mit Abstract)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	11
2. Schrifttum	13
2.1 Spermatogenese und epididymale Spermienreifung	13
2.2 Das Spermienchromatin	14
2.2.1 Spermienchromatinstruktur	14
2.3 Einflüsse auf den Spermienchromatinstatus	19
2.3.1 Physiologische Einflüsse auf den Spermienchromatinstatus	19
2.3.2 Pathologische Einflüsse auf den Spermienchromatinstatus	22
2.4 Untersuchungsmethoden zur Erfassung des Spermienchromatinstatus	26
2.4.1 Spermienchromatinstruktur Assay®	26
2.4.2 Modifizierter Spermienchromatinstruktur Assay®	27
2.5 Spermienchromatinstruktur in Bezug zur Fertilität	29
3. Eigene Untersuchungen	33
3.1 Material und Methoden	33
3.1.1 Versuchstiere	33
3.1.2 Methoden	34
3.1.2.1 Andrologische Untersuchung und Samengewinnung	34
3.1.2.2 Biologische Samenuntersuchung	34
3.1.2.2.1 Bestimmung der Samendichte und Spermiengesamtzahl	35
3.1.2.2.2 Bestimmung der Spermienmotilität	35
3.1.2.2.2.1 Mikroskopische Schätzung	35
3.1.2.2.2.2 Computergestützte Motilitätsanalyse (CMA)	36
3.1.2.2.3 Bestimmung des Anteils membrangeschädigter Spermien	36

3.1.2.2.3.1 Supravitalfärbung	37
3.1.2.2.3.2 Propidium-Iodid-Färbung	37
3.1.2.2.4 Spermienmorphologie	37
3.1.2.3 Spermienchromatinstruktur Assay®	38
3.1.2.3.1 Untersuchung der Spermienchromatinstruktur von Rüden unter Berücksichtigung des Fertilitäts- und Rassestatus	41
3.1.2.3.2 Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Spermienchromatinstruktur und ausgewählten konventionellen Ejakulatparametern	41
3.1.2.3.3 Untersuchung des Einflusses externer Faktoren auf die Spermienchromatinstruktur	43
3.2 Statistische Auswertung	44
4. Ergebnisse	46
4.1 Spermienchromatinstatus innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation	46
4.2 Spermienchromatinstatus bei Rüden mit unterschiedlichem Ejakulatstatus	46
4.3 Spermienchromatinstatus in Ejakulaten mit Normospermie und unter Berücksichtigung möglicher Rassenunterschiede	48
4.4. Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und ausgewählten spermatologischen Parametern	50
4.5 Beeinflussung der Spermienchromatinstruktur durch externe Faktoren	57
4.5.1 Individuelle Schwankungen des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien	57
4.5.2 Einfluss jahreszeitlicher Temperaturschwankungen	58
4.5.3 Einfluss einer hochfrequenten Samenentnahme auf den Spermienchromatinstatus	69

5. Diskussion	79
5.1 Material und Methode	79
5.2 Ergebnisse	82
5.2.1 Spermienchromatinstatus innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation	82
5.2.2 Spermienchromatinstatus bei Rüden mit Normo-, Dys- oder Pathospermie	82
5.2.3 Spermienchromatinstatus in Ejakulaten mit Normospermie unter Berücksichtigung möglicher Rasseunterschiede	84
5.2.4 Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler und ausgewählten spermatologischen Parametern	84
5.2.5 Einfluss externer Faktoren auf die Spermienchromatinstruktur	87
5.2.5.1 Einfluss jahreszeitlicher Temperaturschwankungen	87
5.2.5.2 Einfluss der Samenentnahmefrequenz	88
5.3 Schlussfolgerungen	90
6. Zusammenfassung	91
7. Summary	94
8. Literaturverzeichnis	97
9. Anhang	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AO	Akridin Orange
α_T	Rotfluoreszenz / (Rot- + Grünfluoreszenz)
bidest.	bidestillata
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMA	Cell Motion Analyser
COMPot	Cells Outside the Main Population (durchflusszytometrisch ermittelter Prozentsatz chromatininstabiler Spermien)
°C	Grad Celsius
d	day (Tag)
DFI	DNA-Fragmentationsindex
dest.	destillata
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
dPI	distale Plasmotropfen
DTT	1,4-Dithiotreit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Gramm / Gravitationsbeschleunigung (9,81m/sec ²)
HaEnd	Spermien mit Veränderungen am Haupt- und Endstück
Hals	Spermien mit Veränderungen am Halsstück
HCl	Salzsäure
incl.	inklusive
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht

KK	Spermien mit Kopfkappenveränderungen
KKs	Spermien mit sekundären Kopfkappenveränderungen (geschwollener Kopfkappe, Kopfkappe in Ablösung und abgelöster Kopfkappe)
Kopf	Spermien mit Kopfveränderungen
MAS	Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien
max.	maximal
mfSCSA	modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur Assay
mg	Milligramm
MgS	membrangeschädigte Spermien
min.	mindestens
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mrd.	Milliarden
n	Anzahl der Tiere / Ejakulate
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
Nr.	Nummer
p	Wahrscheinlichkeitswert für die Nullhypothese
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
pPI	proximale Plasmotropfen
®	eingetragenes Warenzeichen
r	Korrelationskoeffizient
ROS	radical oxygene species (radikale Sauerstoffspezies)
s.	siehe
SCSA	Spermienchromatinstruktur Assay
SCSAK	computergestützt ermittelter mfSCSA-Wert (korrigiert)
SCSAT	computergestützt ermittelter mfSCSA-Wert (getrichert)
SD	standard deviation (Standardabweichung)

SGZ	Spermiengesamtzahl
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
u.	und
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
v.a.	vor allem
VAP	Velocity Averaged Path
VCL	Velocity Curve Line
Vmot	geschätzter Anteil an vorwärtsmotilen Spermien
VSL	Velocity Straight Line
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Der Spermienchromatinstatus hat einen eigenständigen Wert in Bezug auf die Fertilitätsprognose (EVENSON et al. 1980a, TEJADA et al. 1984, BALIACHEY et al. 1988, SAKKAS u. TOMLINSON 2000) und ist für die männliche Infertilitätsdiagnostik prognostisch wertvoll (SPANNO et al. 1998; EVENSON et al. 1999; LARSON et al. 2000). Die Untersuchung der Spermienchromatinstruktur im Rahmen der spermatologischen Diagnostik des Mannes wurde erstmals 1980 von EVENSON et al. (1980b) durchgeführt. Das dafür verwendete Untersuchungsverfahren, der Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA®), ermittelt chromatindefekte Spermien. Der Anteil chromatininstabiler Spermien (%) charakterisiert unmittelbar die im Spermienkopf befindliche Kernsubstanz. Untersuchungen mittels SCSA wurde bereits an mehreren Spezies wie Mensch, Maus, Rind, Eber, Pferd und verschiedenen Nagern durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist als international anerkanntes Verfahren zur Analyse der Spermienchromatinstruktur die Methode der Wahl.

In der Hundezucht werden die Vatertiere nicht auf Fruchtbarkeit selektiert, so dass vielfältige Erkrankungen der Hoden, Nebenhoden und Prostata zu finden sind, die sich auf unterschiedlichste Weise nachteilig auf die Fertilität auswirken. Bei den Nutztierarten Rind und Schwein treten kaum Fertilitätsprobleme auf, da aus wirtschaftlichen Gründen seit Jahrzehnten nur hochfertile Tiere zur Zucht eingesetzt werden. In der heutigen Zeit wird der Hund als Liebhabertier von den Menschen als Partner oder Familienmitglied angesehen. Dieser Status des Hundes als Individualtier und der daraus resultierende hohe ideelle Wert für die Besitzer von Zuchtrüden bedingen die Notwendigkeit einer weitgehenden Diagnostik.

Die Einbeziehung des Spermienchromatinstrukturassays in die andrologische Diagnostik beim Hund lässt wertvolle zusätzliche Informationen über die ätiologischen Hintergründe einer Sub- oder Infertilität erwarten. Da beim Hund keine verlässlichen Daten im Hinblick auf den Chromatinstatus vorliegen, war es somit Ziel dieser Studie, Daten über den Chromatinstatus bei Rüden zu ermitteln, mögliche

bestehende Zusammenhänge mit den konventionellen spermatologischen Parametern zu erarbeiten und verschiedene Einflüsse auf den Chromatinstatus zu überprüfen.

2. Schrifttum

2.1 Spermatogenese und epididymale Spermienreifung

Die Spermatogenese setzt sich zusammen aus der Spermiozytogenese und der Spermio-genese (LIEBICH 1993), und erfolgt im Keimepithel der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) des Hodengewebes. Die Samenzellbildung beim Hund dauert 8-9 Wochen und läuft in vier bis fünf Tubulusepithelzyklen ab (FOOTE et al. 1972; IBACH et al. 1975). Nach vollständiger Spermiozytogenese liegen Spermatiden mit einem haploiden Chromosomensatz vor, die sich im Verlauf der Spermio-genese zu morphologisch ausdifferenzierten Spermien umwandeln. Im Verlauf der Spermiozytogenese entwickeln sich Spermatogonien aus denen im Keimepithelzyklus Spermatozyten und durch die anschließende 1. und 2. Reifeteilung Spermatiden entstehen. Während des Keimepithelzyklus bewegen sich die Zellen in mehreren Reihen von der Basalmembran der Samenkanälchen in Richtung Tubuluslumen. Die sich anschließende Spermio-genese lässt sich in folgende vier Phasen unterteilen: Golgi-Phase, Kappenphase, Akrosomphase und Reifungsphase. In der Golgi-Phase entsteht durch Abwanderung und Verschmelzung von kleinen Vesikeln aus dem Golgi-Apparat eine akrosomale Vakuole, die sich an der Kernmembran im Bereich des späteren Vorderendes anheftet. Über ein proximales Zentriol wird über eine Basalplatte Kontakt zu dem Spermatidenkern aufgenommen und aus einem distalen Zentriol beginnt die Geißelentwicklung. Während der Kappenphase entsteht durch Verdichtung der Granula-Abflachung und Ausbreitung der akrosomalen Vakuole über den Spermatidenkern die Kopfkappe. Anschließend erfolgt in der Akrosomphase zunächst die Drehung der Spermatide, so dass der akrosomale Anteil in Richtung Basalmembran zeigt.

Im Spermatidenkern kommt es durch zunehmende Kondensation des Chromatins und Streckung zur Erlangung der speziesspezifischen Form. Das Akrosom bedeckt nun zu zwei Dritteln den Zellkern. Das Zytoplasma befindet sich am proximalen Anteil der Geißel. Durch Gruppierung von Mitochondrien um die Geißel entsteht die Mitochondrienscheide des Mittelstücks. Die Spermio-genese endet mit der

Reifephase, in der die Spermatide durch Transformation die speziestypische Morphologie des Kopfes und Schwanzes erlangt (LIEBICH 1993).

2.2 Das Spermienchromatin

Das Spermienchromatin füllt den Spermienkopf fast vollständig aus und enthält die genetische Information der Samenzelle. Es besteht aus der DNA, basischen Kernproteinen, Lipiden und Ionen wie Magnesium, Eisen, Kupfer, Zink, Kalium und Phosphat, und stellt somit einen DNA-Protein-Komplex dar. Der Spermienchromatinstatus wird eine eigenständige Bedeutung für die Fertilitätsprognose zugeschrieben, und zwar in Hinblick auf die Befruchtungsfähigkeit und Embryonalentwicklung.

Chromatindefekte Spermien sind prinzipiell in der Lage die Eizelle zu befruchten, führen aber zu einer erhöhten embryonalen Mortalität (TEJADA et al. 1984). Viele chromatindefekte Spermien sprechen für das Vorliegen einer verminderten Fruchtbarkeit oder Unfruchtbarkeit.

2.2.1 Spermienchromatinstruktur

Der Chromatinaufbau unterscheidet sich in somatischen Zellen und ausdifferenzierten Keimzellen, wobei nicht ausdifferenzierte Keimzellen (meiotische Keimzellen), Spermatogonien, Spermatozyten 1. und 2. Ordnung, einen Chromatinaufbau wie somatische Zellen haben. In somatischen Zellen ist die DNA in sog. Nukleosomen angeordnet. Hierbei erfolgt alle 200 Basenpaare eine doppelte Umwicklung der DNA-Struktur um ein Histonoktamer und eine weitere spezielle Anordnung. Diese Organisation wird als Superspiralisierung (Solenoid) bezeichnet. Die DNA-Organisation somatischer Zellen beruht auf der sog. nukleären Matrix, wobei Proteine im Abstand von 60.000 Basen fest an die DNA binden (WARD u. COFFEY 1991). Während der letzten Stadien der Spermio-genese (letzte meiotische Teilung der Spermatozyten in frühe Spermatiden) und im Zuge der

Spermatidenreifung kommt es zu Veränderungen des Kerns und zu einem Austausch der lysinreichen Histone. Dies erfolgt zunächst durch Übergangspoteine und schließlich durch Protamine (MEISTRICH, 1989; BARRATT, 1995; KISTLER et al., 1996; PRIGENT et al. 1996; STEGER, 1999; KIERSZENBAUM, 2001; ZHAO et al., 2001). Protamine sind niedermolekulare, basische Kernproteine, die einen hohen Anteil an den schwefelhaltigen Aminosäuren Arginin und Cystein besitzen (KUMAROO et al. 1975) und kaum oder kein Lysin enthalten (POCCIA 1986). Die Protamination führt zunächst zu einer starken Kondensation des Spermienchromatins und somit zu einer extrem kompakten und stabilen Struktur (BALHORN 1982, SELIGMAN u. SHALGI 1991; SAKKAS et al.1999). Während der Nebenhodenpassage kommt es zur Oxidation der freien Thiolgruppen zwischen den Cysteinresten. Hierdurch werden kovalente inter- und intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Protaminen gebildet (BALHORN 1982), die dem Spermienchromatin eine zusätzliche Festigkeit verleihen. Die Reifung der Spermien während der Nebenhodenpassage hat eine entscheidende Bedeutung für eine stabile Spermienchromatinstruktur.

Der DNA-Protamin-Komplex lässt im Gegensatz zur Histon gebundener DNA keine Superspiralisierung zu. Die DNA von Spermienkernen ist linear Seite an Seite angeordnet (WARD u. COFFEY 1991). Diese kompakte Form der Tertiärstruktur ermöglicht einen starken Kondensationsgrad des Spermienchromatins und verhindert eine Transkription. Die protamingebundene DNA bildet konzentrische Kreise, sog. Doughnut Domänen, die wie ein Ring aussehen. Diese Schleifen um den Matrix-Kern sind nur halb so groß wie in somatischen Zellen (WARD u. COFFEY 1991). Dieses sog. „Sperm Doughnut Loop Domain Model“ ist in Abb. 1 dargestellt.

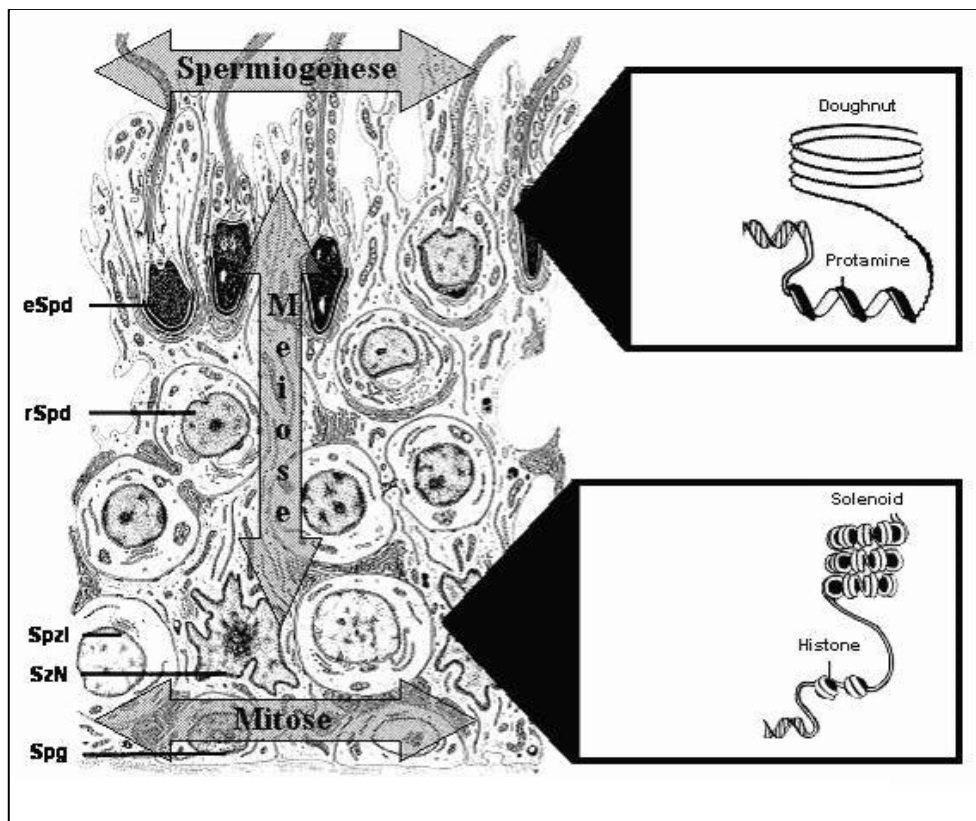


Abb 1. Sperm Doughnut Loop Domain Model (nach STEGER et al.2005)

Die Chromatinstabilität von Säugetierspermien wird durch die Anzahl an Disulfidbrücken zwischen den Protaminketten bestimmt (DADOUNE 2003). Daher wird die Chromatinstabilität stark vom Protaminanteil beeinflusst (PERREAULT et al. 1988). In Säugetierspermien konnten insgesamt drei Protamintypen nachgewiesen werden, deren Vorkommen und Anteil zwischen den einzelnen Spezies stark variiert. Die drei Protamintypen lassen sich unterteilen in Übergangproteine, die am Prozess der Histonersetzung übergangsweise beteiligt sind (OLIVA u. DIXON 1991) und zwei unterschiedliche arginin- und cysteinreiche Protamintypen, Protamin 1 und 2 (CORZETT et al. 1999, 2002). Protamin 1 ist reich an Arginin und Cystein und besteht aus ca. 50 Aminosäuren (DADOUNE 2003). Es bildet den größten Anteil an DNA-bindenden Proteinen. Protamin 2 ist nach KUMAROO et al. (1975) und JAGER (1990) sehr reich an Arginin, besitzt kein Lysin oder Cystein, und weist aufgrund der fehlenden Thiolgruppen eine geringere Stabilität auf. Nach EVENSON et al. 2002 ist

Protamin 2 reich an Histidin und besteht, je nach Spezies, aus ca. 54-63 Aminosäuren.

Alle Säugetiere besitzen Protamin 2 Gene, aber nicht alle sind in der Lage Protamin 2 zu exprimieren (LEWIS et al, 2003). Das Vorkommen von Protaminen bei unterschiedlichen Säugetieren ist in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1. Protaminfamilien in Nagetieren, Haustieren und Affen

Protamine	Spezies	Literatur
P1	Ratte	KISTLER et al. 1976; CALVIN 1976; AMMER u. HENSCHEN 1988
	Schaf	SAUTIÈRE et al. 1984
	Rind	MAZRIMAS et al. 1986; KRAWETZ et al. 1987
	Schwein	TOBITA et al. 1983
	Kaninchent	CALVIN 1976
	Meerschweinchen	CALVIN 1976; LEE u. CHO 1999
	Hund	
	Schwarzaffe	
	Affe	LEE u. CHO, 1999
P1 + P2	Maus	CALVIN 1976; BALHORN et al. 1977; BELLVÉ et al. 1988
	Hamster	CORZETT et al. 1999
	Pferd	AMMER und HENSCHEN 1987; BELAICHE et al. 1987; PIRHONEN et al. 1989

Beim Hund ist nur Protamin 1 im Spermienchromatin vorhanden (DADOUNE 2003). Bei Eber und Bullen ist die Abwesenheit von Protamin 2 auf eine Genmutation zurückzuführen (MAIER et al. 1990).

Das Fehlen von Protamin 2 in Spermien von Ratten beruht auf einer Unterdrückung der Transkription und Translation (HECHT 1989). Zunächst ging man davon aus, dass bei Spezies, deren Spermien, Protamin 1 und Protamin 2 enthalten, Protamin 2 essentiell für die Fertilität ist, da bei einigen infertilen Männern Protamin 2 fehlte (DE YEBRA et al., 1993 1998). Allerdings belegen neuere Studien, dass beide Protamine für die Fertilität von Bedeutung sind, da ein Protaminmangel, der durch eine Mutation in einem Gen von Protamin 1 oder Protamin 2, die Produktion fertiler Spermien unterbindet (CHO et al., 2001).

Die Bildungseffizienz von intermolekularen Disulfidbindungen beruht auf einer optimalen Positionierung und Bindung der Protamine an die DNA als Folge von Phosphorylierungs- und Desphosphorylierungsprozessen (MARUSHIGE u. MARUSHIGE 1978, BALHORN et al, 1984).

Untersuchungen über die Anzahl von Disulfidbindungen in Protaminen von reifen Spermatiden und Nebenhodenspermien haben gezeigt, dass die Chromatinstabilisierung im Hoden beginnt und während der Nebenhodenpassage abgeschlossen wird (DADOUNE 2003). Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine sind in Hodenspermien weitestgehend zu Disulfiden oxidiert (BALHORN et al., 2000; BREWER et al. 2002, 2003). Die Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken führt zu einer zusätzlichen Verdichtung des Spermienchromatins (BALHORN et al. 1991), die ebenso bedeutend für die fertilen Spermien ist, wie deren rechtzeitige Dekondensation in Verbindung mit der Kernformation (QUI et al. 1995).

Die Anzahl an Disulfidverbindungen in ejakulierten Spermien kann als kritische Größe im Dekondensationsprozess, der der Befruchtung unmittelbar folgt, angesehen werden, da dieser Vorgang auf der Reduktion von Disulfidverbindungen

beruht (LOVE and KENNEY 1998). Der Dekondensationszeitpunkt wiederum ist abhängig von der Anzahl der Disulfidbindungen innerhalb des Spermienkerns (PERREAULT et al. 1987). Die kompakte Chromatinstruktur der Spermien ist somit entscheidend für die Befruchtung und eine ungestörte embryonale Entwicklung (DE JONGE 1999).

2.3 Einflüsse auf den Spermienchromatinstatus

2.3.1 Physiologische Einflüsse auf den Chromatinstatus

Spermienreifung:

Die Protamination, der Austausch von Histonen durch Protamine, während der Spermiogenese führt zu einem extrem stabilen und hochkondensiertem Chromatin reifer Spermien (GOLDBERG et al. 1977; GATEWOOD et al. 1987). Diese extrem stabile Chromatinstruktur beruht vor allem in der Ausbildung von Disulfidbrücken während der Nebenhodenpassage (CALVIN u. BEDFORD 1971). Vor Ablauf der Protamination ist das Spermienchromatin aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung gegenüber Denaturierung in situ instabil.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen während der unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese an männlichen Keimzellen von Maus, Hamster, Kaninchen und Rind haben gezeigt, dass Keimzellen aus dem Hoden und aus dem Nebenkopf nach Säuredenaturierung in situ und Färbvorgang mit Akridin Orange zu 100% rot fluoreszieren, und dass während der Nebenhodenpassage die Anzahl der Spermien mit grüner Fluoreszenz zunimmt. Im Nebenhodenschwanz zeigten reife Spermien nur einen geringen Anteil an rot fluoreszierenden Spermien (KOSOWER et al. 1992; LÖHMER 2003). Während der Spermienreifung im Nebenhoden erhöht sich somit die Resistenz des Chromatins gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen (MONESI 1962; KIERSZENBAUM u. TRES 1975).

Entsprechend wurde im Nebenhodenkopf- und Nebenhodenkörper von Schafbock, Rotwild und Hund ein höherer Anteil an chromatininstabilen Spermien als im

Nebenhodenschwanz gefunden (GARCIA- MACIAS et al. 2006). Zwischen Spermien aus dem Nebenhodenschwanz und ejakulierten Spermien bestand jedoch in Hinblick auf den Chromatinstatus kein Unterschied.

Lebensalter:

In Bezug auf den Einfluss des Alters auf den Spermienchromatinstatus liegen kontroverse Ergebnisse vor. Untersuchungen von SPANŮ et al. (1998) bei Männern haben gezeigt, dass der Anteil an chromatininstabilen Spermien bei älteren im Vergleich zu jüngeren Männern erhöht ist. SUN et al. (1997) und ANGELOPOULOS et al. (1998) konnten diese Ergebnisse beim Menschen nicht bestätigen. Auch bei Bullen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und dem Anteil chromatininstabiler Spermien beobachtet (KARABINUS et al. 1990). Dagegen fand THIEßEN (2006) beim Vergleich einer Junghengstgruppe (5 Jahre alt) mit einer Althengstgruppe (im Mittel 21 Jahre alt) keine Unterschiede im Anteil chromatininstabiler Spermien.

Zink als Spurenelement

Zink hat sowohl als Wachstumsfaktor als auch für die physiologische Entwicklung der Geschlechtsorgane eine wichtige Bedeutung. Es ist bekannt, dass der Cysteinrest des Protamins 1 an Zink bindet (DADUONE 2003) und einen membran- bzw. proteinstabilisierenden Effekt, v.a. auf das Spermienchromatin besitzt (CHVAPIL 1973). Das Spermienchromatin von Mäusen mit Zinkmangelernährung wies eine verminderte Resistenz gegenüber Hitzedenaturierung in situ auf, die diätetisch beeinflussbar war (EVENSON et al. 1980a).

Temperatur

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass eine Erhöhung der Hodentemperatur, z.B. durch hohe Umgebungstemperaturen, sich nachteilig auf die Spermienchromatinstabilität auswirkt, und somit bei Männern, die aufgrund ihres Berufes (z.B. Glaser) hohen Umgebungstemperaturen ausgesetzt sind, das Risiko einer Subfertilität erhöht ist. WU (2005) beobachtete bei Bullen nach experimentell

induzierter Hyperthermie der Hoden eine temporäre Schädigung der Spermatogenese und eine Beeinträchtigung der Spermaqualität. Die Temperaturerhöhung führte zur Zunahme sowohl von Kopfanomalien als auch des Anteils chromatininstabiler Spermien. Auch andere Untersuchungen zeigten bei Bullen und Hengsten einen negativen Einfluss hoher Temperaturen auf die klassischen spermatologischen Parameter und auf den Chromatinstatus (SAACKE et al. 1994; KARABINUS et al. 1997; LOVE et al. 2002).

Rasse

Eine mögliche Rasseabhängigkeit in Bezug auf den Spermienchromatinstatus wird beim Rind diskutiert. GUENIAT VON COURROUX (1988) stellte fest, dass Bullen der Rasse Schweizer Simmentaler einen deutlich höheren Anteil chromatininstabiler Spermien (α_t : 222,11; COMP- α_t : 19,56) gegenüber allen anderen untersuchten Rassen (Holstein-Friesian, Schweizer Simmentaler, sowie Rassekreuzungen aus Red Holstein und Schweizer Simmentaler bzw. Braunvieh und Brown Swiss) aufwiesen. Die Autorin kommt daher zu dem Schluss, dass es nicht zu vernachlässigende Rasseunterschiede bezüglich der untersuchten SCSA-Parameter gibt.

Sexuelle Aktivität

Der Einfluss einer erhöhten geschlechtlichen Aktivität bzw. sexueller Ruhephasen auf den Spermienchromatinstatus wird kontrovers diskutiert. SPANÓ et al. (1998) stellte fest, dass sich eine Sexualkarenz bei Männern nachteilig auf die Spermienchromatinstabilität auswirkt. EVENSON et al. (1991) und SUN et al. (1997) konnten bei Männern diesen Einfluss jedoch nicht bestätigen. Aussagen über saisonale Schwankungen der Spermienchromatinstabilität sind ebenfalls widersprüchlich. Bei Kaninchen, Bullen und Schafböcken wurde außerhalb der Decksaison eine erhöhte Stabilität des Spermienchromatins, bei verminderter Fertilität festgestellt (MILLER u. BLACKSHAW 1968; SALISBURY u. HART 1970; RODRIGUEZ et al. 1985). Bei Deckhengsten war der Anteil chromatininstabiler Spermien im Winter signifikant höher als im Sommer ($p < 0,05$) (THIEßEN 2006).

2.3.2 Pathologische Einflüsse auf den Chromatinstatus

Störungen der Spermatogenese

Im Verlauf der Spermatogenese erhöht sich die Resistenz des Spermienchromatins gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen (MONESI 1962; KIERSZENBAUM u. TRES 1975). Diese kann durch pathologische Vorgänge erheblich beeinflusst werden. Eine Unterprotamination, d.h. ein mangelhafter oder fehlender Austausch von Histonen gegen Protamine, während der Spermiogenese wirkt sich nachteilig auf die DNA- Stabilität aus (BALHORN et al. 1988; BELEKOPYTOVA et al.1993; DE YEBRA et al. 1993; SAKKAS et al. 1995, 1996). Bei Männern hat auch ein Missverhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2 Chromatinveränderungen zur Folge (EVENSON et al. 2000; DE YEBRA et al. 1998; SCHLICKER et al. 1994).

Die DNA wird während der Spermiogenese durch Endonukleasen an bestimmten Stellen getrennt und wieder zusammengefügt (MC PHERSON u. LONGO 1993; SAKKAS et al. 1995), bis sie ihre endgültige räumliche Struktur erhält. DNA-Strangbrüche können die Folge einer unzureichenden Spermienreifung während der Nebenhodenpassage sein, die zu einer instabilen Spermienchromatinstruktur aufgrund einer unvollständigen Protamination führen (GORCZYCA et al. 1993; MANICARDI et al.1995, SAILER et al.1995). Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen hohen Gehalten des Enzyms Topoisomerase II und dem Auftreten von DNA- Strangbrüchen bei einer verlängerten Spermienreifung beobachtet werden (ROCA u. MEZQUITA 1989; MC PHERSON u. LONGO 1993). Die Topoisomerase II ist ein Chromosomen- assoziiertes Enzym, das Doppelstrangsnitte in die Doppelstrang-DNA einfügt, nach Aufwindung der Doppelhelix die Brüche wieder kovalent schließt und somit auch eine wichtige Bedeutung für eine stabile Spermienchromatinstruktur besitzt. Eine abnormale Aktivität der Apoptose kann ebenfalls zu Schäden der Spermienchromatinstruktur führen. Das Auftreten von DNA- Strangbrüchen ist charakteristisch für Apoptose (GORCZYCA et al. 1993). In

Ejakulaten mit einem erhöhtem Anteil an chromatindefekten Spermien konnten häufiger apoptotische Vorgänge beobachtet werden als in Ejakulaten mit chromatinintakten Spermien (MOUSTAFA et al. 2004). 20% von ejakulierten Spermien bei Männern weisen sowohl DNA-Strangbrüche als auch Apoptose-Merkmale auf (OOSTERHUIS et al. 2000). Nach EVENSON et al. (2002) sind DNA-Strangbrüche nicht mit apoptotischer Degeneration gleichzusetzen. Das transmembrane Rezeptorprotein FAS löst Apoptose aus (LEE et al. 1997). Von Sertolizellen exprimierte FAS-Liganden binden FAS- positive Stammzellen, was zum programmierten Zelltod führt. Durch diesen Vorgang wird eine Überproliferation von Stammzellen verhindert und Zellen eliminiert, die für die Spermiogenese ungeeignet sind (LEE et al. 1997b; RODRIGUEZ et al. 1997). Subfertile Männer haben einen höheren Anteil an FAS- positiven Spermien als fertile Männer (SAKKAS et al. 1999).

Die Spermatogenese kann weiterhin durch ein Übermaß an ROS (reactive oxygen species) beeinträchtigt werden. ROS sind notwendige Oxidantien, die an wichtigen physiologischen Funktionen beteiligt sind und deren Überproduktion durch Antioxidantien geregelt wird. Unter physiologischen Bedingungen sind sie mitverantwortlich sowohl für die Bildung fertiler Spermien als auch für die Befruchtungsvorgänge (BECKMAN u. AMES 1997). Ein erhöhter ROS- Gehalt im Sperma liegt während einer Leukozytose (AITKEN et al. 1992, 1995; ALVAREZ et al. 2002), bei Spermien mit Zytoplasmotropfen am Mittelstück im Ejakulat (GOMEZ et al. 1996) oder bei einer Oligozoospermie vor (AITKEN et al. 1992). Ein Anstieg von ROS führt zu Spermienfunktionstörungen und Chromatinstrukturdefekten (EVENSON et al. 2002), die auf einem Anstieg an DNA-Fragmenten (POTTS et al. 2000; BAUMBER et al. 2003; MOUSTAFA et al 2004), auf einer abnormaler Endonukleaseaktivität oder auf apoptotischen und nekrotischen Prozessen im Hoden (EVENSON et al. 2002) beruhen können.

Krankheitsbedingte Ursachen

Entzündungen, Infektionen, Fieber sowie Neoplasien, Kryptorchismus, Varikozelen und eine Leukozytospemie haben Einfluss auf den Spermienchromatinstatus.

Untersuchungen an Männern von EVENSON et al. (1991) ergaben, dass entzündliche Prozesse, die mit einer Bakteriospermie einhergehen, z.B. bei einer Prostatitis zu einer verminderten Spermienchromatinstabilität führen, die sich nach einer antibiotischen Therapie wieder normalisiert. Eine Leukozytospemie in Folge akuter oder chronischer Infektionen der männlichen Geschlechtsorgane und akzessorischen Geschlechtsdrüsen führt ebenfalls zu vermehrten chromatininstabilen Spermien im Ejakulat (ENGH et al. 1992; SPANO et al. 1998; ALVAREZ et al. 2002).

Generalisierte mit Fieber einhergehende Infektionskrankheiten beeinflussen aufgrund der Hodenerwärmung durch die erhöhte Körpertemperatur die Spermienchromatinstabilität nachteilig (EVENSON et al. 2000). Nach Abklingen des fiebrigen Infektes normalisiert sich die Spermienchromatinstabilität wieder. In Ejakulaten von Patienten mit Hodenneoplasien, Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin Lymphomen sowie anderen Tumoren waren DNA-Schäden signifikant höher als in Ejakulaten fertiler Männer (KOBAYASHI et al. 2001). Bei an einer akuten lymphozytären Leukämie erkrankten Männern wurden 10 bis 52 Monate nach Beendigung der Therapie DNA-Fragmentationen in Übereinstimmung mit einem physiologischen Fertilitätsstatus festgestellt (EVENSON et al. 1984). FOSSA et al. (1997) stellten bei Patienten mit malignem Hodentumor nach einer erfolgreichen Strahlen- bzw. Chemotherapie eine physiologische Spermatogenese mit normalem Anteil an DNA- Fragmentationen fest.

Toxikologische und umweltbedingte Einflüsse

Bestimmte Wirkstoffe von Arzneimitteln, Pestizide und Luftverschmutzungen führen zu einer verminderten Spermienchromatinstabilität. Bei Männern stieg nach 4 - monatiger Kortisontherapie der Anteil an DNA-Fragmentationen auf 50 % an. Nach abgeschlossener Behandlung reduzierte er sich auf seinen Ausgangswert (EVENSON et al. 1991). Bei Hengsten sank zwei Monate nachdem Absetzen leistungssteigernder Zusatzstoffe der COMP α_t -Wert 48% auf 10 % ab (KENNEY et

al. 1995). Eine längerfristige Acetaminophen-Gabe führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Spermienchromatinstruktur in situ (WIGER et al. 1995). Acetaminophen ist häufig in Medikamenten mit analgetischer und antipyretischer Wirkung zu finden. Bei Überdosierung hemmt es die DNA- Replikation und wirkt sich nachteilig auf das Hodengewicht aus. Ebenso können toxische Stoffe wie Zeranol, Hydroxycarbamide und Methyl-Methansulfonate Chromatindefekte und eine testikuläre Gewichtsabnahme verursachen (BALLACHEY et al. 1986; EVENSON u. JOST 1993; EVENSON et al. 1993). SELEVAN et al. 2000 untersuchten den Einfluss von Luftverschmutzungen auf den Spermienchromatinstatus von 18- jährigen Männern aus einer Stadt in der tscheschischen Republik, in der Braunkohle verbrannt wird. Ein Viertel der Männer wiesen im Ejakulat über 30% an chromatininstabilen Spermien auf. Bei gleichaltrigen gesunden Männern lag der Anteil chromatininstabiler Spermien unter 5%. In Villa Juarez, einem Staat von Durango in Mexiko, betrug bei 75% der landwirtschaftlichen Arbeiter, die Organophosphat-Pestiziden exponiert waren, die DFI-Werte über 30% (SANCHEZ-PEÑA et al. 2004). Weiterhin haben Studien an Mäusen (AHMADI u. NG 1999) und Rindern (FATEHI et al.2006) gezeigt, dass eine durch Bestrahlung hervorgerufene Spermien-DNA-Schädigung eine fehlerhafte Blastozystenbildung zur Folge hat.

2.4 Untersuchungsmethoden zur Erfassung des Spermienchromatinstatus

2.4.1 Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA®)

Der Spermienchromatinstrukturassay (SCSA®) wurde erstmals von Evenson et al. (1980a) entwickelt und ist als Verfahren zur Analyse des Spermienchromatinstatus international anerkannt. Er prüft die Anfälligkeit der Spermienkern-DNA gegenüber säure- oder hitzevermittelter Denaturierung in-situ, und gibt somit Aufschluss über die Chromatinstabilität der Spermien. Durch den Denaturierungsvorgang wird die Doppelstrangstruktur der DNA aufgelöst, so dass zwei Einzelstränge entstehen. Die Denaturierung erfolgt nur an protaminvernetzter DNA (EVENSON et al. 1985, 1986). Nur die DNA von chromatininstabiler Spermien ist anfällig gegenüber diesem Denaturierungsprozess. Das Ausmaß der Denaturierung ist somit von der Chromatinintegrität der Spermien abhängig. Anschließend erfolgt die Färbung mit dem metachromatischen DNA-Farbstoff Akridin Orange. Intakte Spermienkern-DNA fluoresziert grün, während die DNA-Einzelstränge eine rote Fluoreszenz zeigen (EVENSON et al. 1991; EVENSON et al. 1995;).

Die Intensität der Fluoreszenzen wird durchflusszytometrisch von 5000 Zellen erfasst. Während dieses Vorganges werden suspendierte Spermien einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem fokussierten Laser vorbeigeführt. Der Laserstrahl trifft mit einer bestimmten Wellenlänge (blaues Laserlicht, 488 nm) auf die Zellen und regt diese zur Fluoreszenz an. Die unterschiedlichen Fluoreszenzen entstehen durch die Bindungseigenschaften des Akridin Orange. Bei doppelsträngiger DNA wird der Farbstoff als Monomer zwischen zwei parallele Basen eingebaut und fluoresziert unter blauem Laserlicht grün (max. Emission 530nm). An einzelsträngiger DNA hingegen lagert sich das Akridin Orange als Polymer in Form von ionischen Bindungen an die Phosphatgruppen an und fluoresziert rot (max. Emission 640nm) (DARZYNKIEWICZ et al. 1975; EVENSON et al. 1980a, b; TEJADA et al. 1984, ROYERE et al. 1988; KOSOWER et al. 1992). Die Intensität der Rot- und Grünfluoreszenz wird für jedes einzelne Spermium ermittelt und in

einem Punktwolkendiagramm dargestellt, an dem die Spermienpopulation vom Zelldetritus abgegrenzt wird. Nachfolgend wird der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot+grün) errechnet. Dieser Wert wird nach der neuen Nomenklatur DNA-Fragmentationsindex genannt (früher α_t) (EVENSON et al. 2002). Er nimmt einen Wert zwischen 1 und 0 an und charakterisiert den Denaturierungsgrad jedes einzelnen Spermiums. Je höher dieser Wert ist, desto mehr Spermien mit chromatininstabiler DNA liegen vor. In einem Verteilungshistogramm werden alle detektierten Spermien gemäß ihrem DNA-Fragmentationsindex (DFI) aufgetragen.

Zusätzlich werden die Mittelwerte und Standardabweichungen des DFI basierend auf der Analyse aller Spermien errechnet. Die Abgrenzung zwischen den Spermienpopulationen mit niedrigem bzw. hohem DFI erfolgt für die Auswertung anhand der Verteilungshistogramme subjektiv. Anschließend wird der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Wert mittels Softwareprogramm errechnet (DIGRASSIE 2000). Nach EVENSON und JOST (2000) ist der früher genannte COMP α_t der wichtigste Wert des SCSA zur Beurteilung der Fruchtbarkeit.

2.4.2 Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA)

TEJADA et al. (1984) entwickelten basierend auf der Methode von EVENSON et al. (1980a) ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zur Ermittlung chromatininstabiler Spermien beim Menschen. Die Färbung erfolgt mittels Akridin Orange (Akridin Orange Test, AOT). Es werden 300 Spermienköpfe mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dieser Test besitzt eine hohe Reproduzierbarkeit und den Vorteil, dass eine gleichzeitige Beurteilung von Spermienchromatinstruktur und Spermienmorphologie möglich ist (TEJADA et al. 1984, ROUX u. DADOUNE 1989). Nachteile dieses Untersuchungsverfahrens sind, dass neben der Rot- und Grünfluoreszenz auch Zwischenstufen von Gelb- und Orangefarbtönen auftreten sowie das schnelle Verblässen der Fluoreszenz. Diese Nachteile führen zur

Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Auswertung (TEJADA et al. 1984). KOSOWER et al. (1992) fanden heraus, dass die Protamination während der Spermiogenese für die Spermienchromatininstabilität verantwortlich und dass die Fluoreszenz des AO vom Thiol-Disulfid-Status der Protamine abhängig ist. Auf Grundlage dieser Erkenntnis fügten KOSOWER et al. (1992) das DDT (1,4 Dithiothreit) zu, wodurch die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen den Protaminen aufgelöst, die Thiolgruppen jedoch erhalten bleiben. Durch die Aufhebung der Tertiärstruktur der protamingebundenen DNA wird die Oberfläche für die anschließende Säuredenaturierung vergrößert. Auf dieser Grundlage entwickelte ACEVEDO (2001) unter Verwendung von Bullensperma ein neues fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zur Untersuchung des Spermienchromatinstatus, in welchem an Stelle des DTT das 2 Mercaptoethanol zur Stabilisierung der Thiole zum Einsatz kam. Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode etablierte LÖHMER (2003) am hiesigen Institut einen modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Chromatinstruktur Assay (mfSCSA) für Bullensperma. BIEGE (2004) wandte den mfSCSA für die spermatologische Diagnostik beim Hund an. Die fluoreszenzmikroskopische Methode ist ein kostengünstigeres Verfahren gegenüber dem durchflusszytometrischen Verfahren, erlaubt aber nur die subjektive Auswertung von 300 bzw. 500 Spermien pro Probe und beansprucht deutlich mehr Zeit.

2.5 Spermienchromatinstatus in Bezug zur Fertilität

Eine stabile Spermienchromatinstruktur ist entscheidend für die Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung (TEJADA et al. 1984, SAACKE et al. 1994, DARZYNKIEWICZ et al. 1997, SAKKAS u. TOMLINSON 2000, EVENSON et al. 2000). Die Ätiologie der Unfruchtbarkeit kann bei 30% aller infertilen Männer mit der herkömmlichen Spermatologie nicht geklärt werden (NIESCHLAG 2000). Die Spermien von Männern mit idiopathischer Infertilität zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Säuredenaturierung in situ (EVENSON et al. 1991, 2002; SALEH et al. 2002). Studien an unterschiedlichen Spezies haben gezeigt, dass ein vermehrtes Auftreten von Spermien mit instabilem Spermienchromatin im Ejakulat mit Spermatogenesestörungen, Spermienanomalien und Infertilität assoziiert ist (EVENSON u. MELAMED 1983; EVENSON et al. 1984; EVENSON et al. 1980a; EVENSON et al. 1985).

Der Spermienchromatinstatus hat einen eigenständigen Stellenwert in der Fertilitätsdiagnostik, und ist als unabhängiger Parameter zu betrachten. Über Zusammenhänge zwischen dem Spermienchromatinstatus und den klassischen spermatologischen Parametern liegen kontroverse Ergebnisse vor. Beim Menschen wurden Korrelationen bezüglich des Anteils an vorwärtsbeweglichen Spermien und eines erhöhten Anteils an chromatininstabilen Spermien festgestellt (EVENSON et al. 1991; ENGH et al. 1992; GIWERCMAN et al. 2003). GUENIAT VON COURROUX (1988) konnte diesen Zusammenhang auch beim Rind nachweisen. Beim Hengst wurde eine negative Korrelation zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und der initialen Spermienmotilität beobachtet (KENNEY et al 1995; THIEßEN et al. 2006). Beim Rüden waren nur teilweise signifikante negative Korrelationen zwischen Spermienmotilität, -geschwindigkeiten und dem Anteil chromatininstabiler Spermien zu finden. In diesem Fall bestand ein Zusammenhang zwischen dem mittels CMA gemessenen Anteil vorwärtsmotiler Spermien, der Spermengeschwindigkeit über die gemittelte Bahn (VAP) und der Spermengeschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn (VCP) (BIEGE 2004). Positive Korrelationen sind bei Mensch, Rind und Hund zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Anteil

membrangeschädigter Spermien beschrieben (GUENIAT VON COURROUX 1988; ENGH et al. 1992; und BIEGE 2004), sowie bei Mensch, Pferd, Hund und Katze zwischen dem Anteil an chromatininstabilen Spermien und dem Anteil an morphologisch abweichenden Spermien (IBRAHIM u. PEDERSEN 1988; EVENSON et al. 1991; CLAASSENS et al. 1992; ENGH et al. 1992; KENNEY et al. 1995, THIEßEN 2006; PENFOLD et al. 2003 und BIEGE 2004). Im Gegensatz dazu konnten BALLACHEY et al. (1986) bei Mäusen, HAMMADEH et al. (1996) bei Rindern und SPANÒ et al. (2000) bei Menschen keinen Zusammenhang zwischen dem Spermienchromatinstatus und den Samenqualitätsparametern darstellen.

Beim Schwein wurde eine negative Korrelation zwischen der Überlebensfähigkeit der Spermien während der Lagerung und dem DFI nachgewiesen (BOE- HANSEN et al. 2008). Da das Spermienchromatin den Spermienkopf fast vollständig ausfüllt, ist es nahe liegend Spermienkopfanomalien in Bezug auf den Anteil an Spermien mit instabiler Spermienchromatinstruktur zu betrachten. Dazu durchgeführte Studien lieferten ebenfalls kontroverse Ergebnisse. TEJADA et al. (1984) und EVENSON et al. (1991) zeigten beim Menschen signifikante Korrelationen zwischen dem Anteil an Spermienkopfanomalien und dem Anteil chromatininstabiler Spermien. Die chemische Induktion von Spermienkopfanomalien ging bei Mäusen mit einer Erhöhung der $COMP\alpha_t$ -Werte einher (EVENSON et al. 1985, 1986). Dagegen ergaben sich beim Rind keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Anteil an morphologisch abweichenden Spermienköpfen und dem Anteil chromatininstabiler Spermien (LÖHMER 2003).

Beim Hund wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen von $\leq 5\%$ und $> 5\%$ und dem jeweiligen Prozentsatz chromatininstabiler Spermien aufgezeigt (BIEGE 2004). Dagegen wies der Spermienchromatinstatus bei Rüden mit einer Normo- und mit einer Dysspermie keine Unterschiede auf (BIEGE 2004). Nach ROUX u. DADOUNE (1989) müssen Spermienkopfanomalien nicht zwangsläufig mit Chromatinschäden einhergehen. Ebenso können Spermien mit physiologischer Kopfmorphologie Chromatinschäden

aufweisen (DADOUNE et al. 1988; MARTIN u. RADEMAKER 1988 und LIU u. BAKER 1992). Die unterschiedlichen Ergebnisse im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den konventionellen spermatologischen Parametern und dem Spermienchromatinstatus machen deutlich, dass der Spermienchromatinstatus als eigenständiger Fertilitätsparameter anzusehen ist. EVENSON et al. (2002) setzten für den Menschen Grenzwerte des Anteils chromatininstabiler Spermien im Ejakulat (DFI- Werte) in Hinblick auf den Fertilitätsstatus fest (Tab. 2).

Tab.2 DFI-Werte von Männern im Hinblick auf den Fertilitätsstatus nach EVENSON et al. (2002)

DFI (%)	Fertilitätsstatus
< 15	sehr gut
15 - 24	gut
25 – 30	mittelmäßig
> 30	schlecht

Obere Grenzwerte des Anteils an DNA-Fragmentationen von Bullen und Hengsten mit ungestörter Fruchtbarkeit beträgt ca. 25% (BOCHENEK et al. 2001; LOVE 2005). Ebenfalls konnte anhand mehrerer Studien der kausale Zusammenhang zwischen einem hohen Anteil an chromatindefekten Spermien im Ejakulat und einer herabgesetzten Fertilität verdeutlicht werden (EVENSON et al. 1980(a); TEJADA et al. 1984; IBRAHIM u.PEDERSEN 1988; BALLACHEY et al. 1988).

Nach ARDON (2005) besitzen chromatindefekte Spermien eine herabgesetzte Fähigkeit am Eileiterepithel zu binden, wodurch auch ihre Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigt ist. Sauen, die mit Sperma besamt wurden, dessen DFI- Wert über 2,1% lag, hatten um 0,5 – 0,9 Ferkel weniger als Sauen, bei denen die Insemination bezüglich des DFI-Wertes mit besserem Sperma erfolgt war (BOE-HANSEN et al. 2008). Mit Hilfe des SCSA besteht somit die Möglichkeit Eber mit herabgesetzter

Fertilität zu erkennen und nach einer Kosten-Nutzen-Analyse aus der Schweine-Industrie zu eliminieren (BOE-HANSEN et al. 2008).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Ejakulate von insgesamt 112 Hunden untersucht. Dabei handelte es sich um vier institutseigene Beagle-Rüden im Alter von 4 bis 8 Jahren sowie um folgende Tiere aus dem Privatbesitz: 12 Foxterrier im Alter von 1 bis 11 Jahren, acht Labrador Retriever und zwei Golden Retriever im Alter von 1,2 und 5 Jahren, neun Deutsche Doggen im Alter von 2 bis 5 $\frac{3}{4}$ Jahren und 37 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von 9 Monaten bis 11 Jahren. In der gemischten Rüdenpopulation (n=37) waren folgende Rassen vertreten: Airdale Terrier, Altdeutscher Schäferhund, Beagle, Berner Sennenhund, Bouvier de Flandres, Boxer, Cavalier King Charles Spaniel, Deutsch Kurzhaar, Eurasier, Foxterrier, Gordon Setter, Kleiner Münsterländer, Mittelpudel, Rhodesian Ridgeback, Rottweiler, Tibet Spaniel und Wolfsspitz. Als homogene Kontrollgruppe dienten 40 einjährige Beagle- Rüden einer pharmazeutischen Firma, die im Rahmen einer Toxizitätsstudie unbehandelt blieben und einmal zur Samengewinnung herangezogen wurden.

Die institutseigenen Beagle waren zusammen in einem Zwinger mit Auslauf im Freien und einer mit Stroh eingestreuten Schutzhütte untergebracht. Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit einem handelsüblichen Trockenfutter. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Die Rüden aus den Privathaushalten wurden als Liebhabertiere oder als Zuchthunde gehalten. Die 40 Beagle der Kontrollgruppe lebten in Einzelhaltung in Zwingern und wurden mit handelsüblichem Futter und Wasser ad libitum versorgt.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Hunde klinisch allgemeingesund.

3.1.2 Methoden

Die für die Untersuchungen verwendeten Chemikalien und Vorschriften zur Herstellung von Lösungen und Puffern und die benötigten Laborgegenstände und Geräte sind im Anhang aufgeführt (9.1 Laborbedarf, 9.2 Chemikalien, 9.3 Lösungen; Puffer).

3.1.2.1 Andrologische Untersuchung und Samengewinnung

Von jedem Tier wurden die Kennzeichen, das Körpergewicht und ein Vorbericht bezüglich der bisherigen Zuchteinsätze, des Deckverhaltens, der Befruchtungsergebnisse (Wurfrate, Wurfgröße) sowie vorausgegangener Erkrankungen und Behandlungen, aufgenommen und dokumentiert. Anschließend wurde jeder Rüde, wie bei GÜNZEL-APEL (1994) beschrieben, andrologisch untersucht (Untersuchung auf Allgemeingesundheit, phänotypische genitale Erbgesundheit, Geschlechtsgesundheit, Begattungsfähigkeit und Befruchtungsfähigkeit). Zur Beurteilung der Geschlechtsgesundheit wurde neben der Adspektion und Palpation eine sonographische Untersuchung von Hodensack, Hoden, Nebenhoden und Prostata durchgeführt. Hierfür stand das Ultraschallgerät LOGIQ 5 Pro (Fa. General Electrics Healthcare, Solingen) mit einem 6-MHz Konvexschallkopf und einem 12-MHz-Linearschallkopf zur Verfügung.

Die Ejakulate wurden nach KRAUSE (1965) und GÜNZEL-APEL (1994) unter Kontaktaufnahme mit einer läufigen Hündin durch manuelle Stimulation und Fixation des Penis fraktioniert in Vorsekret, spermienreiche und spermienfreie Phase gewonnen. Als Samenauffanggläser dienten graduierte (8ml), auf 38 °C angewärmte Tulpengläser (Fa. Ludwig Bertram GmbH MedVet, Laatzen).

3.1.2.2 Biologische Samenuntersuchung

Jede Ejakulatfraktion wurde makroskopisch, mikroskopisch und chemisch-physikalisch untersucht (KRAUSE 1965, GÜNZEL-APEL 1994). Bestimmt wurden das Volumen (ml), das Aussehen (Konsistenz/ Farbe), die Samendichte ($\times 10^6$ Samenzellen/ml), die Spermiengesamtzahl ($\times 10^6$), und der pH-Wert. In der

spermienreichen Ejakulatfraktion wurden zusätzlich die Anteile vorwärts-, orts- und unbeweglicher Spermien (%), membrangeschädigter Spermien (%) und morphologisch abweichender Samenzellen (%) bestimmt.

3.1.2.2.1 Bestimmung der Samendichte und der Spermiengesamtzahl

Die Dichtebestimmung ($10^6/\text{ml}$) erfolgte unter Auszählung der Spermien in einer Zählkammer nach Thoma „neu“ und anschließender Berechnung.

Dafür wurde aus 10 ml einer 10% igen NaCl-Lösung zunächst die Menge (μl) entnommen, die anschließend an Sperma hinzugefügt wurde. Der Volumenanteil an Sperma richtete sich nach der Konsistenz (rahmähnlich bis milchig, milchig, milchig bis molkig, molkig, molkig bis wässrig) und betrug zwischen 10 und 200 μl . Für die Auszählung wurde die Zählkammer mit einem ca. 8 μl großer Tropfen des sorgfältig in der NaCl- Lösung suspendierten Spermas beschickt. Die Auszählung erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch bei 400-facher Vergrößerung. Es wurden jeweils die Spermienköpfe in 5 großen Quadraten des unteren und oberen Zählkreuzes ausgezählt und addiert. Zusätzlich wurden die auf zwei Begrenzungslinien (L-Form) liegenden Spermienköpfe eines großen Quadrates und „Deckglasspermien“ mitgezählt. Die Berechnung der Dichte erfolgte nach folgender Formel: Dichte = Gesamtzahl der ausgezählten Spermien / ausgezählte Fläche x Kammerhöhe x Verdünnungsgrad. Die Spermienzahl pro Ejakulatphase ($\times 10^6$) ist das Produkt aus deren Volumen und Dichte. Die Spermiengesamtzahl ($\times 10^6$) im Ejakulat errechnet sich durch Addition der in allen Ejakulatfraktionen befindlichen Spermien.

3.1.2.2.2 Bestimmung der Spermienmotilität

3.1.2.2.2.1 Mikroskopische Schätzung

Die Untersuchung der Spermienmotilität erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops mit Heiztisch (38°C). Zum Pipettieren des Spermas verwendete Eppendorfpipettenspitzen sowie Objektträger und Deckgläschen wurden ebenfalls auf einem Heiztisch bei 38°C vorgewärmt. Für die Untersuchung wurden

drei ca. senfkorngroße Tropfen aus der unverdünnten spermienreichen Ejakulatfraktion auf einen Objektträger gegeben und jeweils mit einem Deckgläschen (18 x 18mm) bedeckt.

Die Bewegungsaktivität der Samenzellen wurde hinsichtlich der Einzelbewegung geprüft und die Anteile vorwärts-orts und unbeweglicher Spermien geschätzt und in Prozent (%) angegeben. Beimengungen wie Epithelzellen, Erythrozyten, Leukozyten, freie Plasmotropfen und Rundzellen sowie Agglutinationen wurden mitbeurteilt und notiert.

3.1.2.2.2 Computergestützte Motilitätsanalyse (CMA, Cell Motion Analyser®)

Die Betrachtung erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop [Olympus BH 2 mit Heiztisch (39°C)] bei 200-facher Vergrößerung. Das Mikroskopbild wurde über eine schwarzweiß Videokamera auf einen Computerbildschirm übertragen und mittels Cell Motion Analyser® 2,0 Programm analysiert. Für die Untersuchung wird ein Teil der zu beurteilenden Samenprobe auf 100 Mio./ml mit TRIS-Stammlösung verdünnt, und ein ca. 2 µl großer Tropfen in eine Mika-Zählkammer pipettiert. Die dafür benötigten Pipettenspitzen sowie die Mika-Zählkammer wurden auf einem Heiztisch auf 38°C vorgewärmt. Es wurde der Bewegungsmodus von 200 Zellen ausgewertet, und folgende Parameter bestimmt: der Anteil vorwärtsmotiler Spermien (%), die Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende (µm/sec) (velocity Straight Line, VSL), die Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn (µm/sec) (Velocity Averaged Path, VAP) und die Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn (µm/sec) (Velocity Curve Line, VCL).

3.1.2.2.3 Bestimmung des Anteils membrangeschädigter Spermien

Zur Differenzierung von lebender (membrangeschädigter) und toter (membranintakter) Spermien erfolgte durch Färbung der Spermien mit Eosin (Supravitalfärbung) oder durch Fluoreszenzmarkierung mit Propidiumiodid (PI).

3.1.2.2.3.1 Supravitalfärbung

Dieser Farbstoffabsorptionstest wurde am unverdünnten Sperma durchgeführt. Für die Färbung wurde eine 2%ige Farblösung aus Eosin in einer 3%igen wässrigen Tri-Natriumcitratdihydrat-Lösung hergestellt. Der Färbevorgang erfolgte auf einem vorgewärmten Objektträger (38°C). Zwei Tropfen der Färbelösung wurden mit einem Tropfen Sperma vermischt, ausgestrichen und luftgetrocknet. Unter einem Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch wurden 200 Zellen bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt und nach nicht gefärbten (lebenden) und rot gefärbten (toten) Spermien differenziert.

3.1.2.2.3.2 Propidium-Iodid- Färbung

Die für den Färbevorgang benötigte Propidium-Iodidlösung wurde unter Lösung von 0,5 mg Propidium-Iodid in 1 ml Aqua dest. (HARRISON u. VICKERS 1990) hergestellt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen portioniert, die lichtgeschützt bei -18°C gelagert wurden. Für jede Färbung wurde die Lösung unter Lichtausschluss bei 37 °C aufgetaut. Die zu untersuchende Spermafraktion wurde mit TRIS-Stammlösung auf 100 Mio. Spermien/ml verdünnt. Danach wurden 485 µl der verdünnten Spermienlösung, 10 µl Formolcitrat und 5 µl Propidium-Iodidlösung in ein mit Aluminiumfolie ummanteltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und vermischt. Für die Differenzierung wurden 200 Zellen in einem abgedunkelten Raum am Fluoreszenzmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Axioskop, Fa. Zeiss, Jena) bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung eines 560 nm- Filters beurteilt. Dabei stellten sich die membrandefekten Zellen rotfluoreszierend dar.

3.1.2.2.4 Spermienmorphologie

Für die Beurteilung morphologisch abweichender Spermien wurden einige Tropfen der spermienreichen Phase zu 300 µl Formolcitratlösung pipettiert und auf diese Weise flüssig fixiert. Daraus wurde ein ca. 2 µl großer Tropfen auf einen Objektträger verbracht und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die Untersuchung von 200 Zellen erfolgte nach einer kurzen Wartezeit, um zu gewährleisten, dass alle Zellen plan auf dem Objektträger lagen, mit Hilfe eines

Phasenkontrastmikroskops ohne Heiztisch bei 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Ölimmersion. Es wurden Kopfkappen-, Kopf-, Hals-, Verbindungsstück-, Haupt- und Endstückveränderungen sowie Doppel- und Mehrfachmissbildungen differenziert.

3.1.2.3 Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA®)

Unmittelbar nach der spermatologischen Untersuchung wurden jeweils eine Nativspermaprobe für den SCSA® in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und gelagert.

Die Durchführung des SCSA® orientierte sich nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000). Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer Epics XL-MCL (Fa. Beckman Coulter, Krefeld) unter Verwendung der Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL -3 für die rote Fluoreszenz.

Vorbereitung der Spermaprobe

Die in flüssigen Stickstoff (-196°C) gelagerten Ejakulatproben wurden in einem Heizblock bei 37°C für ca. 3 min aufgetaut, und anschließend mit TNE- Puffer in einem Durchflusszytometerröhrchen auf 2×10^6 Spermien / ml verdünnt. 200 µl der Spermiesuspension wurden in ein neues Durchflusszytometerröhrchen überführt. Aus jeder Ejakulatprobe wurden zwei Verdünnungen hergestellt (Doppelprobe).

Denaturierung und Färbung des Spermienchromatins

Zu den 200 µl der Spermiesuspension wurden 400 µl Säuredetergenz hinzupipettiert und die Probe für 30 sec gevortext.

Durch diesen Vorgang wird die Doppelstrangstruktur der DNA bei instabilem Spermienchromatin in seine zwei Einzelstränge aufgelöst. Die DNA in Spermien mit intaktem Chromatin denaturiert nicht.

Anschließend erfolgte der Färbevorgang durch Zugabe von 1,2 ml Akridin-Orange (AO)- Färbelösung und exakt 3-minütiger Inkubationszeit.

Aufgrund der metachromatischen Eigenschaften des AO wird dieser Farbstoff bei doppelsträngiger DNA als Monomer zwischen parallelen Basen eingebaut und fluoresziert unter blauem Laserlicht grün (max. Emission 530 nm). Bei einsträngiger DNA lagert sich das AO als Polymer in Form ionischer Bindungen an die Phosphatgruppen und fluoresziert rot (max. Emission 640 nm) (DARZYNKIEWICZ et al. 1975; EVENSON et al. 1980a, b; TEJADA et al. 1984; ROYERE et al. 1988; DARZYNKIEWICZ u. KAPUSCINSKI 1990; KOSOWER et al. 1992).

Messung und Auswertung

Nach der Inkubationszeit wurde die Probe am Durchflusszytometer gemessen. Es wurde die Fluoreszenz von 5000 Zellen bestimmt. Für die computergestützte Auswertung der Messdaten wurde zunächst die zu untersuchende Spermienpopulation vom übrigen Zelldebris an einem Punktwolkendiagramm eingegrenzt (Abb. 2). Bestimmt wurde der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz [α_t bzw. DFI (DNA- Fragmentationsindex)] für jedes einzelne Spermium. Diese Werte werden in Abhängigkeit von ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm dargestellt. An diesem Histogramm erfolgte eine subjektive Eingrenzung der Spermien mit niedrigem α_t -Wert (niedrigem DFI; Hauptpopulation) von solchen mit erhöhten α_t -Werten (erhöhtem DFI, Nebenpopulation). Diese Eingrenzung wurde für jede Probe doppelt durchgeführt, um mögliche Ungenauigkeiten zu minimieren. Anschließend wurde der Anteil an denaturierten Spermien in % (hier DFI- Spermien; früher COMP α_t) und der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz ($\text{rot} / (\text{rot} + \text{grün}) \times 1000$; hier α_t) errechnet. Aus den so für jede Ejakulatprobe erhaltenen 4 Messwerten für jeden Parameter wurde der Mittelwert gebildet.

Zu Beginn und nach jeder 5. Doppelmessung wurde eine Standardprobe gemessen. Bei dieser Probe handelte es sich um eine auf 200×10^6 Spermien verdünnte Ebersamenprobe. Diese Kontrollprobe diente dazu, bei starken Schwankungen der Werte mögliche Messfehler anzuzeigen. Da es sich bei den Rüdenejakulaten um Nativsperma handelte, wurde bei starken Verunreinigungen ein Spülvorgang mit Aqua dest. durchgeführt.

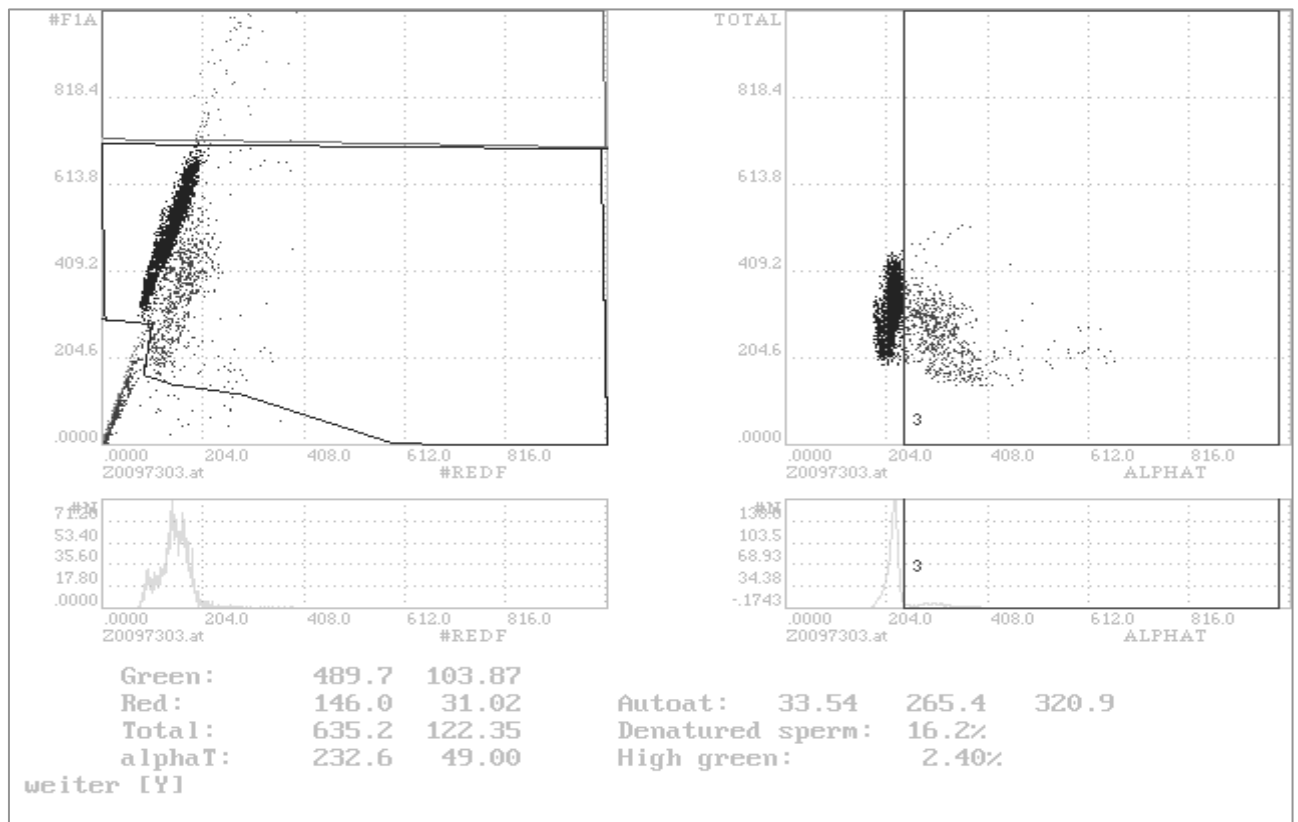


Abb. 2 Punktwolkendiagramm und Verteilungshistogramm einer mittels SCSA® untersuchten Ejakulatprobe

3.1.2.3.1 Untersuchung der Spermienchromatinstruktur von Rüden unter Berücksichtigung des Fertilitäts- und Rassestatus

- in einer gemischten Rüdenpopulation

Es wurden 68 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von 9 Monaten bis 11 Jahren andrologisch untersucht und der Anteil an chromatininstabilen Spermien (DFI %) sowie der α_t - Wert bestimmt.

- bei Rüden mit unterschiedlichem Ejakulatstatus

Die Ejakulate von 68 Rüden aus der gemischten Rüdenpopulation wurden am Anteil morphologisch abweichender Spermien (< 30% MAS, > 30 – 60% MAS, > 60% MAS) in Normospermie (n=37), Dysspermie (n=19) und Pathospermie (n=12) unterteilt

- bei Rüden mit Normospermie und unter Berücksichtigung von möglichen Rasseunterschieden

In diese Untersuchung flossen die Ergebnisse der Rüden mit Normospermie (total n= 37) ein. Für die Beurteilung möglicher Rasseunterschiede wurden 8 Foxterrier Rüden, 6 Retriever (4 Labrador Retriever und 2 Golden Retriever) und 3 Deutsche Doggen untersucht. Diese 3 Rassen wurden auch gewählt, um den DFI (%)- und die α_t - Werte bei einer kleinen, mittelgroßen und großen Rasse zu beurteilen.

3.1.2.3.2 Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Spermienchromatinstruktur und ausgewählten konventionellen Ejakulat-parametern

Von den 68 Rüden der gemischten Rüdenpopulation wurde je ein Ejakulat (n=68) in die Untersuchung einbezogen. Es wurden die DFI- Werte (%) und die α_t -Werte mit folgenden Parametern in Beziehung gesetzt:

- Vorwärtsmotiler Spermien (%)
(mikroskopische Schätzung, Vmot, n=68; computergestützte Motilitätsanalyse, CMA, n=51)
- Membrangeschädigter Spermien (%)
(Propidium-Iodid-Färbung, n=55; Lebend-Tod-Färbung mit Eosin, n=13)
- Morphologisch abweichender Spermien (MAS) (%)
- Spermien mit Kopfkappenveränderungen (insgesamt, KK) (%)
- Spermien mit sekundären Kopfkappenveränderungen (%)
(geschwollener apikaler Rand, Akrosom in Ablösung, abgelöstes Akrosom)
- Spermien mit persistierenden Cytoplasmotropfen (%)
(proximale und distale Cytoplasmotropfen, pPI, dPI)
- Spermien mit Veränderungen am Hals, Haupt- und Endstück (Hals, HaEnd)
(%)

Ferner erfolgte eine Klassifizierung verschiedener Parameter nach der Ejakulatbeschaffenheit, um die DFI- Werte (%) und die α_t -Werte gemäß Tabelle 1 miteinander verglichen.

Tabelle 1: Vergleich von DFI (%) und α_t nach der Beschaffenheit verschiedener Parameter

Vmot \leq 60% (n= 10) DFI (%), α_t	Vmot > 60% (n= 58) DFI (%), α_t
CMA \leq 60% (n= 12) DFI (%), α_t	CMA > 60% (n= 12) DFI (%), α_t
MAS \leq 30% (n= 37) DFI (%), α_t	MAS > 30 - 60% (n= 19) DFI (%), α_t
MAS > 30 - 60% (n= 19) DFI (%), α_t	MAS > 60% (n= 12) DFI (%), α_t
MAS \leq 30% (n= 37) DFI (%), α_t	MAS > 60% (n= 12) DFI (%), α_t
KK \leq 10% (n= 56) DFI (%), α_t	KK > 10% (n= 12) DFI (%), α_t
Kopf \leq 5% (n=53) DFI (%), α_t	Kopf > 5% (n=53) DFI (%), α_t

pPI ≤ 10% (n=53) <i>DFI (%)</i> , α_t	pPL > 10% (n= 15) <i>DFI (%)</i> , α_t
dPI ≤ 10% (n=61) <i>DFI (%)</i> , α_t	dPL > 10% (n=7) <i>DFI (%)</i> , α_t
Hals ≤ 10% (n=44) <i>DFI (%)</i> , α_t	Hals > 10% (n=24) <i>DFI (%)</i> , α_t
HaEnd ≤ 10% (n=60) <i>DFI (%)</i> , α_t	HaEnd > 10% (n=8) <i>DFI (%)</i> ,

3.1.2.3.3 Untersuchung des Einflusses externer Faktoren auf die Spermienchromatinstruktur

An vier institutseigenen Beagle-Rüden wurden der Einfluss der Außentemperatur und der Einfluss einer hohen Samenentnahmefrequenz untersucht. Da über einen längeren Zeitraum mehrere Ejakulate eines Rüden gewonnen wurden, konnten auch intraindividuelle Schwankungen im Prozentsatz chromatidefekter Spermien überprüft werden.

In Zeitraum von April bis Dezember 2005 wurden pro Rüde zwei Ejakulate pro Monat im Abstand von 14 Tagen gewonnen, biologisch untersucht und der Anteil an chromatidefekten Spermien (*DFI (%)*) und der α_t -Wert bestimmt. Dabei wurden von zwei Rüden je 16 und von je einem Rüden je 17 oder 18 Ejakulate erfasst.

Zur Ermittlung möglicher Temperatureinflüsse auf die Spermienchromatinstruktur wurde am Zwinger der Beagle ein handelsüblicher Außenthermometer installiert und von Mitte April bis Ende Dezember 2005 täglich die Außentemperatur zwischen 11.30 Uhr und 14.00 Uhr abgelesen und notiert.

Nach einer dreiwöchigen Sexualekarens wurden die Rüden vom 16.01. bis 02.02.2006 einmal täglich zur Samenentnahme herangezogen.

Nach einer erneuten geschlechtlichen Ruhephase vom 02.02. bis 13.03.2006 wurden im Abstand von 3 Tagen zwei Ejakulate gewonnen und wie oben beschrieben untersucht.

3.2 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SAS® (Statistical Analysis System®, SAS Institute Inc., Version V 8.3 für Windows, Cary, North Carolina, USA). im Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ausgewertet.

Zur Beurteilung der Spermienchromatinstruktur von Rüden mit unterschiedlichem Ejakulatstatus wurden jeweils die Mittelwerte der DFI (%)– und der α_t -Werte für Normo- und Dysspermie, Normo- und Pathospermie und Dys- und Pathospermie verglichen. Für diesen Vergleich wurde eine 1- faktorielle Varianzanalyse für unabhängige Stichproben (Prozedur GLM) durchgeführt.

Für den Vergleich der Spermienchromatinstruktur (DFI %) von Rüden unterschiedlicher Rassen mit Normospermie wurde der Wilcoxon- Test angewendet.

Der Zusammenhang der DFI (%)– und der α_t -Werte mit ausgewählten spermatologischen Parametern wurde mit dem Rang- Korrelationskoeffizienten nach Spearman beurteilt. Die DFI (%)– und der α_t -Werte der Ejakulatparameterklassen wurden gemäß Tabelle 1 unter Durchführung des Wilcoxon- Tests miteinander verglichen.

Die Auswertungen der Untersuchungen an den vier Beagle-Rüden (3.2.7) erfolgten deskriptiv an Hand von Graphiken. Die Beurteilung eines möglichen Temperatureinflusses auf den Anteil chromatininstabiler Spermien wurde für jeden Rüden im Zusammenhang mit der Spermiengesamtzahl (SGZ), dem Anteil morphologisch abweichender Spermien, dem Anteil proximaler und distaler Cytoplasmotropfen beschrieben. Der Einfluss einer hoch frequenten Samenentnahme auf den Anteil chromatininstabiler Spermien wurde jeweils im Zusammenhang mit der Spermiengesamtzahl, dem Anteil morphologisch

abweichender Spermien, dem Anteil proximaler und distaler Cytoplasmatropfen beurteilt.

4. Ergebnisse

4.1 Spermienchromatinstatus innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI%) in der gemischten Rüdenpopulation von 68 Tieren betrug $5,5 \pm 8,5\%$ bei einer Variationsbreite von 0,5 bis 57,5%. Der α_t -Mittelwert war $204,7 \pm 14,7$ (185,1 - 260,7) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Chromatininstabile Spermien (DFI%) und α_t -Werte innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation mit unterschiedlichem Fertilitätsstatus

n= 68	mean	\pm SD	min	max
DFI (%)	5,5	8,5	0,5	57,5
α_t	204,7	14,7	185,1	260,7

4.2 Spermienchromatinstatus bei Rüden mit unterschiedlichen Ejakulatstatus

Zum Vergleich des Anteils chromatininstabiler Spermien bei den 37 Rüden mit Normospermie ($2,7 \pm 2,4\%$, 0,5 – 10,4%) wurde bei Rüden mit Dysspermie (n=19) ein DFI- Wert von $6,2 \pm 5,7\%$ (0,9 – 22,9%) und bei Rüden mit Pathospermie (n=12) $12,9 \pm 16,8\%$ (0,6 – 57,5%) ermittelt (Abbildung 3). Die DFI- Werte (%) der Ejakulate mit Normospermie und Dysspermie unterschieden sich von denjenigen der Ejakulate mit Pathospermie signifikant ($p \leq 0,05$).

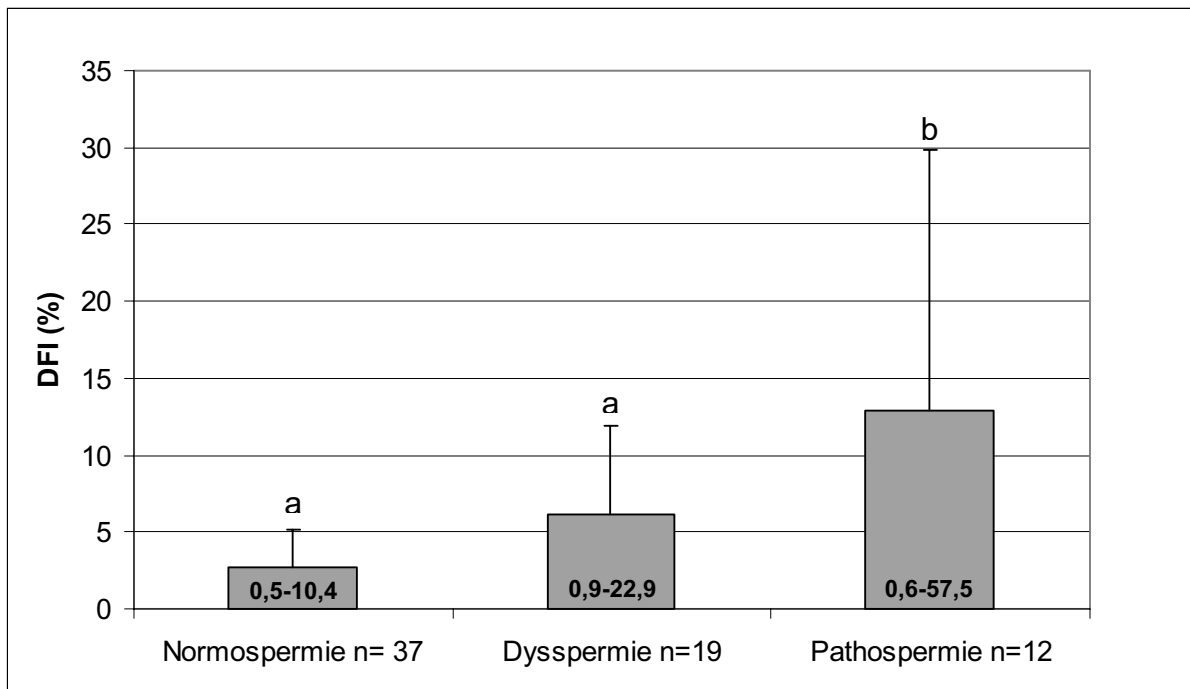


Abbildung 3: Mittlerer Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) (\pm SD) bei Rüden mit Normo-, Dys- und Pathospermie. Die Zahlen in den Säulen geben die Variationsbreite wieder. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) an.

Es wurden folgende α_t -Werte ermittelt: bei den Rüden mit Normospermie $202,4 \pm 10,2$ (189,6 – 235,5), mit Dysspermie $204,6 \pm 15,9$ (185,1 – 249,4) und bei Rüden mit Pathospermie $212,0 \pm 22,1$ (188,1 – 260,7) (Abbildung 4). Die α_t -Werte unterschieden sich nicht signifikant.

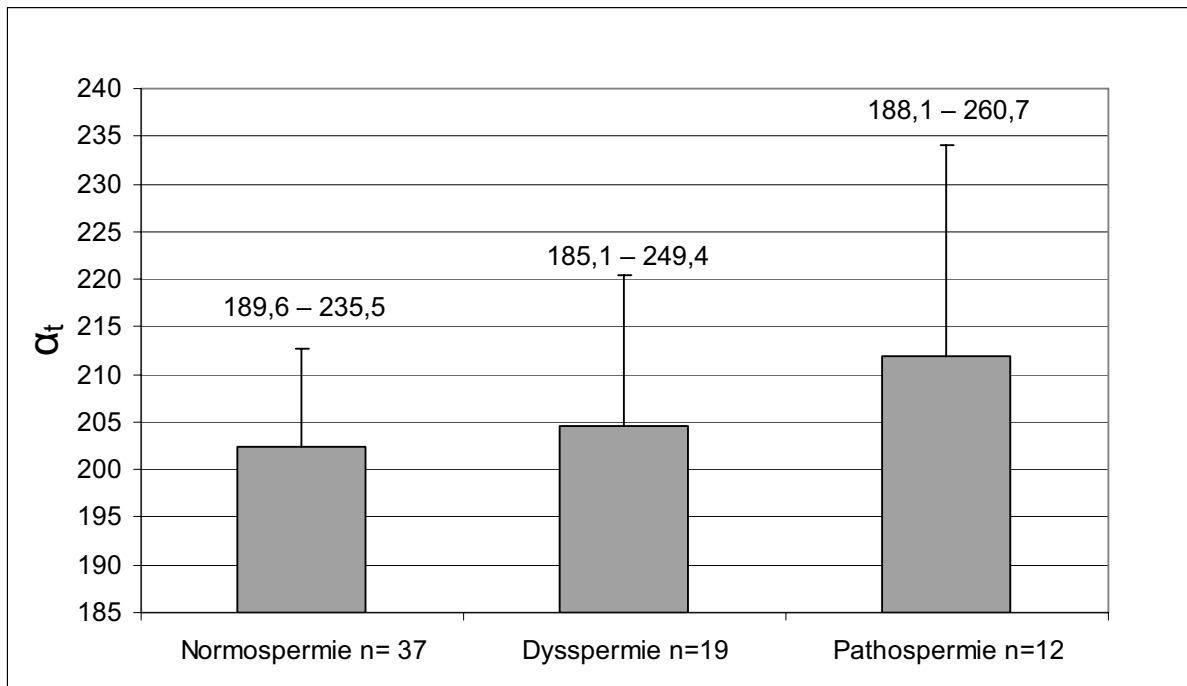


Abbildung 4: Mittlere α_t -Werte (\pm SD) bei Rüden mit Normo-, Dys- und Pathospermie. Die Zahlen über den Säulen geben die Variationsbreite wieder.

4.3 Spermienchromatinstatus in Ejakulaten mit Normospermie und unter Berücksichtigung möglicher Rasseunterschiede

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien lag bei allen Rüden mit Normospermie (n=37) bei $2,7 \pm 2,4\%$, in der gemischten Rüdenpopulation (n=20) bei $2,4 \pm 2,8\%$ und in der Kontrollgruppe aus 40 Beagle-Rüden mit Normospermie bei $2,7 \pm 1,5\%$. Bei den Foxterriern (n=8) wurden $3,4 \pm 2,6\%$, bei den Retrievern (n=6) $3,3 \pm 0,8\%$, und bei den Doggen (n=3) $2,1 \pm 0,1\%$ chromatininstabile Spermien nachgewiesen (Abbildung 5). Zwischen den Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

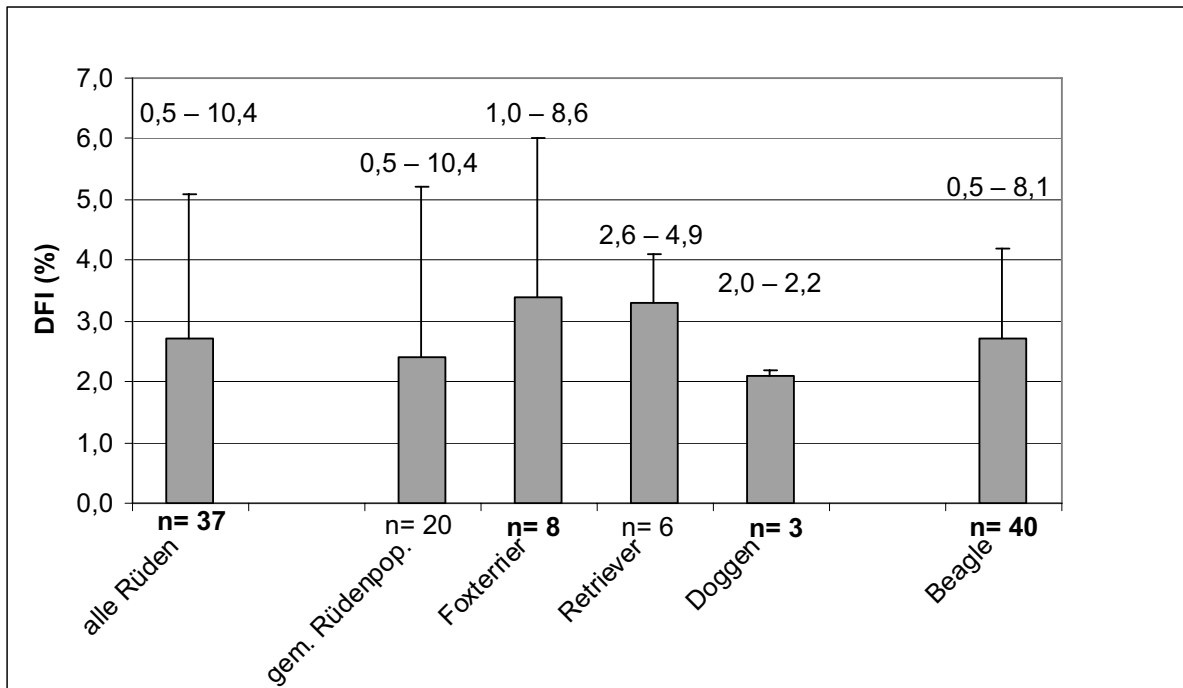


Abbildung 5: Mittlerer Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) (\pm SD) bei Rüden unterschiedlicher Rassen mit Normospermie. Die Zahlen über den Säulen geben die Variationsbreite wieder.

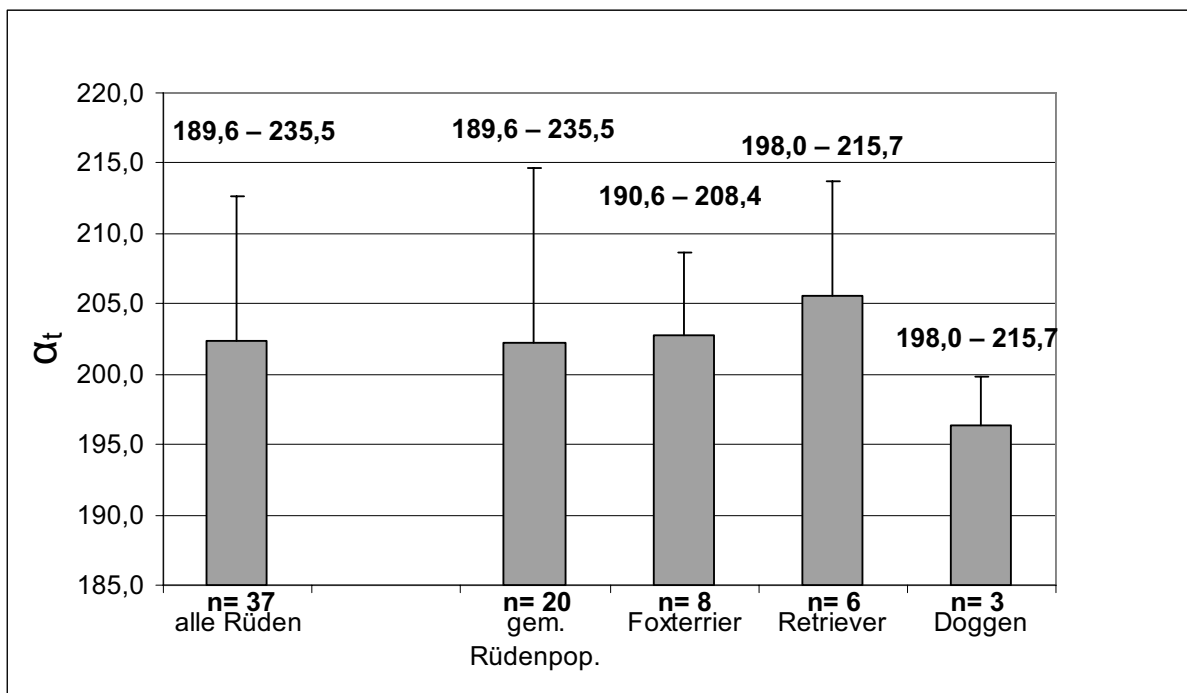


Abbildung 6: Mittlere α_t -Werte (\pm SD) bei Rüden unterschiedlicher Rassen mit Normospermie. Die Zahlen über den Säulen geben die Variationsbreite wieder.

In der gemischten Rüdengruppe (n=20) betrug der α_t -Wert $202,2 \pm 12,5$, bei den Foxterriern (n=8) $202,8 \pm 5,8$, den Retrievern (n=6) $205,6 \pm 8,1$ und den Doggen (n=3) $196,3 \pm 3,5$ (Abbildung 6). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant. Für die Beaglekontrollgruppe lagen keine α_t -Werte vor.

4.4 Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und ausgewählten spermatologischen Parametern

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien von $4,5 \pm 6,9\%$ (n=108) und der mittlere α_t -Wert von $204,72 \pm 14,7$ (n=68) waren signifikant miteinander korreliert ($r=0,6002$, $p < 0,001$).

In Tabelle 3 sind die ausgewählten spermatologischen Parameter mit deren Mittelwerten und Standardabweichungen sowie deren Minimal- und Maximalwerten

aufgelistet. Die jeweiligen Korrelationen mit dem Anteil chromatininstabiler Spermien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (Vmot 75,7±18,6%, CMA 78,0±22,0%) bestand eine signifikante negative Korrelation (Vmot: $r = -0,3106$, $p < 0,01$; CMA: $r = -0,4560$, $p < 0,001$). Der α_t -Wert war mit dem computergestützt ermittelten Anteil vorwärtsmotiler Spermien negativ korreliert ($r = -0,3097$, $p < 0,05$).

Der Anteil membrangeschädigter Spermien (MgS) lag im Mittel bei 16,9±23,9% und der Gesamtanteil an morphologisch abweichenden Spermien (MAS) bei 33,7±23,9%. Beide Parameter korrelieren signifikant positiv mit dem Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) (MgS: $r = 0,4070$, $p < 0,001$; MAS: $r = 0,4550$, $p < 0,0001$). Für den α_t -Wert bestand für diese Parameter keine Korrelation.

Der mittlere Gesamtanteil an Spermien mit veränderter Kopfkappe betrug 6,7±8,2%. Dabei handelte es sich durchschnittlich um 5,2±7,7% sekundäre Kopfkappenveränderungen. Der Anteil an Kopfveränderungen (%) lag bei 4,3±3,0%. Der Prozentsatz an Spermien mit veränderter Kopfkappe zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Prozentsatz chromatininstabiler Spermien ($r = 0,5465$, $p < 0,0001$). Die Korrelation des α_t -Wertes mit dem Anteil kopfkappengeschädigter Spermien lag an der Signifikanzgrenze ($r = 0,2376$, $p = 0,0511$). Ferner zeigte der Anteil chromatininstabiler Spermien eine signifikante Korrelation mit dem Prozentsatz an Spermien mit sekundären Kopfkappenveränderungen ($r = 0,5622$, $p < 0,001$). Für diesen Parameter bestand auch ein Zusammenhang mit dem α_t -Wert ($r = 0,24774$, $p < 0,05$).

Der Anteil an Spermien mit Kopfveränderungen war mit dem Anteil chromatininstabiler Spermien signifikant korreliert ($r = 0,2477$, $p < 0,05$).

Der mittlere Anteil an Spermien mit proximalen Cytoplasmatropfen betrug 7,4±13,0% und distalen Cytoplasmatropfen 3,7±6,7%. Beide Parameter waren weder mit dem Anteil chromatininstabiler Spermien (%) noch mit dem α_t -Wert korreliert.

Der Prozentsatz an Spermien mit Halsveränderungen lag bei durchschnittlich $13,0 \pm 16,7\%$, mit Veränderungen am Haupt- und Endstück $5,3 \pm 2,5\%$. Der Anteil chromatininstabiler Spermien, nicht aber der α_t -Wert, korrelierte mit dem Anteil an Spermien mit Halsveränderungen ($r = 0,3296$, $p < 0,01$). Bei den Halsveränderungen handelte es sich hauptsächlich um Halsbrüche sowie par- oder retroaxiale Schwanzansätze. Der Anteil an Spermien mit Veränderungen am Haupt- und Endstück korrelierte mit dem Prozentsatz chromatininstabiler Spermien ($r = 0,2551$, $p < 0,05$), aber nicht mit dem α_t -Wert.

Tabelle 3: Mittlere Anteile(\pm SD) chromatininstabiler Spermien, α_t -Werte sowie Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien, membrangeschädigter Spermien und morphologisch abweichender Spermien sowie deren Variationsbreite (min – max)

	n	mean	\pmSD	min	max
DFI	108	4,5	6,9	0,5	57,5
α_t	68	204,7	14,7	185,1	260,7
SGZ	68	512,5	31,0	31,0	2220,0
Vmot	68	75,7	18,6	0,0	95,0
CMA	51	78,0	22,0	21,0	99,1
MgS	68	16,9	23,9	2,0	94,0
MAS	68	33,7	23,9	5,0	96,0
KK	68	6,7	8,2	0,0	44,0
KKs	68	5,2	7,7	0,0	44,0
Kopf	68	4,3	3,0	0,0	36,0
Hals	68	13,0	16,7	0,0	77,5
pPI	68	7,4	13,0	0,0	77,5
dPI	68	3,7	6,7	0,0	30,0
HaEnd	68	5,3	2,5	0,5	57,5

DFI (%)	=	Chromatininstabiler Spermien (%)
α - T	=	α_t - Wert
SGZ	=	Spermiengesamtzahl ($\times 10^6$)
Vmot	=	vorwärtsmotile Spermien (geschätzt)(%)
CMA	=	vorwärtsmotile Spermien (CMA)(%)
MgS	=	membrangeschädigter Spermien (%)
MAS	=	morphologisch abweichender Spermien (%)
KK	=	Spermien mit Kopfkappenveränderungen (%)
KKs	=	Spermien mit sekundären Kopfkappenveränderungen (%)
Kopf	=	Spermien mit Kpfveränderungen (%)
Hals	=	Spermien mit Halsveränderungen (%)
pPI	=	Spermien mit proximalem Cytoplasmotropfen (%)
dPI	=	Spermien mit distalem Cytoplasmotropfen (%)
HaEnd	=	Spermien mit Haupt- und Endstückveränderungen (%)

Tabelle 4: Korrelationen des DFI (%) und des α_t Wertes mit klassischen Ejakulatparametern

DFI	r	p	α_t	r	p
α_t	0,6002	<0,001			
SGZ		n.s.	SGZ		n.s.
V- mot	- 0,3106	<0,01	V- mot		n.s.
CMA	- 0,4560	<0,001	CMA	- 0,3097	<0,05
Membrangeschäd.Spermien	0,4070	<0,001	Membrangeschäd.Spermien		n.s.
MAS	0,4550	p<0,0001	MAS		n.s.
Kopfkappe	0,5465	<0,0001	Kopfkappe	0,2376	0,0511
Sek. Kopfkappe	0,5622	<0,001	Sek. Kopfkappe	0,2477	<0,05
Kopf	0,2407	<0,05	Kopf		n.s.
Hals	0,3296	<0,01	Hals		n.s.
Prox. Cytoplasmatr.		n.s.	Prox. Cytoplasmatr.		n.s.
Dist. Cytoplasmatr.		n.s.	Dist. Cytoplasmatr.		n.s.
Haupt- u. Endstückver.	0,2551	<0,05	Haupt- u. Endstückver.		n.s.

r = Spearman's Rang- Korrelationskoeffizient

p = p- Wert

n.s. = nicht signifikant

Die Unterschiede von DFI (%) und α_t zwischen definierten Unterschieden der Ejakulatbeschaffenheit sind in Tabelle 5 dargestellt.

Der DFI (%) und α_t - Wert war in Ejakulaten mit ≤ 60 % und >60 % vorwärtsmotiler Spermien (geschätzt und computergestützt ermittelt) signifikant unterschiedlich.

Bei der Klassifizierung der Ejakulate nach dem Anteil morphologisch abweichender Spermien in MAS ≤ 30 % (n = 37), MAS $>30 - 60$ % (n= 19) und MAS >60 % (n= 12) wurde ein signifikanter Unterschied im Anteil chromatininstabiler Spermien zwischen

MAS ≤ 30 % und MAS > 60 % ($p < 0,001$) sowie zwischen MAS $> 30 - 60\%$ und MAS $> 60\%$ ($p < 0,05$) festgestellt. Die α_t -Werte unterschieden sich diesbezüglich nur zwischen MAS ≤ 30 und MAS > 60 % ($p < 0,05$) signifikant.

Bei Ejakulaten mit ≤ 10 % und > 10 % Kopfkappenveränderungen lag ein signifikanter Unterschied jeweils in den Anteilen chromatininstabiler Spermien ($p < 0,01$) und den α_t -Werten ($< 0,05$) vor.

Der Prozentsatz an DFI-Spermien unterschied sich in Ejakulaten mit ≤ 5 % und > 5 % Kopfveränderungen signifikant ($p < 0,05$). Zwischen den α_t -Werten lag kein signifikanter Unterschied vor.

Zwischen den Ejakulaten mit ≤ 10 % und > 10 % an proximalen und distalen Cytoplasmotropfen bestand bezüglich des DFI (%) - und des α_t - Wertes kein Unterschied.

In Ejakulaten mit ≤ 10 % Halsveränderungen war der Anteil an DFI-Spermien signifikant geringer als in Ejakulaten, in welchen > 10 % der Spermien Halsveränderungen aufwiesen ($p < 0,05$).

In Ejakulaten mit ≤ 10 % und $> 10\%$ Haupt- und Endstückveränderungen lag kein Unterschied zwischen den Anteilen chromatininstabiler Spermien und den α_t -Werten vor.

Tab. 5: Unterschiede der DFI- und α_t -Werte in Bezug auf definierte Ejakulatmerkmale

Vmot \leq 60% (n= 10) 37,5 \pm 18,8% DFI (%):14,5\pm17,9 α_t :216,06 \pm 24,85	Vmot > 60% (n= 58) 81,9 \pm 9,3% DFI (%):4,0\pm4,3% α_t :202,8 \pm 11,5	DFI (%): p< 0,001 α_t :< 0,01
CMA \leq 60% (n= 12): 43,4 \pm 14,0% DFI (%):15,4\pm16,5% α_t :217,13 \pm 24,25	CMA > 60% (n= 12): 88,8 \pm 8,1% DFI (%): 3,2\pm2,6% α_t :201,7 \pm 11,5	DFI (%): p< 0,0001 α_t : p< 0,01
MAS \leq 30% (n= 37): 15,6 \pm 7,0% DFI (%):2,7\pm2,4% α_t :202,40 \pm 10,19	MAS > 30 - 60% (n= 19): 42,7 \pm 7,5% DFI (%):6,2%\pm5,7% α_t :204,6 \pm 15,9	DFI (%): n.s. α_t : n.s.
MAS > 30 - 60% (n= 19): 42,7 \pm 7,5% DFI (%):6,2%\pm5,7% α_t :204,6 \pm 15,9	MAS > 60% (n= 12): 75,1 \pm 10,6% DFI (%):12,9%\pm16,9 α_t :212,0 \pm 22,1	DFI (%): p< 0,05 α_t : n.s.
MAS \leq 30% (n= 37): 15,6 \pm 7,0% DFI (%):2,7\pm2,4% α_t :202,4 \pm 10,2	MAS > 60% (n= 12): 75,1 \pm 10,6% DFI (%):12,9%\pm16,9 α_t :212,0 \pm 22,1	DFI (%): p< 0,001 α_t : p< 0,05
KK \leq 10% (n= 56): 3,7 \pm 2,6 DFI (%):3,5\pm3,7% α_t :202,3 \pm 11,9	KK > 10% (n= 12): 21,3 \pm 10,8% DFI (%): 14,7\pm10,8% α_t :216,03 \pm 20,99	DFI (%): p< 0,0001 α_t : p< 0,05
Kopf \leq 5% (n= 53): 2,2 \pm 1,4% DFI (%): 4,1\pm5,0% α_t :203,4 \pm 13,3	Kopf > 5% (n= 15): 11,6 \pm 9,3% DFI (%): 10,3\pm15,0% α_t :209,5 \pm 18,8	DFI (%): p< 0,05 α_t : n.s.
pPI \leq 10% (n= 53): 2,5 \pm 2,9% DFI (%):4,7\pm5,9 α_t :205,1 \pm 13,3	pPL > 10% (n= 15): 24,7 \pm 19,2 DFI (%):8,3\pm14,4% α_t :203,5 \pm 19,6	DFI (%): n.s. α_t : n.s.
dPI \leq 10% (n= 61): 1,7 \pm 2,1 DFI (%):5,5\pm8,6 α_t :204,0, \pm 14,0	dPL > 10% (n= 7): 21,4 \pm 7,1% DFI (%):5,6\pm8,1 α_t :211,4 \pm 20,4	DFI (%): n.s. α_t : n.s.
Hals \leq 10% (n= 44): 3,9 \pm 3,2% DFI (%): 3,7\pm4,9% α_t : 204,5 \pm 13,2	Hals > 10% (n= 24): 29,5 \pm 18,9% DFI (%): 8,8\pm12,2% α_t :205 \pm 17,5	DFI (%): p< 0,05 α_t : n.s.
HaEnd \leq 10% (n= 60): 2,8 \pm 2,2% DFI (%):5,0\pm8,4% α_t :203,6 \pm 13,6	HaEnd > 10% (n= 8): 24,4 \pm 10,0 DFI (%):8,9\pm9,5% α_t :213,3 \pm 20,3	DFI (%): n.s. α_t : n.s.

4.5 Beeinflussung der Spermienchromatinstruktur durch externe Faktoren

4.5.1 Individuelle Schwankungen des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien aus den von April bis Dezember 2005 gewonnenen Ejakulaten betrug bei Beagle 1: $0,9 \pm 0,5$ %, bei Beagle 2: $1,3 \pm 0,4$ %, bei Beagle 3: $4,6 \pm 1,0$ % und bei Beagle 4: $0,7 \pm 0,4$ % (Abbildung 7). Aus den Ergebnissen werden intra- und interindividuelle Schwankungen deutlich.

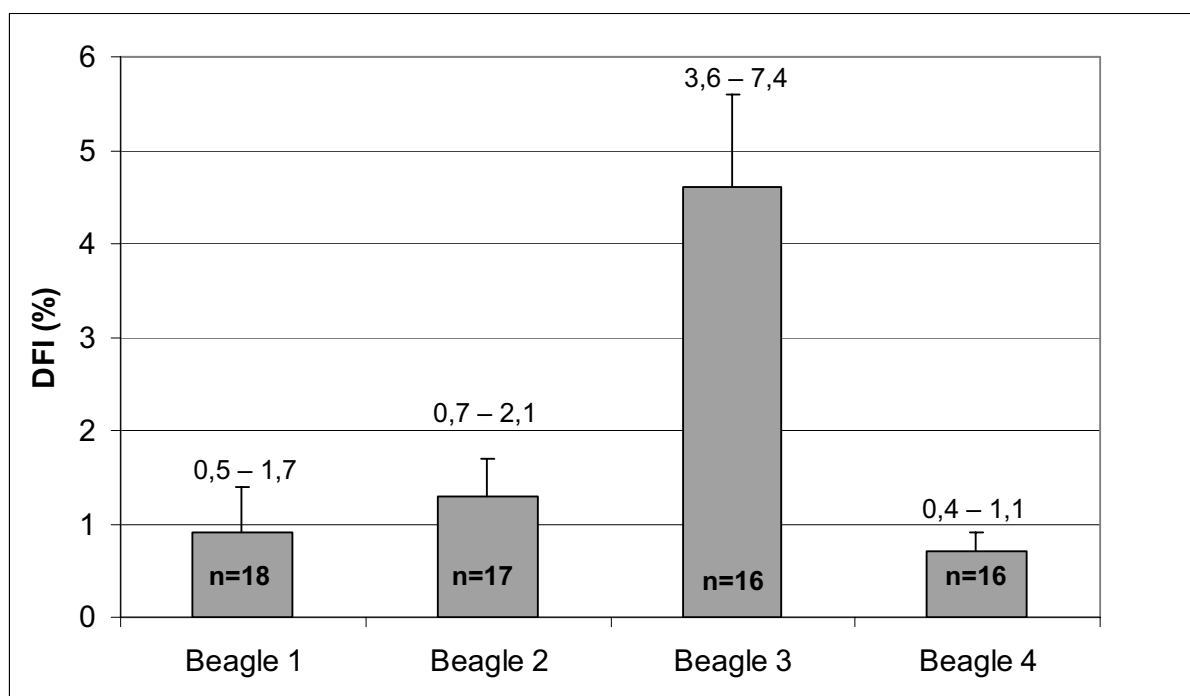


Abbildung 7: Mittlerer Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) in Ejakulaten von 4 Beagle-Rüden von April bis Dezember 2005. Die Zahlen über den Säulen geben die Variationsbreite wieder.

Der α_t -Wert von Beagle 1 betrug $195,9 \pm 3,5$, von Beagle 2 $190,7 \pm 3,7$, von Beagle 3 $191,8 \pm 4,2$ und von Beagle 4 $193,5 \pm 3,1$ (Abbildung 8). Damit sind die intraindividuellen Schwankungen als gering zu beurteilen, jedoch bestehen deutliche interindividuelle Unterschiede. Ferner fällt auf, dass Beagle 3 den höchsten Anteil

chromatininstabiler Spermien besitzt, der mittlere α_t -Wert sich jedoch im niedrigen Bereich befindet.

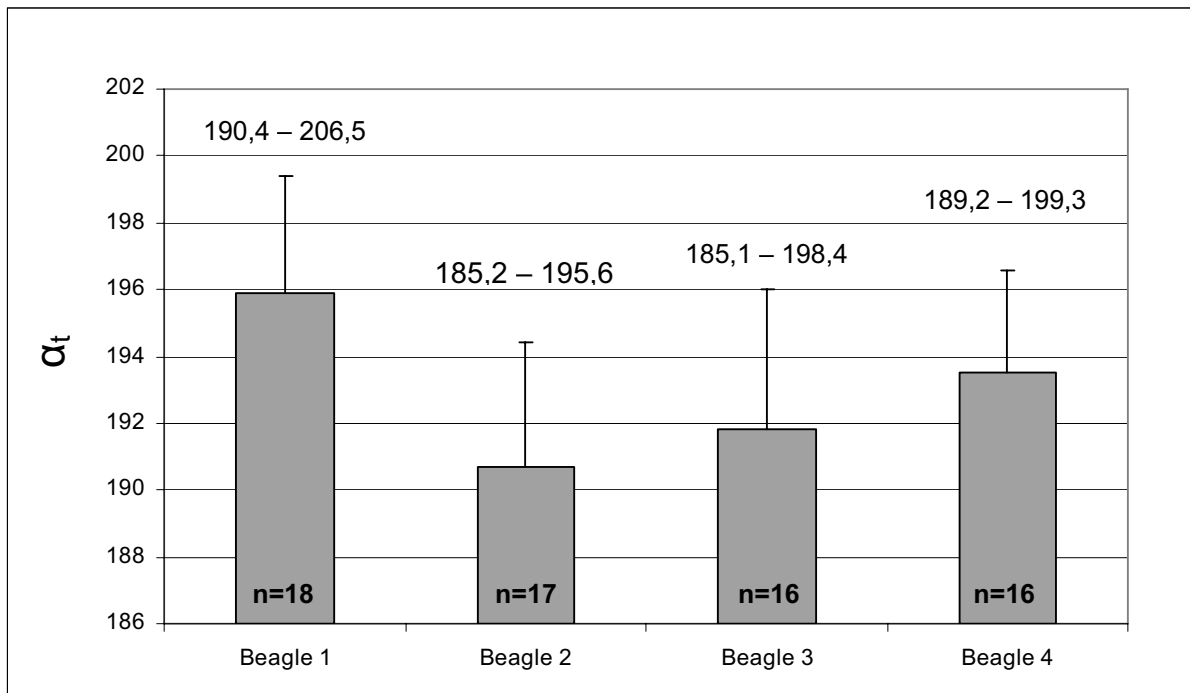


Abbildung 8: Mittlere α_t -Werte in Ejakulaten von 4 Beagle-Rüden von April bis Dezember 2005. Die Zahlen über den Säulen geben die Variationsbreite wieder.

4.5.2 Einfluss jahreszeitlicher Temperaturschwankungen

In den Abbildungen 9 und 10 ist der Einfluss jahreszeitbedingter Temperaturunterschiede auf den Chromatinstatus von 4 Beagle-Rüden anhand des Anteils chromatininstabiler Spermien (DFI%) und der α_t -Werte dargestellt.

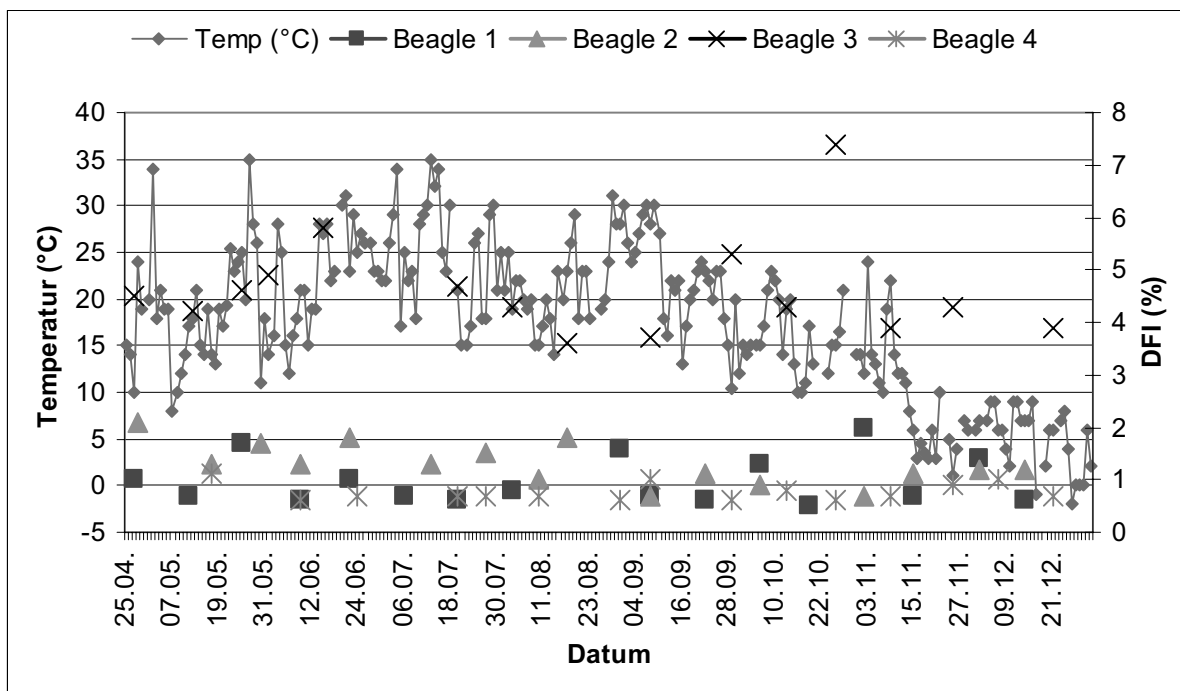


Abbildung 9: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) in Ejakulaten von 4 Beagle-Rüden von April bis Dezember 2005 in Zusammenhang mit der täglichen Tagestemperatur (°C).

Am Verlauf der Temperaturkurve ist zu erkennen, dass die mittleren Tagestemperaturen im April zunächst anstiegen, im Mai und Juli ihre höchsten Werte erreichten und ab September wieder kontinuierlich abnahmen. Die Höchsttemperatur von 35,0°C wurde am 27.05. und 13.07.05 registriert. Die höchsten mittleren Monatstemperaturen bestanden im Mai mit 19,3 °C, im Juni mit 22,5°C, im Juli mit 24,8°C und im August mit 21,4°C.

Der Anteil chromatininstabiler Spermien bei Beagle 1 variierte von 0,5 (13.04. und 19.10.) bis 2,0 % (02.11.) und die Spermigesamtzahl (SGZ x 10⁶) von 297,5 x 10⁶ (25.05.) bis 1312,3 (14.12.). Der Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) zeigte bei diesem Rüden eine Variationsbreite von 9,5 (22.06.) bis 20,0 % (14.12.). Der Anteil an Spermien mit proximalem Cytoplasmatrophen schwankte von 0,0 (31.8.) bis 5,5 % (22.06. und 20.07.) und der Anteil an Spermien mit distalem Cytoplasmatrophen von 0,0 (11.05.) bis 9,0 % (14.12.) (Abbildung 10).

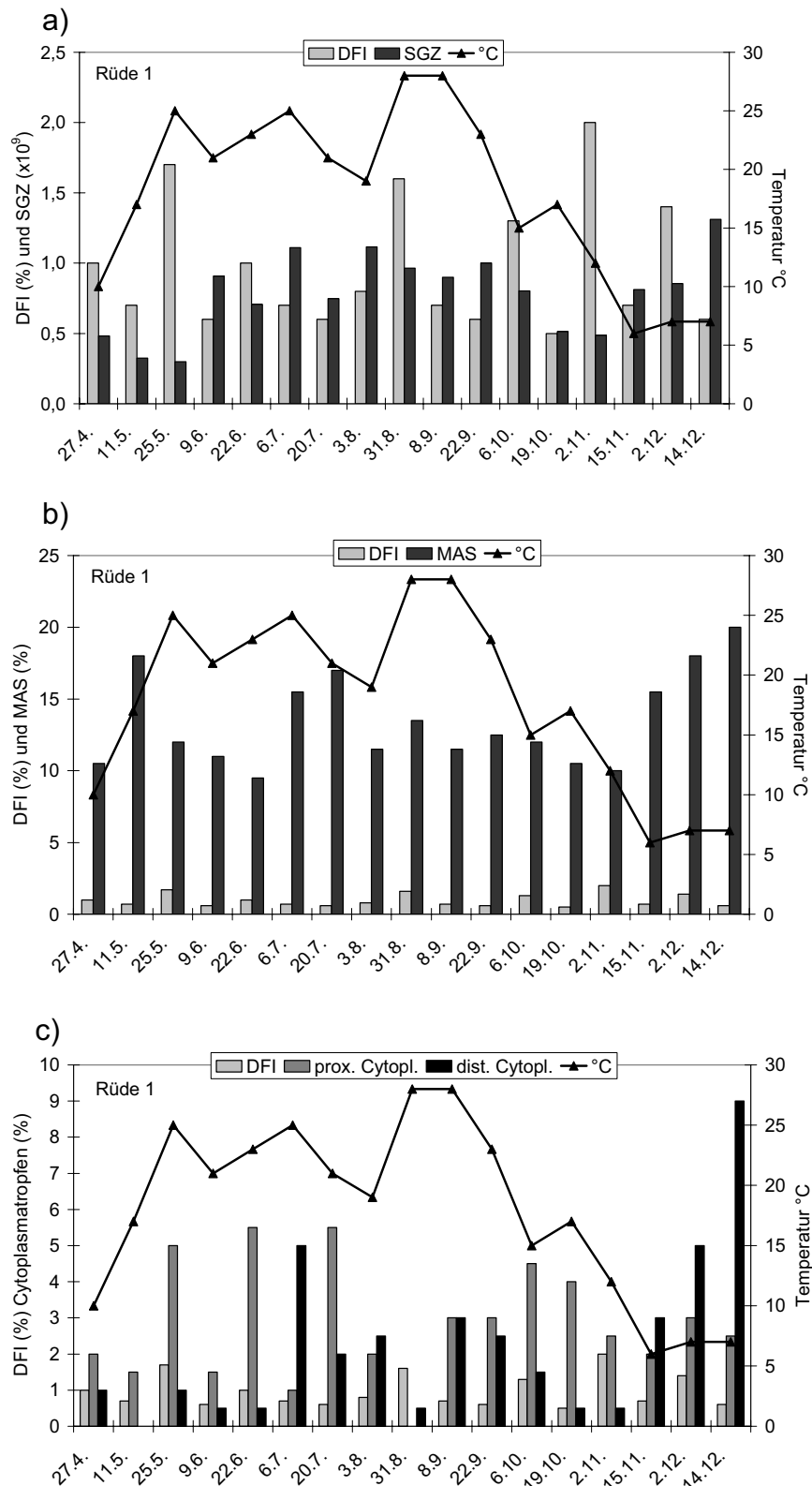


Abbildung 10: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermien-
 zahl (SGZ $\times 10^9$), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie

(c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatrophen (Cytoplasmatrophen %) bei Rüde 1

Bei Beagle 2 variierte der Anteil chromatininstabiler Spermien von 0,7 (08.09. und 02.11.) bis 2,1 % (28.04.) und die Spermien Gesamtzahl von 195×10^6 (28.04.) bis 1650×10^6 (14.12.). Der Anteil morphologisch abweichender Spermien lag in diesem Untersuchungszeitraum zwischen 14,0 (13.07.) und 65,0 % (30.05.). Der Anteil proximaler Cytoplasmatrophen variierte von 1,0 (27.07.) bis 38,5 % (22.06.) und der Anteil distaler Cytoplasmatrophen von 0,0 (10.08.) bis 16,0 % (02.12.) (Abbildung 11).

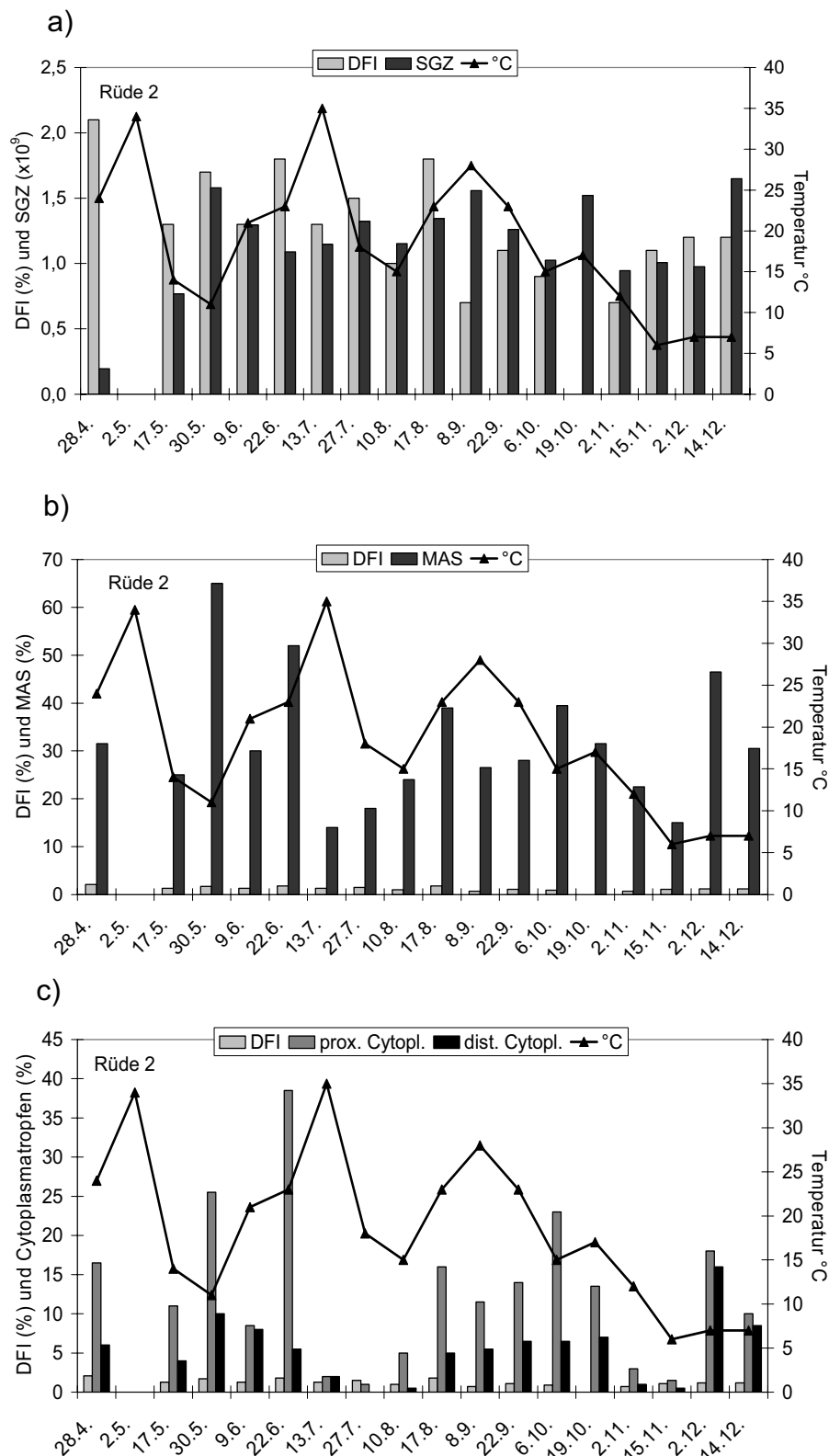


Abbildung 11: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermigesamtzahl (SGZ $\times 10^9$), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie

(c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmotropfen (Cytoplasmotropfen %) bei Rüde 2

Bei Beagle 3 lagen die DFI- Werte auf einem insgesamt höheren Niveau mit Schwankungen von 3,6 (17.08.) bis 7,4 % (26.10.). Die drei höchsten DFI- Werte wurden bei Beagle 3 am 15.06. (5,8 %), 29.09. (5,3 %) und 26.10. (7,4 %) gemessen. Die Spermengesamtzahl variierte bei diesem Rüden von 84×10^6 (12.05.) bis $1696,5 \times 10^6$ (08.09.), und der Anteil morphologisch abweichender Spermien von 15,5 (03.08.) bis 57,5 % (20.07.). Der Anteil an Spermien mit proximale Cytoplasmotropfen schwankte von 0,0 (17.8.) bis 26,5 % (20.07.) und der Anteil distaler Cytoplasmatropfen von 0,0 (12.05. und 21.12.) bis 5,5 % (27.04.) (Abbildung 12).

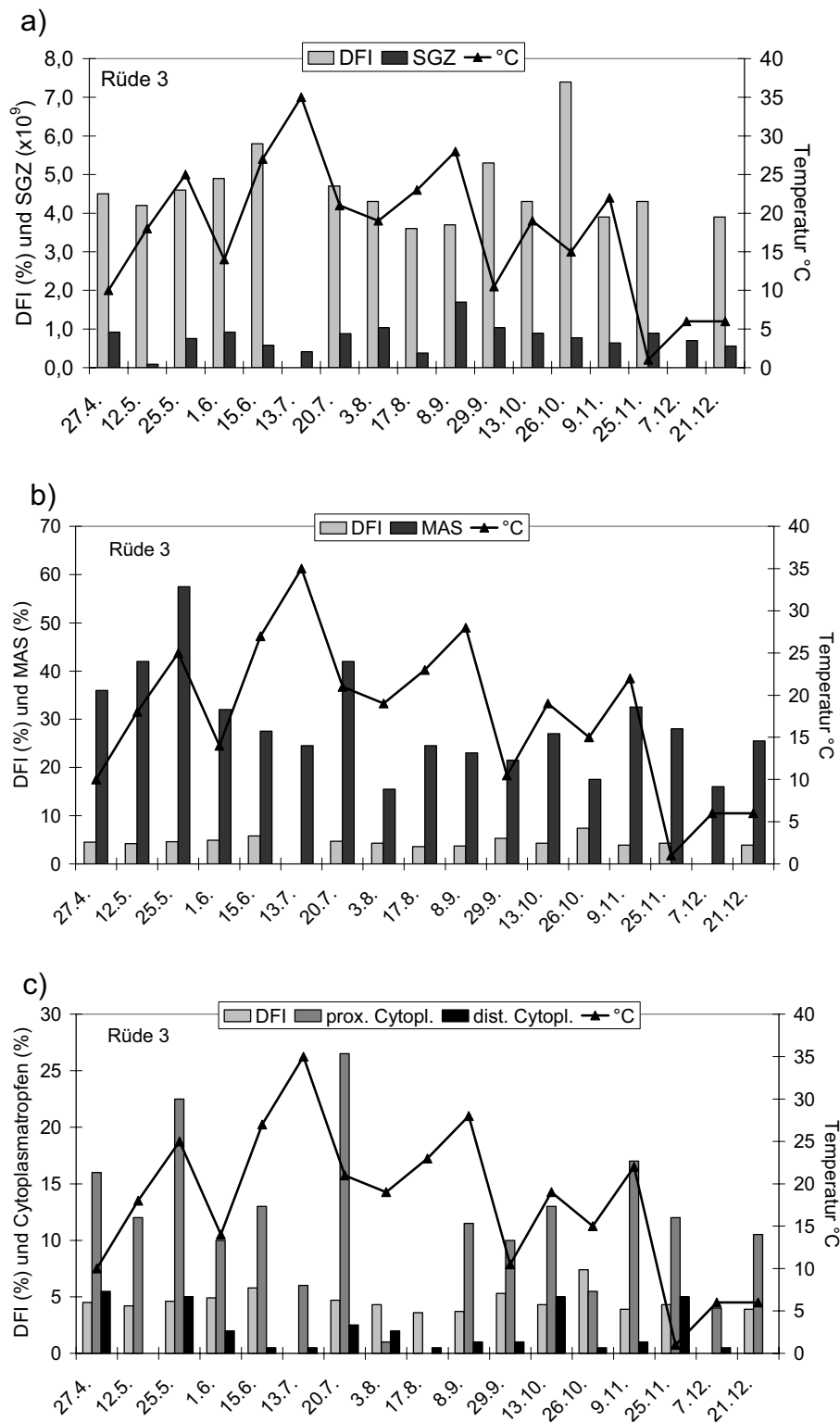


Abbildung 12: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermiengesamtzahl (SGZ $\times 10^9$), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie

(c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatrophen (Cytoplasmatrophen %) bei Rüde 3

Bei Beagle 4 wurde ein Anteil chromatininstabiler Spermien von 0,6 (09.06., 31.08., 29.09. und 26.10.) bis 1,1 % (17.05.) gemessen. Die Spermengesamtzahl schwankte von 572×10^6 (19.08.) bis $1605,5 \times 10^6$ (31.05.). Der Anteil morphologisch abweichender Spermien variierte von 6,0 (08.09.) bis 31,5 % (31.05. und 09.06.). Die Variationsbreite des Anteils proximaler Cytoplasmatrophen lag zwischen 1,5 (08.09.) bis 26,0 % (31.05.) und der Anteil distaler Cytoplasmatrophen zwischen 0,0 (16.06., 26.10., und 21.12.) und 4,5 % (09.06.) (Abbildung13).

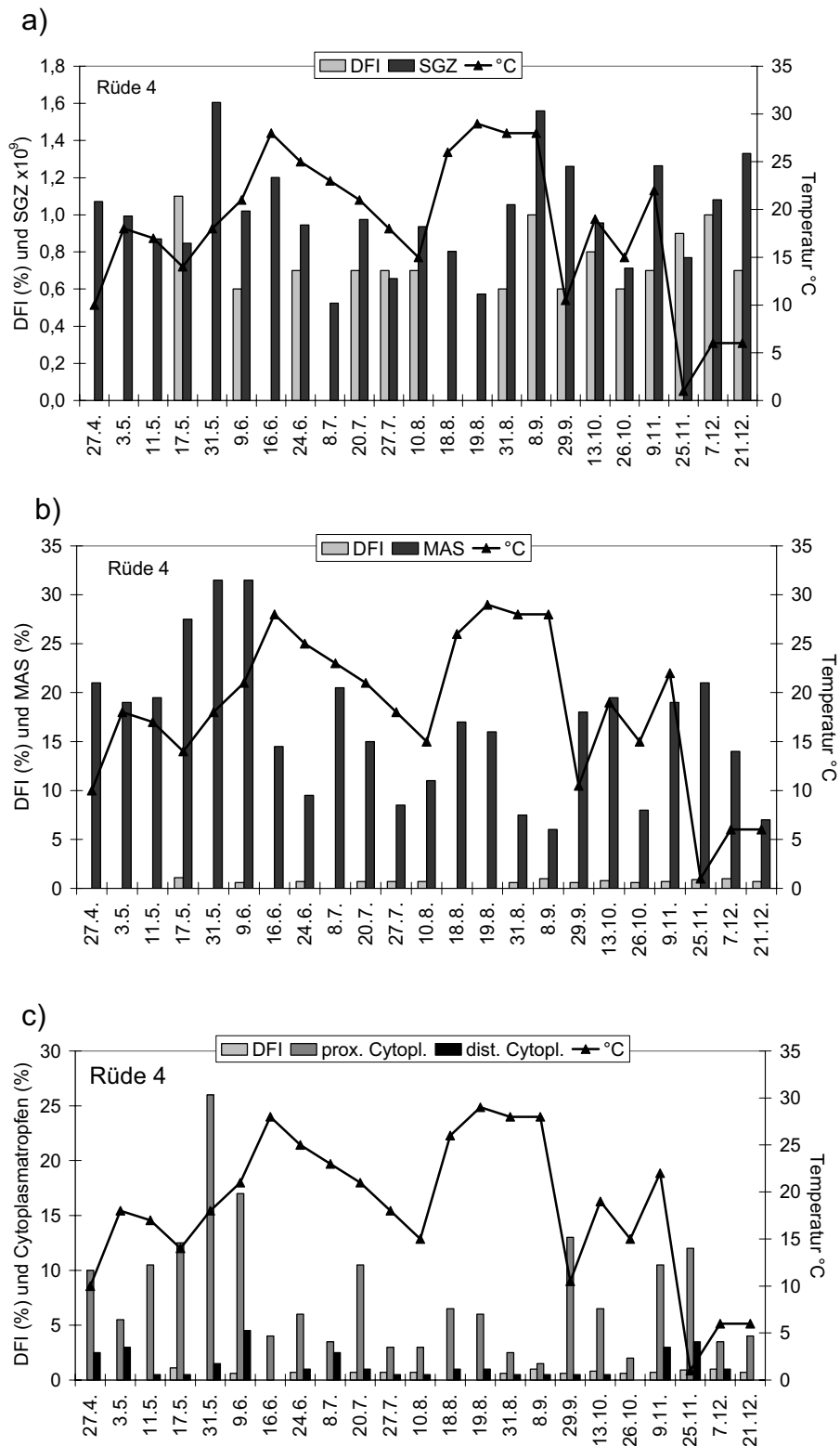


Abbildung 13: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermigesamtzahl (SGZ $\times 10^9$), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie

(c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatropfen (Cytoplasmatropfen %) bei Rüde 4

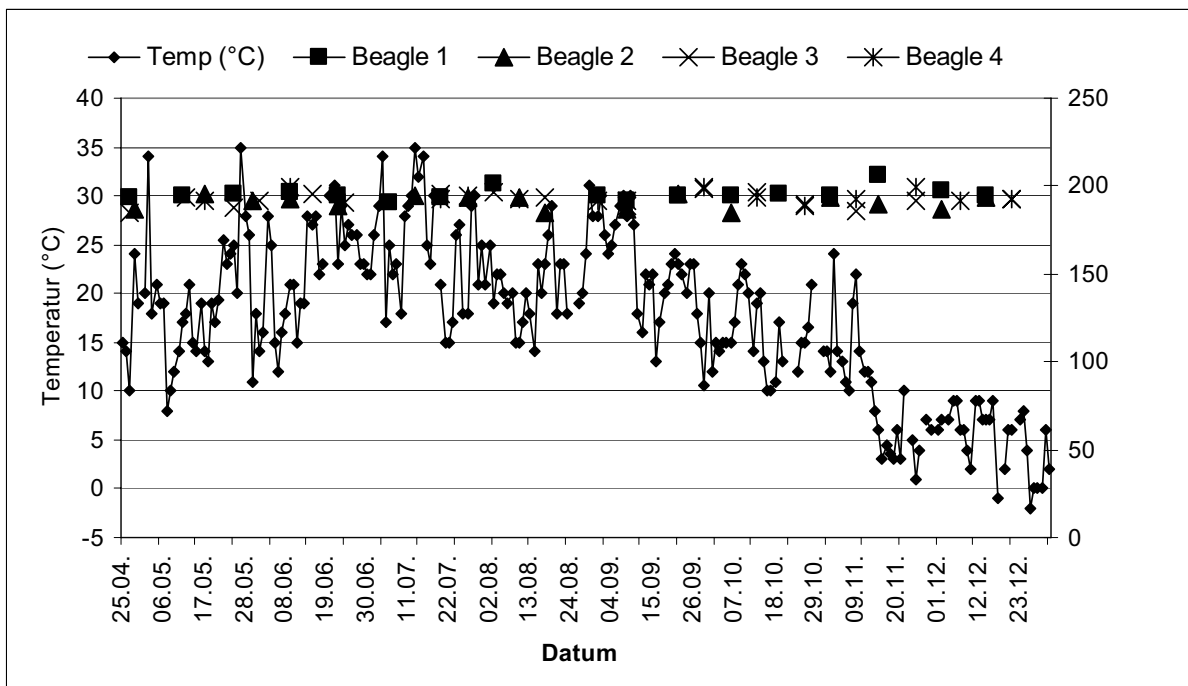


Abbildung 14: α_t -Werte in Ejakulaten von 4 Beagle-Rüden von April bis Dezember 2005 in Zusammenhang mit der täglichen Tagestemperatur ($^{\circ}\text{C}$).

Die α_t -Werte wiesen bei allen 4 Beagle-Rüden keine temperaturabhängigen Unterschiede auf (Abbildung 14). Bei Beagle 1 wurden α_t -Werte von 190,4 (06.07.05) bis 206,5 (15.11.), bei Beagle 2 von 185,2 (06.10.) bis 195,6 (17.05., 22.09.), bei Beagle 3 von 185,1 (27.04.05) bis 198,4 (29.09.) und bei Beagle 4 von 189,2 (26.10.) bis 199,3 (09.06.05, 25.11.) gemessen.

4.5.3 Einfluss einer hochfrequenten Samenentnahme auf den Spermienchromatinstatus

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien in Ejakulaten die im Abstand von 24 Stunden über einen Zeitraum von 18 Tagen (16.01.-02.02.2006) gewonnen wurden betrug bei Beagle 1: $1,5 \pm 0,5$ % (0,8 - 2,6%). Der höchste DFI- Wert von 2,6 % wurde am 12. Samenentnahmetag gemessen. Die mittlere Spermien Gesamtzahl betrug bei diesem Rüden $322,9 \pm 201,1 \times 10^6$ [$48,8 \times 10^6$ (24.01.) bis $836,0 \times 10^6$ (16.01.)]. Am letzten Untersuchungstag betrug die Spermien Gesamtzahl 481×10^6 . Der mittlere Anteil morphologisch abweichender Spermien lag bei $31,2 \pm 11,0$ % [13,0 % (26.01.) bis 58,5% (29.01.06)]. Am letzten Samenentnahmetag wurden 39,0 % morphologisch abweichende Spermien im Ejakulat festgestellt. Die mittleren Anteile proximaler und distaler Cytoplasmotropfen betragen $11,7 \pm 5,3$ % und $4,9 \pm 8,5$ %. Die Variationsbreite des Anteils proximaler Cytoplasmotropfen reichte von 5,0 % (26.01.) bis 27,0 % (18.01.) und die des Anteils distaler Cytoplasmotropfen von 0,0 % (18.01. und 26.01.) bis 35,5 % (29.01.). Am Tag der letzten Samenentnahme betragen die jeweiligen Anteile 9,5 % und 0,5 %. Nach einer sexuellen Ruhephase von 38 Tagen lag der Anteil chromatininstabiler Spermien bei Beagle 1 am 13.03. bei 0,7 % und am 17.03. bei 0,4 %. Die Spermien Gesamtzahl betrug an diesen Tagen 784×10^6 und 528×10^6 , der Anteil morphologisch abweichender Spermien 14,5 % und 19,0 %, der Anteil proximaler Cytoplasmotropfen 3,0 % und 5,5 % und der Anteil distaler Cytoplasmotropfen 3,0 % und 2,5 % (Abbildung 15).

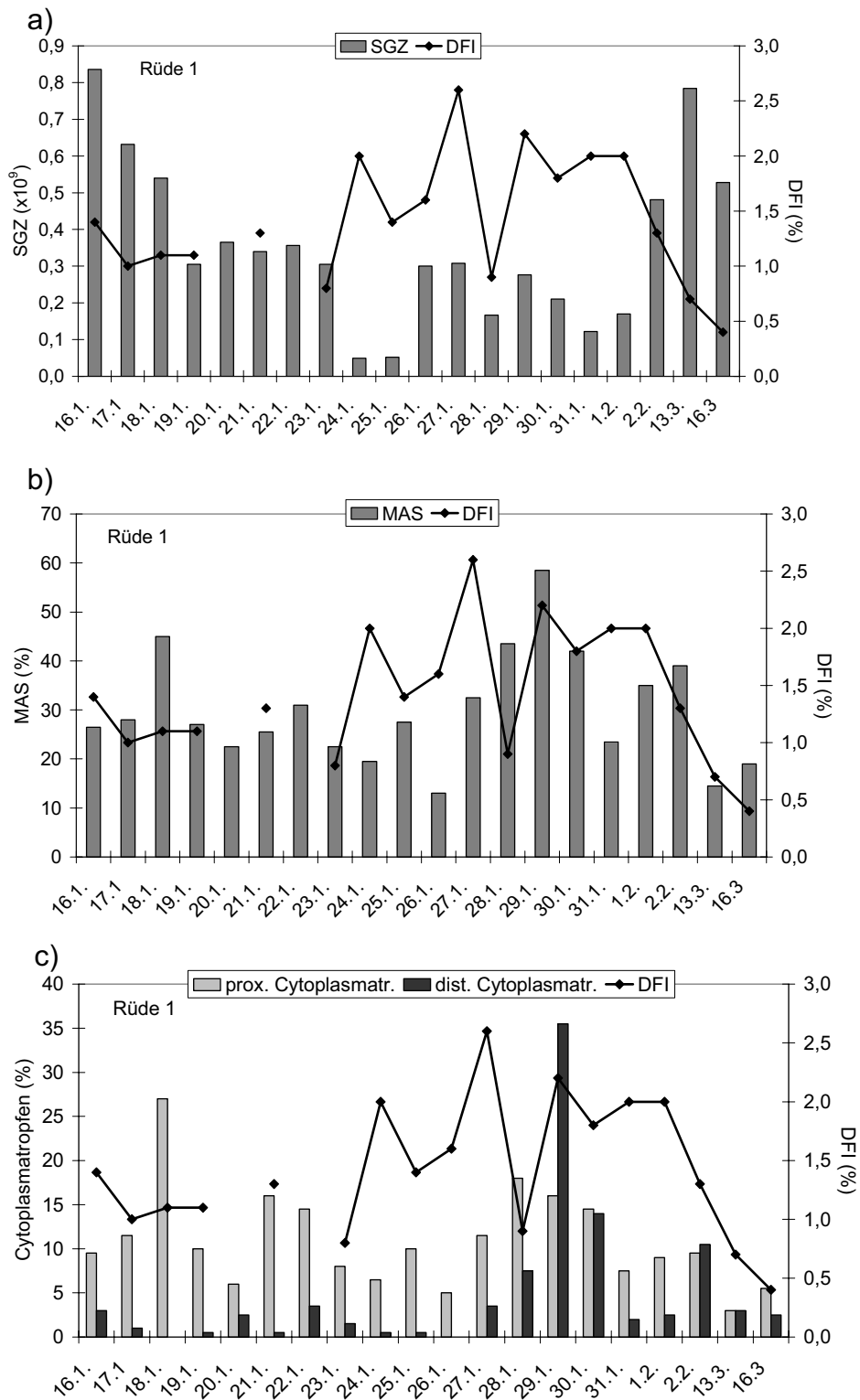


Abbildung 15: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermengesamtzahl (SGZ x 10⁹), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie (c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatropfen (Cytoplasmatropfen %) bei Rüde 1 bei täglicher Samenentnahme über einen Zeitraum von 18 Tagen (16.01. bis 02.02.) und nach 38-tägiger Sexualruhe (13. und 16.03.)

Bei Beagle 2 betrug der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien 1,1±0,2 % (0,8-1,5 %). Der höchste DFI-Wert (1,5 %) trat am 7. Samenentnahmetag auf. Die mittlere Spermengesamtzahl lag bei 440±246,9 x 10⁶ [154,7 x 10⁶ ,(22.01.) bis 1352 x 10⁶ (17.01.05)] und am letzten Untersuchungstag wurden 480 x 10⁶ Spermien im Ejakulat gezählt. Der mittlere Anteil morphologisch abweichender Spermien bei diesem Hund wies 44,0±11,4 % mit einer Variationsbreite von 27,0 % (20.01.) bis 61,0 % (28.01.). Am 18. Samenentnahmetag wurden 45,0 % morphologisch abweichender Spermien festgestellt. Die mittleren Anteile proximaler und distaler Cytoplasmatropfen betragen 23,0±11,4 % und 5,5±5,6 %. Die Variationsbreite des Anteils proximaler Cytoplasmatropfen reichte von 7,5 % (20.01.) bis 43,5 % (17.01.) und die des Anteils distaler Cytoplasmatropfen von 0,0 % (20.01.) bis 24,5 % (29.01.). Am Tag der letzten Samenentnahme betragen die jeweiligen Anteile 20,5 und 4,5 %. Nach der 38-tägigen Karenzzeit lag der DFI- Wert bei 1,3 % und 1,6 %, die Spermengesamtzahl bei 645 x 10⁶ und 820,5 x 10⁶, der Anteil morphologisch abweichender Spermien bei 31,5 % und 26,5 %, der Anteil proximaler Cytoplasmatropfen bei 7,0 % und 5,0 % und der Anteil distaler Cytoplasmatropfen bei 1,0 % und 0,5 % (Abbildung16).

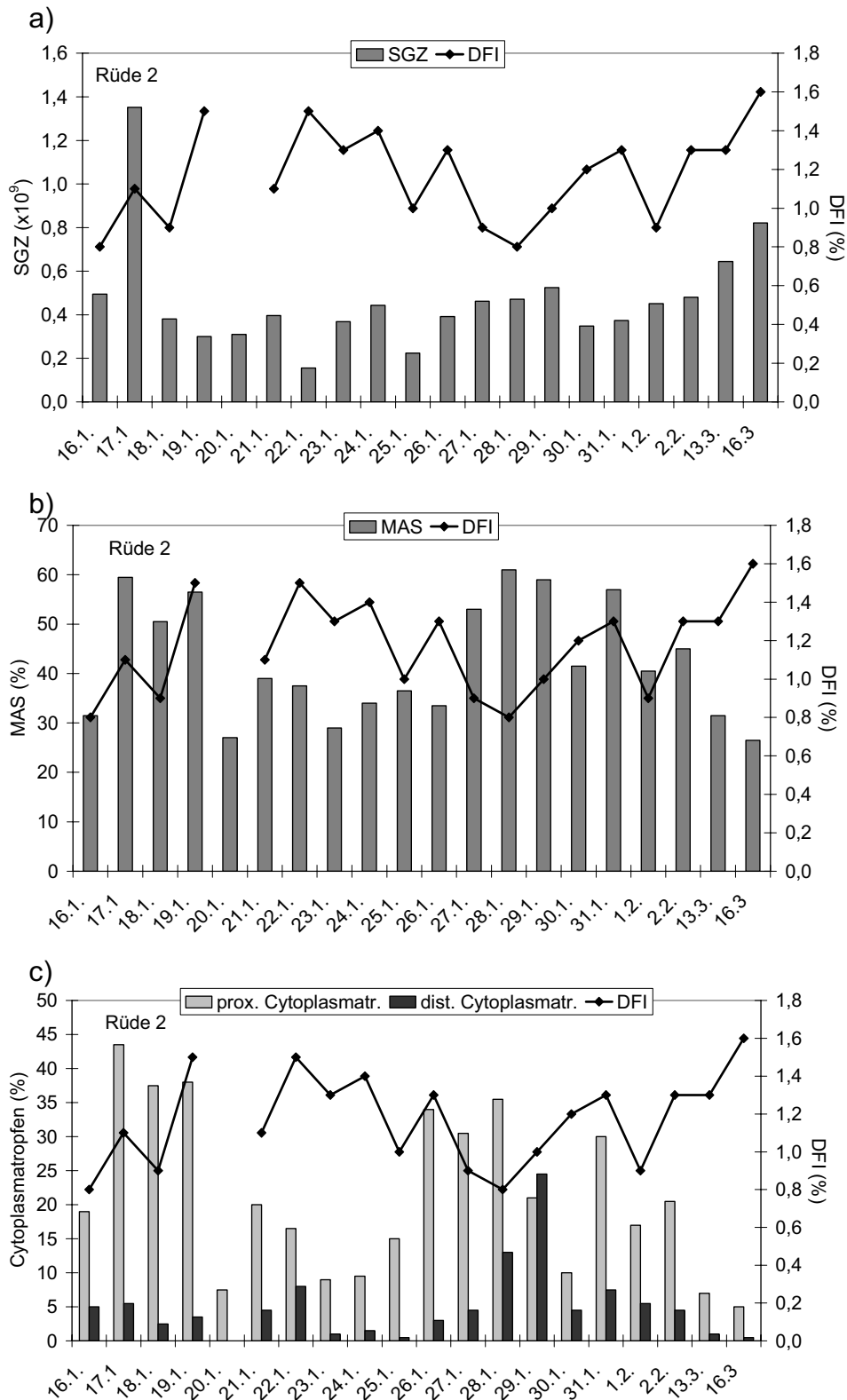


Abbildung 16: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermengesamtzahl (SGZ x 10⁹), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie (c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatrophen (Cytoplasmatrophen %) bei Rüde 2 bei täglicher Samenentnahme über einen Zeitraum von 18 Tagen (16.01. bis 02.02.) und nach 38-tägiger Sexualruhe (13. und 16.03.)

Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien betrug bei Beagle 3 $3,5 \pm 1,2$ % (1,3 -5,3 %). Maximale DFI- Werte wurden am 2. (4,9 %), 14. (5,0 %) und 18. Samenentnahmetag (5,3%) erreicht. Die Spermengesamtzahl wies $283,9 \times 10^6 \pm 170,3$ Spermien mit einer Variationsbreite von 52×10^6 (20.01.) bis 690×10^6 Spermien (16.01.) auf. Am 18. Samenentnahmetag wurden 141×10^6 Spermien im Ejakulat festgestellt. Der mittlere Anteil morphologisch abweichender Spermien lag bei $42,6 \pm 13,1$ % [18,0% (16.01.) bis 63,0 % (31.01.)]. Ein Anteil von 48 % morphologisch abweichender Spermien wurde am letzten Samenentnahmetag ermittelt. Die mittleren Anteile proximaler und distaler Cytoplasmatrophen betragen $20,8 \pm 10,6$ % und $3,3 \pm 3,4$ % und deren Variationsbreite 1,5% (16.01.) bis 38,0 % (31.01.) und 0,0 % (16. und 25.01.) bis 13,5 % (31.01.). Am 02.02. (letzter Tag der Samenentnahme) lagen die Anteile proximaler und distaler Cytoplasmatrophen bei 25,0 % und 3,0 %. Nach der 38-tägigen Samenentnahmepause betrug der DFI- Wert 3,6 % und 3,8 %, die Spermengesamtzahl bei 1016×10^6 und $409,4 \times 10^6$, der Anteil morphologisch abweichender Spermien bei 15,5 % und 34,5 %, der Anteil proximaler Cytoplasmatrophen bei 0,5 % und 11,0 % und der Anteil distaler Cytoplasmatrophen 0,5 % und 11,0 % (Abbildung 17).

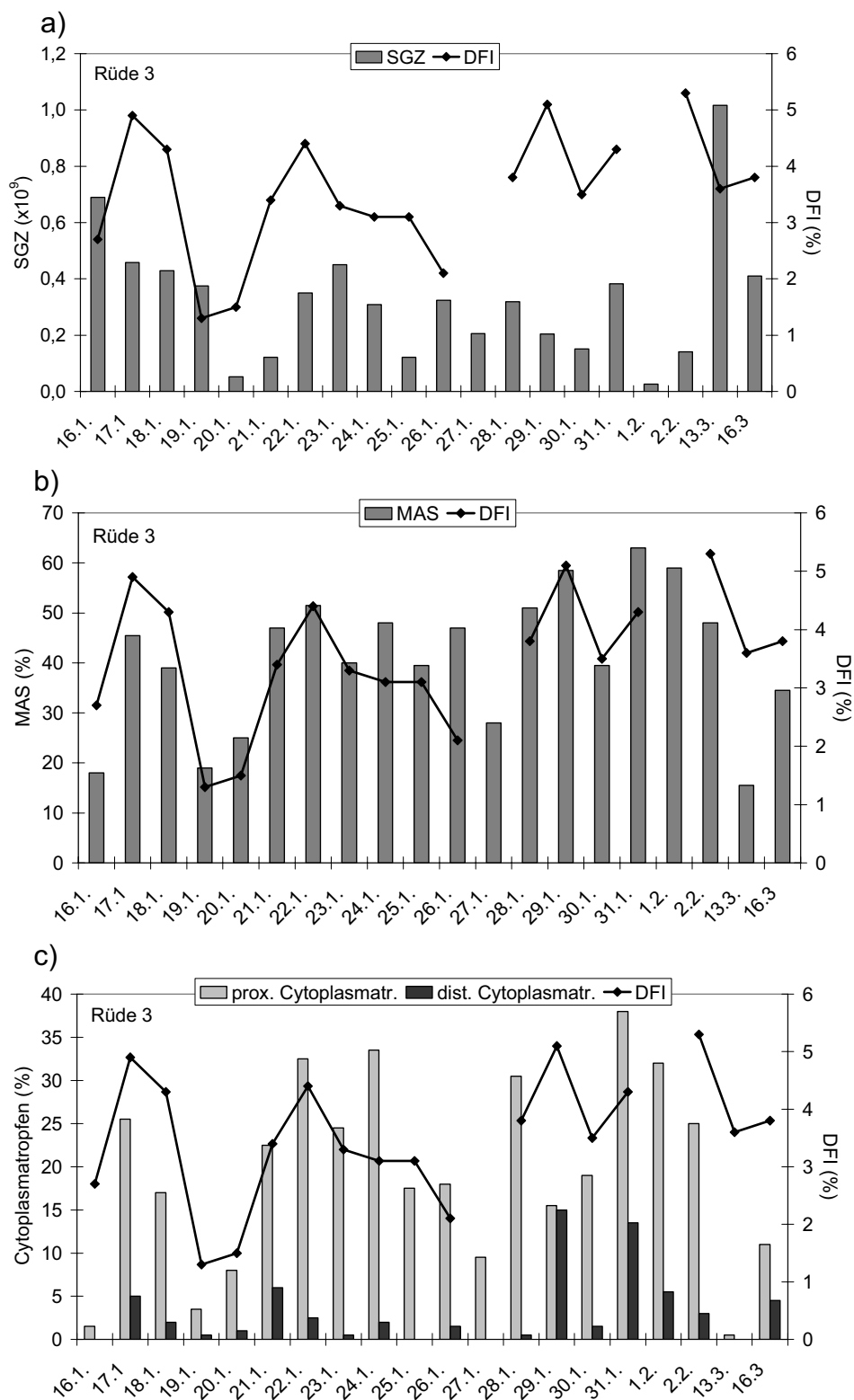


Abbildung 17: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermigesamtzahl (SGZ x 10⁹), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie

(c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmatrophen (Cytoplasmatrophen %) bei Rüde 3 bei täglicher Samenentnahme über einen Zeitraum von 18 Tagen (16.01. bis 02.02.) und nach 38-tägiger Sexualruhe (13. und 16.03.)

Beagle 4 zeigte von allen vier Rüden die niedrigsten Anteile chromatininstabiler Spermien ($0,8 \pm 0,7$ %) mit einer Variationsbreite von 0,7 bis 1,4 %. Der höchste DFI-Wert wurde am 3. Samenentnahmetag festgestellt. Die mittlere Spermiengesamtzahl betrug $394 \pm 195,1 \times 10^6$ [66×10^6 (28.01.) bis 855×10^6 (16.01.)]. Am 02.02. lag die Spermiengesamtzahl bei $437,5 \times 10^6$. Der mittlere Anteil morphologisch abweichender Spermien betrug $16,2 \pm 8,6$ % mit einer Variationsbreite von 6,0 % (20.01. und 31.01.) bis 37,5 % (17.01.). Am 18. Samenentnahmetag wurden 15,0 % morphologisch abweichender Spermien festgestellt. Die mittleren Anteile proximaler und distaler Cytoplasmatrophen betragen $9,7 \pm 7,5$ % und $0,6 \pm 0,5$ %. Die Variationsbreite des Anteils proximaler Cytoplasmatrophen reichte von 1,0 % (20.01.) bis 25,5 % (17.01.) und die des Anteils distaler Cytoplasmatrophen von 0,0 % (17.. 24.. und 25.01.) bis 1,5 % (22. und 28.01.). Am Tag der letzten Samenentnahme betragen die jeweiligen Anteile 9,5 und 0,5 %. Nach 38-tägiger geschlechtlicher Ruhe betrug der DFI- Wert 1,0 % und 1,3 %, die Spermiengesamtzahl $1339,5 \times 10^6$ und $333,8 \times 10^6$, der Anteil morphologisch abweichender Spermien 7,5 % und 11,0 %, der Anteil proximaler Cytoplasmatrophen 0,0 % und 2,0 % und der Anteil distaler Cytoplasmatrophen 0,0 % und 1,0 % (Abbildung 18).

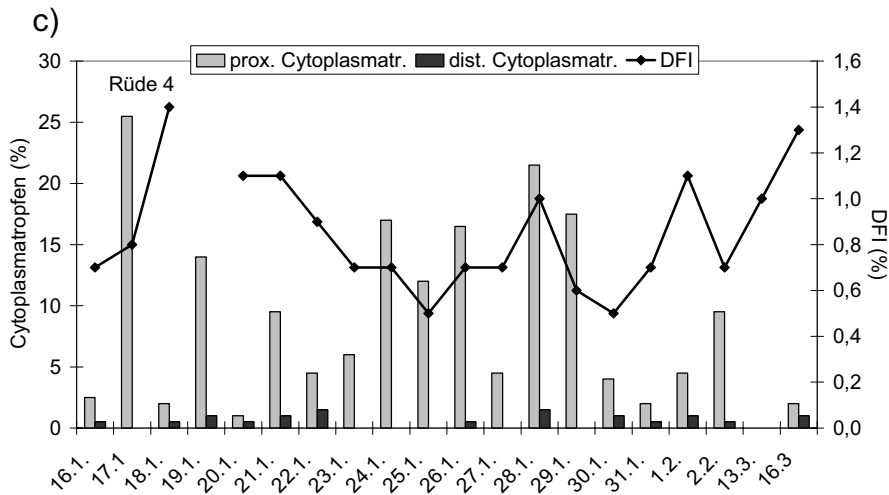
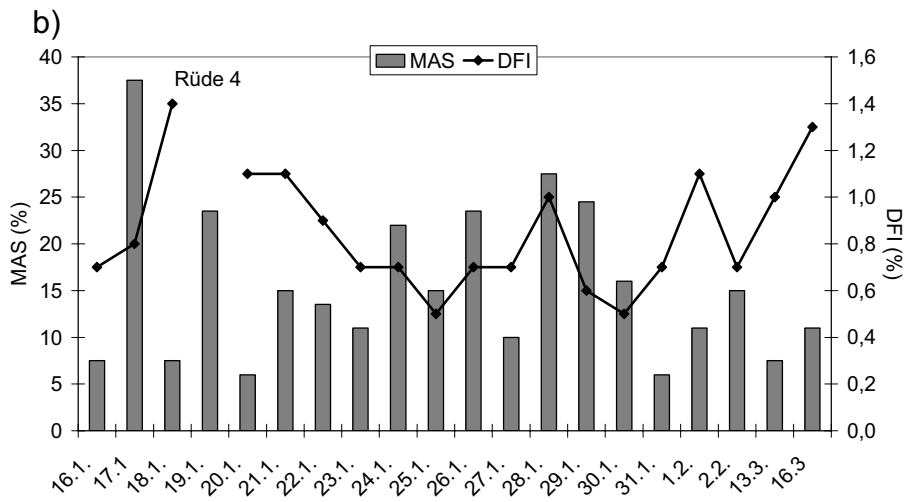
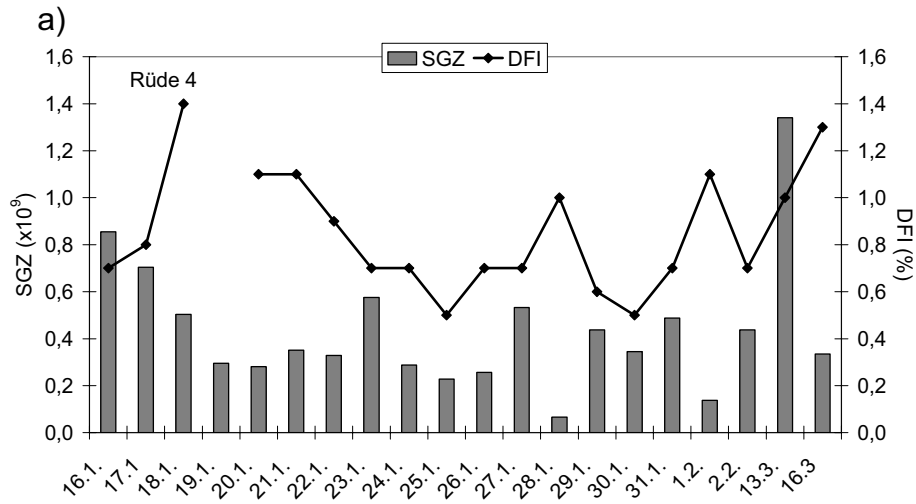


Abbildung 18: Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und (a) Spermengesamtzahl (SGZ x 10⁹), (b) Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS %) sowie (c) Anteil an proximalen und distalen Cytoplasmotropfen (Cytoplasmotropfen %) bei Rüde 4 bei täglicher Samenentnahme über einen Zeitraum von 18 Tagen (16.01. bis 02.02.) und nach 38-tägiger Sexualruhe (13. und 16.03.)

Damit war keine eindeutige Tendenz einer Ab- oder Zunahme an chromatininstabilen Spermien innerhalb des 18-tägigen Zeitraums mit täglicher Spermagewinnung zu erkennen (Abbildung 19).

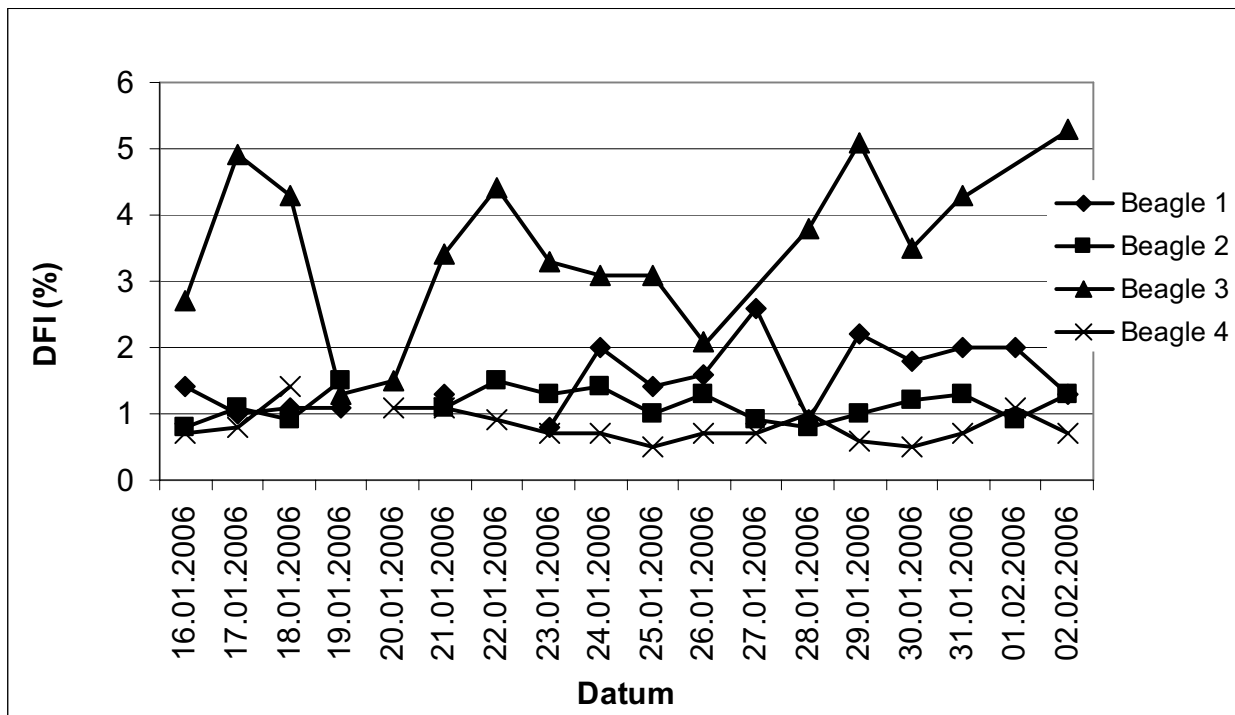


Abbildung 19: Anteil chromatininstabiler Spermien in Ejakulaten von vier Beagle-Rüden bei einer Samenentnahme pro Tag vom 16.01. bis 02.02.06.

Die α_t -Werte der vier Beagle-Rüden lagen während des Untersuchungszeitraums eng beieinander (Abbildung 20). Bei Beagle 1 betrug die Variationsbreite 186,0 bis 205,5, bei Beagle 2 184,0 bis 194,3, bei Beagle 3 182,7 bis 195,7 und Beagle 4

189,5 bis 203,3. Die jeweiligen Werte nach 38-tägiger Sexualkarenz betragen entsprechend 186,5 bei Beagle 1, 189,5 bei Beagle 2, 190,1 bei Beagle 3 und 189,9 bei Beagle 4.

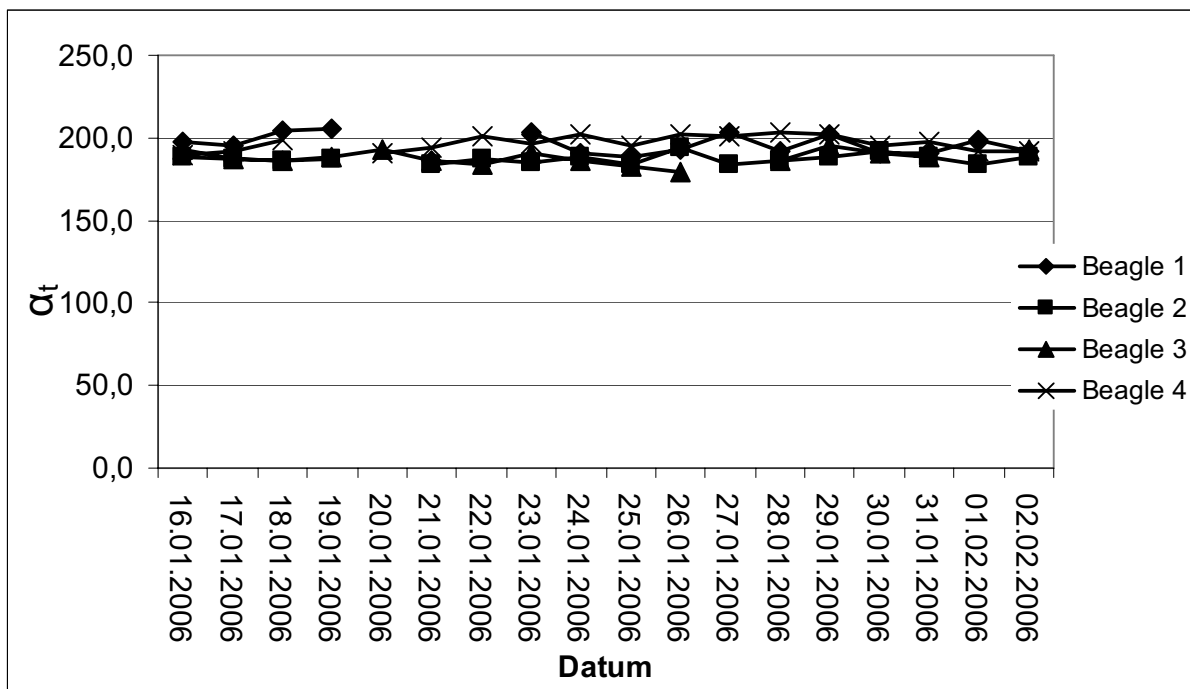


Abbildung 20: α_t - Werte in Ejakulaten von vier Beagle-Rüden bei einer Samenentnahme pro Tag vom 16.01. bis 02.02.06.

5. Diskussion

5.1 Material und Methode

Zur Untersuchung des Spermienchromatinstatus standen insgesamt 112 Rüden zur Verfügung, während in die Studien von Biege (2004) und GARCIA- MACIAS et al. (2006) 52 bzw. 27 Rüden eingingen. Aus der Rüdengruppe der vorliegenden Studie wurde der Spermienchromatinstrukturassay bei 68 Tieren unterschiedlicher Rassen und unterschiedlichen Alters durchgeführt, um die vermutete Heterogenität des Anteils chromatininstabiler Spermien in der Rüdengruppe zu überprüfen. Ferner erfolgte eine Unterteilung der Ejakulate in Normospermie (n=37), Dysspermie (n= 19) und Pathospermie (n=12), um den Anteil chromatininstabiler Spermien bei Rüden mit unterschiedlichem Ejakulatstatus zu ermitteln und mit den Ergebnisse von Biege (2004) zu vergleichen, die den Spermienchromatinstatus bei Rüden mit Normo- und Dysspermie fluoreszenzmikroskopisch erfasst hatte. Zur Beurteilung der erhobenen SCSA[®]-Befunde diente eine homogene Gruppe von 40 einjährigen, unter identischen Bedingungen gehaltenen Beagle-Rüden mit Normospermie als Kontrollgruppe. Der Frage nach möglichen Rasseunterschieden im Spermienchromatinstatus wurde durch den Vergleich des mittleren Anteils chromatininstabiler Spermien von Ejakulaten mit Normospermie bei einer gemischten Rüdengruppe (n=20) sowie bei Foxterriern (n=8), Retrievern (n=6) und Doggen (n=3) nachgegangen. Diese drei Rassen wurden auch gewählt, um einen möglichen Einfluss der Körpergröße auf den Anteil chromatininstabiler Spermien erkennen zu können.

Zur Beurteilung des Spermienchromatinstatus beim Rüden als eigenständigen Ejakulatparameter wurden unter Einbeziehung von 68 Ejakulaten Korrelationen zwischen dem DFI-Wert und den klassischen spermatologischen Parametern untersucht. Zusätzlich wurden Unterschiede zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und innerhalb der Ejakulatparameter gebildeten Untergruppen herausgestellt, um ermittelte Korrelationen zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und den jeweiligen Ejakulatparametern zu verdeutlichen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Umgebungstemperatur und der Samenentnahmefrequenz auf

den Spermienchromatinstatus an 4 klinikeigenen adulten Beagle-Rüden, untersucht. Trotz der z.T. geringen Gruppengröße (< 6 Tiere) war es möglich, durch deskriptive Auswertung der Daten einheitliche Aussagen zu treffen.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete durchflusszytometrische Methode (SCSA[®]) ist nach EVENSON et al. (2002) die Methode der Wahl für die Diagnose und Prognose einer männlichen Infertilität. Ein Vorteil dieses Tests gegenüber dem von ACEVEDO (2001) und BIEGE (2004) eingesetzten fluoreszenzmikroskopischen Verfahren sind die bereits 20 jährigen Erfahrungen basierend auf zahlreichen Studien an Spermien diverser Tierarten und des Menschen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der durchflusszytometrischen Erfassung von 5000 bis 10000 Samenzellen pro Ejakulat im Gegensatz zur mikroskopischen Bewertung von nur 100 bis 200 Samenzellen. Des weiteren zeigen die Ergebnisse des SCSA[®] eine höhere Reproduzierbarkeit (0,98 – 0,99) als die Ergebnisse zahlreicher anderer spermatologischer Messmethoden. Nach SCHRADER et al. (1988) und EVENSON et al. (1991) sind die SCSA[®]-Parameter über einen Zeitraum von 8 Monaten konstanter als die Samenanalyseparameter der WHO. Der durchflusszytometrische SCSA[®] wird als objektivstes und statistisch stabilstes Testverfahren im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik angesehen (EVENSON et al. 2002). Beim Menschen wird der SCSA[®] routinemäßig eingesetzt (EVENSON et al. 1999; SPANO et al. 1998; LARSON et al. 2000; BUNGUM et al. 2004) und besitzt hier einen eigenständigen Stellenwert (EVENSON et al. 1980a; TEJADA et al. 1984; BALLACHEY et al. 1988; SAKKAS u. TOMLINSON 2000). Der SCSA[®] wurde und wird bereits an mehreren Haustierspezies durchgeführt. Beim Hund liegen bisher keine verlässlichen Daten hinsichtlich des mittels SCSA[®] ermittelten Spermienchromatinstatus vor. Von GARCIA-MACIAS et al. (2006) liegen Daten über den Chromatinstatus von Nebenhodenkopf-, Nebenhodenkörper- und Nebenhodenschwanzspermien sowie ejakulierten Spermien von 19 Hunden und von ejakulierten Spermien von 8 weiteren Rüden jeweils einer mittelgroßen Rasse vor.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde zusätzlich zum Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) der α_t -Wert mitbestimmt. Nach EVENSON und JOST (2000) wird das Ausmaß der DNA-Denaturierung von dem errechneten α_t -Wert

$[\alpha_t = (\text{Rotfluoreszenz} / \text{Rotfluoreszenz} + \text{Grünfluoreszenz}) \times 1000]$ beschrieben. Dieser Wert wird von allen 5000 Zellen in der Probe gemessen und bildet die α_t -Verteilung (Histogramm). Aus diesem Verteilungshistogramm wird dann der Prozentsatz an Spermien mit erhöhtem DFI subjektiv als DFI (%) (früher COMP α_t , Cells Outside the Main Population) bestimmt. Nach EVENSON et al. (2002) besteht eine neue Nomenklatur, so dass der Mittelwert von α_t heute als mean DFI und die Standardabweichung von α_t ($SD\alpha_t$) als SD DFI bezeichnet werden. In der vorliegenden Studie wurde durchgehend der Begriff α_t verwendet. Nach EVENSON und JOST (2000) beschreibt die Standardabweichung von α_t ($SD\alpha_t$) das Ausmaß einer abnormalen Spermienchromatinstruktur innerhalb einer Population und der Mittelwert von α_t ($x\alpha_t$) weist auf die Bewegung und Tendenz in der ganzen Zellpopulation hin. COMP α_t (heute DFI) wurde als wichtigste Variable des SCSA für die Fertilitätsbewertung festgelegt, während $SD\alpha_t$ die wichtigste Variable toxikologischer Studien darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden die α_t -Werte bei jeder Einzeluntersuchung mitberücksichtigt, um zu prüfen, ob dieser Parameter zusätzliche Hinweise und Informationen in Bezug auf den Spermienchromatinstatus bei Rüden liefert.

In dieser Studie wurden die durchflusszytometrische Erfassung chromatininstabiler Spermien in Anlehnung an das Protokoll von EVENSON und JOST (2000) durchgeführt. Ferner wurden, um Schwankungen innerhalb des Messbereichs gering zu halten, die zu untersuchenden Nativspermaproben schockgefroren und alle Proben innerhalb eines kurzen Zeitraums gemessen und ausgewertet. Auf diese Weise wurden Assay-bedingte Schwankungen vermieden. Zur zusätzlichen Präzisierung der Ergebnisse wurden stets Doppelproben gemessen und daraus die Mittelwerte berechnet. Ferner fand nach jeder 5. Doppelmessung jeweils eine Kontrollmessung an einer Eberspermaprobe statt, um mögliche Verfahrensfehler erkennen und korrigieren zu können.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Spermienchromatinstatus innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation

In einer gemischten Rüdenpopulation ($n=68$) wurde mit $5,5\pm 8,5\%$ ($0,5 - 57,5\%$) ein sehr variabler Anteil chromatininstabiler Spermien festgestellt. Der mittlere α_t -Wert betrug 204,7 mit einer Standardabweichung von 14,7 ($185,1 - 260,7$). Für canine Nebenhodenhodenspermien wurde ein Anteil chromatininstabiler Spermien von $7,1\pm 1,8\%$ ($n=19$), für Nebenhodenkörperspermien von $6,1\pm 4,0\%$ ($n=19$) und für Nebenhodenschwanzspermien von $5,4\pm 1,7\%$ ($n=19$) ermittelt (GARCIA-MACIAS et al. 2006). Der Chromatinstatus ejakulierter Spermien ($n=8$) betrug in derselben Studie $6,5\pm 3,0\%$. Auch beim Hengst wurde eine deutliche Heterogenität im Anteil chromatininstabiler Spermien von $1,8 - 41,3\%$, im Mittel $17,9\%$ beschrieben (SIEME et al. 2004). Eine mögliche Ursache für die große Variationsbreite des Anteils chromatininstabiler Spermien bei Rüden und Hengsten ist in dem unterschiedlichem Fertilitätsstatus der Einzeltiere infolge der fehlenden Selektion der Vatertiere auf Fruchtbarkeit zu sehen. Diese Begründung wird dadurch gestützt, dass der Spermienchromatinstatus bei Bullen bei $4,6\pm 1,6\%$ ($2,3 - 9,9\%$) (LÖHMER 2003) und bei Ebern $<5\%$ (ARDON 2005) beträgt. Bei diesen beiden Nutztierspezies unterliegen die männlichen Zuchttiere seit Jahrzehnten einer strengen Selektion im Hinblick auf die Fertilität.

5.2.2 Spermienchromatinstatus bei Rüden mit Normo-, Dys- oder Pathospermie

Nach EVENSON et al. (2002) ist ein Test zur Beurteilung der Fertilität erst dann sinnvoll, wenn gewährleistet wird, dass Grenzbereiche sowohl für fertile als auch für infertile Individuen vorliegen, deren Werte sich bestenfalls geringgradig überlappen sollten. In der Literatur liegen nur wenige Daten über den Spermienchromatinstatus beim Hund vor. In der vorliegenden Studie wurde bei Rüden mit Normospermie ein durchschnittlicher DFI-Wert von $2,7\pm 2,4\%$ ($0,5 - 10,4\%$) und ein mittlerer α_t -Wert

von $202,4 \pm 10,2$ ($189,6 - 235,5$) ermittelt. Dieses Ergebnis wird durch den Anteil chromatininstabiler Spermien einer homogenen Beaglekontrollgruppe ($n=40$) von im Mittel $2,7\% \pm 1,5$ ($0,5 - 8,1\%$) bestätigt. Die bei Rüden mit Normospermie bestehende Schwankungsbreite von 0,5 bis 10,4% kann einen möglichen Grenzbereich bezüglich des Chromatinstatus für Rüden mit Normospermie darstellen. Nach EVENSON et al. (2002) spricht beim Menschen ein DFI-Wert von $< 15\%$ für einen sehr guten und ein DFI-Wert von 15 bis 24% für einen guten Fertilitätstatus. Bei Rüden mit Dysspermie variierte der Anteil an chromatininstabilen Spermien von 0,9 bis 22,9% (Mittelwert $6,2 \pm 5,7\%$) und beim Vorliegen einer Pathospermie von 0,6 bis 57,5% (Mittelwert $12,9 \pm 16,8\%$). Trotz der großen Schwankungsbreite der DFI-Werte bestanden zwischen Ejakulaten mit Normospermie und Pathospermie sowie Dysspermie und Pathospermie signifikante Unterschiede. Dagegen wiesen die α_t -Werte hinsichtlich des Ejakulatstatus keine signifikanten Unterschiede auf.

Mit Hilfe eines fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assays stellte BIEGE (2004) bei Normospermie einen mittleren Anteil chromatininstabiler Spermien von $4,1 \pm 5,8\%$ ($n=17$) und bei Dysspermie von $14,0 \pm 23,7\%$ ($n=29$) fest. Die Unterschiede waren jedoch wegen hoher Variabilität nicht signifikant. Auch bei Ejakulaten von Katern und Hengsten wurde ein Unterschied zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien bei Normo- und Teratozoospermie festgestellt (PENFOLD et al. 2003; THIEßEN 2006). Nach EVENSON et al. (1980) war bei Menschen, Mäusen und Rindern und nach KENNEY et al. (1995) bei Pferden mit guter Fertilität der Anteil chromatininstabiler Spermien geringer als bei Probanden, bei denen eine Subfertilität diagnostiziert worden war. Bei Bullen und Hengsten wird ein oberer DFI-Grenzwert von ca. 25% in Bezug auf eine herabgesetzte Fertilität gesehen (BOCHENEK et al. 2001; LOVE 2005). Beim Schwein wurde eine signifikante Abnahme der Wurfgröße bei einem DFI-Wert $> 3\%$ nachgewiesen (BOE-HANSEN et al. 2008). In der vorliegenden Studie konnte weiterhin festgestellt werden, dass bei 14 von insgesamt 19 Ejakulaten mit Dysspermie in Form einer Teratozoospermie ($MAS > 30 - 60\%$) und bei 8 von insgesamt 12 Ejakulaten mit Pathospermie ($MAS > 60\%$) die DFI-Werte $< 10,4\%$ lagen. Es kann somit beim Vorliegen einer Dys- oder Pathospermie bzw. einer mittel- bis hochgradigen

Teratozoospermie nicht in jedem Fall von einem erhöhten Anteil chromatininstabiler Spermien im Ejakulat ausgegangen werden.

5.2.3 Spermienchromatinstatus in Ejakulaten mit Normospermie unter Berücksichtigung möglicher Rasseunterschiede

Ein Einfluss der Rasse wie er nach GUENIAT VON COURROUX (1988) beim Rind beschrieben wurde war in der vorliegenden Studie beim Hund nicht zu erkennen. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils chromatininstabiler Spermien in Ejakulaten von Foxterriern ($3,4 \pm 2,6\%$), Retrievern ($3,3 \pm 0,8\%$) und Doggen ($2,1 \pm 0,1\%$) festgestellt werden. Ebenso lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem Spermienchromatinstatus dieser Rassen und der homogenen Beaglegruppe ($2,7 \pm 1,5\%$) vor. Aus diesen Ergebnissen kann der Rückschluss gezogen werden, dass die Körpergröße bzw. das Körpergewicht der Rüden keinen Einfluss auf den Spermienchromatinstatus hat.

5.2.4 Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und ausgewählten spermatologischen Parametern

Über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Chromatinstatus und den klassischen spermatologischen Parametern liegen im Schrifttum widersprüchliche Ergebnisse vor. Bei der Betrachtung der eigenen Ergebnisse war erwartungsgemäß eine hohe positive Korrelation zwischen dem DFI (%) und dem α_t -Wert feststellbar ($p < 0,001$), da der DFI-Wert (%) anhand der α_t -Verteilung (Histogramm) bestimmt wird. Bezüglich der Spermienmotilität und des Chromatinstatus ergaben sich negative Korrelationen. Dabei war die Korrelation des Anteils chromatininstabiler Spermien mit dem mittels CMA gemessenen Anteil vorwärtsmotiler Spermien deutlicher ($p < 0,001$) als mit dem mikroskopisch geschätzten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien ($p < 0,01$). BIEGE (2004) ermittelte unter Verwendung des fluoreszenzmikroskopischen SCSA eine negative Beziehung zwischen dem Chromatinstatus und den Geschwindigkeiten von Hundespermien. Dieser

Zusammenhang wird auch für Equine, Bovine- und Humane Spermien beschrieben (GUENIAT VON COURROUX 1988; EVENSON u. KARABINUS 1991; KENNEY et al. 1995; THIEßEN 2006). Dagegen konnte LÖHMER (2003) beim Bullen keinen Bezug zwischen Spermienchromatinstatus und Motilität nachweisen. Die in der vorliegenden Studie festgestellte positive Korrelation zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und den Anteilen membrangeschädigter und morphologisch abweichender Spermien wurde auch von BIEGE (2004) für Hundespermien aufgezeigt. Auch beim Schwein (BOE- HANSEN et al. 2008) wurde ebenso wie beim Rind (GUENIAT VON COURROUX 1988) und beim Menschen (ENGH et al., 1992) eine Erhöhung der DFI- Werte im Zusammenhang mit einer Abnahme der Plasmamembranintegrität der Spermien beobachtet. Die Differenzierung der morphologischen Abweichungen in Veränderungen der Kopfkappe, des Kopfes, des Halses, Plasmatrophen und Haupt- und Endstückveränderungen ließ eine positive Korrelation des DFI-Wertes mit dem Anteil an Spermien mit Kopfkappenveränderungen (insgesamt und sekundär) und mit Kopfveränderungen erkennen. Dagegen zeigte der α_t -Wert lediglich eine grenzwertige Korrelation mit dem Gesamtanteil an kopfkappenveränderten Spermien, jedoch eine signifikante Korrelation mit dem Prozentsatz sekundärer Kopfkappenveränderungen. Für Spermien mit Kopfveränderungen ist ein Zusammenhang mit der Chromatinstruktur insofern nahe liegend, als das Chromatin in dieser Lokalisation vorliegt. TEJADA et al. (1984) sahen eine mögliche Erklärung in dem Verlust der Tertiärstruktur der Spermien- DNA. Studien an Mäusen, Rindern und Menschen lieferten diesbezüglich ebenfalls kontroverse Ergebnisse (BALLACHEY et al. 1986; HAMMADEH et al. 1996; SPANÒ et al. 2000; LÖHMER 2003). Weitere signifikante Unterschiede wurden sowohl zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Anteil an Spermien mit Halsveränderungen als auch mit dem Anteil an Spermien mit Haupt- und Endstückveränderungen festgestellt. Der Prozentsatz an Spermien mit persistierendem Plasmatrophen (proximal und distal) war weder mit dem Chromatinstatus noch mit dem α_t -Wert verknüpft.

Dieser Zusammenhang konnte durch den DFI-Mittelwertvergleich zwischen den pro Parameter gebildeten Untergruppen zusätzlich verdeutlicht werden. Der Anteil chromatininstabiler Spermien unterschied sich in Ejakulaten mit $\leq 60\%$ und $> 60\%$ vorwärtsmotiler Spermien (CMA) signifikant ($p < 0,0001$), ebenfalls in Ejakulaten mit $MAS \leq 30\%$ und $MAS > 60\%$ ($p < 0,001$) sowie zwischen $MAS > 30 - 60\%$ und $MAS > 60\%$ ($p < 0,05$). Signifikante Unterschiede im Anteil chromatininstabiler Spermien ergaben sich auch für Ejakulate mit $\leq 10\%$ und $> 10\%$ kopfkappenveränderten Spermien und für Ejakulate mit $\leq 5\%$ und $> 5\%$ an kopfveränderten Spermien. Damit konnte die beim Menschen (TEJADA et al. 1984), beim Bullen (EVENSON und KARABINUS 1991) und bereits beim Hund (BIEGE 2004) nachgewiesene Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen in der vorliegenden Studie nachvollzogen werden. Auch wurde durch den Mittelwertvergleich zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und Spermien mit $\leq 10\%$ und $> 10\%$ Halsveränderungen der Zusammenhang mit diesem Parameter verdeutlicht.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen lassen somit erkennen, dass einige Ejakulatparameter wie Spermienmotilität, Membranintegrität und Spermienmorphologie auf Chromatinschäden hinweisen können, jedoch bleibt die Bedeutung über funktionelle Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und anderer Ejakulatparameter mit Ausnahme der Kopfmorphologie fraglich.

Doch zeigen die Ergebnisse auch, dass Spermien mit Kopfveränderungen nicht zwangsläufig eine instabile Spermienchromatinstruktur aufweisen müssen, was bereits von ROUX und DADOUNE (1989) dargelegt wurde. Auch bei der Betrachtung der anderen, mit dem Chromatinstatus signifikant korrelierten Ejakulatparameter ist festzustellen, dass im Falle ihrer Erhöhung der Anteil chromatininstabiler Spermien physiologisch sein kann. Nach SPANŮ et al. (1998), EVENSON et al. (1999) und LARSON et al. (2000) zeigt der Anteil chromatininstabiler Spermien nur schwache Korrelationen mit den konventionellen Ejakulatparametern, so dass der SCSA[®] als zusätzliches prognostisches Kriterium für die Beurteilung der männlichen Infertilität angesehen werden kann.

5.2.5 Einfluss externer Faktoren auf die Spermienchromatinstruktur

5.2.5.1 Einfluss jahreszeitlicher Temperaturschwankungen

Auswirkungen der Jahreszeit auf die Ejakulatbeschaffenheit sind in erster Linie bei Haustieren zu beobachten, deren weibliche Individuen eine deutliche Saisonalität des Sexualzyklus aufweisen, wie z.B. das Pferd und die kleinen Wiederkäuer Schaf und Ziege (BOSTEDT 2001; PICKET et al. 1975). Dagegen werden bei Rüden keine eindeutigen jahreszeitlichen Schwankungen der Fruchtbarkeit beschrieben. Da Hunde insbesondere bei Zwingerhaltung den jahreszeitlich schwankenden Außentemperaturen stärker ausgesetzt sind als im Haus gehaltene Tiere, sollte in dieser Studie eine mögliche temperaturabhängige Beeinflussung des Chromatinstatus von April bis Dezember untersucht werden. Bei allen vier Rüden war der Spermienchromatinstatus während des gesamten 9-monatigen Untersuchungszeitraums bis auf geringe intraindividuelle Schwankungen stabil. Ebenso wurde die Spermiengesamtzahl, die Spermienmorphologie sowie der Anteil proximaler und distaler Cytoplasmotropfen nicht beeinflusst. Dasselbe trifft für die zugehörigen α_t -Werte zu. Warum die α_t -Werte des Rüden 3, der im Vergleich zu den anderen drei Tieren die höchsten Anteile chromatininstabiler Spermien aufwies, in einem sehr niedrigen Bereich lagen, bleibt fraglich.

Insgesamt konnte somit anhand der eigenen Untersuchungen beim Rüden kein saisonaler Einfluss auf den Chromatinstatus nachgewiesen werden.

In Ejakulaten von Hengsten wurde im Dezember ein signifikant höherer Anteil chromatininstabiler Spermien als im Frühjahr bzw. Sommer ermittelt (THIEßEN 2006), während in Tiefgefriersperma derselben Spezies kein saisonaler Einfluss auf die Spermienchromatinstruktur zu beobachten war (KRIENKE 2003). Beim Menschen liegen diesbezüglich ebenfalls kontroverse Ergebnisse vor. Während SPANÓ et al. (1998) im Frühjahr höhere DFI- Werte als im Herbst und Winter feststellten, konnten EVENSON et al. (1999) keinen saisonalen Einfluss auf den Anteil chromatininstabiler Spermien beim Mann nachweisen.

Studien beim Wiederkäuer (SAACKE et al. 1994; KARABINUS et al. 1997) haben gezeigt, dass eine exogene Wärmezufuhr auf die Hoden sich sowohl nachteilig auf die klassischen spermatologischen Parameter als auch auf den Chromatinstatus auswirkt. Beim Hund scheint jedoch neben den üblichen Ejakulatparametern auch die Spermienchromatinstruktur im Vergleich zu anderen Spezies relativ stabil gegenüber erhöhten Umgebungstemperaturen zu sein. Ob dabei ein Einfluss der Domestikation zum Tragen kommt, der auch zu einer Entzerrung des streng monöstrischen Zyklus des Wolfes bei der Mehrzahl der Hündinnen geführt hat, kann an dieser Stelle nur als Denkansatz eingebracht werden.

5.2.5.2 Einfluss der Samenentnahmefrequenz

Über den Einfluss einer erhöhten geschlechtlichen Aktivität bzw. sexueller Ruhephasen auf den Anteil chromatininstabiler Spermien des Rüden liegen keine einheitlichen Ergebnisse vor. In der Praxis kann häufig festgestellt werden, dass Zuchtrüden aufgrund einer hohen Deckfrequenz nur geringe Befruchtungsergebnisse aufweisen. Diesbezüglich spielt erfahrungsgemäß die Erschöpfung der epididymalen Spermienreserven sowie ein suboptimales Deckmanagement eine ursächliche Rolle. Da über einen Zusammenhang zwischen der sexuellen Beanspruchung und dem Spermienchromatinstatus beim Hund bisher keine Informationen vorliegen, wurde dieser Parameter neben den konventionellen Ejakulatparametern bei täglicher Samenentnahme über einen Zeitraum von 18 Tagen untersucht. Der Anteil chromatininstabiler Spermien und der α_t -Wert blieben während des gesamten Zeitraums auf einheitlichem Niveau. Auch in den nach einer anschließenden Sexualkarenz von 38 Tagen gewonnenen Ejakulaten waren keine Veränderungen zu erkennen. Bei Männern stellte lediglich SPANÓ et al. (1998) negative Einflüsse einer längeren Sexualkarenz auf die Spermienchromatinstruktur fest, während EVENSON et al. (1991) und SUN et al. (1997) keinen solchen Zusammenhang herstellen konnten. Die bei drei der vier Rüden im Vergleich zu den Ausgangswerten deutlich geringere Spermiengesamtzahl am 18. Samenentnahmetag ist ein Indiz für die bereits erwähnte Erschöpfung der Spermienreserven in den Nebenhoden. Diese

füllten sich im Verlauf der darauffolgenden 38-tägigen sexuellen Ruhephase wieder auf, was in dem Wiederanstieg der Spermiengesamtzahl zum Ausdruck kommt. Dagegen war kein eindeutiger Einfluss auf die Spermienmorphologie und den Anteil an Spermien mit persistierendem Cytoplasmotropfen (proximale und distale) feststellbar.

Aufgrund des monöstrischen Zyklus der Wölfin hält der männliche Wolf, auf den der moderne Haushund entwicklungsgeschichtlich zurückgeht, eine ca. 11-monatige Phase der Sexualruhe ein, welcher aufgrund der annähernd synchron auftretenden Läufigkeiten der zum Rudel gehörenden Wölfinnen eine kurze Phase relativ hoher sexueller Aktivität folgt. Obwohl Publikationen über saisonale Schwankungen der Beschaffenheit von Wolfsejakulaten fehlen, lässt sich aus diesen Gegebenheiten ableiten, dass die Spermienphysiologie des Wolfes entsprechend auf eine extrem lange Phase der Nebenhodenspeicherung eingestellt ist. Dies scheint auch bei seinen Nachkommen, den Haushunden, der Fall zu sein und kann anhand der Erfahrungen im Rahmen der klinisch-andrologischen Diagnostik abgeleitet werden. So sind die Ejakulatparameter „Spermienmotilität“, „Anteil membrangeschädigter Spermien“ und „Anteil formabweichender Spermien“ bei Rüden nach einer sexuellen Ruhephase von mehreren Wochen oder Monaten gewöhnlich unverändert. Eine entsprechende Stabilität kann offensichtlich auch für den Spermienchromatinstatus geltend gemacht werden.

5.3 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse über den Spermienchromatinstatus beim Rüden lassen die Schlussfolgerungen zu, dass innerhalb der Zuchtrüdenpopulation eine ausgeprägte individuelle Variabilität hinsichtlich des Anteils chromatininstabiler Spermien besteht. Obwohl deutliche Hinweise auf Zusammenhänge zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und den Anteilen vorwärtsbeweglicher Spermien, membrangeschädigter und morphologisch abweichender Spermien bestehen, kann beim Vorliegen einer Dysspermie oder Pathospermie nicht von einem gleichzeitig erhöhten Anteil an chromatininstabilen Spermien ausgegangen werden. Dies wird auch anhand der Variationsbreite der DFI-Werte der Hunde mit Normospermie (0,5 - 10,4%), Dysspermie (0,9 - 22,9%) und Pathospermie (0,6 - 57,5%) deutlich.

Der Spermienchromatinstatus beim Rüden ist offensichtlich rasseunabhängig.

Im Jahresverlauf erweist sich das Spermienchromatin bei Rüden mit Normospermie als stabil. Ebenso scheint weder eine hohe Deckfrequenz noch eine mehrwöchige Sexualekare die Spermienchromatinstruktur zu beeinflussen.

Somit ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht mit saisonalen Schwankungen des Spermienchromatinstatus beim Rüden zu rechnen.

Von der zusätzlichen Untersuchung der α_t -Werte können keine ergänzenden Informationen über den Spermienchromatinstatus der untersuchten Rüden sowie über etwaige externe Einflüsse abgeleitet werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Marta Anna Strotmann

Chromatinstatus von Hundespermien unter Berücksichtigung der Genitalgesundheit und der Ejakulatbeschaffenheit sowie verschiedener externer Einflussfaktoren

Ziel dieser Studie war es, den Spermienchromatinstatus beim Rüden mittels SCSA® zu untersuchen, mögliche bestehende Zusammenhänge mit den konventionellen Ejakulatparametern zu erarbeiten und die Einflüsse saisonal bedingter Temperaturschwankungen und der geschlechtlichen Aktivität auf die Stabilität des Spermienchromatins zu überprüfen.

Insgesamt wurden Ejakulate von 112 Rüden im Alter von 9 Monaten bis 11 Jahren untersucht. Dabei handelte es sich um 37 Hunde unterschiedlicher Rassen, 12 Foxterrier, zehn Retriever, neun Deutsche Doggen und vier institutseigene Beagle. Als Kontrollgruppe dienten Ejakulate von 40 einjährigen Beagle-Rüden mit Normospermie. Von allen gewonnenen Ejakulaten wurde die Samendichte (10^6 / ml) und die Spermiengesamtzahl (10^6), der Anteil vorwärtsmotiler Spermien (mikroskopische Schätzung und CMA), der Anteil membrangeschädigter und der Anteil morphologisch abweichender Spermien untersucht. Zusätzlich wurde mittels SCSA® der Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) und der α_t Wert bestimmt. Die Untersuchungen beinhalteten die Bestimmung des Spermienchromatinstatus 1.) innerhalb einer gemischten Rüdenpopulation (n= 68, Alter: 9 Monate bis 11Jahre), 2.) bei Rüden mit Normo-, Dys- und Pathospermie und 3.) bei Rüden unterschiedlicher Rassen. Es wurden Korrelationen zwischen dem Chromatinstatus (DFI, α_t) und dem Anteil vorwärtsbeweglicher, membrangeschädigter sowie morphologisch abweichender Spermien bestimmt. Ferner wurde bei vier Beagle-Rüden der Einfluss jahreszeitlicher Temperaturschwankungen (April bis Dezember) und einer hochfrequenten Samenentnahme (einmal pro Tag über 18 Tage) sowie

einer anschließenden 38-tägigen Sexualkarenz auf den Spermienchromatinstatus überprüft.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt

- Innerhalb der gemischten Rüdenpopulation mit unterschiedlichem Fertilitätsstatus (n= 68) betrug der Anteil chromatininstabiler Spermien $5,5 \pm 8,5\%$ (α_t : $204,7 \pm 14,7$).
- Bei Hunden mit Normospermie (n=37) lag der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien bei $2,7 \pm 2,4\%$ (0,5 – 10,4%) (α_t : $202,4 \pm 10,2$, 189,6 – 235,5). Der DFI-Wert der Beagle-Kontrollgruppe (n= 40) betrug $2,7 \pm 1,5\%$ (0,5 – 8,1).
- In Ejakulaten mit Dysspermie (n=19) betrug der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien $6,2 \pm 5,7\%$ (0,9 – 22,9%) (α_t : $204,6 \pm 15,9$, 185,1 – 249,4) und mit Pathospermie (n=12) $12,9 \pm 16,8\%$ (0,6 – 57,5%) (α_t : $212,0 \pm 22,1$, 188,1 – 260,7). Damit war der Anteil chromatininstabiler Spermien bei Pathospermie signifikant höher als bei Normo- und Dysspermie ($p < 0,05$).
- Spermienchromatinstatus und α_t -Wert wiesen keine Abhängigkeit von der Hunderasse auf.
- Der Anteil chromatininstabiler Spermien (DFI %) korrelierte mit dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (mikroskopisch geschätzt: $p < 0,01$, CMA: $p < 0,001$), dem Anteil membrangeschädigter Spermien ($p < 0,001$) und dem Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien (MAS) ($p < 0,0001$).
- Der Spermienchromatinstatus wies signifikante Unterschiede zwischen Ejakulaten mit einer Vorwärtsmotilität (CMA) $\leq 60\%$ und $> 60\%$ ($p < 0,001$), mit $MAS \leq 30\%$ und $MAS > 60\%$ ($p < 0,001$) sowie mit $MAS > 30 - 60\%$ und $MAS > 60\%$ ($p < 0,05$) auf.
- Signifikante Unterschiede bestanden ferner hinsichtlich des Chromatinstatus bei Ejakulaten mit einem Anteil von $\leq 10\%$ und $> 10\%$ an kopfkappenveränderten Spermien ($p < 0,01$) sowie mit einem Anteil von $\leq 10\%$ und $> 10\%$ an Veränderungen des Spermienhalses ($p < 0,05$),
- Der Anteil chromatininstabiler Spermien korrelierte mit dem Gesamtanteil kopfkappenveränderter Spermien ($p < 0,0001$), dem Anteil sekundärer Kopfkappenveränderungen ($p < 0,001$), dem Anteil an Kopfveränderungen

($p < 0,05$), dem Anteil an Spermien mit Veränderungen im Halsbereich ($p < 0,01$) sowie mit dem Anteil an Spermien mit Veränderungen am Haupt- und Endstück ($p < 0,05$).

- Saisonal bedingte Temperaturschwankungen hatten keinen Einfluss auf den Spermienchromatinstatus von vier Beagle-Rüden.
- Während einer 18-tägigen Phase mit einer Samenentnahme pro Tag trat bei vier Beagle-Rüden keine Veränderung des Anteils chromatininstabiler Spermien auf. Ebenso war nach 38 Tagen Sexualkarenz kein Einfluss zu erkennen.

Die Untersuchung des Spermienchromatinstatus beim Rüden zeigte sich als zusätzlicher und eigenständiger Parameter für die Beurteilung der Fertilität. Vor allem bei sub- oder infertilen Rüden, deren herkömmliche spermatologische Parameter keine deutlichen Normabweichungen aufwiesen, ist die Untersuchung des Spermienchromatinstatus ratsam. Zur genaueren Einschätzung des Spermienchromatinstatus im Rahmen von Fertilitätsstörungen beim Rüden sind weiterführende gezielte Untersuchungen von Befruchtungsergebnissen erforderlich.

7. SUMMARY

Marta-Anna Strotmann

Chromatin status of dog spermatozoa under consideration of genital health and semen quality as well as different external factors

The aims of the present study were to investigate the sperm chromatin status in dogs using the SCSA[®] in order to detect correlations with conventional ejaculate parameters and to evaluate the influences of seasonal changes in ambient temperature and of sexual activity on sperm chromatin stability.

Ejaculates of a total of 112 dogs aged 9 months to 11 years were examined, including 37 dogs of different breeds, 12 Foxterriers, 10 Retrievers, 9 Great Danes and 4 Beagles. Ejaculates of 40 one year-old Beagles with normospermia served as controls. Each ejaculate was analysed for sperm concentration ($10^6/\text{ml}$) and total sperm number (10^6), and for the percentages of progressively motile spermatozoa (microscopic estimation and computer assisted/CMA), spermatozoa with damaged plasma membrane, and spermatozoa with abnormal morphology. Furthermore the percentage of chromatin instable spermatozoa (DFI %) and the α_t value were determined by SCSA[®]. The investigations included the characterisation of the sperm chromatin status 1) in a mixed dog population (n=68, age 9 months to 11 years), 2) in dogs with normo-, dys- and pathospermia, and 3) in dogs of different breeds. Correlations were calculated between sperm chromatin status (DFI, α_t) and the percentages of progressively motile, membrane damaged and morphologically abnormal spermatozoa. The influences of seasonal variations in ambient temperature from April to December and of frequent semen collections (one per day for 18 days) and a subsequent 38-day period of sexual rest on the sperm chromatin status were additionally tested in 4 Beagles.

The following results were obtained:

- Within a mixed dog population with varying fertility status (n=68) the percentage of chromatininstable spermatozoa was $5.5 \pm 8.5\%$ (α_t : 204.7 ± 14.7).
- In dogs with normospermia (n=37) the mean percentage of chromatininstable spermatozoa was $2.7 \pm 2.4\%$ (0.5 – 10.4%) (α_t : 202.7 ± 10.2 , 189.6 – 235.5). The DFI-value of the Beagle control group (n=40) was $2.7 \pm 1.5\%$ (0.5 – 8.1%).
- In ejaculates showing dysspermia (n=19) or pathospermia (n=12) the mean percentage of chromatininstable spermatozoa was $6.2 \pm 5.7\%$ (0.9 – 22.9%) (α_t : 204.6 ± 15.9 , 185.1 – 249.4) and $12.9 \pm 16.8\%$ (0.6 – 57.5%) (α_t : 212.0 ± 22.1 , 188.1 – 260.7), respectively. By this the percentage of chromatininstable spermatozoa in pathospermia was significantly higher than in normo- and dysspermia ($p < 0.05$).
- The sperm chromatin status and α_t -value were not influenced by the dog breed.
- The percentage of chromatininstable spermatozoa (DFI %) was correlated with the percentage of progressively motile spermatozoa (microscopic estimation: $p < 0.01$, CMA: < 0.001), the proportion of spermatozoa with damaged plasma membrane ($p < 0.001$), and the total percentage of morphologically abnormal spermatozoa (MAS) ($p < 0.0001$).
- The sperm chromatin status was significantly different between ejaculates with a forward motility (CMA) $\leq 60\%$ and $> 60\%$ ($p < 0.001$), with MAS $\leq 30\%$ and $> 60\%$ ($p < 0.001$), and with MAS $> 30\% - 60\%$ and $> 60\%$ ($p < 0.05$).
- Significant differences were also found regarding the chromatin status in ejaculates with $\leq 10\%$ and $> 10\%$ acrosome alterations ($p < 0.01$) and in ejaculates with $\leq 10\%$ and $> 10\%$ sperm neck alterations ($p < 0.05$).
- The percentage of chromatininstable spermatozoa was correlated with the total percentages of spermatozoa with acrosome alterations ($p < 0.0001$), secondary acrosome alterations ($p < 0.01$), head alterations ($p < 0.05$), neck alterations ($p < 0.01$), and main- and endpiece alterations ($p < 0.05$).
- Seasonal temperature variations did not influence the sperm chromatin status of 4 Beagle dogs.

- During an 18-day period of daily semen collections and after a subsequent 38-day period of sexual rest no changes in the percentage of chromatin unstable spermatozoa could be observed in 4 Beagle dogs.

The results of the present study indicate the suitability of the sperm chromatin status as additional and independent parameter for fertility assessment in dogs. Especially in sub- or infertile dogs in which the conventional semen characteristics do not show clear deficiencies the sperm chromatin status should be evaluated. Future studies are necessary for more detailed assessment of the significance of the sperm chromatin status in infertility in male dogs.

8. Literaturverzeichnis

ACEVEDO, N. (2001):

Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine.

Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Blacksburg, Virginia, USA

AHMADI, A., S.C. NG (1999):

Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa.

J.Exp.Zool. 284, 696-704

AITKEN, R.J., D.W. BUCKINGHAM, J. BRINDLE, E. GOMEZ, H.W.G. BAKER u. D.S. IRVINE (1995):

Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leucocytes in washed sperm preparations and seminal plasma.

Human Reprod. 10, 2061-2071

AITKEN, R.J., D.W. BUCKINGHAM, K. WEST, F.C. WU, K. ZIKOPOULOS u. D.W. RICHARDSON (1992):

Contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors.

J.Reprod.Fertil. 94, 451-462

ALVAREZ, J.G., R.K. SHARMA, M. OLERO, R.A. SALEH, M.C. LOPEZ, A.J. THOMAS, D.P. EVENSON u. A. AGARWAL (2002):

Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay.

Fertil.Steril. 78, 319-329

AMMER, H. u. A. HENSCHEN (1987):

The major protamine from stallion sperm. Isolation and amino-acid sequence.

Biol. Chem. Hoppe Seyler 368, 1619-1626

AMMER, H. u. A. HENSCHEN (1988):

Rat sperm protamine. Isolation and sequence analysis.

Biol. Chem. Hoppe Seyler 369, 1301-1306

ANGELOPOULOS, T., Y.A. MOSHEL, L. LU, E. MACANAS, J.A. GRIFO u. L.C. KREY (1998):

Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures:effect on the clinical outcome after in vitro fertilization.

Fertil.Steril. 69, 740-747

- ARDON MARTINEZ, F. (2005):
Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- BALHORN, R. (1982):
A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.
J.Cell.Biol. 93, 298-305
- BALHORN, R., L. BREWER u. M. CORZETT (2000):
DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of torroidal stability using single DNA molecules.
Mol. Reprod. Develop. 56, 230-234
- BALHORN, R., M. CORZETT, J. MARZRIMAS u. B. WATKINS (1991):
Identification of bull protamine disulfides.
Biochemistry 30, 175-181
- BALHORN, R., B.L. GLEDHILL u. A.J. WYBOREK (1977):
Mouse sperm chromatin proteins: Quantitative isolation and partial characterization.
Biochemistry 16, 4047-4080
- BALHORN, R., S. SEED u. N. TANPHAICHITR (1988):
Aberrant protamine 1 / protamine 2 ratios in sperm of infertile human males.
Experientia 44, 52-55
- BALHORN, R., S. WESTON, C. THOMAS u. A. WYROBEK (1984):
DNA packaging in mouse spermatids; synthesis of protamine variants and four transition proteins.
Exp.Cell.Res. 150, 298-308
- BALLACHEY, B.E., D.P. EVENSON u. R.G. SAACKE (1988):
The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.
J.Androl. 9, 109-115
- BALLACHEY, B.E., H.L. MILLER, L.K. JOST u. D.P. EVENSON (1986b):
Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol.
J.Anim.Sci. 63, 995-1004
- BARRAT, C.L.R. (1995):
Spermatogenesis.
In: GRUDZINSKAS, J.G. u. J.L. YOVICH (Hrsg.). Gametes: The spermatozoon, Cambridge University Press, Cambridge, 250-261

- BAUMBER, J., B.A. BALL, J.J. LINFOR u. S.A. MEYERS (2003):
Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa.
J.Androl. 24, 621-628
- BECKMAN, K.B., u. B.N. AMES (1997):
Oxidative decay of DNA.
J.Biol.Chem. 272, 19633-19636
- BELAICHE, D., M. LOIR, W. KRUGGLE u. P. SAUTIERE (1987):
Isolation and characterization of two protamines St1 and St2 from stallion spermatozoa, and amino-acid sequence of the major protamine St1.
Biochim. Biophys. Acta 913, 145-149
- BELEKOPYTOVA, I.A., E.I. KOSTYLEVA, A.N. TOMILIN u. V.I. VOROB'EV (1993):
Human male infertility may be due to a decrease of the protamine p2 content of sperm chromatin.
Mol.Reprod.Dev. 34, 53-57
- BELLVE, A.R., D.J. MC KAY, B.S. RENAUX u. G.H. DIXON (1988):
Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2.
Biochemistry 27, 2890-2897
- BIANCHI (1999):
Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.
Rev.Reprod. 4, 31-37
- BIEGE, J.J. (2004):
Etablierung eines fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assays im Rahmen der spermatologischen Diagnostik beim Hund.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- BOCHENEK, M., SMORAG, Z. u. J. PILCH (2001):
Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination.
THERIOGENOLOGY, 56, 557-567
- BOE-HANSEN, G.B., P. CHRISTENSEN, D. VIBJERG, NIELSEN, M:B:F: u. A.M. HEDEBOE (2008).
Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility.
Theriogenology 69, 728-736
- BOSTEDT, H. (2001)
Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Kopulation.
Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 246

- BREWER, L., M. CORZETT, R. BALHORN (2002):
Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins.
J. Biol. Chem. 41, 38895-38900
- BREWER, L., M. CORZETT, E.Y. LAU, R. BALHORN (2003):
Dynamics of protamine I binding to single DNA molecules.
J. Biol. Chem. 278, 42403-42408
- BUNGUM, M., P. HUMAIDAN, M. SPANO, K. JEPSON, L. BURGUM u. A. GIWERCMAN (2004):
The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI.
Hum. Reprod. 19, 1401-1408
- CALVIN, H.L. (1976):
Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa.
Biochim. Biophys. Acta. 434, 377-389
- CALVIN, H.I., u. J.M. BEDFORD (1971):
Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis.
J.Reprod.Fert., Suppl. 13, 65-75
- CHO, C., W.D. WILLIS, E.H. GOULDING, H. JUNG-HA, Y.C. CHOI, N.B. HECHT u. E.M. EDDY (2001):
Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice.
Nat. Gen. 28, 82-86
- CHVAPIL, M. (1973):
New aspects in the biological role of zinc: A stabilizer of macromolecules and biological membranes.
Life Sci. 13, 1041-1049
- CLAASSENS, O.E., R. MENKVELD, D.R. FRANKEN, E. PRETORIUS, Y. SWART, C.J. LOMBARD u. T.F. KRUGER (1992):
The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro.
Human Reprod. 7, 242-247
- CORZETT, M., C. KRAMER, R. BLACHER, J. MARZIMAS u. R. BALHORN (1999):
Analysis of Hamster Protamines: Primary Sequence and Species Distribution.
Mol.Repr.Dev. 54, 273-282
- CORZETT, M., J. MARZIMAS u. R. BALHORN (2002):
Protamine 1: Protamine2 Stoichiometry in the Sperm of Eutherian Mammals.
Mol.Repr.Dev. 61, 519-527

- DADOUNE, J.P. (2003):
Expression of Mammalian Spermatozoal Nucleoproteins.
Microsc.Res.Tech. 61, 56-75
- DADOUNE, J.P., M.J. MAYAUX u. M.L. GUIHARD-MOSCATO (1988):
Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics.
Andrologia 20, 211-217
- DE JONGE, C. (1999):
Attributes of fertile spermatozoa: An update.
J.Androl. 20, 463-473
- DE YEBRA, L., J.L. BALLESCA, J.A.VANRELL, L. BASSAS u. R. OLIVA (1993):
Complete selective absence of protamine P2 in humans.
J. Biol. Chem. 268, 10553-10557
- DE YEBRA, L., J.L. BALLESCA, J.A.VANRELL, M. CORZETT, R. BALHORN u. R. OLIVA (1998):
Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2 levels.
Fertil. Steril. 69, 755-759
- DIGRASSI, W.A.(2000):
Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric assays.
Vet. Med. Diss., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- DARZYNKIEWICZ, Z. u. J. KAPUSCINSKI (1990):
Acridine orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents.
In: M.R. MELAMED , T. LINDMO u. M.L. MENDELSON (Eds): Flow Cytometry and Sorting.
2nd ed. New York, NY: Wiley-Liss, pp. 291-314
- DARZYNKIEWICZ, Z., G. JUAN, X. LI, W. GORCZYCA, T. MURAKAMI u. F. TRAGANOS (1997):
Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).
Cytometry 27, 1-20
- DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS u. M.R. MELAMED (1975):
Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry.
Exp.Cell.Res. 90, 411-428

ENGH, E., O.P.F. CLAUSEN, A. SCHOLBERG, A. TOLLEFSRUD u. K. PURVIS (1992):
Relationship between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence using flow cytometry.
Int.J.Androl. 15, 407-415

EVENSON, D.P., R.K. BAER, L.K. JOST u. R.W. GESCH (1986):
Toxicity of thiotepa on mouse spermatogenesis as determined by dual parameter flow cytometry.
Toxicol.Appl.Pharmacol. 82, 151-16

EVENSON, D.P., Z DARZYNKIEWICZ u. M.R. MELAMED (1980a):
Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.
Science 210, 1131-1133

EVENSON, D.P., DARYNKIEWIECZ, Z. u. MELAMED, M.R. (1980b):
Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry.
Chomosome 78, 225-238

EVENSON, D.P., P.H. HIGGINS, D. GRUENEBERG u. B.E. BALLACHEY (1985):
Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea.
Cytometry 6, 238-253

EVENSON, D., u. L. JOST (2000):
Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.
Meth.Cell.Sci. 22, 169-189

EVENSON, D.P., L.K. JOST u. R.K. BAER (1993):
Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics.
Environ.Mol.Mutagen. 21, 144-153

EVENSON, D.P., L.K. JOST, R.K. BAER, T.W. TURNER u. S.M. SCHRADER (1991):
Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay.
Reprod.Toxicol. 5, 115-125

EVENSON, D.P., L.K. JOST, M. CORZETT u. R. BALHORN (2000):
Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study.
J.Androl. 21, 739-746

EVENSON, D.P., L.K. JOST, D. MARSHALL, M.J. ZINAMAN, E.CLEGG, K. PURVIS, P. DE ANGELIS u. O.P. CLAUSSEN (1999):

Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.

Human Reprod. 14, 1039-1049

EVENSON, D.P. u. KARABINUS, D.S. (1991):

Early detection by flow cytometry of reduced semen quality resulting from environmental heat stress.

A Reasearch Report submitted to Select Sires, Inc. Plain City, OH

EVENSON, D.P., F.A. KLEIN, W.F. WHITMORE u. M.R. MELAMED (1984):

Flow cytometric evaluation of sperm from patients with testicular carcinoma.

J.Urol. 132, 1220-1225

EVENSON, D., K.L. LARSON u. L.K. JOST (2002):

Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.

J.Androl. 23, 25-43

EVENSON, D.P., u. M.R. MELAMED (1983):

Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry.

J.Histochem.Cytochem. 31, 248-253

EVENSON, D.P., B.L. SAILOR u. L.K. JOST (1995):

Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: Implications for fertility and embryo viability.

Biol.Reprod.Mono. 1, 655-659

FATEHI, A.N., BEVERS, M.M., SCHOEVERS, E., ROELEN, B.A., COLENBRANDER, B., u. B.M. GADELLA (2006):

DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages.

J.Androl 2006, 27, 176-88

FOOTE, R.H., E.E. SWIERSTRA u. W.L. HUNT (1972):

Spermatogenesis in the dog.

Anat.Rec. 173, 341-352

FOSSA, S.D., P. DE ANGELIS, S. M. KRAGGERUD, D. EVENSON, L.

THEODORSEN u. O.P.F. CLAUSEN (1997):

Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay.

Cytometry 30, 192-196

GARCIA-MACIAS, V., F. MARTINEZ-PASTOR, M. ALVAREZ, J.J. GARDE, E. ANEL, L. ANELI u. P. DE PAZ (2006):

Assesment of chromatin status (SCSA[®]) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer and domestic dog.

Theriogenology 66, 1921-1930

GATEWOOD, J.M., G.R. COOK, R. BALHORN, E.M. BRADBURY u. C.W. SCHMID (1987):

Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin.

Science 236, 962-964

GIWERCMAN, A., RICHTHOFF, J., HJØLLUND, H., BONDE, J.P., JEPSON, K., FROHM, B. u. M. SPANO (2003):

Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters.

Fertl. Steril. 80, 1404-1412

GOLDBERG, R.B., R. GEREMIA u. W.R. BRUCE (1977):

Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse.

Differentiation 7, 167-180

GOMEZ, E., D.W. BUCKINGHAM, J. BRINDLE, F. LANZAFAME, D.S. IRVINE u. R.J. AITKEN (1996):

Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function.

J. Androl. 17, 276-287

GORCZYCA, W., F. TRAGANOS, H. JESIONOWSKA u. Z. DARZYNKIEWICZ (1993):

Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells. Analogy to apoptosis of somatic cells.

Exp.Cell.Res. 207, 202-205

GUENIAT VON COURROUX, N. (1988):

Relations between the sperm chromatin structure assay and conventional semen quality and fertility parameters of swiss bulls used for artificial insemination.

Bern, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Bern, Schweiz, Diss.

GÜNZEL-APEL, A.-R. (1994):

Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. Der Zuchtrüde.

Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 11-47

HAMMADEH, M.E., D. AL-HASANI, M. STIEBER, P. ROSENBAUM, D. KUPKER, K. DIEDRICH u. W. SCHMIDT (1996):

The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme.

Human Reprod. 11, 2468-2471

HARRISON, R.A.P., u. S.E. VICKERS (1990):

Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J.Reprod.Fertil. 88, 343-352

HECHT, N.B. (1989):

The molecular biology of spermatogenesis: Regulation of mammalian protamines from gene to proteins.

Serio, M. (Ed.). Perspectives in Andrology Serono Symposium. Raven Press, New York, 265-283

IBACH, B., L. WEISSBACH u. B. HILSCHER (1975):

Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the dog.
Andrologia 8, 297-307

IBRAHIM, M.E., u. H. PEDERSEN (1988):

Acridine orange fluorescence as male fertility test.
Arch.Androl. 20, 125-129

JAGER, S. (1990):

Sperm nuclear stability and male infertility.
Arch.Androl. 25, 253-259

KARABINUS, D.S., D.P. EVENSON, L.K. JOST, R.K. BAER u. M.T. KAPROTH (1990):

Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry.
J.Dairy.Sci. 73, 2364-2371

KARABINUS, D.S., C.J. VOGLER, R.G. SAACKE u. D.P. EVENSON (1997):

Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls.
J.Androl. 18, 549-555

KENNEY, R.M., D.P. EVENSON, M.C. GARCIA u. C.C. LOVE (1995):

Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate.
Biol.Reprod.Mono. 1, 647-653

KIERSZENBAUM, A.L. (2001):

Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed.

Mol.Reprod.Develop. 58, 357-358

KIERSZENBAUM, A.L., u. L.L. TRES (1975):

Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.
J.Cell.Biol. 65, 258-270

KISTLER, W.S., HENRIKSEN, K., MALI, P. u. M. PARVINEN (1996):
Sequential expression of nucleoproteins during rat spermiogenesis.
Exp.Cell.Res. 225, 374-381

KISTLER, W.S., P.S. KEIM u. R.L. HEINRIKSON (1976):
Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa.
Biochim. Biophys. Acta. 427, 752-757

KRAWETZ, S.A., W. CONNOR u. G.H. DIXON (1987):
Cloning of bovine P1 protamine CDNA and the evolution of vertebrate P1
protamines.
DNA 6, 47-57

KRIENKE, M. (2003):
Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von
kryokonserviertem Hengstesperma
München, Ludwig-Maximilian-Universität, Diss.

KOBAYASHI, H., LARSON, K., SHARMA, R.K., NELSON, D.R., EVENSON, D.P.,
TOMA, H., THOMAS, A.J. u. A. AGARWAL (2001):
DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin
structure assay.
Fert.Steril. 75

KOSOWER, N.S., H. KATAYOSE u. R. YANAGIMACHI (1992):
Thiol-disulfide status and acridin orange fluorescence of mammalian sperm nuclei.
J.Androl. 13, 342-348

KUMAROO, K.K., G. JAHNKE u. J.L. IRVIN (1975):
Changes in basic chromosomal proteins during spermatogenesis in the mature rat.
Arch.Biochem.Biophys. 168, 413-424

LARSON, K.L., C.J. DE JONGE, A.M. BARNES, L.K. JOST u. D.P. EVENSON
(2000):
Relationship of assisted reproductive technique (ART) outcomes with sperm
chromatin integrity and maturity as measured by the sperm chromatin structure
assay (SCSA).
Human Reprod. 15, 1717-1722

LEE, C.H. u. Y.H. CHO (1999):
Aspects of mammalian spermatogenesis: Electrophoretical analysis of protamines in
mammalian species.
Mol. Cells 9, 556-559

LEE, J., J.H. RICHBURG, S.C. YOUNKIN u. K. BOEKELHEIDE (1997):
The Fas System is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis.
Endocrinology 138, 2081-2088

- LEWIS, J.D., Y. SONG, M.E. DE JONG, S.M. BAGHA u. J. AUSIO (2003):
A walk through vertebrate and intervertebrate protamines.
Chromosoma 111, 473-482
- LIEBICH, H.-G. (1993):
Funktionelle Histologie. Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussägetiere. 2. Aufl.
Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, S.233-254
- LIU, D.Y., u. H.W.G. BAKER (1992):
Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro.
Fertil.Steril. 58, 1178-1184
- LÖHMER, I. (2003):
Stabilität der Chromatinstruktur von Bullenspermien in Beziehung zu der konventionellen Spermatologie, der Bindungsfähigkeit im Ovidukt-Explant-Assay und der Fruchtbarkeit.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- LOVE, C.C. (2005):
The sperm chromatin structure assays a review of clinical applications.
Anim.Reprod.Sci. 89, 39-45
- LOVE, C.C., KENNEY, R.M. (1998):
The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion.
Theriogenology 57 , 955-972
- LOVE, C.C., J.A. THOMPSON, G. LOWRY u. D.D. VARNER (2002):
Effect of time of exposure to different temperatures on stallion sperm DNA and fertility.
Theriogenology 57, 1135-1142
- MAIER, W.M., G. NUSSBAUM, L. DOMENJOUR, U. KLEMM u. W. ENGE (1990):
The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene.
Nucleic Acids Res. 18, 1249-1254
- MANICARDI, G.C., P.G. BIANCHI, S. PANTANO, P. AZZONI, D. BIZZARO, U. BIANCHI u. D. SAKKAS (1995):
Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A₃ accessibility.
Biol.Reprod., 52, 864-867

MARTIN, R.H., u. A. RADEMAKER (1988):

The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans.

Mutat.Res. 207, 159-164

MARUSHIGE, Y. u. K. MARUSHIGE (1978):

Phosphorylation of sperm histones during spermiogenesis in mammals.

Biochim. Biophys. Acta 518, 440-449

MAZRIMAS, J.A., M. CORZETT, C. CAMPOS u. R. BALHORN (1986):

A corrected primary sequence for bull protamine.

Biochim. Biophys. Acta 872, 11-15

MC PHERSON, S.M.G., u. F.J. LONGO (1993):

Chromatin structure function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids.

Eur.J.Histochem. 37, 109-128

MEISTRICH, M.L. (1989):

Histones and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis.

In: HNILICA, L.S., STEIN, G.S., u. J.L. STEIN (Hrsg.) Histones and other basic nuclear proteins. CRC Press. Boca Raton. Florida, 165-182

MILLER, O.C., u. A.H. BLACKSHAW (1968):

The DNA of rabbit spermatozoa aged in vitro and its relation to fertilization and embryo survival.

In: Proceedings of the Vth International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Paris, Vol II, p. 1275

MONESI, V. (1962):

Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine.

J.Cell.Biol. 14, 1

MOUSTAFA, M.H., R.K. SHARMA, J. THORNTEN, E. MASCHA, M.A. ABDELHAFEZ, A.J. THOMAS u. A. AGARWAL (2004):

Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility.

Human Reprod. 19, S. 129-138

NIESCHLAG, E. (2000):

Scopes and goals of andrology.

In: NIESCHLAG, E. u. H.M. BEHRE (Hrsg.): Andrology: Male reproductive health and dysfunction.

Springer Verlag, Heidelberg, Germany, S. 1-8

- OLIVA, R. u. DIXON, G.H. (1991):
Vertebrate Protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 40, 25-94
- OOSTERHUIS, G.J., A.B. MULDER, E. KALSBECK-BATENBURG, C.B. LAMBALK,
J. SCHOEMAKER u. I. VERMES (2000):
Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?
Fertil.Steril. 74, 245-250
- PENFOLD, L.M., L. JOST, D.P. EVENSON u. D.E. WILDT (2003):
Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity
evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection.
Biol.Reprod. 69, 1730-1735
- PERREAULT, S.D., R.R. BARBEE, K.H. ELSTEIN, R.M. ZUCKER u. C.L. KEEFER
(1988):
Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo
by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry.
Biol.Reprod. 39, 157-167
- PERRCAULT, S.D., S.J. NAISH u. B.R. ZIRKIN (1987):
The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation
is related to sperm nuclear disulfide bond content.
Biol. Reprod. 36, 239-244
- PICKETT, B.W., L.C. FAULKNER und J.J. VOSS (1975):
Effect of season on some characteristics of stallion semen.
J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 25-28
- PIRHONEN, A., A. LINNALA-KANKKUNEN u. P.H. MAENPAA (1989):
Comparison of partial amino acid sequences of two protamine 2 variants from stallion
sperm. Structural evidence that the variants are products of different genes.
FEBS Lett. 244, 199-202
- POCCIA, D. (1986):
Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early
development.
Int.Rev.Cytol. 105, 1-65
- POTTS, R.J., L.J. NOTARIANNI u. T.M. JEFFERIES (2000):
Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined
by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation.
Mutat.Res. 447, 249-256
- PRIGENT, Y., MÜLLER, S. u. J.P. DADOUNE (1996):
Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines
during human spermiogenesis.
Mol.Hum.Reprod. 2, 929-935

- QUI, J., B.F. HALES u. B. ROBAIRE (1995):
Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of ratspermatozoa.
Biol. of Reprod., 52, 33-40
- ROCA, J., MEZQUITA, C. (1989):
DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids.
Embo J., 8, 1855-1860
- RODRIGUEZ, I., C. ODY, K. ARAKI, I. GARCIA u. P. VASSALLI (1997):
An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis.
EMBO.J. 16, 2262-2270
- RODRIGUEZ, H., C. OHANIAN u. E. BUSTOS-OBREGON (1985):
Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: A method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen.
Int.J.Androl. 8, 147-158
- ROUX, C. u. DADOUNE, J.P. (1989):
Use of acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heattreatment; evaluation of the chromatin condensation.
Andrologia 21, 275-281
- ROYERE, D., S.HAMAMAH, J.C. NICOLLE, C. BARTHELEMY u. J. LANSAC (1988):
Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies.
Gam.Res. 21, 51-57
- SAACKE, R.G., S. NADIR, J. DALTON, J. BAME, J.M. DE JARNETTE, S. DEGELOS u. R.L. NEBEL (1994):
Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update.
In: Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Columbia, MO, S. 57-67
- SAILER, B.L., L.K. JOST, K.R. ERICKSON, M.A. TAJIRAN u. D.P. EVENSON (1995):
Effects of X-Irradiation on Mouse testicular cells and sperm chromatin structure.
Env. Mol. Mutag., 25, 23-30
- SAKKAS, D., G. MANICARDI, P.G. BIANCHI, D. BIZZARO u. U. BIANCHI (1995):
Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa.
Biol.Reprod. 52, 1149-1155

SAKKAS, D., E. MARIETHOZ, G. MANICARDI, D. BIZZARO, P.G. BIANCHI u. U. BIANCHI (1999):

Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.

Rev.Reprod. 4, 31-37

SAKKAS, D. u. M. TOMLINSON (2000):

Assessment of sperm competence.

Semin. Reprod. Med. 18, 133-139

SAKKAS, D., F. URNER, P.G. BIANCHI, D. BIZZARO, I. WAGNER, N.

JAQUENOUD, G. MANICARDI u. A. CAMPANA (1996):

Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection.

Human Reprod. 11, 837-843

SALEH, R.A., A. AGARWAL, D.R. NELSON, E.A. NADA, M.H. EL-TONSY, J.G.

ALVAREZ, A.J. THOMAS u. R.K. SHARMA (2002):

Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study.

Fertil.Steril. 78, 313-318

SALISBURY, G.W., u. R.G. HART (1970):

Gamete aging and its consequences.

Biol.Reprod.Suppl. 2, 1-13

SÁNCHEZ-PEÑA, L.C., REYES, B.E., LÓPEZ-CARRILLO, RECIO, R., MÓRAN-MARTÍNEZ, J., CEBRIÁN, M.E. u. B. QUINTANILLA-VEGA (2004):

Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 196, 108-113

SAUTIERE, P., D. BELAICHE, A. MARTINAGE u. M. LOIR (1984):

Primary structure of the ram (*Ovis aries*) protamine.

Eur. J. Biochem. 144, 121-125

SCHLICKER, M., SCHNÜLLE, V., SCHNEPPEL, L., VOROB'EV, V.I. u. W. ENGEL (1994):

Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: Search for mutations in the genes for protamine 1, protamine 2 and transition protein 1.

Hum.Reprod. 9, 2313-2317

SCHRADER, S.M., TURNER, T.W., BREITENSTEIN, M.J. u. S.D. SIMON (1988):

Longitudinal study of sperm quality of unexposed workers. I. Study overview.

Reprod.Toxicol. 2, 183-190

- SELEVAN, S.G., L. BORKOVEC, V.L. SLOTT, Z. ZUDOVA, J. RUBES, D.P. EVENSON U. S.D. PERREAULT (2000):
Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution.
Environ Health Perspect 108,887–894.
- SELIGMAN, J., u. R. SHALGI (1991):
Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats.
J.Reprod.Fert. 93, 399-408
- SIEME, H. (2004)
Spermaqualitäts- und fertilitätsbeeinflussende Faktoren in der equinen Samenübertragung
Hannover Tierärztliche Hochschule, Habil.
- SPANÒ, M., J.P. BONDE, H.I. HJØLLUND, H.A. KOLSTAD, E. CORDELLI, G. LETER u. The Danish First Pregnancy Planner Study Team (2000):
Sperm chromatin damage impairs human fertility.
Fertil.Steril. 73, 43-50
- SPANÒ, M., A.H. KOLSTAD, S.B. LARSEN, E. CORDELLI, G. LETER, A. GIWERCMAN u. J.P. BONDE (1998):
The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. Asclepios.
Human Reprod. 13, 2495-2505
- STEGER, K. (1999):
Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids.
Anat.Embryol. 199, 471-487
- STEGER, K., T. DIEMER, E.W. HAUCK, W. WEIDNER (2005):
Protamin als Prognosefaktor für den Erfolg einer testikulären Spermienextraktion (TESE).
J. Reproduktionsmed. Endokrinol. 2, 13-17
- SUN, J.G., A. JURISICOVA u. R.F. CASPER (1997):
Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro.
Biol.Reprod. 56, 602-607
- TEJADA, R.I., J.C. MITCHEL, A. NORMAN, J.J. MARIK u. S. FRIEDMANN (1984):
A test for the practical evaluation of male fertility by acridin orange (AO) fluorescence.
Fertil.Steril. 42, 87-81
- THIEßEN, H. (2006):
Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Spermienchromatinstruktur beim Hengst.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss

TOBITA, T., H. TSUTSUMMI, A. KATO, H. SUSUKE, M. NOMOTO, M. NAKANO u. T. ANDO (1983):

Complete amino acid sequence of boar protamine.

Biochim Biophys. Acta 744, 141-146

WARD, W.S., u. D.S. COFFEY (1991):

DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells.

Biol.Reprod. 44, 569-574

WIGER, R., J.K. HONGSLO, D.P. EVENSON, P. DE ANGELIS, P.E. SCHWARZE u. J.A. HOLME (1995):

Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in laboratory mice.

Reprod.Toxicol. 9, 21-33

WU, C. (2005):

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

Hannover, Tierärztl. Hochsch. Diss.

ZHAO, M., SHIRLEY, C.R., YU, Y.E., MOHAPATRA, B., ZHANG, Y., UNNI, E., DENG, J.M., ARANGO, N.A., TERRY, N.H.A., WEIL, M.M., RUSSEL, L.D., BEHRINGER, R.R. u. M.L. MEISTRICH (2001):

Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice.

Mol.Cell.Biol. 21, 7243-7255

9 ANHANG

9.1 Laborbedarf

Laborbedarf für die Spermatologie:

Deckgläser (18x18mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co. KG
Eppendorf- Reaktionsgefäße 1,5 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
Mikroröhre 1,5 ml mit Verschuß	Fa. Sarstedt (72.692), Nürnbergrecht
Objektträger (76 x 26 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co. KG (IDL), Nidderau
Phasenkontrastmikroskop mit und ohne Heiztisch	Fa. Zeiss, Jena
Pipette, einstellbar (2-20 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Wasserbad mit Temperaturregelung	Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zählkammer nach Thoma	Fa. Landgraf Laborsysteme, Langenhagen

Anlage für computergestützte Motilitätsmessung:

Strömberg-Mika Cell Motion Analyser:	Strömberg-Mika, Bad Feilnbach
Phasenkontrastmikroskop Olympus BH2	Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan
Heiztisch HT 100	Fa. Minitüb, Tiefenbach
MTM Mika chamber	Fa. Minitüb, Tiefenbach
Kamera	Strömberg-Mika, Bad Feilnbach
Software für Bildauswertung:	
Cell Motion Analyzer® 2.0; © 1993	Medical Technologies Montreaux, Schweiz

Laborbedarf für den SCSA:

Eppendorff-Gefäße 1,5 ml	Fa. Sarstedt, Nürnbergrecht, Deutschland
Stoppuhr	

Heizblock	Fa. Kleinfeld, Gehrden, Deutschland
Eppendorff-Pipetten (1000 µl, 100 µl, 10 µl, 5 µl)	
Pipettenspitzen gelb (100 µl) und blau (1000 µl)	Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Flow-Röhrchen	Fa. Beckman Coulter, Fullerton, Californien, USA
Styroporgefäß	
Vortexer (Typ Lab Dancer Orbital Shaker))	Fa. IKA®, Staufen, Deutschland
Anlage für den SCSA®: COULTER® EPICS® XL- MCL	Fa. Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Software für die Bildauswertung: SOFTWARE SYSTEM II Version 3.0 HDAS 11	

9.2 Chemikalien

Chemikalien für die Spermatologie:	
Citronensäure Monohydrat DAB (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	Fa. Roth (5110.1), Karlsruhe
Formaldehyd ≥ 35% DAB, f.d.	
Histologie	Fa. Roth (4980.2), Karlsruhe
D(-)- Fruktose 99%	Fa. Roth (4981.2), Karlsruhe
Glycerin ≥ 86%, Ph. Eur., reinst	Fa. Roth (7533.1), Karlsruhe
Propidium Iodide, Minimum 95% (HPLC)	Fa. Sigma (P-4170), Steinheim
Tris-(hydroxymethyl) aminomethan	
Pufferan® ≥ 99,7%, p.a.	Fa. Roth (4855.2), Karlsruhe

Chemikalien für den SCSA:

Akridin Orange	Fa. Polysciences (04539) Eppelheim,
Citric acid monohydrate	Fa.Sigma-Aldrich (C-1909), München
1 mM EDTA	Fa.Sigma-Aldrich, München, EDS 100g
0,15 M NaCl	Fa.Sigma-Aldrich (S-7653), München
Sodium phosphate dibasic	Fa. Sigma-Aldrich (S-7907), München
0,01 M Tris-HCl (Trizma Base)	Fa. Sigma-Aldrich(T-1503), München
0,1% Triton-X	Fa.Sigma-Aldrich (X-100), München

9.3 Lösungen, Puffer**9.3.1 Rezepte für die Spermatologie****Formolcitrat**

(Lösung zur Flüssigfixation von Spermien)

- 2,9 g tri-Natriumcitrat x 2H₂O
- 100 ml Aqua bidest.
- 4 ml davon verwerfen und durch 4 ml 37 %ige Formalinlösung ersetzen

9.3.2 Medien für den SCSA:**Acridine Orange (AO)- Stammlösung)**

- 10 mg AO
- 10 ml Aqua bidest.
- Lagerung bei 4°C

Acridin Orange – Gebrauchslösung

- 100 ml Färbepuffer pH 6
- 600 µl AO-Stammlösung

- Lagerung bei 4° C, während der Färbung auf Eis

Säuredetergenz- Lösung pH 1,2

(0,008 N HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton-X 100)

- 300 ml Aqua bidest
- 4,39 g 0,15 M NaCl
- 0,5 ml 0,1% Triton-X
- 20 ml 2,0 N HCl
- Aqua bidest. ad 500 ml
- mit 5N HCl auf pH 1,2 einstellen
- Lagerung bei 4°C

0,1 M Citric acid

- 21,01 g Citric acid monohydrate
- Aqua bidest. ad 1000 ml
- Lagerung bei 4°C

0,2 M Na_2HPO_4 - Puffer

- 28,4 g Sodium phosphate dibasic
- Aqua bidest. ad 1000 ml
- Lagerung bei 4°

Färbepuffer pH 6,0

(0,1 M Citric acid, 0,2 M Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl)

- 370 ml 0,1 M Citric acid-Puffer
- 630 ml 0,2 M Na_2HPO_4 -Puffer
- 372 mg 1 mM EDTA

- 8,77 g 0,15 M NaCl
- mit konzentrierter NaOH auf pH 6,0 eingestellt
- Lagerung bei 4°C

TNE- Puffer 10 x 7,4

- 9,48 g 0,01 M Tris (Trizma Base)
- 52,6 g 0,15 M NaCl
- 2,23 g 1 mM EDTA
- 600 ml Aqua bidest
- mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

TNE-Puffer 1x, pH 7,4

- 90 ml Aqua bidest
- 10 ml TNE-Puffer 10x

9.4 Befunde der spermnologischen Untersuchungen und des SCSA® - Tests

Tier	Ras	Alter	Gewgr	DFI	α_t	SGZ	Vmot	CMA	MgS	MAS	KK	KKs	Kopf	Hals	pPL	dPI	frPI	HaEnd	Norsp
1	1	6,5	3	12,9	211,6	212,5	85,0	79,2	19,0	36,0	12,0	12,0	3,5	12,5	3,0	1,0	1,0	6,5	2,0
2	3	4	3	6,2	198,4	224,0	70,0	71,9	16,0	65,0	40,5	40,5	0,0	17,0	14,5	1,0	1,0	6,0	3,0
3	1	5,5	4	7,4	205,9	656,0	85,0		20,0	23,5	3,5	3,0	6,0	11,0	11,0	1,0	1,0	2,0	1,0
4	1	6	2	10,4	235,5	334,8	85,0	94,1	9,0	19,0	7,5	7,0	1,0	3,0	2,0	0,5	0,5	7,0	1,0
5	1	3	4	6,4	215,0	728,5	95,0	93,3	4,0	10,0	3,5	1,5	1,5	1,5	1,5	2,0	1,0	1,0	1,0
6	1	3,5	1	1,3	202,8	491,5	85,0	97,7	10,0	11,5	4,0	3,5	3,0	2,0	0,5	0,0	0,0	1,5	1,0
7	1	1,5	2	2,6	227,2	844,0	80,0	86,0	11,0	40,5	6,0	5,5	0,5	5,0	4,5	19,5		9,5	2,0
8	1	2	1	23,6	234,4	182,0	65,0	35,5	42,0	68,5	21,0	21,0	2,5	9,0	4,0	3,0		33,0	3,0
9	3	4	3	2,8	201,0	2220,0	70,0	94,9	9,0	16,5	4,5	4,5	0,5	2,5	1,5	6,5		2,5	1,0
10	1	3,5	4	11,5	208,9	1326,0	40,0	56,7	34,0	52,5	9,5	5,5	3,5	18,0	12,5	1,0		18,0	2,0
11	1	4	3	1,6	211,0	1293,0	90,0	89,4	8,0	8,0	1,0	1,0	3,0	0,5	0,0	1,0		2,0	1,0
12	1	5	2	2,4	201,9	472,0	80,0	90,7	12,0	14,0	1,5	1,0	0,5	7,0	6,0	0,5		4,5	1,0
13	1	2	1	5,7	227,8	505,8	90,0	88,1	12,0	21,5	1,0	1,0	0,5	10,0	7,0	3,5		5,5	1,0
14	1	3,5	2	1,5	204,7	1233,5	85,0	97,5	2,0	18,0	5,0	2,5	6,0	5,5	5,5	0,0		1,5	1,0
15	1	3	3	17,8	233,4	425,5	70,0	52,8	25,0	66,5	17,0	7,0	10,5	28,0	22,5	5,5		4,5	3,0
16	1	5	3	1,7	200,8	324,0	90,0	91,2	7,0	87,5	3,5	3,5	4,5	77,5	77,5	1,5		0,5	3,0
17	1	5	3	1,1	204,8	782,0	90,0	85,0	18,0	5,5	1,5	1,0	2,0	1,5	1,0	0,5		0,0	1,0
18	3	1,2	3	2,8	204,6	1701,0	80,0	96,4	6,0	18,0	0,0	0,0	11,0	1,0	0,5	1,5		3,0	1,0
19	3	5	4	1,5	208,0	1428,0	70,0	85,4	6,0	46,0	1,5	1,5	0,5	1,5	1,0	26,0		16,5	2,0
20	4	2	4	2,2	196,1	118,8	95,0	59,3	10,0	24,0	7,0	3,5	2,5	3,0	2,0	0,5		9,0	1,0
21	1	6	1	22,9	249,4	728,0	30,0	30,0	30,0	56,0	9,5	8,5	0,0	2,5	0,0	12,0		32,0	2,0
22	3	1,5	4	3,2	198,9	1837,5	90,0	87,8	9,0	12,0	1,0	1,0	4,5	0,5	0,5	1,5		4,5	1,0
23	4	2	4	12,4	228,1	1479,5	60,0	49,8	20,0	31,5	15,0	11,0	3,0	13,0	1,0	0,0		0,5	2,0
24	1	4	3	57,5	260,7	388,5	40,0	21,9	39,0	78,5	44,0	44,0	6,0	22,5	15,0	0,0		6,0	3,0
25	4	3	4	2,2	199,9	915,0	85,0	84,6	23,0	17,5	5,0	2,0	5,5	4,0	1,0	0,5		2,5	1,0
26	1	3	4	2	200,8	1775,0	80,0		16,0	12,5	4,5	3,0	1,5	1,5	1,5	1,5		2,5	1,0
27	2	2,5	1	3,1	203,3	510,0	85,0		9,0	10,0	1,5	1,5	1,0	3,5	2,0	3,0		1,0	1,0
28	2	2,75	1	1	202,5	493,0	80,0		5,0	39,0	1,0	1,0	1,0	10,0	10,0	24,5		2,5	2,0
29	2	11	2	1,5	190,6	264,8	75,0		8,0	28,5	6,0	5,5	3,5	17,0	17,0	1,0		1,0	1,0

Tier	Ras	Alter	Gewgr	DFI	α_t	SGZ	Vmot	CMA	MgS	MAS	KK	KKs	Kopf	Hals	pPL	dPI	frPI	HaEnd	Norsp
30	2	1	1	1,3	202,2	390,0	95,0		10,0	22,0	2,5	2,5	0,5	9,5	7,5	7,5	7,5	0,5	1,0
31	2	1,5	1	1	208,4	610,0	80,0		9,0	8,5	1,5	1,5	1,0	3,5	0,5	0,5	0,5	2,0	1,0
32	2	2,5	1	5	207,7	570,0	80,0		8,0	16,0	5,0	4,5	2,0	5,5	3,5	3,0	3,0	0,5	1,0
33	2	1	1	1,8	199,0	569,5	90,0		9,0	26,5	2,0	1,5	3,0	18,5	18,0	2,5	2,5	0,5	1,0
34	2	1,5	2	4,7	204,0	380,0	70,0		7,0	13,5	4,5	4,5	4,5	2,0	0,5	2,0	2,0	0,5	1,0
35	2	5,5	2	8,6	206,9	620,0	80,0		8,0	29,5	5,5	5,5	1,0	18,0	0,5	2,0	2,0	3,0	1,0
36	2	7,5	1	1,9	198,9	63,0	70,0		12,0	52,0	2,5	2,5	1,5	45,0	45,0	1,0	1,0	1,0	2,0
37	2	3,75	1	8,8	204,5	660,0	80,0		10,0	36,5	2,5	2,5	2,0	10,0	18,5	2,0	2,0	3,0	2,0
38	2	1,75	2	7	200,9	413,0	75,0		14,0	46,5	14,0	8,0	0,5	9,0	0,0	8,0	4,0	4,0	2,0
39	4	4	4	4,3	201,0	910,0	80,0	85,0	10,0	38,5	9,0	3,5	6,5	19,0	18,0	2,0	2,0	1,5	2,0
40	3	5	3	6	194,5	912,0	85,0	72,4	11,0	40,0	2,0	2,0	36,0	1,5	0,0	0,5	0,0	0,0	2,0
41	3	3,5	3	2,6	198,0	1343,0	80,0	87,5	9,0	15,0	3,0	1,0	4,5	2,5	0,5	0,0	1,0	3,0	1,0
42	1	5	4	1,8	204,2	838,8	85,0		12,0	12,5	1,5	1,5	0,0	3,5	0,0	0,0	1,0	7,0	1,0
43	3	4,5	3	8,6	207,0	1580,0	85,0	85,0	11,0	43,5	5,0	4,0	3,5	9,0	8,0	25,5	1,0	0,5	2,0
44	3	4,25	3	3,4	215,7	910,0	80,0	88,5	14,0	11,5	1,0	1,0	9,5	0,5	0,5	0,0	1,0	0,5	1,0
45	3	1,5	3	4,9	215,6	1780,0	85,0	98,2	10,0	18,0	7,0	3,5	3,0	2,5	2,5	3,0	1,0	2,5	1,0
46	1	8,5	4	0,9	198,6	316,8	40,0	48,5	42,0	51,0	16,0	7,5	10,5	8,0	3,5	0,0	15,0	2,0	2,0
47	4	4	4	6,5	202,1	610,5	70,0	70,1	27,0	66,5	8,0	6,0	4,5	50,0	10,0	1,0	2,5	3,0	3,0
48	4	2,5	4	28,8	220,9	157,5	50,0	30,7	55,0	96,0	18,0	9,0	32,0	43,0	1,0	0,0	3,0	3,0	3,0
49	1	3,5	4	5	189,8	31,0	85,0	57,1	28,0	54,0	8,0	6,0	6,0	10,0	10,0	0,0	28,0	2,0	2,0
50	1	11	4	0,9	189,6	558,0	90,0	94,2	5,0	9,5	1,0	1,0	1,5	3,0	0,5	1,5	2,0	1,0	1,0
51	1	2,75	3	0,5	190,7	1890,0	90,0	99,1	3,0	13,5	3,0	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0	1,0	3,5	1,0
52	1	11	4	5,4	220,6	301,0	0,0		94,0	85,5	24,5	22,5	8,5	38,0	2,5	0,0	13,0	3,0	3,0
53	1	6	3	2,1	199,8	1090,0	85,0	87,6	16,0	71,0	9,0	2,0	3,5	56,5	55,5	0,0	1,0	3,0	3,0
54	4	4,5	4	1,9	188,7	874,5	60,0	49,5	45,0	71,0	4,0	2,0	3,5	58,5	0,0	0,0	5,5	3,0	3,0
55	1	5	3	0,6	196,6	1422,0	15,0	21,1	67,0	63,0	13,5	12,0	0,5	9,5	6,0	0,0	39,5	3,0	3,0
56	1	0,75	2	0,6	192,0	555,0	80,0	94,8	12,0	12,5	1,5	1,5	3,5	2,0	1,0	0,0	2,5	1,0	1,0
57	1	0,75	2	0,6	194,5	420,0	80,0	64,5	6,0	5,0	0,0	0,0	1,0	0,5	0,5	0,0	1,0	1,5	1,0
58	4	5,75	4	3	188,1	693,0	40,0		42,0	82,5	10,5	6,0	10,5	58,5	0,0	0,0	3,0	3,0	3,0
59	1	1,5	2	1,1	195,1	940,0	85,0	90,6	9,0	9,5	1,5	1,5	1,0	2,5	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0
60	1	1	2	2	194,3	41,3	90,0	89,5	13,0	41,0	3,5	2,5	1,0	0,5	0,5	30,0	2,5	2,5	2,0

Tier	Ras	Alter	Gewgr	DFI	α_t	SGZ	Vmot	CMA	MgS	MAS	KK	KKs	Kopf	Hals	pPL	dPI	frPI	HaEnd	Norsp
61	1	2,5	2	0,8	191,6	1382,5	90,0	96,2	7,0	29,5	5,0	1,5	2,5	5,5	5,5	12,0	1,0	2,5	1,0
62	1	1	2	0,8	191,6	510,0	90,0	88,5	9,0	6,5	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	1,0
63	1	5	3	1,2	190,4	616,0	80,0	97,3	6,0	39,0	4,0	3,0	1,0	20,0	19,0	8,0	8,0	5,5	2,0
64	4	4	4	2	192,9	609,8	70,0	86,3	10,0	28,0	4,0	4,0	4,0	13,0	12,5	2,5	2,5	4,0	1,0
65	1	7	2	0,7	190,7	945,0	80,0	96,4	11,0	9,5	1,0	0,0	1,0	6,0	6,0	1,0	1,0	0,5	1,0
66	1	5	2	4,5	185,1	920,0	80,0	91,4	11,0	36,0	6,0	6,0	4,5	17,0	16,0	5,5	5,5	3,0	2,0
67	1	5	2	2,1	187,2	195,0	80,0	93,9	18,0	31,5	2,0	2,0	1,5	17,0	16,5	6,0	6,0	4,5	2,0
68	1	3	2	1	193,7	481,0	90,0	95,8	11,0	10,5	1,5	1,5	3,5	4,0	2,0	1,0	1,0	0,0	1,0

Tier= Auflistung der untersuchten Rüden in dieser Studie; Ras= Unterteilung der Hunderasse in 1: gemischte Rüdenpopulation , 2: Fox Terrier ,3: Labrador bzw. Golden Retriever und 4: Deutsche Dogge; Alter=Lebensalter der Hunde in Jahren; Gewigr: Unterteilung der Hunde nach Körpergewicht in 1: ≤ 10 kg, 2: < 20 kg, 3: < 40 kg und 4: ≥ 40 kg; DFI: Anteil der Spermien in % mit einem erhöhten DNA- Fragmentationsindex; α -T= α - T-Wert, SGZ= Spermiengesamtzahl; Vmot= geschätzter Anteil (%) an vorwärtsmotilen Spermien; CMA: mittels Cell Motion Analyser bestimmter Anteil an vorwärtsmotilen Spermien; MgS= Anteil (%) an membrangeschädigten Spermien; MAS= Gesamtanteil (%) an morphologisch abweichenden Spermien; KK= Anteil (%) an Spermien mit veränderter Kopfkappe; KKs=Anteil (%) an Spermien mit geschwollener Kopfkappe, Kopfkappe in Ablösung und abgelöster Kopfkappe; Kopf= Anteil (%) an Spermien mit Kopfanomalien; Hals= Anteil (%) an Spermien mit Halsveränderungen; pPI= Anteil (%) an Spermien mit proximalen Plasmatotrophen; dPI= Anteil (%) an Spermien mit distalen Plasmatotrophen; frPI= freie Plasmatotrophen im Ejakulat(1); HaEnd= Anteil (%) an Spermien mit Veränderungen am Haupt- und Endstück; Norsp= Unterteilung der untersuchten Ejakulate in Normo-, Dys- und Pathospermie in Anlehnung an den Anteil an morphologisch abweichender Spermien (1:< 30% MAS, 2: 30 – 60% MAS, 3:> 60% MAS)

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Anne-Rose Günzel-Apel für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute und herzliche persönliche Betreuung bedanken sowie für die Erfahrungen, die ich auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin beim Hund sammeln konnte.

Frau Prof. Dr. Dagmar Waberski und Herrn Prof. Dr. Heinrich Bollwein danke ich für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung sowie auch Ermöglichung der Dissertationsarbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Martin Beyerbach für die kompetente Unterstützung bei der Bearbeitung der statistischen Fragen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Petra Hasenleder und Erika Schröder für jederzeit gewährte und außerordentlich engagierte Hilfe im Labor bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Iris Buchholz für die Einarbeitung in den SCSA, die Geduld, kompetente und humorvolle Unterstützung.

Bei Frau Cordula Köß und Frau Karin Löppen bedanke ich mich für die entgegengebrachte Hilfe bei Fragen bezüglich des SCSA.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranden der reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken für eine schöne und lehrreiche Zeit. Vor allem Franziska Eschricht und Carola Urhausen für die tatkräftige Unterstützung beim Sammeln der Proben (Sonntagmorgens im Winter) sowie schöne und humorvolle Zusammenarbeit (Es macht Spaß mit Euch zu arbeiten) als auch für die lustigen privaten Treffen.

Meiner Freundin Natalija Sergejew danke ich ganz herzlich für das gründliche Korrekturlesen zu unmöglichen Zeiten.

Für eine schöne Studienzeit und bestehende Freundschaft danke ich Verena Schroers, Jana Vohrer, Dani Scheirer, Anne Jordan und Tatjana Stammen. Dir, Verena, danke ich für die Unterstützung in Sachen Literaturfragen.

Meinem Bruder danke ich für die Motivation diese Arbeit fertig zu schreiben.

Meinen lieben Eltern danke ich ganz besonders für die Ermöglichung meines Studiums und der Promotion. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und dass ich mich jederzeit auf euch verlassen kann. Ohne Euch wäre ich nicht der Mensch der ich jetzt bin.

Bei meiner noch kleinen Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken.

Dir Christian danke ich für Deine zu jederzeit entgegengebrachte Hilfe, unermüdliche Motivation, außerordentliche Geduld und Dein liebevolles Verständnis, und dafür, dass Du immer für mich da bist.

Dir, liebe Ella, danke ich dafür, dass durch Dich und Dein zauberhaftes Lächeln an jedem Tag die Sonne scheint.

Ihr seid die größte Bereicherung meines Lebens und macht mich sehr glücklich.
DANKE.