Aus dem Institut für Reproduktionsmedizin
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Etablierung eines fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assays im Rahmen der spermatologischen Diagnostik beim Hund

I N A U G U R A L – D I S S E R T A T I O N

Zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Jasmin-Janina Biege
aus Oldenburg

Hannover 2004

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

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

2. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Dr. N. Parvizi

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2004

Meiner Mutter

und Alpha

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 13

2 LITERATURÜBERSICHT 14

2.1 Bildung und Morphologie der Samenzelle 14
2.2 Spermienchromatin 15
2.2.1 Spermienchromatinstruktur 16
2.2.2 Untersuchung der Stabilität der Spermienchromatinstruktur gegenüber Denaturierung in situ 20
2.2.3 Andere Untersuchungsverfahren zur Charakterisierung der Spermienchromatinstruktur 22
2.2.4 Physiologische Einflüsse auf die Spermienchromatinstruktur 24
2.2.5 Pathologische Einflüsse auf die Spermienchromatinstruktur 27
2.2.6 Das Spermienchromatin als Fertilitätsindikator 31

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN 35

3.1 Versuchstiere 35
3.2 Methoden 35
3.2.1 Materialien 35
3.2.2 Andrologische Untersuchung incl. Samengewinnung 36
3.2.3 Samenuntersuchung 36
3.2.3.1 Bestimmung der Spermienkonzentration (Samendichte) und Spermiengesamtzahl 37
3.2.3.2 Bestimmung der mikroskopisch geschätzten und computergestützt ermittelten (CMA) Spermienmotilität 38
3.2.3.3 Lebend-Tot-Färbung mit Eosin und Propidiumiodid 39

3.2.3.4	Spermienmorphologie	40
3.2.4	Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA)	42
3.2.4.1	Computergestützte Auswertung	46
3.2.5	Untersuchungen methodischer Einflüsse auf die Ergebnisse des mfSCSA	48
3.2.5.1	Untersuchung der Reproduzierbarkeit der mittels mfSCSA erhobenen Befunde	48
3.2.5.2	Untersuchung des Einflusses verschiedener Spermienkonzentrationen auf die Genauigkeit des mfSCSA	49
3.2.5.3	Untersuchung der Spermienchromatinstabilität bei 22 und 26-27°C	49
3.2.5.4	Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach zweistündiger Aufbewahrung des Samens unter verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen	50
3.2.5.5	Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in Nativsperma und Nativspermaausstrichen nach Lagerung bei 5°C	50
3.2.5.6	Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in gefärbten Spermaausstrichen nach vierwöchiger Lagerung bei 5°C	51
3.2.5.7	Untersuchung des Spermienchromatinstatus in nativem, schockgefrorenem und tiefgefrorenem Sperma	51
3.2.5.8	Untersuchung der intraindividuellen Variabilität des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien zwischen mehreren Ejakulaten eines Rüden	52
3.2.6	Untersuchung der Spermienchromatinstruktur im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern	53
3.2.6.1	Beziehung zwischen Chromatinstatus und Normospermie oder Dysspermie	53

3.2.6.2 Beziehungen zwischen Chromatinstatus und ausgewählten spermatologischen Parametern 53
3.2.6.3 Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen 54
3.3 Statistische Auswertung 55
3.3.1 Ergebnisse des mfSCSA 55

4 ERGEBNISSE 57

4.1 Methodische Einflüsse auf den mfSCSA 57
4.1.1 Reproduzierbarkeit der mittels mfSCSA erhobenen Befunde 57
4.1.2 Einfluss verschiedener Spermienkonzentrationen auf die Genauigkeit des mfSCSA 58
4.1.3 Spermienchromatinstabilität bei 22 und 26-27°C 59
4.1.4 Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach zweistündiger Aufbewahrung des Samens unter verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen 60
4.1.5 Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach Lagerung bei 5°C 61
4.1.6 Spermienchromatinstabilität in Nativspermaausstrichen nach Lagerung bei 5°C 63
4.1.7 Auswertbarkeit der Spermienchromatinstruktur in gefärbten Spermaausstrichen nach vierwöchiger Lagerung bei 5°C 65
4.1.8 Chromatinstatus von nativen, schockgefrorenen und tiefgefrorenen Spermien 66
4.1.9 Intraindividuelle Variabilität des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien zwischen mehreren Ejakulaten eines Rüden 66
4.1.10 Korrelation der beiden mfSCSA-Werte 68

4.2 Anteil chromatininstabiler Spermien im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern 69
4.2.1 Beziehung zwischen Chromatinstatus und Normospermie oder Dysspermie 69
4.2.2 Beziehungen zwischen Chromatinstatus und ausgewählten spermatologischen Parametern 70
4.2.3 Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen 73

5 DISKUSSION 75

5.1 Methodische Einflüsse auf den mfSCSA 75
5.2 Anteil chromatininstabiler Spermien im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern 80
5.3 Schlussbetrachtung 83

6 ZUSAMMENFASSUNG 86

7 SUMMARY 89

8 LITERATURVERZEICHNIS 92

9 ANHANG 110

9.1 Laborbedarf 110
9.2 Chemikalien 112
9.3 Rezepte 113
9.3.1 Formolcitrat 113
9.3.2 Tiefgefrierverdünner für Rüden (nach ANDERSEN 1975) 113
9.3.3 Rezepte für den mfSCSA 114

9.3.3.1 tri-Natriumcitratpuffer 2,9 % 114
9.3.3.2 Carnoy's solution, pH 2 115
9.3.3.3 0,1-molare Citronensäure-Stammlösung 115
9.3.3.4 0,3-molare di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung 115
9.3.3.5 Akridin Orange (AO) Stammlösung 115
9.4 Softwareeinstellung für den mfSCSA 116
9.4.1 Klassifizierung 116
9.4.2 Detektion 116
9.4.3 Manueller Weißabgleich 118
9.4.4 Farbschwellwertdateien 119
9.5 Beurteilungsgrundlage für Normo- und Dysspermie 120
9.6 Spermatologische Beispielbefunde mit unauffälligen und erhöhten mfSCSA-Werten 121

10 DANKSAGUNG 122

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	**Abb**ildung
AOT	**A**kridin **O**range **T**est
ART	**a**rtificial **r**eproductive **t**echnology
bidest.	**bidest**illata
bzw.	**b**e**z**iehungs**w**eise
ca.	**c**irc**a**
cm	Zenti**m**eter
CMA	**C**ell **M**otion **A**nalyser
COMET	Single Cell Gel Electrophoresis Assay
COMPα_t	**C**ells **O**utside the **M**ain **P**opulation (flowzytometrisch ermittelter Prozentsatz chromatininstabiler Spermien)
°C	Grad **C**elsius
d	**d**ay (Tag)
DFI	**D**efragmen**t**ierungs**i**ndex
dest.	**dest**illata
d.h.	**d**as **h**eißt
d-DNA	doppelsträngige **DNA** (**d**ouble)
DMSO	**D**i**m**ethyl**s**ulf**o**xid
DNA	**D**eoxyribo**n**ucleic **a**cid
DTT	1,4-**D**i**t**hio**t**reit
EDTA	**E**thylen**d**iamin**t**etra**a**cetat
engl.	**engl**isch
et al.	**et al**ii
evtl.	**ev**en**t**ue**l**l
g	**G**ramm / **G**ravitationsbeschleunigung (9,81m/sec2)
h	**h**our (Stunde)
ICSI	**i**ntra**c**ytoplasmic **s**perm **i**njection
incl.	**in**k**l**usive
IVF	**i**n **v**itro **F**ertilisation

Kap.	**Kap**itel
kg	**K**ilo**g**ramm
KGW	**K**örper**ge**w**i**cht
max.	**max**imal
mfSCSA	**m**odifizierter **f**luoreszenzmikroskopischer **S**permien**c**hromatin**s**truktur **A**ssay
mg	**M**illi**g**ramm
MG	**G**esamtanteil **m**orphologisch abweichender Spermien
min.	**min**destens
Mio.	**Mi**lli**o**n
ml	**M**illi**l**iter
mM	**M**illi**m**olar
Mrd.	**M**illia**rd**en
MS	vowärts **m**otile **S**permien (CMA)
n	Anzahl der Tiere / Ejakulate / Objektträger
NaCl	**Na**trium**c**h**l**orid
NaOH	**Na**tronlauge
nm	**N**ano**m**eter
Nr.	**N**umme**r**
NT	in situ **N**ick-**T**ranslation Assay
p	Wahrscheinlichkeitswert für die Nullhypothese
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PI	**P**ropidium**i**odid
®	eingetragenes Warenzeichen
r	Korrelationskoeffizient
ROS	**r**adical **o**xygene **s**pecies (radikale Sauerstoffspezies)
s.	**s**iehe
SCD	**S**permien**c**hromatin **D**ispersionstest
SCSA	**S**permien**c**hromatin**s**truktur **A**ssay
SCSAK	computergestützt ermittelter mf**SCSA**-Wert (**k**orrigiert)
SCSAT	computergestützt ermittelter mf**SCSA**-Wert (ge**t**richtert)

SD	**s**tandard **d**eviation (Standardabweichung)
s-DNA	einsträngige **DNA** (**s**ingle)
sec	**Se**kunde
sog.	**sog**enannt
Tab.	**Tab**elle
TG	**T**ief**g**efriersperma
TUNEL	**T**erminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated **N**ick **E**nd **L**abeling Assay
u.	**u**nd
u.a.	**u**nter **a**nderem
µg	Mikro**g**ramm
µl	Mikro**l**iter
µm	Mikro**m**eter
v.a.	**v**or **a**llem
VAP	**V**elocity **A**veraged **P**ath
VCL	**V**elocity **C**urve **L**ine
VSL	**V**elocity **S**traight **L**ine
WHO	**W**orld **H**ealth **O**rganisation
Wo.	**Wo**che
$\bar{x}$	Mittelwert
z.B.	**z**um **B**eispiel
z.T.	**z**um **T**eil

1 EINLEITUNG

Die gesundheitliche und geschlechtliche Zuchttauglichkeit eines Zuchtrüden wird durch eine andrologische Untersuchung festgestellt. Diese beinhaltet u. a. die Beurteilung der Samenqualität. Neben den bekannten Parametern der klassischen und modernen Spermatologie machten erstmals EVENSON et al. (1980) mit dem sog. Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA) auf das Spermienchromatin aufmerksam. Dabei wurde die Anfälligkeit der Spermienkern-DNA gegenüber Denaturierung in situ von Mensch, Maus und Rind flowzytometrisch untersucht und ein Bezug zur Fertilität hergestellt. Es bestand die Hypothese, dass Spermien mit instabiler oder abnormer Chromatinstruktur keine oder nur eine geringe Befruchtungsfähigkeit aufweisen. Zudem stellt sich die Frage, ob es im Falle einer Befruchtung durch chromatininstabile Spermien zu embryonalen Entwicklungsstörungen bis hin zum frühembryonalen Fruchttod kommen kann (SAKKAS et al. 1998).
Es folgte die Erarbeitung weiterer Verfahren unter Einbeziehung der Fluoreszenzmikroskopie von TEJADA et al. (1984), KOSOWER et al. (1992) und ACEVEDO (2001).

Ziel der vorliegenden Studie war es, den in Anlehnung an das Protokoll von ACEVEDO (2001) entwickelten modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA) für die spermatologische Diagnostik beim Hund zu etablieren. Es sollten methodische Einflüsse auf den mfSCSA untersucht und Beziehungen zwischen der Spermienchromatinstruktur und ausgewählten spermatologischen Parametern hergestellt werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bildung und Morphologie der Samenzelle

Die Samenzellbildung erfolgt im Keimepithel der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) des Hodengewebes. Die Spermatogenese besteht aus der Spermiozytogenese und der Spermiogenese (LIEBICH 1993) und läuft beim Hund innerhalb von acht bis neun Wochen in vier bis fünf Tubulusepithelzyklen ab (FOOTE et al. 1972; IBACH et al. 1975). Während der Spermiozytogenese werden Stammspermatogonien gebildet, die zu Spermatozyten heranwachsen und sich dabei zunehmend in mehreren Reihen von der Basalmembran des testikulären Keimepithels abheben. Nach der ersten und zweiten Reifeteilung der Spermatozyten (meiotische und mitotische Teilungsprozesse) liegen Spermatiden mit einem haploiden Chromosomensatz (n = 39) vor. Die sich anschließende Spermiogenese umfasst die Golgi-, Kappen-, Akrosom- und Reifephase, wobei die männlichen Geschlechtszellen bis auf einen verbleibenden Zytoplasmatropfen, den sog. Residualkörper, ihre arttypische Spermienform erlangen. In der Golgiphase bildet der Golgiapparat Vesikel mit dichter Granula, die zu einem Akrosomvesikel verschmelzen und sich dem Kern anlagern. Gegenüberliegend nimmt ein proximales Zentriol über eine Basalplatte Verbindung zum Kern auf, am distalen Zentriol beginnt die Entwicklung einer Geißel. In der Kappenphase wird aus dem Akrosomvesikel die Kopfkappe gebildet, die sich über der Spermatide ausbreitet. In der Akrosomphase kommt es zu einer starken Kondensation des Chromatins im Spermienkopf, wobei dieser sich unter Abflachung in die Länge streckt und dreht, so dass er in Richtung Keimepithel zeigt. Um die sich lumenwärts gerichtete Geißel lagern sich Mitochondrien an. Dabei kommt es zur Manschettenbildung um das Mittelstück des Spermienschwanzes, bestehend aus einem zentralen und neun peripheren Mikrotubulipaaren. In der Reifephase endet der Prozess der Kopf- und Schwanzbildung (LIEBICH 1993). Der Spermienschwanz besteht aus einem Halsstück, dem beweglichen Gelenkstück zwischen Kopf und übrigen Geißelanteilen, einem Mittel-, Haupt- und Endstück (MONESI 1976). Das

Spermium ist von einer Plasmamembran überzogen. In der folgenden sog. epididymalen Spermienreifung durchwandern die Spermien in ca. 10 Tagen den Nebenhodenkopf und -körper und erreichen den Nebenhodenschwanz, wo sie schließlich ausgereift gespeichert werden (WAITES u. SETCHELL 1969). Während der Nebenhodenpassage löst sich der Residualkörper ab und die biochemische Zusammensetzung der einzelnen Spermienabschnitte verändert sich (LIEBICH 1993). Das Akrosom erhält seine endgültige Struktur, bedeckt etwa die Hälfte bis zwei Drittel des Spermienkopfes und ist mit hydrolytischen Enzymen, v.a. Akrosin und Hyaluronidase, ausgestattet, die insbesondere für die Penetration der Zona pellucida der Eizelle entscheidend sind (MONESI 1976; YANAGIMACHI 1994). Durch die Reifung der Spermien im Nebenhoden erlangen die Spermien ihre volle Befruchtungsfähigkeit, eine gerichtete Vorwärtsmotilität (YANAGIMACHI 1988; KIRCHHOFF u. IVELL 1995) und die Fähigkeit, im männlichen und weiblichen Genitaltrakt zu überleben. Der Aufbau eines Spermiums ist bei den meisten Haussäugetierarten gleich, Form und Größe sind tierartlich unterschiedlich. Der Spermienkopf misst beim Rüden in der Länge ca. 5,6-5,9 µm und in der Breite ca. 3,9 µm. Die durchschnittliche Gesamtlänge eines Hundespermiums beträgt 55,2 µm (CUMMINS u. WOODALL 1985).

2.2 Spermienchromatin

Alle Informationen zum Spermienchromatin beziehen sich auf Untersuchungen von Samenzellen folgender Säugetierspezies: Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Schwein, Rind, Pferd und Mensch. Bis auf einige Ausnahmen ist die Chromatinstruktur bei den meisten genannten Tierarten ähnlich aufgebaut. Bei Besonderheiten wird im folgenden Text auf die entsprechende Spezies hingewiesen. Das Chromatin füllt den Spermienkopf fast vollständig aus und enthält die genetische Information der Samenzelle (MONESI 1976). Das Spermien-chromatin beinhaltet die DNA, niedermolekulare, basische Kernproteine, Lipide und Ionen wie Magnesium, Eisen, Kupfer, Zink, Kalium und Phosphat. Es ist hoch-kondensiert und erscheint im

Elektronenmikroskop sehr elektonendicht. In der Halsregion ist ein minimaler Anteil des Kernchromatins unkondensiert, was in diesem Bereich auf proteinsynthetische Prozesse hinweist, welche jedoch bisher nicht geklärt sind (ROVAN 2001). Die Aufgabe eines Spermiums besteht darin, die DNA physikalisch und chemisch sicher verpackt in die Eizelle zu transportieren (WARD u. COFFEY 1991; SAKKAS et al. 1999). Dafür benötigt es eine gute Vitalität und Vorwärtsmotilität (YANAGIMACHI 1988).

2.2.1 Spermienchromatinstruktur

Grundsätzlich unterscheidet sich der Chromatinaufbau in somatischen Zellen und Keimzellen (Abb. 1). In somatischen Zellkernen ist die DNA in sog. Nukleosomen angeordnet, d.h., im Abstand von 200 Basenpaaren erfolgt eine zweifache Umwicklung der Doppelhelix um ein Histonoktamer. Die Nukleosomen sind wiederum speziell angeordnet (Superspiralisierung, engl.: „solenoid“). Die Organisation somatischer DNA basiert auf der sog. „nukleären Matrix“, bestehend aus Proteinen, an die im Abstand von 60000 Basenpaaren die DNA fest bindet. Dadurch entstehen um diesen Matrixkern Schleifen, sog. „loop domains“, die der DNA ihre dreidimensionale Struktur geben (WARD u. COFFEY 1991). Im Spermienkern liegt das Chromatin während der Spermiogenese ungeordnet vor. Die DNA-Stränge werden durch eine Endonuklease an unterschiedlichen Stellen geschnitten und wieder ligiert (MC PHERSON u. LONGO 1993). Während der finalen Stadien der Spermatogenese erfolgt im Säugetierspermienchromatin ein Austausch somatischer Histone gegen Protamine (GOLDBERG et al. 1977; GATEWOOD et al. 1987). Protamine sind niedermolekulare, stark basische Proteine, die reich an Arginin und Cystein (schwefelhaltige Aminosäure) sind (KUMAROO et al. 1975) und wenig oder kein Lysin besitzen (POCCIA 1986). MONESI konnte bereits 1965 den Austausch von Histonen gegen ein stark argininhaltiges Protein des Chromatins von Mäusespermien im Laufe der Spermiogenese zeigen. Später wurde klar, dass positiv geladene Argininreste negativ geladene Phosphodiester neutralisieren, wodurch die DNA zu einem neutra-

len Polymer transformiert wird (WARD 1993). Die anfangs vorhandenen Thiole (freie SH-Gruppen) oxidieren während der Spermienreifung im Nebenhoden zu Disulfiden (CALVIN u. BEDFORD 1971). Dadurch kommt es zu einer starken Kondensation des Spermienchromatins (MARUSHIGE u. MARUSHIGE 1975), was Voraussetzung für seine extrem kompakte und stabile Struktur ist (BALHORN 1982; SELIGMAN u. SHALGI 1991; SAKKAS et al. 1999). Das Chromatin wird durch kovalente inter- und intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Protaminen gefestigt (BALHORN 1982). Dies führt zu einer erheblichen Resistenz gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen. MEISTRICH et al. (1976) zeigten an Mäusespermien, dass das Chromatin ausgereifter Spermien gegenüber Ultraschallwellen, Trypsin und Sodiumdodecylsulfat resistent war, während Chromatin nicht ausgereifter Spermien sensibel reagierte. Dies verdeutlicht, dass die während der Nebenhodenpassage stattfindenden Reifungsprozesse für die Stabilität des Spermienkerns von zentraler Bedeutung sind. Der Protamin-DNA-Komplex lässt im Gegensatz zu histongebundener DNA in somatischen Zellen keine Superspiralisieung zu. Die DNA von Spermienkernen ist linear Seite an Seite angeordnet (WARD u. COFFEY 1991). Diese kompakte Form der Tertiärstruktur ermöglicht zum einen den starken Kondensationsgrad von Spermienchromatin und verhindert zum anderen die Transkription. Das sog. „Sperm Doughnut Loop Domain Model“ (Abb. 1) von WARD (1993) zeigt die räumliche Struktur des Spermienchromatins. Die protamingebundene DNA bildet konzentrische Kreise, die wie ein Ring (doughnut) aussehen. Man spricht von der sog. „Doughnut-Domäne“. Die Schleifen um den Matrixkern sind nur halb so groß wie die bei somatischen Zellen (WARD u. COFFEY 1991). Die Stabilität von Säugetierspermienkernen ist stark vom Protamingehalt abhängig und variiert zwischen den Spezies deutlich (PERREAULT et al. 1988). In menschlichen Spermienkernen besteht der Proteingehalt zu ca. 15 % aus Histonen (TANPHAICHITR et al. 1978; GATEWOOD et al. 1987), um die sich die DNA wickelt und sog. Nukleosomen bildet. Der überwiegende Proteinrest besteht aus drei Protamintypen (BALHORN et al. 1988), die an die DNA gebunden und linear Seite an Seite angelagert sind (WARD u. COFFEY 1991). Das Protamin 1 ist neben Arginin und Cystein (KUMAROO et al. 1975) sehr reichhaltig an Glutaminsäure und Histidin (PONGSAWASDI u. SVASTI 1976;

TANPHAICHITR et al. 1978). Die Protamine 2 und 3 unterscheiden sich lediglich durch ein zusätzliches Tripeptid (BALHORN et al. 1988). Sie weisen keine Cysteinreste auf (JAGER 1990; EVENSON et al. 2002) und besitzen wesentlich mehr Histidinreste als Protamin 1. Das Verhältnis von Protamin 1 zu den Protaminen 2 und 3 beträgt 1:1 (BALHORN et al. 1988). Die Protamine 2 und 3 führen vermutlich schnell zu einer Dekondensation von menschlichem Spermienchromatin (PERREAULT et al. 1988). Die Anzahl der Spermien, deren Kerne nicht genügend durch Disulfidbrücken stabilisiert sind, sind beim Menschen insgesamt höher (BEDFORD et al. 1973; BLAZAK u. OVERSTREET 1982). Dies ist unter anderem auf den geringen Cysteingehalt des Protamin 2 zurückzuführen. Das vermehrte Auftreten unreifer Spermien wird mit der extrem kurzen Nebenhodenpassage beim Menschen, die nicht mehr als 2 Tage andauert, begründet (AMANN u. HOWARDS 1980). Daraus resultiert eine weniger stabile Chromatinstruktur als bei anderen Säugern. Im Spermienchromatin vom syrischen Hamster sowie von Maus und Pferd wurden zwei Protamintypen identifiziert (BALHORN et al. 1984; CORZETT et al. 1987; PIRHONEN et al. 1989). Hier besteht vermutlich ähnlich wie beim Menschen eine geringere Chromatinstabilität als bei Spezies (z.B. Rind), die nur einen Protamintypen aufweisen, wenn man davon ausgeht, dass das Protamin 2 weniger cysteinhaltig ist als Protamin 1 (JAGER 1990). Die enge Packungsdichte der Spermienkern-DNA, die während der Spermatogenese entsteht, ist ultimativ entscheidend für die Befruchtung und eine ungestörte, embryonale Entwicklung (DE JONGE 1999).

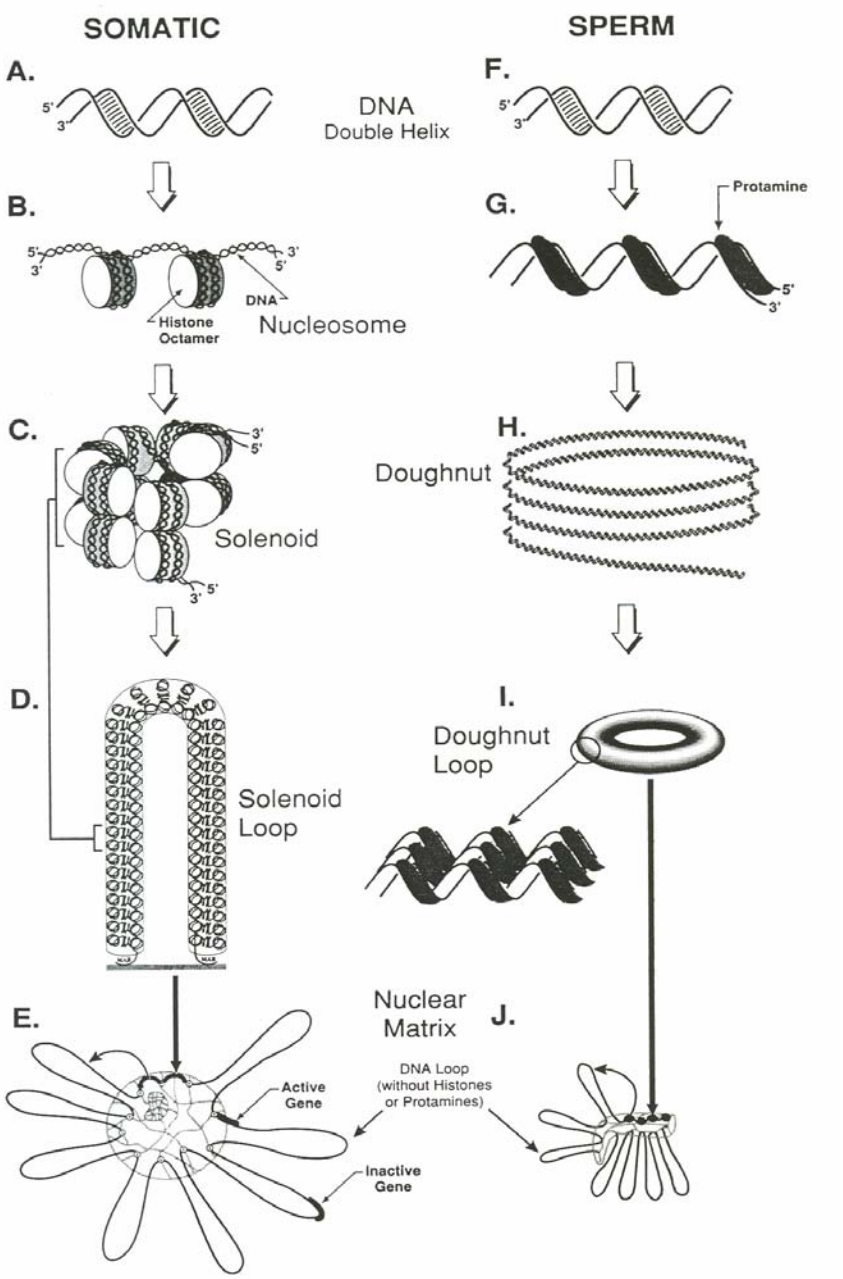


Abb. 1: Tertiärstruktur der DNA in somatischen Zellkernen und in Spermienkernen (nach WARD 1993)

2.2.2 Untersuchung der Stabilität der Spermienchromatinstruktur gegenüber Denaturierung in situ

Es gilt das Prinzip, dass Spermien mit instabilem Chromatin anfällig gegenüber Denaturierung in situ sind (DARZYNKIEWICZ et al. 1975). Die Denaturierung der DNA kann sowohl durch Hitze als auch durch Säure induziert werden, dabei unterscheiden sich die Ergebnisse nicht. Die Säuredenaturierung hat sich inzwischen wegen der einfacheren Handhabung (EVENSON et al. 1985) durchgesetzt. Der niedrige pH-Wert der Säurelösung steigert zudem die Anfärbbarkeit der DNA mit dem metachromatischen Farbstoff Akridin Orange (DARZYNKIEWICZ et al. 1977; BALLACHEY et al. 1988), welcher zur Identifizierung denaturierter und nicht-denaturierter DNA eingesetzt wird. Die Anfärbbarkeit der Spermienkern-DNA ist indirekt an den Kondensationsstatus des Chromatins gekoppelt (JAGER 1990). Akridin Orange lagert sich an doppelsträngige DNA als Monomer an, dagegen bindet es einsträngige DNA als Polymer (DARZYNKIEWICZ et al. 1976; KOSOWER et al. 1992). Bei partiell denaturierter DNA (einsträngige DNA) zeigen die Spermiennuklei rote Fluoreszenz, bei chromatinintakten Spermien (doppelsträngige DNA) grüne Fluoreszenz. Für die Auswertung stehen die Verfahren der Flowzytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie zur Verfügung.

Flowzytometrie

EVENSON et al. (1980) untersuchten mit dem sog. Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA) erstmals flowzytometrisch die Stabilität des Spermienchromatins von Mensch, Maus und Rind gegenüber Denaturierung in situ. Das Verhältnis roter zu totaler (rot + grün) Fluoreszenz gibt den α_t-Wert an (DARZYNKIEWICZ et al. 1975).

- α_t ist der Mittelwert, der die Tendenz und Shifts von grün nach rot in der gesamten Zellpopulation anzeigt. Die Standardabweichung $SD\alpha_t$ beschreibt den Grad der Variabilität des Shifts von grün nach rot innerhalb der Population. Der $COMP\alpha_t$-Wert (Cells Outside the Main Population) gibt den Prozentsatz chromatininstabiler

Spermien an. Pro Samenprobe werden in der Flowzytometrie 5000 Zellen ausgewertet, wobei 150 Zellen / sec idealerweise erfasst werden sollten (EVENSON u. JOST 1994). Bei Rattenspermien ist wegen ihrer sehr langen, fibrösen Schwänze eine Isolierung der Spermienköpfe durch eine Ultraschallbehandlung erforderlich, um aufgrund dieser anatomischen Gegebenheit verfälschte Messergebnisse durch Artefakte im Flowzytometer zu verhindern. Bei anderen Spezies ist dies nicht notwendig (EVENSON et al. 1985; EVENSON u. JOST 1994). Inzwischen wurde die flowzytometrische Methode nach über 20 Jahren laufender Modifikationen als sog. SCSA patentiert (EVENSON et al. 2002). Dabei wurde ein eigenes Software-Programm entwickelt (SCSASoft). Der Begriff COMPα_t (cells outside the main population) wurde durch den sog. DFI (Defragmentierungsindex) ersetzt.

Fluoreszenzmikroskopie

Auf der Grundlage des Verfahrens von EVENSON et al. (1980) etablierten TEJADA et al. (1984) mit dem sog. Akridin Orange Test (AOT) ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zur Untersuchung der Spermienchromatinstruktur beim Menschen. Pro Probe wurden 300 Spermienköpfe ausgewertet. Es konnte ein Zusammenhang zwischen einem abnorm hohen Prozentsatz rot fluoreszierender Spermien und geringer Fertilität des Individuums hergestellt werden. Der Test wies eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die Methode zeigte jedoch kein exakt differenziertes Färbebild, da neben roter und grüner Fluoreszenz auch Zwischenstufen von Gelb- und Orangefarbtönen auftraten. Ebenso stellte das schnelle Verblassen der Fluoreszenz bei der mikroskopischen Auswertung ein Problem dar (TEJADA et al. 1984). Vorteil des mikroskopischen Verfahrens ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Erfassung chromatininstabiler und morphologisch abweichender Spermien (TEJADA et al. 1984; ROUX u. DADOUNE 1989). Nach KOSOWER et al. (1992) spielt der Austausch von Histonen gegen Protamine während der Spermiogenese eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Spermienchromatins. Ferner ist die Fluoreszenz des Akridin Orange vom Thiol-Disulfid-Status der Protamine abhängig. Zur Untersuchung des Spermienchromatinstatus von Maus, Hamster und Kaninchen während verschiedener testikulärer und epididymaler Reifungsstadien wurde eine fluoreszenz-

mikroskopische Methode, die auf dem Verfahren nach TEJADA et al. (1984) basierte, angewandt. Zudem wurde das DTT (1,4-Dithiothreit) in die Analyse eingeführt (KOSOWER et al. 1992), das die Tertiärstruktur der protamingebundenen DNA durch Reduktion der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zu freien Thiolgruppen auflöst. So wird die Angriffsfläche des dann freiliegenden DNA-Doppelstranges für die folgende Säurebehandlung vergrößert. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein neues fluoreszenmikroskopisches Verfahren zur Untersuchung der Chromatinstruktur von Bullenspermien etabliert ACEVEDO (2001). Dabei wurde zur Stabilisierung des Thiolstatus statt DTT das 2-Mercaptoethanol eingesetzt. In Anlehnung an das Protokoll von ACEVEDO (2001) wurde am hiesigen Institut der modifizierte fluoreszenzmikroskopische Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA) für Bullenspermien erarbeitet (LÖHMER 2003).

2.2.3 Andere Untersuchungsverfahren zur Charakterisierung der Spermienchromatinstruktur

Studien ergaben enge Korrelationen zwischen der Spermienchromatinstabilität gegenüber Säuredenaturierung in situ und DNA-Strang-Brüchen (GORCZYKA et al. 1993; EVENSON et al. 1995; SAILER et al. 1995; SAKKAS et al. 1995; ARAVINDAN et al. 1997; SAKKAS et al. 1999; EVENSON et al. 2002). Untersuchungsverfahren, mit denen DNA-Strang-Brüche erfasst werden können, sind der „in situ Nick-Translation Assay“ (NT) (SAKKAS et al. 1999), der Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick End Labeling Assay (TUNEL-Assay) (GORCZYKA et al. 1993; SAILER et al. 1995; MANICARDI et al. 1998) und der Single Cell Gel Electrophoresis Assay (COMET-Assay) (ARAVINDAN et al. 1997; HUGHES et al. 1996; HAINES et al. 2001) dar.

Im „in situ NT Assay“ werden einsträngige DNA-Strang-Brüche durch katalysierte Enzymreaktionen von bestimmten Markern erkannt. Anhand des Anteils an DNA-Schäden kann eine Prognose im Hinblick auf die Dekondensationsfähigkeit des Spermienchromatins nach ICSI (intracytoplasmic sperm injection) und damit eine

Auswahl adäquater Spermien für ART (assisted reproductive technology) gestellt werden. Klassische spermatologische Parameter stehen nicht in Relation mit den Ergebnissen des Assays. Spermien mit DNA-Strang-Brüchen scheinen die Fertilitätsrate nicht zu mindern. Es wird vermutet, dass es zu Entwicklungsstörungen der Frucht während der Schwangerschaft kommen kann (SAKKAS et al. 1996). TWIGG et al. (1998a, b) untersuchten mit dem NT die Spermienchromatinintegrität in Bezug auf das Vorhandensein von ROS (reactive oxygen species). Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass oxidativer Stress DNA-Strang-Brüche verursacht, bestand keine Korrelation der Ergebnisse des NT mit der Fertilität. Auch konnten keine Grenzwerte für den NT erhoben werden, die eine Prognose bezüglich der Vitalität des Embryos zulassen. Daher wird der NT im Rahmen der klinischen Diagnostik nicht als Fertilitätsparameter anerkannt.

Der TUNEL-Assay dient der Identifizierung von Brüchen ein- und doppelsträngiger DNA. Eingelagerte Marker (Deoxyuridin Triphosphat) werden durch chemische Reaktionen mit bestimmten Enzymen katalysiert und flowzytometrisch (SAILER et al. 1995; SUN et al. 1997), fluoreszenz- oder lichtmikroskopisch (SUN et al. 1997; LOPES et al. 1998) erkannt. Anhand der Untersuchungen mit dem TUNEL-Assay konnte festgestellt werden, dass DNA-Strang-Brüche in enger Korrelation mit reduzierter Spermienqualität, verminderter Fertilität und erhöhter Chromatininstabilität gegenüber Säuredenaturierung in situ stehen (SUN et al. 1997; LOPES et al. 1998).

Beim COMET-Assay unterscheidet man das alkalische (pH > 10) (ARAVINDAN et al. 1997) und das neutrale Verfahren (pH = 9) (EVENSON et al. 2002). Die Spermien sind auf einem Objektträger in einem dünnen Agarose Gel gelöst, werden dann lysiert und einer Elektrophorese unterzogen. Die Färbung erfolgt mit einem DNA-gängigen Fluoreszenzfarbstoff. Die DNA-Fragmente wandern in Richtung Anode (HAINES et al. 1998). Beim alkalischen COMET-Assay wird die DNA denaturiert und somit die Identifizierung von ein- als auch doppelsträngigen DNA-Strang-Brüchen möglich. Im neutralen Verfahren wird die DNA nicht denaturiert, so dass vorwiegend Brüche doppelsträngiger DNA identifiziert werden (SINGH et al. 1988; HAINES et al. 1998; SINGH u. STEPHENS 1998). Klinisch relevante Grenzwerte konnten bisher nicht festgestellt werden. Bei weiterer Optimierung könnte das Verfahren jedoch

einen nützlichen Beitrag im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik leisten (EVENSON et al. 2002).

In neuester Zeit entwickelten FERNÀNDEZ et al. (2003) den Spermienchromatin-Dispersions-Test (SCD). Er dient der fluoreszenz- und / oder lichtmikroskopischen Analyse von Spermien-DNA-Fragmenten. Die Spermien-DNA wird einer Säuredenaturierung unterzogen. Nukleare Proteine werden durch eine lysierende Lösung entfernt, die unter anderem DTT (1,4-Dithiothreit) und SDS (Sodiumdodecylsulfat) enthält. Nicht-fragmentierte DNA bildet einen charakteristischen Hof gestreuter DNA-Schleifen, fragmentierte DNA dagegen nicht. Der SCD soll als prognostisches Hilfsmittel in die andrologische Fertilitätsdiagnostik beim Menschen aufgenommen werden.

2.2.4 Physiologische Einflüsse auf die Spermienchromatinstruktur

Spermienreifung

Während der Spermiogenese führt die Protamination, d.h. der Austausch von Histonen gegen Protamine, zu einer extrem stabilen und engen Packungsdichte hochkondensierten Chromatins reifer Spermien (GOLDBERG et al. 1977; GATEWOOD et al. 1987). Dies ist insbesondere in der Ausbildung von Disulfidbrücken während der Nebenhodenreifung zu begründen (CALVIN u. BEDFORD 1971). In frühen Stadien der Spermatogenese, bzw. vor Ablauf der Protamination, ist das Spermienchromatin aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung gegenüber Denaturierung in situ instabil. Die Chromatinstabilität männlicher Keimzellen von Maus, Hamster, Kaninchen und Rind wurde während verschiedener Stadien der Spermatogenese fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Testikuläre Keimzellen und proximale Nebenhodenkopfspermien zeigten nach Säuredenaturierung in situ und Färbeprozedur mit Akridin Orange zu 100 % rote Fluoreszenz. Mit Voranschreiten der Nebenhodenreifung zeigten die Spermien zunehemend grüne Fluoreszenz,

ausgereifte Spermien des Nebenhodenschwanzes wiesen nur geringe Anteile rotfluoreszierender Spermien auf (KOSOWER et al. 1992; LÖHMER 2003).

Alter

Die Samenqualität ist altersabhängig. Bei Erlangung der Geschlechtsreife entsprechen die Spermienkonzentration und -motilität sowie morphologische Kriterien oftmals nicht der Norm (ELLIOT 1978). Die quantitativen und qualitativen Eigenschaften verändern sich auch mit dem Älterwerden (ALMQUIST u. AMANN 1976). Ähnliche Beobachtungen machte man bei der Spermienchromatinstruktur. Bei Kaninchen der Rasse New Zealand White ist im Alter von ca. 5 Monaten die Anfälligkeit des Spermienchromatins gegenüber Säuredenaturierung höher als im Alter von 6 bis 28 Monaten. Und die Tendenz des vermehrten Auftretens chromatininstabiler Spermien bei 20 bis 28 Monate alten Kaninchen war deutlich gegenüber 6 bis 16 Monate alten Kaninchen (GOGOL et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie bei juvenilen und adulten Bullen (KARABINUS et al. 1990). Jungbullen (ca. 14 Monate alt) wiesen eine höhere Anfälligkeit der Spermienchromatinstruktur gegenüber Säuredenaturieung in situ auf als Bullen im Alter von ca. 4 Jahren. Beim Menschen zeichnete sich die Tendenz ab, dass mit fortschreitendem Alter auch die Anfälligkeit des Spermienchromatins gegenüber Säuredenaturierung in situ steigt (SPANÒ et al. 1998). SUN et al. (1997) und ANGELOPOULOS et al. (1998) konnten beim Menschen hingegen keinen Bezug zwischen der Chromatinstruktur und dem Alter feststellen.

Spurenelemente

Dem Spurenelement Zink kommt sowohl als Wachstumsfaktor als auch für die sexuelle Entwicklung Bedeutung zu (PRASAD et al. 1963). Eine besondere Eigenschaft des Zinks ist sein membran- bzw. proteinstabilisierender Effekt, insbesondere im Spermienchromatin (CHVAPIL 1973). MILLAR et al. (1958) wiesen bei zinkarm ernährten Ratten ein vermindertes Körperwachstum und eine Unterentwicklung verschiedener Organe wie Hoden, Nebenhoden, akzessorische Geschlechtsdrüsen und Hypophyse nach. Es wurden Hoden mit atrophiertem Tubulusepithel gefunden. EVENSON et al. (1980) zeigten bei Mäusen mit Zinkmangelernährung, dass das

Spermienchromatin eine verminderte Resistenz gegenüber Hitzedenaturierung in situ besitzt, was auf eine Abhängigkeit der Chromatinstruktur vom Zinkgehalt hinweist, welcher diätetisch beeinflussbar ist.

Temperatur

Aus der Humanandrologie bestehen Hinweise, dass durch Erhöhung der testikulären Temperatur, hervorgerufen durch hohe Umgebungstemperaturen, die Spermienchromatinstabilität abnimmt. Dies kann für Männer zutreffen, die an Arbeitsplätzen mit Extremtemperaturen tätig sind (Keramik- oder Glasindustrie), die regelmäßig heiße Bäder nehmen oder Jacuzzis und Saunen aufsuchen (ALVAREZ 2003).

Rasse

Beim Rind wird eine mögliche Rasseabhängigkeit der Spermienchromatinstabilität vermutet (GUENIAT VON COURROUX 1988).

Geschlechtliche Aktivität

Die Aussagen über die Auswirkung sexueller Abstinenz auf die Spermienchromatinstruktur sind widersprüchlich. Während SPANÒ et al. (1998) bei Männern mit zunehmender Abstinenz von bis zu sechs Tagen vermehrt chromatininstabile Spermien nachwiesen, konnten EVENSON et al. (1991) und SUN et al. (1997) keinen Einfluss der Sexualkarenz auf die Spermienchromatinstruktur aufzeigen.

2.2.5 Pathologische Einflüsse auf die Spermienchromatinstruktur

Störungen der Spermatogenese

a) „Unterprotamination“

Störungen der Spermatogenese können in einer fehlerhaften Konfiguration oder Zusammensetzung der DNA zum Ausdruck kommen. Chromatinstrukturdefekte, die während der Spermiogenese in Form einer „Unterprotamination“ entstehen, d.h. bei unzureichendem oder fehlendem Austausch von Histonen gegen Protamine, scheinen die DNA-Stabilität zu verringern (BALHORN et al. 1988; BELOKOPYTOVA et al. 1993; DE YEBRA et al. 1993; SAKKAS et al. 1995, 1996). Der Protamingehalt im Spermienchromatin kann mit dem DNA-gängigen Farbstoff Chromomycin A3 (CMA_3) nachgewiesen werden. Ein CMA_3-positives Färbeergebnis spricht für eine stattgefundene Protamination und ermöglicht eine Aussage über den Spermienchromatinstatus und die Erkennung einer Spermatogenesestörung (BIANCHI et al. 1993; SAKKAS et al. 1995).

b) DNA-Strang-Brüche

Während der Spermiogenesephasen werden die DNA-Stränge des anfangs ungeordneten Chromatins durch Endonukleasen an unterschiedlichen Stellen getrennt und wieder zusammengefügt (MC PHERSON u. LONGO 1993). DNA-Strang-Brüche sind typische Merkmale eines Spermienchromatindefektes. Deren Auftreten ist vermutlich in einer unvollständigen Spermienreifung während der Nebenhodenpassage begründet, was zu instabilem Spermienchromatin aufgrund unzureichender Protamination führt (GORCZYCA et al. 1993; MANICARDI et al. 1995; SAILER et al. 1995).

c) Apoptose

Das Vorhandensein von DNA-Strang-Brüchen steht nach GORCZYCA et al. (1993) in enger Beziehung mit dem programmierten Zelltod, welcher tendenziell häufiger in Ejakulaten mit einem erhöhten Anteil chromatindefekter Spermien auftritt als in

Ejakulaten mit chromatinintakten Spermien (MOUSTAFA et al. 2004). Die Apoptose wird durch ein transmembranes Rezeptorprotein namens FAS ausgelöst (LEE et al. 1997b). Sog. FAS-Liganden werden von Sertolizellen exprimiert und binden FAS-positive Stammzellen. Es kommt zum programmierten Zelltod. Auf diese Weise wird eine Überproliferation von Stammzellen verhindert und Zellen, die für die Spermatogenese ungeeignet sind, eliminiert (LEE et al. 1997b; RODRIGUEZ et al. 1997). SAKKAS et al. (1999) beobachteten bei subfertilen Männern prozentual mehr FAS-positive Spermien als bei fertilen Männern. Dabei sprechen sie von „abortive apoptosis“, was meint, dass diese positiv markierten Spermien sozusagen einem ursprünglich programmierten Zelltod entgangen sind.

d) ROS (reactive oxygen species)

Als weitere Störfaktoren der Spermatogenese sind ROS (reactive oxygen species) zu nennen. Dabei handelt es sich um für die Spermienbildung und -funktion (BECKMAN u. AMES 1997), insbesondere im Zusammenhang mit den Vorgängen bei der Befruchtung (GOMEZ et al. 1996), notwendige Oxidantien. Eine Überproduktion von ROS wird durch Antioxidantien kontrolliert bzw. verhindert. Ein erhöhter ROS-Gehalt besteht beispielsweise in Gegenwart von Leukozyten (AITKEN et al. 1992, 1995; ALVAREZ et al. 2002), wie es bei chronischen Infektionen der Fall sein kann, bei Spermien mit Zytoplasmatropfen am Mittelstück (GOMEZ et al. 1996) oder bei Oligozoospermie (AITKEN et al. 1992). Ein ROS-Überschuss führt zu einem Anstieg an DNA-Fragmenten (POTTS et al. 2000; BAUMBER et al. 2003; MOUSTAFA et al. 2004), abnormaler Endonukleaseaktivität und zu apoptischen und nekrotischen Prozessen in den Hoden (EVENSON et al. 2002). Daraus resultieren Spermienfunktionsstörungen und Chromatinstrukturdefekte (EVENSON et al. 2002). Darüber hinaus führt oxidativer Stress vermutlich zu spontanen Mutationen, die ein erhöhtes Krebsrisiko mit sich bringen. Die Diagnose Hodenkrebs geht allerdings nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Anteil chromatininstabiler Spermien einher (FOSSA et al. 1997).

Infektionen, Entzündungen, Wärme

Es wird vermutet, dass auch entzündliche Prozesse mit Bakteriospermie, wie z.B. bei einer Prostatitis, zu einer verminderten Spermienchromatinstabilität führen. Nach antibiotischer Therapie normalisiert sich die Chromatinstruktur wieder (EVENSON et al. 1991). Bei akuten oder chronischen Infektionen der männlichen Geschlechtsorgane und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen treten vermehrt Leukozyten im Ejakulat auf. Bei Leukozytospermie werden mehr chromatininstabile Spermien nachgewiesen als bei Normospermie (ENGH et al. 1992; SPANO et al. 1998; ALVAREZ et al. 2002). Auch generalisierte Infektionskrankheiten scheinen Einfluss auf die Chromatinstruktur zu nehmen, wenn sie mit Fieber einhergehen (EVENSON et al. 2000). Bei Männern mit fiebrigem, grippalem Infekt (Influenza) ist eine erhöhte Anfälligkeit des Spermienchromatins gegenüber Säuredenaturierung in situ nachweisbar. Nach Abklingen der Infektion normalisiert sich die Chromatinstabilität wieder. Als Ursache wird die Erwärmung der Hoden durch das Fieber diskutiert. Auch virale Einflüsse sind nicht auszuschließen.

Bei Wärmeexposition isolierter Hoden über einen längeren Zeitraum ist eine erhöhte Anfälligkeit des Spermienchromatins gegenüber Säuredenaturierung in situ über Tage nach der Exposition zu verzeichnen (VOGLER et al. 1991; KARABINUS et al. 1997; SAILER et al. 1997; LOVE u. KENNEY 1999; ACEVEDO 2001; ACEVEDO et al. 2001). Der Hitzestress interferiert schon während der Spermatogenese mit den männlichen Keimzellen und führt zudem zu verminderter Motilität und morphologischen Kopfveränderungen (VOGLER et al. 1991; ACEVEDO 2001; ACEVEDO et al. 2001). Die Erwärmung der Hoden scheint keine Auswirkungen auf die Spermienreifung im Nebenhoden zu haben, da der Anteil sekundärer Formabweichungen der Spermien gering ist (VOGLER at al. 1993). SAILER et al. (1997) untersuchten verschiedene Keimzellstadien der Spermatogenese von Mäusen bei unterschiedlichen Temperaturen. Ab einer Temperatur von 42°C konnten keine Spermien aus dem Nebenhodenschwanz mehr gewonnen werden, weil die Spermatogenese temperturbedingt zum Erliegen kam. Nach Befruchtung mit Spermien wärmeexponierter Hoden war eine reduzierte Embryonalentwicklung (SETCHELL et al. 1998) und erhöhte frühembryonale Mortalität zu beobachten (SAACKE et al. 1994, 1998).

Toxikologische Einflüsse

Über die Auswirkungen medikamentöser Behandlungen auf das Spermienchromatin ist bisher wenig bekannt. Kortisongaben scheinen die Spermienchromatinstruktur zu beeinträchtigen (EVENSON et al. 1991). Ebenso können leistungssteigernde Zusatzstoffe ein Gefahrenpotential für die Fertilität darstellen. So wurde bei einem Hengst zwei Monate nach Absetzen eines solchen Zusatzstoffes ein Abfall des COMPα_t-Wertes von anfangs 48 % auf 10 % festgestellt (KENNEY et al. 1995). Acetaminophen wird in Medikamenten mit analgetischer und antipyretischer Wirkung verwendet. Bei Überdosierungen dieses Stoffes kommt es zu hepatischen Nekrosen und genotoxischen Effekten. Später stellt sich eine Hemmung der DNA-Replikation und eine Gewichtsabnahme der Hoden ein. Über einen befristeten Zeitraum ist nach Gabe von Acetaminophen auch eine erhöhte Anfälligkeit der Spermienchromatinstruktur gegenüber Säuredenaturierung in situ nachweisbar (WIGER et al. 1995). Gasförmige Umweltkontaminanten stellen für die Gesundheit von Mensch und Tier in verschiedenster Hinsicht ein Risiko dar. Toxische Stoffe wie Zeranol, Hydroxycarbamide oder Methyl-Methansulfonate können Chromatindefekte und teilweise testikuläre Gewichtsabnahmen hervorrufen (BALLACHEY et al. 1986b; EVENSON u. JOST 1993; EVENSON et al. 1993). Der Grad der Schädigung ist dosisabhängig und nimmt mit anhaltender Dauer der Gabe zu. Zeranol führt zu einer gestörten Spermatogenese (BALLACHY et al. 1986b). Hydroxycarbamide bewirken vermutlich eine Inhibition der DNA-Synthese mit Veränderungen der Chromatinstruktur und der Spermienkopfmorphologie (EVENSON u. JOST 1993).

Alkoholkonsum scheint keinen Effekt auf das Spermienchromatin zu haben (SPANÒ et al. 1998). Raucher wiesen sogar eine erhöhte Spermienchromatinstabilität auf (SPANÒ et al. 1998). SUN et al. (1997) hingegen stellten bei Rauchern einen erhöhten Anteil an DNA-Strang-Brüchen fest.

Ultraschall, Röntgen, Radioaktive Strahlen

Ultraschallbehandlungen haben keinen Einfluss auf die Spermienchromatinstruktur von Mensch und Ratte gezeigt (EVENSON et al. 1985; EVENSON et al. 1991). Die Auswirkung diagnostischer Strahlendosen ist fraglich. Mit steigenden Dosen führen

Röntgenstrahlen und radioaktive Substanzen wie Indium zur Schädigung des Spermienchromatins von Mäusen (HAINES et al. 2001). AHMADI und NG (1999) konnten bei Männern eine Chromatinschädigung durch Gamma-Strahlung nachweisen. Der Defekt nahm mit steigender Dosis zu.

2.2.6 Das Spermienchromatin als Fertilitätsindikator

Der Untersuchung der Spermienchromatinstruktur wird im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik beim Mann ein hoher Stellenwert eingeräumt. Schon 1980 konnten EVENSON et al. mit Hilfe des SCSA bei subfertilen Individuen (Mensch, Maus, Rind) eine höhere Anfälligkeit des Chromatins gegenüber Denaturierung in situ nachweisen als bei Spermien fertiler Individuen. Männer, die bereits Nachkommen gezeugt hatten, wiesen einen höheren Anteil grünfluoreszierender Spermien auf als Männer, die nach mehreren Versuchen noch keine Schwangerschaft erzielt hatten (PELUSO et al. 1992). Die Samenqualität wird anhand der klassischen Parameter wie Volumen, Dichte, Morphologie und Motilität bewertet (YANAGIMACHI 1988). Für den Menschen gelten die Richtwerte der WHO (1999). Laut NIESCHLAG (2000) können mit Hilfe der klassischen Spermatologie mindestens 30 % der Infertilitätsfälle bei Männern nicht geklärt werden. Bei Männern mit idiopathischer Infertilität konnte in vielen Fällen ein Chromatindefekt mit erhöhten Anteilen chromatininstabiler Spermien gegenüber Säuredenaturierung in situ festgestellt werden (EVENSON et al. 1991, 2002; SALEH et al. 2002). Studien bei Mensch (EVENSON u. MELAMED 1983; EVENSON et al. 1984), Rind (EVENSON et al. 1980) und Maus (EVENSON et al. 1985) haben gezeigt, dass die Chromatinstruktur mit Störungen der Spermatogenese, morphologisch anormalen Spermien und Infertilität assoziiert ist. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen einem Spermienchromatindefekt und Samenqualitätsparametern besteht, wird kontrovers diskutiert. Beim Menschen (EVENSON et al. 1991; ENGH et al. 1992), beim Rind (GUENIAT VON COURROUX 1988) und beim Pferd (KENNEY et al. 1995) wurden signifikante Korrelationen zwischen der Vorwärtsmotilität und erhöhten Prozentsätzen chromatininstabiler Spermien festgestellt.

Auch zwischen der Spermienkonzentration und einem erhöhten Prozentsatz chromatininstabiler Spermien des Menschen bestand eine signifikante Korrelation (EVENSON et al. 1991; ENGH et al. 1992). Nach ENGH et al. (1992) und GUENIAT VON COURROUX (1988) wurde zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Anteil membrangeschädigter Spermien von Mensch und Rind eine positive Korrelation festgestellt. Des Weiteren wurden signifikante Korrelationen zwischen dem Anteil morphologisch abweichender Spermien und der Chromatininstabilität beim Menschen (IBRAHIM u. PEDERSEN 1988; EVENSON et al. 1991; CLAASSENS et al. 1992; ENGH et al. 1992), beim Pferd (KENNEY et al. 1995) und bei der Katze (PENFOLD et al. 2003) gefunden. Beim Menschen war nach TEJADA et al. (1984) und EVENSON et al. (1991) der Anteil chromatininstabiler Spermien mit dem Anteil kopfmorphologisch abweichender Spermien signifikant korreliert. Dagegen konnten BALLACHEY et al. (1986a) bei ingezüchteten Mäusen, DOBRINSKI et al. (1994) beim Rind und HAMMADEH et al. (1996) und SPANÒ et al. (2000) beim Menschen keine Relationen zwischen der Spermienchromatinstruktur und Samenqualitätsparametern verzeichnen. Da das Chromatin im Spermienkopf lokalisiert ist, liegt es nahe, die Kopfmorphologie in Relation zum Spermienchromatin zu betrachten. Ein erhöhter Anteil an Spermien mit missgebildeten Köpfen und Kratern führte häufiger zur Entstehung von Embryonen geringer Qualität und zu schlechten Fertilisationsraten als Spermien mit physiologischen Kopfformen (MILLER et al. 1982; DE JARNETTE et al. 1992; SAACKE et al. 1994). Mäuse, bei denen Spermienkopfanomalien durch chemische Behandlungen induziert wurden, zeigten erhöhte COMPα_t-Werte (EVENSON et al. 1985, 1986). Vakuolen im Kopfbereich scheinen geradezu ein Indikator für Chromatindefekte zu sein (ACEVEDO 2001). Die selten vorkommende Globozoospermie beim Menschen ist durch runde Nuklei und Fehlen des Akrosoms und der postakrosomalen Hülle charakterisiert. Zudem sind Anomalien der Mitochondrien, des Mittelstücks und der nuklearen Scheide ebenso mit der Globozoospermie assoziiert (SCHIRREN et al. 1971; HOLSTEIN et al. 1973; PEDERSEN u. REBBE 1974). In einem Fall mit totaler Globozoospermie konnten LARSON et al. (2001) bei einem 36-jährigen Mann keinen erhöhten Anteil chromatininstabiler Spermien feststellen. Kopfmorphologische Abweichungen müssen nicht

zwangsläufig mit Chromatindefekten einhergehen (ROUX u. DADOUNE 1989). Und Spermien mit physiologischer Kopfform können auch beeinträchtigtes Chromatin aufweisen (DADOUNE et al. 1988; MARTIN u. RADEMAKER 1988; LIU u. BAKER 1992). Aus Volumenmessungen mittels eines Atomic Force Mikroskops konnte ermittelt werden, dass das Spermienchromatinvolumen auch bei Spermienkopfanomalien konstant ist, unabhängig vom DNA-Gehalt und seiner Struktur (LEE et al. 1997a). Aus Studien, in denen Akridin Orange und die Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz kamen, liegen beim Menschen kontroverse Ergebnisse bezüglich einer Prognose für das Fertilitätspotential und die Schwangerschaftsrate vor. LIU und BAKER (1992) und HOSHI et al. (1996) sprechen dem AOT eine hohe Aussagekraft bezüglich des Fertilitätspotentials zu. Ähnliches betrifft die Korrelation mit der Schwangerschaftsrate (TEJADA et al. 1984; HOSHI et al. 1996). Bei ≥ 50 % grünfluoreszierenden Spermien kam es immer zu einem erfolgreichen IVF-Ergebnis (HOSHI et al. 1996). Bei < 50 % grünfluoreszierender Spermien waren hingegen nur 39 % der IVF-Behandlungen erfolgreich. Eine Schwangerschaft konnte bei < 50 % grünfluoreszierender Spermien weder nach IVF noch nach ICSI aufrecht erhalten werden. SPANÒ et al. (2000) stellten beim Menschen fest, dass bei > 20 % chromatininstabiler Spermien die Befruchtungsfähigkeit in vivo sinkt bzw. ab 40 % kaum mit einer Befruchtung zu rechnen ist. EVENSON et al. (2002) legten für den Menschen folgende Grenzwerte für den DFI (Defragmentierungsindex) im SCSA fest (Tab. 1):

Tab. 1: Grenzwerte für den DFI im Hinblick auf den Fertilitätsstatus nach EVENSON et al. (2002)

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

Beobachtungen bei verschiedenen Tierarten gaben Grund zu der Annahme, dass die embryonale Entwicklung nach Befruchtung mit qualitativ herabgesetztem Sperma (geringer Anteil vitaler Spermien, erhöhter Anteil morphologisch veränderter Spermien) im Frühstadium vor der Implantation gestört ist, so dass eine Trächtigkeit nicht nachweisbar ist (COUROT u. COLAS 1986; BARTH 1992; DE JARNETTE et al. 1992). Bei Spermien mit geschädigtem Chromatin konnten geringere Befruchtungsraten sowie Teilungsraten der Blastozysten im IVF-Versuch verzeichnet werden (SUN et al. 1997). An Besamungsbullen konnte ebenso gezeigt werden, dass bei einer Gruppe subfertiler Bullen die Morula- und Blastozystenrate geringer war als bei einer Gruppe hochfertiler Bullen. Die Oozytenpenetrationsrate zeigte dagegen bei beiden Gruppen keine Unterschiede (PARRISH u. EID 1994). Nach LÖHMER et al. (2003) wiesen in der IVF Bullenspermien mit niedrigen Gehalten an Chromatindefekten signifikant höhere Teilungsraten auf.

In der Pferdezucht ist die Trächtigkeitsrate (Anzahl tragender Stuten / Anzahl besamter Stuten) kein brauchbarer Fertilitätsparameter, welcher zudem gerade bei jungen Hengsten im ersten Zuchteinsatz nicht vorliegt. Darüber hinaus ist die Anzahl der Zuchteinsätze häufig zu gering, um eine statistische Aussage über die Fruchtbarkeit treffen zu können. Der SCSA ist als geeigneter Fruchtbarkeitsparameter für tiefgefrorenes Pferdesperma zu bewerten, da die Motilität und Morphologie der Spermien nach dem Auftauen nur in sehr geringem Maße für die Fertilitätsprognose von Bedeutung sind (DI GRASSIE 2000).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Versuchstiere

Es kamen elf institutseigene Beaglerüden im Alter zwischen einem Jahr und neun Jahren zum Einsatz. Sie wurden in Vierer- und Fünfergruppen im Zwinger auf Pflastersteinen gehalten. Dort stand ihnen ein Auslauf im Freien und eine mit Stroh eingestreute Schutzhütte zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit einem handelsüblichen Trockenfutter. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.
Außerdem gingen 31 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von einem Jahr bis acht Jahren in die Untersuchungen ein. Von vier dieser Rüden wurde ausschließlich Tiefgefriersperma verwendet. Die Hunde stammten aus Privathaushalten und wurden bis auf ein Liebhabertier als Zuchthunde gehalten. Alle Rüden waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen in einem guten allgemeinen Gesundheits- und Pflegezustand.

3.2 Methoden

3.2.1 Materialien

Der für die Untersuchungen benötigte Laborbedarf, Chemikalien und Rezepte zur Herstellung von Lösungen und die Einstellungen für die Software zur computergestützten Auswertung des mfSCSA sind im Anhang (Kap. 9.1 bis 9.4.4) aufgeführt.

3.2.2 Andrologische Untersuchung incl. Samengewinnung

Jedes Tier wurde im Rahmen der andrologischen Untersuchung wie bei GÜNZEL-APEL (1994) beschrieben auf seine Allgemeingesundheit, phänotypische genitale Erbgesundheit, Geschlechtsgesundheit, Potentia coeundi (Begattungspotenz) und Potentia generandi (Befruchtungspotenz) untersucht. Vorab wurden die Kennzeichen der Tiere aufgenommen, das Körpergwicht ermittelt und ein Vorbericht bezüglich der Zuchteinsätze und des Deckverhaltens sowie evtl. vorausgegangener Allgemein- und Genitalerkrankungen und Therapien erhoben. Die Samengewinnung erfolgte wie bei KRAUSE (1965) und GÜNZEL-APEL (1994) beschrieben. Zur sexuellen Stimulation wurde den Rüden Gelegenheit gegeben, mit einer läufigen Hündin Kontakt aufzunehmen. An einem ruhigen Ort erfolgte die Samenentnahme in Form einer fraktionierten Ejakulatgewinnung durch manuelle Stimulation (Massage) und Fixation des Penis. Vorsekret, spermienreiche Phase, spermienarme Phase und spermienfreie Phase (Prostatasekret) wurden in tulpenförmigen, graduierten auf 38°C vorgewärmten Samenauffanggläsern getrennt gewonnen.

3.2.3 Samenuntersuchung

Die Untersuchung des Nativsamens beinhaltete gemäß der von KRAUSE (1965) und GÜNZEL-APEL (1994) beschriebenen Vorgehensweise die Erfassung klassischer Ejakulatparameter. Zur Beurteilung der erhobenen Daten wurden die von GÜNZEL-APEL (1994) erarbeiteten Normrichtwerte für die einzelnen Ejakulatparameter herangezogen. Die Normrichtwerte sind im Anhang (Kap. 9.5) aufgeführt und dienten als Beurteilungsgrundlage für die Diagnosestellung von Normospermie und Dysspermie. Rüden mit Normospermie galten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als befruchtungspotent, bei vorliegender Dysspermie wurde von einer mehr oder weniger herabgesetzten Befruchtungspotenz ausgegangen (aus WEITZE 2001).
Makroskopisch wurde von jedem Ejakulat das Volumen (ml), die Konsistenz und die Farbe aller Phasen bestimmt. In der mikroskopischen Samenuntersuchung wurden

folgende klassische Samenqualitätsparameter bestimmt: Spermienkonzentration (Mio./ml) und Spermiengesamtzahl (Mio.), Anteile vorwärts-, orts- und unbeweglicher Spermien (%) durch mikroskopische Schätzung, Anteil an Spermien mit geschädigter Plasmamembran (sog. tote Spermien) mit Eosin (%) und Anteil formabweichender Spermien (%). Darüberhinaus fanden moderne spermatologische Parameter wie die computergestützte Motilitätsanalyse (CMA) und die Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumiodid (PI) Anwendung.

3.2.3.1 Bestimmung der Spermienkonzentration (Samendichte) und Spermiengesamtzahl

Für die Dichtebestimmung wurde zunächst aus 10 ml einer 10 %igen NaCl-Lösung der Volumenanteil entnommen, der anschließend an Sperma hinzugefügt wurde. Das Spermavolumen wurde je nach makroskopischem Aussehen (rahmähnlich, rahmähnlich bis milchig, milchig, milchig bis molkig, molkig, molkig bis wässrig) zwischen 10 und 200 µl bestimmt und in 10 %iger NaCl-Lösung gelöst. Es wurde ein ca. 2 µl großer Tropfen des suspendierten Spermas in eine Zählkammer nach Thoma „neu“ pipettiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch bei 400-facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurden im unteren und oberen Zählkreuz die Spermienköpfe jeweils in fünf großen Quadraten gezählt und addiert. Die auf zwei Begrenzungslinien eines Quadrates befindlichen Spermienköpfe wurden mitgezählt. Die Berechnung der Dichte in Millionen pro ml (x 10^6/ml) erfolgte nach folgender Formel: Summe ausgezählter Spermien / ausgezählte Fläche x Kammerhöhe x Verdünnungsgrad. Dann wurde die Spermiengesamtzahl (x 10^6) durch Multiplikation von Volumen und Dichte der spermienreichen Phase ermittelt.

3.2.3.2 Bestimmung der mikroskopisch geschätzten und computergestützt ermittelten (CMA) Spermienmotilität

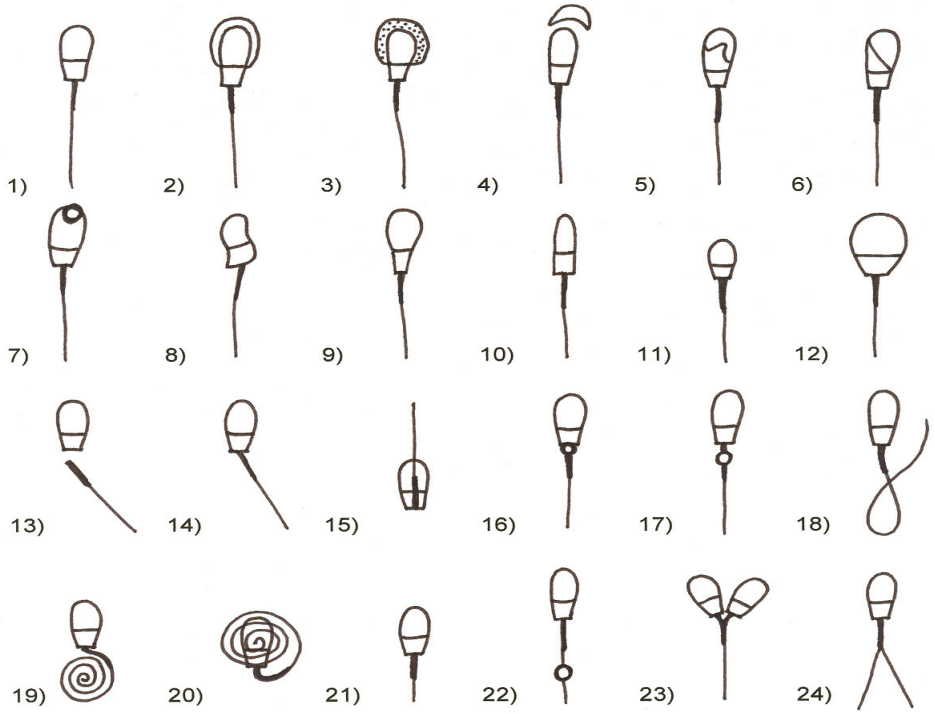
Es wurde der prozentuale Anteil vorwärts-, orts- und unbeweglicher Samenzellen der spermienreichen Phase ermittelt. Für die mikroskopische Schätzung der Spermienmotilität wurde ein etwa senfkorngroßer Tropfen der zu untersuchenden Probe auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) bedeckt. Die Untersuchung erfolgte an einem Phasenkontrastmikrokop mit Heiztisch (38°C) bei 160-facher Vergrößerung. Die Glaspipetten, Objektträger und Deckgläschen wurden auf einem Heiztisch bei 38°C vorgewärmt.
Zur Durchführung der computergestützten Motilitätsmessung wurde zunächst ein Teil der spermienreichen Phase mit einer TRIS-Stammlösung (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.2) auf 100 Mio. Samenzellen / ml verdünnt. Es wurde ein ca. 2 µl großer Tropfen der zu untersuchenden Probe in die Mika-Zählkammer eingefüllt und unter einem Phasenkontrastmikroskop [Olympus BH 2 mit Heiztisch (39°C)] bei 200-facher Vergrößerung betrachtet und mittels des Cell Motion Analyzer® 2.0 Programms ausgewertet. Die Anlage für den CMA (Cell Motion Analyser) ist im Anhang (Kap. 9.1) aufgeführt. Das Mikroskopbild wurde über eine Schwarz-Weiß-Videokamera live auf einen Computerbildschirm übertragen. Es wurde das Bewegungsmuster von mindestens 200 Zellen computergestützt ausgewertet. Dabei fanden folgende Parameter Berücksichtigung: Anteil vorwärtsmotiler Spermien in % (MS), die Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende in µm / sec (Velocity Straight Line, VSL), die Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn in µm / sec (Velocity Averaged Path, VAP) und die Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn in µm / sec (Velocity Curve Line, VCL). Pipettenspitzen und die Mika-Zählkammer wurden auf einem Heiztisch bei 38°C vorgewärmt.

3.2.3.3 Lebend-Tot-Färbung mit Eosin und Propidiumiodid

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils lebender und toter bzw. membrangeschädigter Spermien wurde eine Färbung der Spermien mit Eosin sowie eine Fluoreszenzmarkierung der Spermien mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt.
Die Färbelösung für die Eosinfärbung wurde aus einer 2 %igen Eosinlösung und einer 3 %igen wässrigen tri-Natriumcitrat-Dihydratlösung hergestellt. Auf einem vorgewärmten Objektträger (38°C) wurden zwei Tropfen der Färbelösung mit einem Tropfen Sperma vermischt, ausgestrichen und luftgetrocknet. Es erfolgte die Auszählung von 200 Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch bei 400-facher Vergrößerung. Ungefärbte Zellen galten als membranintakt.
Zur Herstellung der Propidiumiodidlösung wurden 0,5 mg Propidiumiodid in 1 ml Aqua dest. gelöst (HARRISON u. VICKERS 1990) und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Lichtausschluss bei -18°C aufbewahrt. Vor jedem Färbevorgang wurde die PI-Lösung unter Lichtausschluss bei 37°C aufgetaut. 485 µl des mit TRIS-Stammlösung (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.2) auf 100 Mio. Spermien / ml verdünnten Spermas, 10 µl Formolcitrat (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.1) und 5 µl Propidiumiodidlösung wurden in ein mit Aluminiumfolie ummanteltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Differenzierung von 200 Zellen erfolgte in einem abgedunkelten Raum am Fluoreszenzmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Axioskop, Fa. Zeiss, Jena) bei 400-facher Vergrößerung unter Verwendung eines 560 nm-Filters. Rotfluoreszierende Zellen wurden als membrandefekt beurteilt.

3.2.3.4 Spermienmorphologie

Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurden einige Tropfen der spermienreichen Phase in 300 µl Formolcitrat (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.1) fixiert. Daraus wurde ein ca. 2 µl großer Tropfen auf einen Objektträger gegeben. Dieser wurde mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Untersuchung erfolgte nach kurzem Warten, bis alle Zellen auf dem Objektträger plan lagen, unter einem Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch bei 1000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Ölimmersionslösung. Es wurden 200 Zellen bewertet. Die Beurteilung schloss Kopfkappen-, Kopf-, Hals-, Verbindungsstück-, Haupt- und Endstückveränderungen sowie Doppel- und Mehrfachmissbildungen ein (Abb. 2).



1) normale Kopfkappe, normale Kopfform

Kopfkappenveränderungen
2) geschwollen
3) in Ablösung
4) abgelöst
5) deformiert
6) schief
7) persistierendes Akrosomgranulom

Kopfveränderungen
8) deformiert
9) verjüngt
10) schmal
12) Zwergkopf
13) Riesenkopf

Halsveränderungen
13) Halsbruch
14) paraxialer Schwanzansatz
15) retroaxialer Schwanzansatz
16) Plasmatropfen

Verbindungsstückveränderungen
17) Plasmatropfen

Haupt- und Endstückveränderungen
18) Schleifenform
19) aufgerollt
20) um den Kopf gerollt
21) rudimentär
22) Plasmatropfen

Doppel- und Mehrfachmissbildungen
23) Doppelkopf mit einem Schwanz
24) einköpfiger Zwillingsschwanz

Abb. 2: Schematische Darstellung veränderter Spermienformen (nach WEITZE 2001)

3.2.4 Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA)

Der von EVENSON et al. (1980) etablierte Spermienchromatinstruktur Assay (SCSA) stellt ein flowzytometrisches Verfahren dar. Daraufhin folgten von TEJADA et al. (1984), KOSOWER et al. (1992) und ACEVEDO (2001) neue Verfahren, in denen die Chromatinstruktur fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden konnte. Der in der vorliegenden Studie verwendete modifizierte fluoreszenzmikroskopische Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA) wurde in Anlehnung an das von ACEVEDO (2001) beschriebene Verfahren entwickelt. Die Versuche wurden mit Nativsperma, aufgetautem schockgefrorenem Sperma und Tiefgefriersperma durchgeführt. Die für den mfSCSA zur Herstellung von Lösungen notwendigen Rezepte sind im Anhang (Kap. 9.3.3) aufgeführt. Das Protokoll ist in folgende Abschnitte gegliedert:

A) Vorbereitung der Spermaprobe

1. Abfüllen des Samens

Zuerst wurde eine Spermaprobe mit einem definierten Volumen in ein Zentrifugenröhrchen mit konisch zulaufendem Boden pipettiert. Es wurden 200 µl Nativsamen aus der spermienreichen Phase entnommen bzw. 150 µl aufgetautes Sperma einer schockgefrorenen Probe bzw. 1000 µl aufgetautes Tiefgefriersperma (enspricht zwei mittleren Pailletten). Schockgefrorenes Sperma wurde bei 37°C aufgetaut, Tiefgefriersperma wurde vom Stickstoff direkt in ein bei 38°C vorgewärmtes Wasserbad überführt und dort für 30 sec eingetaucht.

2. Waschen der Spermaprobe

Das abgemessene Spermavolumen wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit konisch zulaufendem Boden pipettiert. Darauf wurden 2 ml Natriumcitratpuffer 2,9 % (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.3.1) hinzugefügt. Die Suspension wurde bei 2700 g (3500 U / min.) und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer

Wasserstrahlpumpe bis auf ca. 50 µl abgesaugt. Das Pellet wurde erneut mit 2 ml Natriumcitratpuffer 2,9 % resuspendiert und ein zweites Mal wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in dem verbleibenden Überstand von ca. 50 µl bis zur vollständigen Auflösung resuspendiert.

3. Anfertigung der Ausstriche

Superfrost®plus Objektträger (Fa. Roth, Karlsruhe) wurden mit einem lösungsmittelfesten Stift mit den erforderlichen Daten [Rufname des Rüden, Nr. des Objektträgers, Spermaart (nativ, schockgefroren, tiefgefroren), Datum] beschriftet. Auf jeden Objektträger wurde ein ca. 10 µl großer Probentropfen pipettiert. Dieser Tropfen wurde mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) ausgestrichen und für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) luftgetrocknet.

B) Dekondensation des Spermienchromatins

Für die folgenden Arbeitsschritte (Abschnitte B bis D) ist aufgrund der gesundheitsschädlichen bzw. toxischen Wirkung von DTT (1,4-Dithiothreit), Methanol und Akridin Orange das Arbeiten unter einem Abzug unter Verwendung von Atemschutzmasken und Handschuhen notwendig. Mit Ausnahme der Färbelösung mit Akridin Orange und Carnoy's solution (pH 2), welche für jeden Färbedurchgang frisch angesetzt wurden, wurden die Lösungen zwei bis drei Wochen (s. Anhang, Kap. 9.3.3) verwendet und anschließend verworfen. Sie wurden im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt.

1. DTT-DMSO-Gebrauchslösung zur Dekondensation des Spermienchromatins

Rezepturbeispiel für ca. 30 ml Lösung:

0,023g DTT wurden in ein Becherglas gegeben und mit 30 ml Natriumcitratpuffer unter kurzem Schwenken gelöst (DTT-Konzentration: 5 mmol / l). Danach wurde DMSO (1mmol / l) mit Aqua bidest. (1,75 mmol / l) gesättigt. In einem Reagenzglas wurden 2130 µl DMSO gegeben [30* x 71µl, entspricht 30* x 1 mmol DMSO],

darauf wurde mit 945 µl Aqua bidest. versetzt [30* x 1,75 x 18 µl, entspricht 30* x 1,75 mmol Aqua bidest.]. Das Reagenzglas wurde mit einem Stopfen verschlossen und kurz geschwenkt. Nach Ablauf der exothermen Reaktion und deutlichem Abkühlen wurde die DMSO-Lösung zur Natriumcitratpuffer-DTT-Lösung gegeben und diese Gebrauchslösung erneut kurz geschwenkt.

* = die als Multiplikationsfaktor eingesetzte Zahl 30 entspricht der verwendeten Natriumcitratpuffermenge von 30 ml

2. Beschichtung der Objektträger mit der DTT-DMSO-Gebrauchslösung

Die Ausstriche wurden waagerecht auf einem Reagenzglasständer positioniert und der Reihe nach mit jeweils 2 ml der hergestellten Lösung beschichtet, so dass die Proben vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die Einwirkzeit betrug 40 Minuten.

3. Waschen der Objektträger

Nach 40 Minuten wurde die Gebrauchslösung der Reihe nach von den Objektträgern abgegossen und vorsichtig mit Natriumcitratpuffer 2,9 % aus einer vorbereiteten Spritzflasche nachgespült. Die Objektträger wurden für 10 Minuten in eine mit Natriumcitratpuffer 2,9 % gefüllte Färbeküvette verbracht. Anschließend wurden die Objektträger nacheinander aus der Pufferlösung entnommen, deren Rückseiten mit Zellstoff abgetrocknet und fast senkrecht auf einer saugfähigen Unterlage für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) luftgetrocknet.

C) Säuredenaturierung

Für die Säuredenaturierung der Spermien-DNA wurden die Ausstriche in einem abgedunkelten Raum für 120 Minuten in eine mit Carnoy's solution (Rezept s. Anhang, Kap. 9.3.3.2) gefüllte Färbeküvette verbracht. Wichtig war, das in der Küvette befindliche Essigsäure-Methanol-Gemisch vorher gut umzurühren, da die Essigsäure sonst aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichts teilweise am Boden verbleibt. Nach

ca. 1h wurde die für die Akridin-Orange-Lösung vorgesehene Färbeküvette in ein Gefrierfach bei -18°C gelegt und vorgekühlt. Eine weitere Küvette wurde mit Natrium-citratpuffer 2,9 % beschickt und im Kühlschrank bei 5°C vorgekühlt. Ungefähr 10 Minuten vor Ablauf der Säurezeit wurde die Farblösung, bestehend aus 40 ml Citronensäure-Stammlösung, 2,5 ml di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung und 10 ml Akridin Orange (AO) Stammlösung, unter weitestgehendem UV-Lichtausschluss in der aus dem Gefrierfach vorgekühlten Färbeküvette hergestellt. Die Lösungen wurden bei 5°C vorgekühlt. Die Rezepte zur Herstellung der benötigten Lösungen [0,1-molare Citronensäure-Stammlösung, 0,3-molare di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung und Akridin Orange (AO) Stammlösung] sind im Anhang (Kapitel 9.3.3.3 bis 9.3.3.5) aufgeführt. Schließlich wurden die Objektträger aus der Carnoy's solution entnommen, an der Rückseite mit Zellstoff abgewischt und bei guter Belüftung auf einer saugfähigen Unterlage fast senkrecht stehend unter dem Abzug für ca. 2 Minuten getrocknet.

D) Färbung mit Akridin Orange

Unter weitestgehendem UV-Lichtausschluss wurden die Objektträger für 14 Minuten in die gekühlte, mit der frisch angesetzten Akridin-Orange-Farblösung gefüllte Färbe-küvette gesetzt. Nach kurzem Abtrocknen von Rückseiten und Seitenkanten wurden sie für 10 Minuten in den vorgekühlten Natriumcitratpuffer 2,9 % umgesetzt. Danach wurden die Ausstriche entnommen, an den Rückseiten abgetrocknet und unter weitestgehendem UV-Lichtausschluss bei Raumtemperatur für ca. 10 Minuten getrocknet. Die Lagerung der getrockneten Ausstriche erfolgte in einem ge-schlossenen Präparatekasten unter UV-Lichtausschluss im Kühlschrank bei 5 °C.

3.2.4.1 Computergestützte Auswertung

Die Untersuchung der Ausstriche erfolgte in einem abgedunkelten Raum mittels Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Fa. Zeiss, Jena), das über eine Digitalkamera (Fa. Olympus, Hamburg) mit einem Computer verbunden war, an den zwei Monitore angeschlossen waren. Die Anlage zur Auswertung für den mfSCSA ist im Anhang (Kap. 9.1) aufgeführt. Die Phasenkontrasteinstellung des Mikroskops betrug Ph 2, die Vergrößerung war 400-fach. Die Ausstriche wurden unter Verwendung eines blauen Lasers von 490 nm untersucht. Dadurch wurde Licht der Wellenlänge 560 nm (grün = doppelsträngige DNA) und 640 nm (rot = einsträngige DNA) emittiert. Mit dem Programm AnalySIS® 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) wurden mindestens 500 Zellen pro Ausstrich ausgewertet.

a) Einstellung der Geräte

Die auf dem Fluoreszenzmikroskop befindliche Digitalkamera wurde auf dessen Objektiv x40 kalibriert. Die Belichtungszeit betrug 59 ms, die Lichtempfindlichkeit ISO 200. Die Bildaufnahme erfolgte mit der höchsten Auflösung, Super High Quality (2776 x 2074 Pixel). Zur Korrektur von Farbstichen im Echtfarbbild wurde der manuelle Weißabgleich, bestehend aus den drei Korrekturfaktoren Rot, Grün und Blau (s. Anhang, Kap. 9.4.3), standardisiert. Nach Erstellen eines Bildes wurde der Vergrößerungsfaktor in µm gesetzt. Die Einstellung der Digitalkamera erfolgte mittels der Software AnalySIS® 3.0. Mit diesem Programm konnte die Klassifizierung roter und grüner Spermien auf zwei Monitoren dargestellt werden. Ein Monitor diente der Live-Bild-Übertragung, der zweite Monitor stellte die Aufnahmen als Vollbild um das 56 %-fache vergrößert dar.

b) Auswertung der Ausstriche

Die genauen Softwareeinstellungen zur Klassifizierung und Detektion sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 9.4).

- Klassifikation der Spermien

Die Spermien wurden nach zwei Klassen unterschieden: Klasse 1 entsprach den rotfluoreszierenden Spermien (denaturierte, einsträngige DNA = s-DNA). In Klasse 2 wurden die grünfluoreszierenden Spermien (doppelsträngige DNA = d-DNA) erfasst. Jede Klasse wurde durch einen oberen und einen unteren Grenzwert bezüglich des Rot- und des Grünanteils in sog. Farbschwellwertdateien definiert.

- Detektion der Spermien

Die Spermien konnten wahlweise durch individuelle Auswertung einzelner Bilder oder über ein Automatisierungssystem detektiert werden. Dieses durch einen gelben Trichter gekennzeichnete System war in der Lage, bis zu 10 Fotos gleichzeitig auszuwerten. Die Differenzieung roter und grüner Spermien wurde durch ein digitales Overlay unmittelbar nach der Detektion im Vollbild sichtbar. Das Overlay markierte grünfluoreszierende Spermien grün und rotfluoreszierende Spermien rot, wobei die einzelnen Zellen je nach Klasse (1 und 2) nummeriert waren. Zur Kontrolle der Richtigkeit der Detektion konnte das Overlay entfernt und anschließend wieder hinzugefügt werden. Die Erfassung kleiner Schmutzpartikel wurde durch Festlegung der minimalen Pixelzahl für die detektierte Fläche ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Detektion wurden in tabellarischer Form in Prozent für die jeweilige Spermienklasse angegeben und konnten gegebenenfalls direkt in Excel überführt werden.

- Farbschwellwertdateien

Zur Definition eines oberen und unteren Grenzwertes des Rot- und Grüngehalts der jeweiligen Klasse wurde anhand eines digitalisierten Bildes ein Farbintensitätsprofil erstellt. Der Rot- und Grünanteil der Spermien wurde auf der y-Achse an den Peaks der roten und grünen Spermien abgelesen und festgelegt. Die Messwerte wurden unter der Funktion „Farbschwellwerte setzen“ eingesetzt und gegebenenfalls abgespeichert. Die beiden am häufigsten verwendeten Farbschwellwertdateien sind im Anhang (Kap. 9.4.4) aufgeführt.

c) Der SCSAT- und SCSAK-Wert

Alle Ausstriche wurden mit zwei mfSCSA-Werten ermittelt. Der zuerst durch computergestützte Analyse ermittelte SCSA**T**-Wert („T“ steht für Trichter) wurde anschließend durch visuelle Beurteilung überprüft und gegebenenfalls korrigiert (SCSA**K**-Wert). Dabei wurden eng beieinander liegende Spermienköpfe, die vom Computer als ein Partikel identifiziert worden waren, als einzelne Zellen gezählt. Die sich daraus ergebende Anzahl zusätzlicher Spermien wurde auf den SCSAT-Wert aufgeschlagen. Ferner wurden Spermien, die vom Computer sowohl als grün als auch als rot klassifiziert wurden, durch visuelle Beurteilung einer Klasse (rot oder grün) zugeordnet.

3.2.5 Untersuchungen methodischer Einflüsse auf die Ergebnisse des mfSCSA

Die Untersuchungen dienten der Überprüfung methodischer Details des mfSCSA im Hinblick auf die Eignung des Testverfahrens für die Beurteilung der Chromatinstruktur von Hundespermien.

3.2.5.1 Untersuchung der Reproduzierbarkeit der mittels mfSCSA erhobenen Befunde

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des mfSCSA bzw. möglicher Einflüsse auf die Messwerte wurden an fünf verschiedenen Versuchstagen bei -196°C kryokonservierte Samenproben (mittlere Pailletten à 0,5 ml) je eines Ejakulates von vier verschiedenen Rüden aufgetaut und mittels mfSCSA untersucht. Bei den Proben handelte es sich um Sperma, welches z.T. über mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert wurde. Pro Tag und Ejakulat wurden zwei Pailletten aufgetaut, gepooled und je Pool zwei Ausstriche angefertigt. Somit wurden insgesamt 40 Ausstriche beurteilt.

3.2.5.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Spermienkonzentrationen auf die Genauigkeit des mfSCSA

Um die Notwendigkeit der Einhaltung einer standardisierten Spermienkonzentration für die korrekte Durchführung des mfSCSA zu prüfen, wurden anhand von vier Beagleejakulaten (Nativsperma) vier verschiedene Spermienkonzentrationen untersucht: 50, 100, 300 und 600 Mio. Spermien pro Probe. Das Spermavolumen wurde anhand der Dichte der spermienreichen Phase bestimmt, welches zwischen 69 und 960 µl lag. Dabei wurde das Verhältnis von 1 Teil Sperma zu 2 Teilen Natriumcitratpuffer 2,9 % nicht überschritten. Bei einem Rüden reichte das Volumen der spermienreichen Phase nicht aus, um mit 600 Mio. Spermien arbeiten zu können.

3.2.5.3 Untersuchung der Spermienchromatinstabilität bei 22 und 26-27 °C

Um den Einfluss hoher Raumtemperaturen (z.B. im nicht klimatisierten Labor) auf die Spermienchromatinstruktur zu prüfen, wurde tiefgefrorenes Sperma von fünf Rüden verwendet. Je zwei Pailletten pro Rüde wurden an einem Tag bei einer Raumtemperatur von 22 °C und einem anderen Tag bei einer Raumtemperatur von 26-27 °C aufgetaut, gepooled und dem mfSCSA zugeführt.

3.2.5.4 Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach zweistündiger Aufbewahrung des Samens unter verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen

Zur Klärung der Frage, ob die Spermienchromatinstruktur in den Samenproben, die vor der Untersuchung unterschiedlichen Temperatur- und Lichtverhältnissen ausgesetzt wurden, beeinträchtigt wird, wurde die spermienreiche Fraktion von sechs Patientenejakulaten in vier Split-Samples unterteilt. Die erste Portion wurde direkt nach Samenentnahme im mfSCSA untersucht. Die Portionen 2 bis 4 wurden 2h vor Einschleusung in den Assay bei Raumtemperatur (18 bis 21 °C) gelagert. Probe 2 wurde kühl (18 °C), dunkel und abgedeckt aufbewahrt, Probe 3 nicht abgedeckt auf dem Labortisch belassen (20 bis 21 °C) und Probe 4 auf der Fensterbank (20 bis 21 °C) nicht abgedeckt der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt.

3.2.5.5 Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in Nativsperma und Nativspermaausstrichen nach Lagerung bei 5 °C

Die Untersuchung auf mögliche Alterungsprozesse am Spermienchromatin ergab sich aus der praktischen Frage, ob die Möglichkeit besteht, Sperma oder Spermaausstriche vor der Untersuchung mittels mfSCSA über mehrere Tage bei 5 °C zu lagern. Hierzu wurden zunächst die spermienreichen Ejakulatfraktionen von neun Beaglerüden in vier Split-Samples unterteilt. Die erste Portion (Probe 1) wurde sofort dem mfSCSA zugeführt. Die drei verbleibenden Proben wurden im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt und nach 24h (Probe 2), 48h (Probe 3) und 72h (Probe 4) untersucht. Des Weiteren wurden Nativspermaproben von acht Beaglerüden mit Natriumcitratpuffer 2,9 % gewaschen bzw. zentrifugiert und vier Ausstriche pro Samenprobe angefertigt. Ein Ausstrich pro Ejakulat (n = 8) wurde sofort im mfSCSA untersucht

(Probe 1), die anderen wurden im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt und entsprechend nach 24h (Probe 2), 48h (Probe 3) und 72h (Probe 4) untersucht.

3.2.5.6 Untersuchung der Spermienchromatinstabilität in gefärbten Spermaausstrichen nach vierwöchiger Lagerung bei 5°C

Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, ob es bei Bedarf möglich ist, gefärbte Spermaausstriche über einen längeren Zeitraum ohne Schädigung des Spermienchromatins bei 5°C unter UV-Lichtausschluss aufzubewahren. Hierfür wurden 12 bereits gefärbte und ausgewertete Ausstriche über vier Wochen bei 5°C gelagert. Dabei handelte es sich um je vier Nativ-, Schockgefrier- und Tiefgefrierspermaausstriche aus je einem Ejakulat von vier Beaglerüden. Die in den frisch angefertigten Ausstrichen ermittelten Ergebnisse wurden mit den nach vier Wochen erhobenen Befunden verglichen. Gleichzeitig wurde damit die Stabilität der Färbung bzw. der Fluoreszenz des Farbstoffs Akridin Orange überprüft.

3.2.5.7 Untersuchung des Spermienchromatinstatus in nativem, schockgefrorenem und tiefgefrorenem Sperma

Das Protokoll des mfSCSA wurde mit Nativsperma entwickelt. Um zu prüfen, ob sich das Verfahren auch für die Untersuchung schockgefrorenen und tiefgefrorenen Spermas eignet bzw. ob sich die Chromatinstruktur durch die Einfrier- und Auftauprozesse verändert, wurden je zwei Ejakulate von neun Beaglerüden im Split-Sample-Verfahren untersucht. Die spermienreiche Phase jedes Ejakulates wurde in drei Teilproben aufgeteilt. Probe 1 (200 µl Nativsperma) wurde sofort nach Samenentnahme im mfSCSA untersucht. Für die Schockgefrierung wurden 150 µl Sperma

in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und unmittelbar in flüssigen Stickstoff bei -196°C verbracht. Die schockgefrorenen Proben wurden am folgenden Tag aufgetaut und im mfSCSA untersucht. Die Samentiefgefrierung erfolgte nach dem instituts-eigenen Protokoll (s. Anhang, Kap. 9.3.2). Die in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagerten kryokonservierten Proben wurden frühestens nach 48h aufgetaut und im mfSCSA untersucht.

3.2.5.8 Untersuchung der intraindividuellen Variabilität des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien zwischen mehreren Ejakulaten eines Rüden

Da bisher in der Literatur keine Informationen zum Chromatinstatus von Hundespermien vorlagen, war es interessant zu überprüfen, inwieweit der Anteil chromatininstabiler Spermien innerhalb mehrerer Ejakulate eines Rüden über einen längeren Zeitraum schwankte. Die Samenentnahmen lagen in einem Zeitraum von Mitte Juli 2002 bis Anfang Februar 2003. Von acht Beaglerüden sind je vier Ejakulate in die Untersuchungen eingegangen, von einem Beaglerüden drei Ejakulate. Damit sind insgesamt 35 Ejakulate in die Untersuchungen eingegangen.

3.2.6 Untersuchung der Spermienchromatinstruktur im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern

3.2.6.1 Beziehung zwischen Chromatinstatus und Normospermie oder Dysspermie

88 Ejakulate von 38 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von einem Jahr bis neun Jahren wurden entsprechend der spermatologischen Diagnose in zwei Gruppen [Normospermie (16 SCSAT- und 17 SCSAK-Werte) und Dysspermie (26 SCSAT- und 29 SCSAK-Werte)] unterteilt. Die Diagnosen Normospermie und Dysspermie wurden anhand der Spermiogramme in Anlehnung an die Normrichtwerte nach GÜNZEL-APEL (1994) erstellt (s. Anhang, Kap. 9.5). Folgende spermatologische Parameter waren dafür relevant: Spermiengesamtzahl ($x10^6$), mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsmotiler Spermien in %, Anteil membrangeschädigter Spermien nach Eosinfärbung in % und Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien in %.

3.2.6.2 Beziehungen zwischen Chromatinstatus und ausgewählten spermatologischen Parametern

In die Untersuchung sind von insgesamt 38 Rüden 88 Ejakulate eingeflossen. Es lagen 79 SCSAT-Werte und 88 SCSAK-Werte in % vor. Die mfSCSA-Ergebnisse wurden mit folgenden ausgewählten spermatologischen Parametern in Beziehung gesetzt: Anteil computergestützt ermittelter (CMA) vorwärtsmotiler Spermien in % (n = 79), Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende in µm / sec [Velocity Straight Line, VSL (CMA)] (n = 79), Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn in µm / sec [Velocity Averaged Path, VAP (CMA)] (n = 79) und Geschwindigkeit

über die tatsächlich zurückgelegte Bahn in µm / sec [Velocity Curve Line, VCL (CMA)] (n = 79), Anteil membrangeschädigter Spermien in % nach Propidium-iodidfärbung (n = 84) und Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien in % (n = 88).

3.2.6.3 Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen

Die von 38 Rüden gewonnenen 88 Ejakulate wurden nach dem Anteil an Spermien mit verändertem Kopf in zwei Klassen unterteilt. Klasse 1 (28 SCSAT-Werte und 31 SCSAK-Werte) wurde Ejakulaten mit ≤ 5 % Kopfveränderungen zugeordnet. In Klasse 2 (10 SCSAT- und SCSAK-Werte) waren Ejakulate mit > 5 % Kopfveränderungen enthalten.

3.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte im Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Verwendung des Statistikprogramms SAS® (Statistical Analysis System®, SAS Institute Inc., Version V 8.3 für Windows, Cary, North Carolina, USA). Die Datenerfassung und -organisation erfolgte mit Microsoft Excel Dateien für Windows, Version 1997 (Microsoft Inc., USA, Version MS-Excel 1997).

3.3.1 Ergebnisse des mfSCSA

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des mfSCSA und die Untersuchung der intraindividuellen Variabilität der mfSCSA-Werte mehrerer Ejakulate innerhalb einzelner Rüden wurde durch eine Varianzkomponentenberechnung geprüft. Der Einfluss unterschiedlicher Raumtemperaturen von 22 und 26-27°C auf die Spermienchromatinstabilität wurde durch die Erhebung der Mittelwerte der Paradifferenzen auf Null (SAS-Prozedur MEANS) mit dem t-Test überprüft. Bei der Untersuchung über die Lagerbarkeit von gefärbten Spermaausstrichen bis zu vier Wochen wurden die erhobenen Daten der Erst- und Zweitauswertung ebenso über die Mittelwerte der Paradifferenzen auf Null (SAS-Prozedur MEANS) mit dem t-Test überprüft. Die statistische Auswertung des Anteils chromatininstabiler Spermien in Nativsperma bzw. Nativspermaausstrichen nach dreitägiger Lagerung bei 5°C, der Untersuchung eines möglichen, negativen Einflusses der Spermienchromatinstruktur nach zweistündiger Aufbewahrung des Samens unter verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen sowie und des Einflusses der Spermaart (nativ, schockgefroren, tiefgefroren) bezüglich des Anteils chromatininstabiler Spermien erfolgte durch 1-faktorielle Varianzanalyse mittels „repeated measurements“ mit Prüfung der Mittelwerte der Paradifferenzen auf Null (SAS-Prozedur MEANS) mit dem t-Test. Der Einfluss unterschiedlicher Spermienkonzentrationen auf die Ergebnisse des mfSCSA konnte aufgrund zu geringen Probenmaterials nicht statistisch abgesichert werden

und wird daher deskriptiv bewertet. Mögliche Zusammenhänge zwischen den beiden mfSCSA-Werten (SCSAT und SCSAK) sowie zwischen den mfSCSA-Werten und ausgewählten spermatologischen Parametern wurden mittels Korrelationsanalyse berechnet. Hierzu wurden die Daten zunächst mit der Prozedur UNIVARIATE auf Normalverteilung überprüft. Für die normalverteilten Daten wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient, für die nicht normalverteilten der Spearman'sche Korrelationskoeffizient mit der SAS-Prozedur CORR berechnet. Da bis auf einen Parameter alle Daten nicht normal verteilt waren, wurde eine Rangkorrelation nach Spearman vorgenommen. Des Weiteren wurde der Chromatinstatus mit den beiden Diagnosegruppen „Normospermie" und „Dysspermie" und mit Ejakulaten ≤ 5 % und > 5 % Veränderungen des Spermienkopfes verglichen. Anhand der Daten wurde zunächst auf Basis der Mittelwerte getrennt nach Spermatyp bezüglich Normo- und Dysspermie und nach Kopftyp die Normalverteilung überprüft. Da in beiden Untersuchungseinheiten keine Normalverteilungen der Werte vorlagen, wurde der Vergleich mit dem Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt.

Alle p-Werte ≤ 0,05 wurden in dieser Studie als signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Methodische Einflüsse auf den mfSCSA

4.1.1 Reproduzierbarkeit der mittels mfSCSA erhobenen Befunde

Anhand der Untersuchungen je eines Tiefgefrierejakulates (je 2 Pailletten an fünf verschiedenen Tagen) von vier verschiedenen Rüden ergab die Standardabweichung innerhalb eines Ejakulates zwischen den fünf Versuchstagen einen Wert von 0,7 % (SCSAT) und 0,6 % (SCSAK) und zwischen den zwei Ausstrichen pro Tag innerhalb eines Ejakulates 1,6 % (SCSAT) und 1,4 % (SCSAK). Die Variabilität zwischen den Tagen innerhalb eines Tieres ist somit geringer als zwischen den Ausstrichen. Insgesamt ist die Reproduzierbarkeit der Ergerbnisse als hoch zu bewerten, weil die Standardabweichungen (Varianzkomponentenberechnung) der mfSCSA-Werte eine relativ geringe Variabilität aufweisen. Die individuellen Messwerte der vier verschiedenen Rüden sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Verteilung der Messwerte chromatininstabiler Spermien in Tiefgefriersamenproben (fünf Untersuchungen à zwei Ausstriche) von vier verschiedenen Rüden

n	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
1	4,6	1,2	3,5	6,5	3,5	0,5	2,9	4,5
2	2,1	1,1	0,7	3,6	1,9	0,8	0,7	3,1
3	2,4	1,4	0,4	4,3	2,1	1,1	0,4	3,4
4	8,7	2,8	4,8	13,1	7,9	2,7	4,1	12,5

4.1.2 Einfluss verschiedener Spermienkonzentrationen auf die Genauigkeit des mfSCSA

Die Durchführung des mfSCSA erfolgte mit Spermienkonzentrationen von 50 Mio., 100 Mio., 300 Mio. und 600 Mio. pro Probe von vier verschiedenen Beaglerüden. Bei Rüde Nr. 2 fehlte die Fraktion mit einer Spermienkonzentration von 600 Mio.. Die Verteilung der Messwerte der einzelnen Spermienkonzentrationen ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Standardabweichungen des SCSAT-Wertes variierten von 4,8 bis 6,7 %, des SCSAK-Wertes von 4,2 bis 6,1 %. Anhand der Ergebnisse waren keine Unterschiede der durch den mfSCSA erbrachten Werte in Abhängigkeit von der Spermienkonzentration zu erkennen.

Tab. 3: Verteilung der Messwerte chromatininstabiler Spermien bei verschiedenen Spermienkonzentrationen

n	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	50 Mio.	100 Mio.	300 Mio.	600 Mio.	50 Mio.	100 Mio.	300 Mio.	600 Mio.
1	0,4	1,2	1,6	0,4	0,4	1,1	1,3	0,4
2	10,7	10,1	15,3	-	9,7	9,0	12,9	-
3	7,9	13,4	13,0	11,1	6,5	10,7	10,8	9,4
4	2,4	2,5	4,1	2,4	2,3	2,0	3,4	2,1
$\bar{x}$	5,3	6,8	8,5	4,6	4,7	5,7	7,1	3,9
SD	4,8	5,9	6,7	5,7	4,2	4,8	6,1	4,8

4.1.3 Spermienchromatinstabilität bei 22 und 26-27°C

Die Testdurchführung bei hohen Raumtemperaturen von 26-27°C resultierte bei drei von fünf Rüden in einer deutlichen Erhöhung des Anteils chromatininstabiler Spermien im Vergleich zu den bei 22°C erzielten Ergebnissen (Tab. 4). Entsprechend hoch sind die Standardabweichungen von 46,4 % (SCSAT) und 45,4 % (SCSAK) bei hohen Raumtemperaturen. Bei zwei Tieren war nahezu kein Einfluss der Umgebungstemperatur zu erkennen. Die statistische Auswertung bezüglich zwei verschiedener Raumtemperaturen ergab für beide mfSCSA-Werte keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 4: Individuelle Anteile chromatininstabiler Spermien bei Testdurchführung bei Raumtemperaturen von 22 und 26-27°C

n	% chromatininstabile Spermien			
	SCSAT		SCSAK	
	22°C	26-27°C	22°C	26-27°C
1	0,0	100,0	0,0	100,0
2	15,7	79,5	15,6	83,5
3	3,0	57,4	5,7	57,1
4	0,0	0,6	0,0	0,2
5	0,0	1,0	0,0	0,2
$\bar{x}$	4,3	48,2	3,7	47,7
SD	6,8	46,4	6,8	45,4

4.1.4 Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach zweistündiger Aufbewahrung des Samens unter verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen

Die Spermienchromatinstabilität wurde durch zweistündige Exposition des Spermas von sechs verschiedenen Rüden gegenüber Raumtemperatur und Tageslicht nicht beeinflusst (Tab. 5). Lediglich die zwischen der geschützten und der der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzten Probe ermittelte Differenz (SCSAK-Wert) war signifikant ($p \leq 0,05$).

Tab. 5: Verteilung der Messwerte bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen über 2h für den SCSAT- und SCSAK-Wert

	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
sofort	4,9	6,4	1,4	17,8	4,3	5,5	1,3	15,5
geschützt	5,6	6,7	0,9	19,2	4,8	5,5	0,9	15,9
offen	5,6	9,4	0,0	24,7	4,8	8,0	0,0	21,0
licht	4,9	6,4	0,8	17,7	3,9	5,1	0,6	14,2

sofort = sofort nach Samenentnahme

geschützt = nach zweistündiger Standzeit unter geschützten Bedingungen: dunkel, abgedeckt, Raumtemperatur (18°C)

offen = nach zweistündiger Standzeit unter ungeschützten Bedingungen: Labortisch, hell, nicht abgedeckt, Raumtemperatur (20-21°C)

licht = nach zweistündiger Standzeit unter ungeschützten Bedingungen: unmittelbare Sonneneinstrahlung, nicht abgedeckt, Raumtemperatur (20-21°C)

Signifikante Unterschiede für SCSAK:

geschützt / licht: $p = 0,0264$

4.1.5 Spermienchromatinstabilität in Nativsperma nach Lagerung bei 5°C

Von 9 untersuchten Ejakulaten lagen sowohl für den SCSAT- als auch für den SCSAK-Wert signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) vor. Die Ergebnisse über den

Einfluss der 72-stündigen Lagerung von Nativsperma bei 5°C sind in der Tabelle 6 dargestellt. Beide mfSCSA-Werte zeigten eine signifikante Steigerung des Anteils chromatininstabiler Spermien nach 48-stündiger Lagerung bei 5°C (0h / 48h). Dieser sank anschließend innerhalb von 24 Stunden wieder signifikant ab. Auffällig war sowohl nach 48 als auch nach 72h die extreme Varianz von 24h / 48h bzw. von 48h / 72h.

Tab. 6: Anteil chromatininstabiler Spermien in Nativsperma bei dreitägiger Lagerung bei 5°C

	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
0h	1,7	2,6	0,0	8,0	1,4	1,9	0,0	5,7
24h	4,8	7,3	0,0	23,2	3,6	4,5	0,0	14,1
48h	42,9	43,5	1,5	94,4	42,2	43,1	1,4	94,1
72h	14,6	25,0	0,5	76,3	14,8	26,1	0,5	79,8

0h = unmittelbar nach Samengewinnung
24h = 24 h Lagerung bei 5°C
48h = 48 h Lagerung bei 5°C
72h = 72 h Lagerung bei 5°C

Signifikante Unterschiede für SCSAT:

0h / 48h: $p = 0,0211$

24h / 48h: $p = 0,0232$

48h / 72h: $p = 0,0376$

Signifikante Unterschiede für SCSAK:

0h / 48h: $p = 0,0214$

24h / 48h: $p = 0,0225$

48h / 72h: $p = 0,0413$

4.1.6 Spermienchromatinstabilität in Nativspermaausstrichen nach Lagerung bei 5°C

Die Untersuchung von Nativspermaausstrichen von acht verschiedenen Rüden, die sofort nach der Anfertigung sowie 24, 48 und 72h (Lagerung bei 5°C) später untersucht wurden, zeigte in beiden Auswertungen (SCSAT und SCSAK) tendenziell eine ähnliche Zunahme an chromatininstabilen Spermien wie die Nativspermaproben (Kap. 4.1.5). Allerdings erbrachte die statistische Auswertung keine klaren signifikanten Unterschiede. Beide mfSCSA-Werte zeigten einen Anstieg chromatininstabiler Spermien nach 24 und 48h (Tab 7). Nach 72h sank der Anteil chromatininstabiler Spermien wieder ab. Lediglich Signifikanznähe wurde für die Differenz zwischen 0h / 24h, 0h / 48h sowie 48h / 72h erreicht.

Tab. 7: Anteil chromatininstabiler Spermien in Nativspermaausstrichen bei dreitägiger Lagerung bei 5°C

	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
0h	4,7	4,8	1,1	14,8	4,4	4,3	1,1	13,0
24h	17,3	16,2	1,6	48,9	17,4	16,6	1,5	48,3
48h	39,5	46,4	1,9	98,9	39,9	48,2	1,5	100,0
72h	16,4	19,4	2,1	55,8	16,5	21,0	1,6	58,5

0h = unmittelbar nach Samengewinnung

24h = 24 h Lagerung bei 5°C

48h = 48 h Lagerung bei 5°C

72h = 72 h Lagerung bei 5°C

Signifikanznähe für SCSAT:

0h / 24h: p = 0,0791

0h / 48h: p = 0,0794

48h / 72h: p = 0,0792

Signifikanznähe für SCSAK:

0h / 24h: p = 0,0739

0h / 48h: p = 0,0816

48h / 72h: p = 0,0800

4.1.7 Auswertbarkeit der Spermienchromatinstruktur in gefärbten Spermaaustrichen nach vierwöchiger Lagerung bei 5°C

Die Überprüfung der Stabilität der Fluoreszenz des Farbstoffs Akridin Orange durch Langzeitlagerung zwölf gefärbter Ausstriche bei 5°C zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Auswertung frisch angefertigter Ausstriche und vier Wochen später. Der Prozentsatz chromatininstabiler Spermien blieb unverändert (Tab. 8). Lediglich die Maximalwerte zum Zeitpunkt „sofort“ (SCSAT: 15,0 %; SCSAK: 2,7 %) sind durch ihre große Variationsbreite auffällig, was in den unterschiedlichen Standardabweichungen von 4,2 % (SCSAT-Wert) und 1,0 % (SCSAK) zum Ausdruck kommt. Hier kam es bei einem Ausstrich aufgrund von Zwischenfarbtönen (gelb-orange) zu Fehldetektionen. In diesem Fall ist der SCSAK-Wert der aussagekräftigere Wert.

Tab. 8: Anteil chromatininstabiler Spermien in mit Akridin Orange gefärbten, über vier Wochen bei 5°C gelagerten Ausstrichen

		% chromatininstabile Spermien							
		SCSAT				SCSAK			
Zeitpunkt	**n**	**$\bar{x}$**	**SD**	**Min**	**Max**	**$\bar{x}$**	**SD**	**Min**	**Max**
sofort	12	2,6	4,2	0,0	15,0	0,9	1,0	0,0	2,7
nach 4 Wo.	12	1,1	1,0	0,0	3,5	0,8	0,9	0,0	3,2

sofort = Auswertung frisch gefärbter Ausstriche am Tag der Färbung
nach 4 Wo. = wiederholte Auswertung der Ausstriche vier Wochen später
n = Anzahl der Ausstriche

4.1.8 Chromatinstatus von nativen, schockgefrorenen und tiefgefrorenen Spermien

Die vergleichende Untersuchung von je zwei Ejakulaten von 9 Beaglerüden mit nativem, aufgetautem schockgefrorenem und kryokonserviertem Sperma erbrachte unabhängig von der Art der Auswertung (SCSAT oder SCSAK) signifikant mehr chromatininstabile Spermien in Nativsperma als in den Vergleichsproben (Tab. 9).

Tab. 9: Anteil chromatininstabiler Spermien in Nativsperma, aufgetautem schockgefrorenem Samen und Tiefgefriersperma (TG) (n = 18 Ejakulate von 9 Rüden)

	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
Spermaart	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
nativ	5,1[a]	3,0	1,4	9,7	3,9[a]	3,0	0,6	9,1
schockgefroren	1,8[b]	1,0	0,8	3,0	1,4[b]	0,8	0,7	2,5
TG	2,8[b]	1,8	0,8	5,6	2,1[b]	1,4	0,8	5,2

a, b : signifikant unterschiedliche Werte ($p \leq 0,05$)

4.1.9 Intraindividuelle Variabilität des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien zwischen mehreren Ejakulaten eines Rüden

Die intraindividuellen Standardabweichungen (Varianzkomponentenberechnung) von neun Rüden betrugen für den SCSAT-Wert 3,9 % und für den SCSAK-Wert 2,9 %, was eine relativ große Streuung der beiden mfSCSA-Werte innerhalb eines Individuums zum Ausdruck bringt. Die Verteilung der Messwerte chromatininstabiler

Spermien bei den einzelnen Tieren (n = 9) sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen sowohl eine große intraindividuelle als auch interindividuelle Variationsbreite auf. Die große intraindividuelle Variationsbreite ist anhand der Minimal- und Maximalwerte beider mfSCSA-Werte bei den Rüden Nr. 2, 3, 7 und 8 ersichtlich. Dagegen weisen die Rüden Nr. 1, 5, 6 und 9 relativ konstante Varianz der mfSCSA-Werte auf. Bei Rüde Nr. 4 liegt eine starke Diskrepanz bezüglich der Maximalwerte von 15,0 % (SCSAT) und 3,2 % (SCSAK) vor. Hier kam es bei einem Ausstrich aufgrund von Zwischenfarbtönen (gelb-orange) zu Fehldetektionen. In diesem Fall ist der SCSAK-Wert der aussagekräftigere Wert.
Bei 19 der insgesamt 35 Ejakulate bestand Normospermie. Die Verteilung des Anteils chromatininstabiler Spermien war in Ejakulaten mit Normospermie ähnlich wie in Ejakulaten mit Dysspermie intraindividuell ausgewogen.

Tab. 10: Individueller Prozentsatz chromatininstabiler Spermien von 9 Beaglerüden

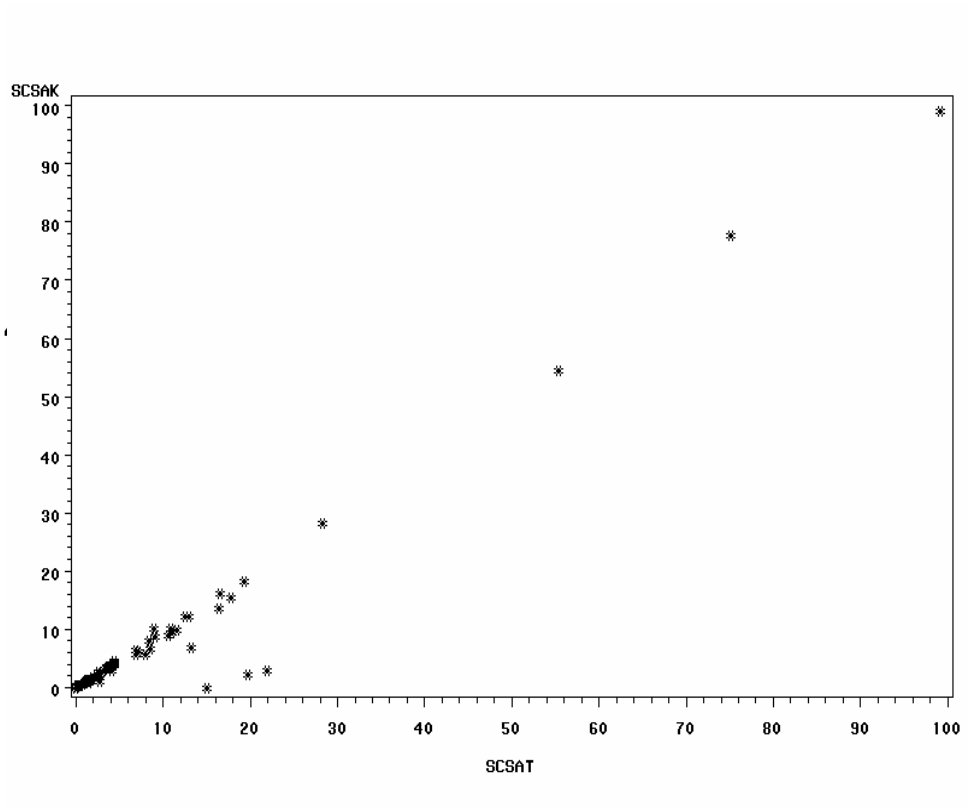
Rüde	% chromatininstabile Spermien							
	SCSAT				SCSAK			
	$\bar{x}$	SD	Min	Max	$\bar{x}$	SD	Min	Max
1*	1,2	1,1	0,4	3,7	0,7	0,4	0,4	3,6
2*	7,2	5,2	0,2	12,5	6,8	5,0	0,4	12,3
3*	7,0	4,6	2,7	13,0	6,3	4,2	2,7	12,3
4*	4,9	6,9	0,0	15,0	1,1	1,5	0,0	3,2
5**	1,0	1,6	0,0	2,9	0,9	1,5	0,0	2,6
6*	1,6	0,8	0,9	2,7	1,3	0,7	0,9	2,2
7*	3,6	2,6	1,5	6,9	3,4	2,5	1,4	6,5
8*	7,5	5,0	3, 9	14,8	6,7	4,3	3,6	13,0
9*	1,8	1,4	0,6	3,7	1,7	1,3	0,6	3,5

* n = vier Ejakulate

** n = drei Ejakulate

4.1.10 Korrelation der beiden mfSCSA-Werte

Der Vergleich von 79 SCSAT- und 88 SCSAK-Werten erbrachte eine hochsignifikante Korrelation (Spearman‘scher Korrelationskoeffizient r = 0,9) von $p \leq 0{,}001$. Der lineare Zusammenhang beider mfSCSA-Werte ist in Abbildung 3 dargestellt.



SCSA**T**-Wert = computergestützter mfSCSA-Wert (ge**t**richtert)

SCSA**K**-Wert = computergestützter mfSCSA-Wert (**k**orrigiert)

Abb 3: Linearer Zusammenhang der SCSAT- und SCSAK-Werte

4.2 Anteil chromatininstabiler Spermien im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern

4.2.1 Beziehung zwischen Chromatinstatus und Normospermie oder Dysspermie

Der Vergleich der SCSAT- und SCSAK-Werte von Ejakulaten mit Normospermie und Dysspermie erbrachte einen mittleren SCSAT-Wert von 4,2±3,5 % bei Normospermie (n = 16) und 15,7±24,3 % bei Dysspermie (n = 26) und einen mittleren SCSAK-Wert von 4,1±5,8 % bei Normospermie (n = 17) und 14,0±23,7 % bei Dysspermie (n = 29). Die mittels SCSAT und SCSAK analysierten Anteile chromatininstabiler Spermien bei Normospermie und Dysspermie sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

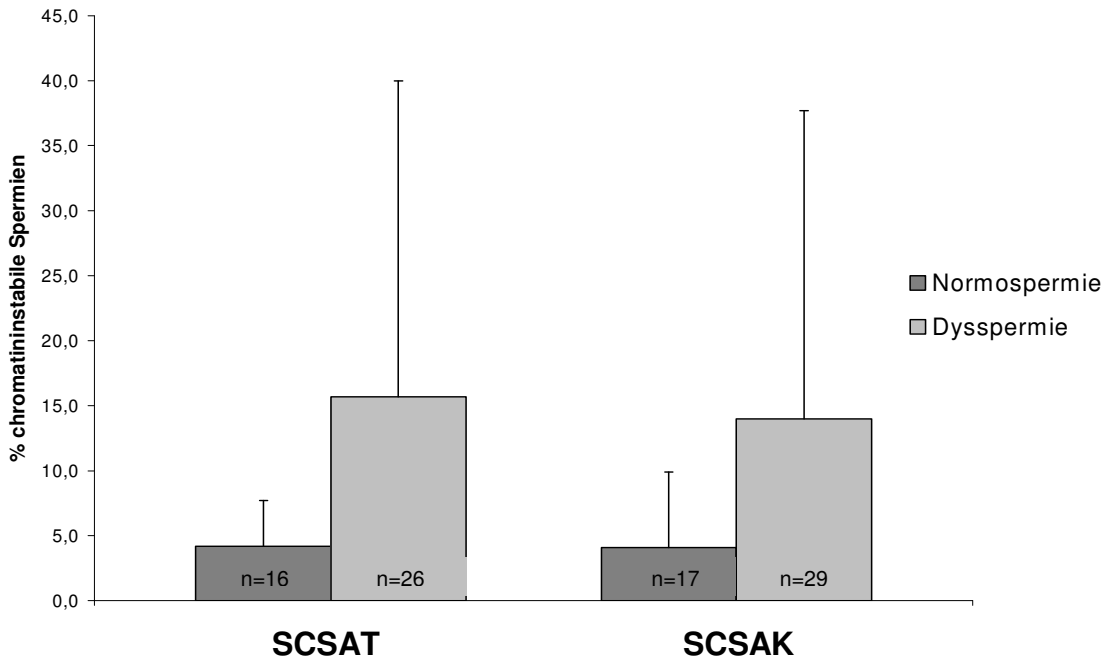


Abb. 4: Mittels SCSAT und SCSAK analysierte Anteile chromatininstabiler Spermien bei Normospermie und Dysspermie

4.2.2 Beziehungen zwischen Chromatinstatus und ausgewählten spermatologischen Parametern

Der mittlere Prozentsatz chromatininstabiler Spermien (SCSAT) betrug unter Einbeziehung von 79 Ejakulaten von 35 Rüden verschiedener Rassen 8,3±15,3 %. Dabei war der Prozentsatz chromatininstabiler Spermien bei einem Ejakulat größer als der Mittelwert plus eine Standardabweichung (>23,6 %) und bei je einem Ejakulat von drei verschiedenen Rüden plus zwei Standardabweichungen (>38,9 %).

Die Auswertung mit dem SCSAK erbrachte für 88 Ejakulate von 38 Rüden verschiedener Rassen einen Prozentsatz chromatininstabiler Spermien von 7,1±14,8 %. Dabei war der Prozentsatz chromatininstabiler Spermien bei je einem Ejakulat von drei verschiedenen Rüden größer als der Mittelwert plus eine Standardabweichung

(>21,9 %) und bei je einem Ejakulat von zwei verschiedenen Rüden plus zwei Standardabweichungen (>36,7 %).

Tabelle 11 stellt eine Auflistung der ausgewählten spermatologischen Parameter dar. Der mittels CMA (computergestützte Motilitätsanalyse / Cell Motion Analyser) festgestellte Anteil vorwärtsmotiler Spermien (Vmot) betrug in 79 Ejakulaten von 34 Rüden durchschnittlich 84,1±17,5 %.

Die mittlere VSL [Velocity Straight Line (Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende)] ergab 80,6±17,7 µm / sec, die mittlere VAP [Velocity Averaged Path (Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn)] 94,3±17,8 µm / sec und die mittlere VCL [Velocity Curve Line (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn)] 129,9±18,9 µm / sec.

Die Propidiumiodidfärbung erbrachte in 84 Ejakulaten von 38 Rüden einen durchschnittlichen Anteil membrangeschädigter Spermien von 8,7±13,4 %.

Der mittlere Gesamtanteil morphologischer Abweichungen betrug in 88 Ejakulaten von 38 Rüden 29,9±21,2 %.

Die SCSAT-Werte waren mit Ausnahme des Anteils vorwärtsmotiler Spermien [Vmot, (CMA)] und der VSL (CMA) mit allen untersuchten spermatologischen Parametern signifikant korreliert ($p \leq 0,05$). Die Korrelationen zwischen den mfSCSA-Werten und spermatologischen Parametern sind in Tabelle 12 dargestellt. Die deutlichste negative Korrelation bestand zur VCL ($r = -0,35$). Außerdem bestand eine negative Korrelation zur VAP ($r = -0,27$). Zum Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien bestand wiederum eine positive Beziehung ($r = 0,32$), wie auch zum Anteil membrangeschädigter Spermien ($r = 0,26$).

Die SCSAK-Werte sind mit Ausnahme der Parameter VSL und VAP mit den spermatologischen Parametern signifikant korreliert ($p \leq 0,05$) (Tab. 12). Die deutlichste positive Korrelation bestand zum Anteil membrangeschädigter Spermien ($r = 0,32$). Weiterhin bestand eine positive Korrelation zum Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien ($r = 0,31$). Zur VCL ergab sich eine negative Korrelation ($r = -0,31$) sowie auch zum Anteil vorwärtsmotiler Spermien (CMA) ($r = -0,25$). Deutliche Signifikanznähe zeigte die VAP ($p = 0,0586$).

Spermatologische Beispielbefunde mit unauffälligen und erhöhten mfSCSA-Werten von je einem Ejakulat von fünf Patientenrüden sind im Anhang (Kap. 9.6) aufgeführt.

Tab. 11: Anteile chromatininstabiler Spermien, Spermienmotilität und -geschwindigkeiten sowie Anteile membrangeschädigter und morphologisch abweichender Spermien

	n	$\bar{x}$	SD	Min	Max
SCSAT [%]	79	7,1	14,8	0,0	99,2
SCSAK [%]	88	8,3	15,3	0,0	99,2
Vmot [%]	79	84,1	17,5	5,8	99,0
VSL [µm/sec]	79	80,6	17,7	22,2	123,4
VAP [µm/sec]	79	94,3	17,8	39,5	136,4
VCL [µm/sec]	79	129,9	18,9	76,8	165,7
PI [%]	84	8,7	13,4	1,0	78,5
MG [%]	88	29,9	21,2	3,0	100,0

SCSAT [%] = computergestützt ermittelter Wert

SCSAK [%] = korrigierter computergestützt ermittelter Wert

Vmot [%] = vorwärtsmotile Spermien (CMA)

VSL [µm/sec] = Geschwindigkeit über eine gerade Linie vom Anfang bis zum Ende (Velocity Straight Line, CMA)

VAP [µm/sec] = Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn (Velocity Averaged Path, CMA)

VCL [µm/sec] = Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn (Velocity Curve Line, CMA)

PI [%] = Anteil membrangeschädigter Spermien nach Propidiumiodidfärbung

MG [%] = Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien

n = Anzahl der ausgewerteten Ejakulate

Tab. 12: Beziehungen zwischen den SCSAT- und SCSAK-Werten und den spermatologischen Parametern

	Vmot	VSL	VAP	VCL	PI	MG
SCSAT r	-0,19	-0,20	-0,27	-0,35	0,26	0,32
SCSAT p	0,1028	0,0976	**0,0210***	**0,0024***	**0,0206***	**0,0037***
SCSAK r	-0,25	-0,13	-0,22	-0,31	0,32	0,31
SCSAK p	**0,0283***	0,2704	0,0586**	**0,0067***	**0,0034***	**0,0035***

* = signifikant für $p \leq 0,05$

** = Signifikanznähe

r = Spearman'scher Korrelationskoeffizient

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.2.3 Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen

Bei Ejakulaten mit Kopfveränderungen ≤ 5 % (Klasse 1) wurde ein mittlerer SCSAT-Wert (n = 28) von 7,9±14,0 % und ein mittlerer SCSAK-Wert (n = 31) von 7,7±14,4 % festgestellt. Bei Ejakulaten mit Kopfveränderungen > 5 % (Klasse 2) wurde ein mittlerer SCSAT-Wert (n = 10) von 25,0±30,6 % und ein mittlerer SCSAK-Wert (n = 10) von 24,3±30,8 % gefunden (Abb. 5). Der Unterschied zwischen Kopfveränderungen ≤ 5 % und > 5% war bei beiden mfSCSA-Werten signifikant ($p \leq 0,05$).

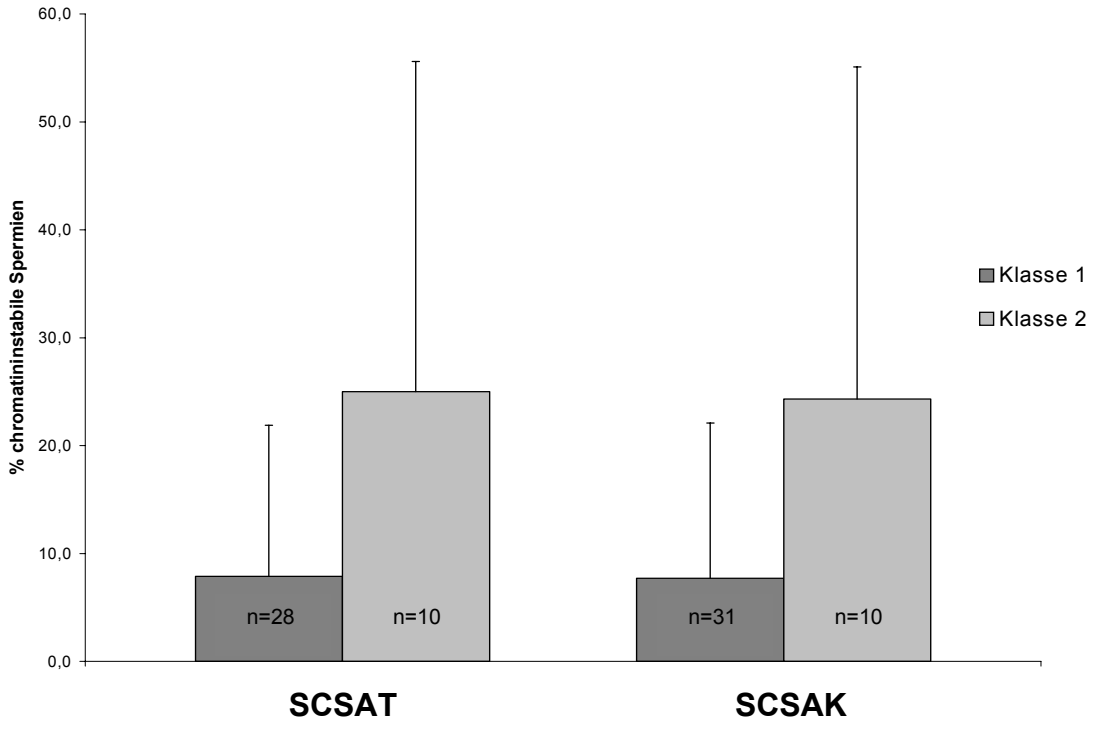


Abb. 5: Anteile chromatininstabiler Spermien (%) in Ejakulaten mit einem Anteil formabweichender Spermienköpfe ≤ 5 % (Klasse 1) und > 5 % (Klasse 2)

5 DISKUSSION

5.1 Methodische Einflüsse auf den mfSCSA

Die in der der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der mittels mfSCSA erhobenen Befunde erbrachten eine sehr geringe Streuung chromatininstabiler Spermien. Damit ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des mfSCSA gegeben.

Verschiedene Spermienkonzentrationen übten keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse des mfSCSA aus. Das Farbbild war auch bei geringen Spermienkonzentrationen gut, so dass auf eine Standardisierung durch vorausgehende Verdünnung oder Konzentration verzichtet werden kann. Dies widerlegt die Aussage nach DARCYNKIEWICZ (1979), dass das Akridin-Orange- / DNA-Phosphat-Verhältnis für eine gute Färbung wichtig ist. Im Übrigen hat auch er bei stark oligozoospermen Proben auf eine Verdünnung verzichtet.

Aus den Untersuchungen bezüglich der Durchführung des mfSCSA bei 22 und 26-27°C ist ersichtlich, dass eine hohe Umgebungstemperatur einen negativen Einfluss auf die mfSCSA-Werte haben kann. Bei drei von fünf Rüden kam es bei einer Umgebungstemperatur von 26-27°C zu einem deutlichen Anstieg chromatininstabiler Spermien, bei zwei von fünf Rüden dagegen blieb der Anteil chromatininstabiler Spermien gegenüber 22°C vergleichsweise konstant. Vermutlich war hier der Temperatureinfluss individuell variabel. Es ist daher zu empfehlen, den mfSCSA stets bei Raumtemperatur (ca. 21°C) durchzuführen. Es bestehen Hinweise, dass durch Erhöhung der testikulären Temperatur, die durch hohe Umgebungstemperaturen sowie durch Anstieg der endogenen Temperatur durch Varikozelen und Fieber hervorgerufen werden kann, die Spermienchromatinstabilität abnimmt (ALVAREZ 2003).

Bezüglich des Einflusses einer Zeitverzögerung von 2h zwischen Samenentnahme und Durchführung des mfSCSA sowie verschiedener Raumtemperatur- und Lichtverhältnisse konnte keine negative Beeinträchtigung des Spermienchromatins im Nativsperma festgestellt werden. Für den signifikant geringeren Anteil chromatininstabiler

Spermien in den der Sonneneinstrahlung ausgesetzten Proben gegenüber den geschützten Proben (SCSAK-Wert) kann keine plausible Erklärung gefunden werden. Auch KENNEY et al. (1995) konnten an Nativsamen von Hengsten nach dreistündiger Wartezeit bei 22°C keine Alterungsprozesse in Form zunehmender Chromatininstabilität nachweisen. Dasselbe gilt für Nativsperma des Menschen (ALVAREZ et al. 2002), das eine Aufbewahrungszeit von 4h bei Raumtemperatur ohne Zunahme von Spermienchromatinschädigungen überstanden hat.

In den eigenen Untersuchungen konnte klar gezeigt werden, dass der Anteil chromatininstabiler Spermien im Nativsperma bei dreitägiger Lagerung bei 5°C innerhalb der ersten 24h tendenziell und nach 48h signifikant ansteigt und in ungefärbten Nativspermaausstrichen bei dreitägiger Lagerung bei 5°C nach 24h und 48h tendenziell ansteigt. Die Zunahme chromatininstabiler Spermien erreicht nach 48h sowohl im Nativsperma als auch in den Nativspermaausstrichen ihren Höhepunkt und sinkt unerklärlicherweise nach 72h wieder ab. Nach LOVE et al. (2002) ist der Grad der Denaturierung der Spermienkern-DNA beim Hengst sowohl von der Umgebungstemperatur als auch von der Lagerungszeit abhängig. Bei dieser Spezies blieb der Denaturierungsgrad des Spermienchromatins bei 5°C für bis zu 46h unverändert, während bei 20 und 37°C bereits nach 7h Denaturierungsprozesse einsetzten.

Das angewandte Färbeverfahren mit Akridin Orange wies stabile Fluoreszenz auf, und der Farbshift ließ eine deutliche Differenzierung rot- und grünfluoreszierender Spermien zu. Dies war auch nach einer vierwöchigen Lagerung der gefärbten Ausstriche bei 5°C noch gegeben. Allerdings mussten für jede Untersuchung die Farbschwellwertdateien neu eingestellt werden. Die Überprüfung des Chromatinstatus in bereits gefärbten Spermaausstrichen nach vierwöchiger Lagerung bei 5°C erbrachte annähernd identische Ergebnisse wie in frisch gefärbten Ausstrichen. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die Praktikabilität des mfSCSA im täglichen Laborbetrieb insofern von Bedeutung, als die Durchführung dieses zeitaufwendigen Verfahrens nicht unbedingt am Tag der Samenentnahme in den Arbeitsablauf eingebaut werden muss, sondern innerhalb des Zeitraums von vier Wochen geplant werden kann. Dies kann auch für forensische Fälle von Bedeutung sein. Allerdings sollte die Färbeprozedur des mfSCSA grundsätzlich innerhalb der nächsten 2h nach Samenentnahme

durchgeführt werden, da die Lagerungsversuche bei 5°C bereits innerhalb der ersten 24h eine Zunahme chromatininstabiler Spermien auf mehr als das Doppelte des mittleren Ausgangswertes in Nativsperma und auf annähernd das Vierfache des mittleren Ausgangswertes in Nativspermaausstrichen zu verzeichnen war.

Die Bedenken von EVENSON et al. (2002) bezüglich der mikroskopischen Auswertung von fluoreszenzmarkierten Zellen durch schnelles Verblassen des Farbstoffes auf dem Objektträger und Unebenheiten im Farbbild in Form diffus verteilter Areale grün fluoreszierender Spermien neben Arealen rot fluoreszierender Spermien konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden. Vielmehr wird die Möglichkeit der visuellen Korrektur und Anpassung der Farbschwellwertdateien an ein individuell variierendes Färbeverhalten von Spermien als Vorteil erachtet. Dies ist mit der flowzytometrischen Methode nicht möglich. Dabei handelt es sich um ein technisch hoch spezialisiertes und kostspieliges Verfahren, das durch die Auswertung einer großen Zellpopulation (5000 Zellen) innerhalb kürzester Zeit besticht (DURAN et al. 1998; EVENSON et al. 2002). Dem steht die fluoreszenzmikroskopische Methode als kostengünstigeres Verfahren gegenüber. Die Analyse umfasst die Auswertung von 300 bzw. 500 Zellen pro Probe und beansprucht vergleichsweise deutlich mehr Zeit, ermöglicht jedoch die gleichzeitige Erfassung von Chromatinstatus und Morphologie der Spermien (TEJADA et al. 1984; ROUX u. DADOUNE 1989).

Im Hinblick auf die Praktikabilität des mfSCSA wurde der Einfluss verschiedener Gefrierverfahren auf canines Spermienchromatin geprüft. Der Vergleich der an Nativsperma einerseits und an aufgetautem schockgefrorenem und kryokonserviertem Sperma (-196°C in flüssigem Stickstoff) andererseits erzielten Ergebnisse zeigt signifikante Unterschiede auf. Das Färbeergebnis bei den kältebehandelten Proben war einwandfrei und somit die Auswertung problemlos. Erstaunlicherweise war der Anteil chromatininstabiler Spermien in den aufgetauten Proben signifikant niedriger als im Nativsperma. Andere Untersuchungen liefern kontroverse Ergebnisse. Während HAMMADEH et al. (1999) nach dem Einfrieren und Auftauen kryokonservierter Spermien des Menschen über eine signifikante Schädigung des Spermienchromatins berichten, konnte bei Mensch (EVENSON et al. 1991), Maus (EVENSON et al. 1993) und Schwein (EVENSON et al. 1994) kein signifikanter

Unterschied zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien in Nativsperma und kryokonserviertem Sperma festgestellt werden. Dies trifft ebenso für schockgefrorene Eberspermien zu (EVENSON et al. 1994). Auch beim Rind zeigte der Vergleich des Anteils chromatininstabiler Bullenspermien in nativen und kryokonservierten Proben keinen signifikanten Unterschied, schockgefrorene Proben wiesen allerdings einen signifikant geringeren Anteil chromatininstabiler Spermien auf als die Vergleichsproben (LÖHMER 2003). ROYERE et al. (1988) und DOBRINSKI et al. (1994) beschrieben sogar eine Zunahme des Kondensationsstatus kryokonservierten menschlichen bzw. bovinen Spermienchromatins nach dem Einfrieren und Auftauen, was den eigenen Untersuchungsergebnissen entspricht. Da dies gleichermaßen in unverdünntem schockgefrorenem Sperma und für die Kryokonservierung von verdünntem Sperma der Fall war, scheint die Tiefgefrierung bei -196°C an sich einen entsprechenden Effekt auf das Spermienchromatin auszuüben. Bezüglich der Befruchtungsfähigkeit von aufgetautem Tiefgefriersperma stellen ROYERE et al. (1988) die Frage, ob es aufgrund der Festigung der Chromatinstruktur beim Befruchtungsvorgang zu einer ungestörten Dekondensation kommen kann. Bezüglich möglicher Einflüsse von Verdünnermedien auf die Spermienchromatinstruktur tiefgefrorener Bullenspermien wird über einen Verlust der Chromatinstabilität bei Verwendung eines Milch-Verdünners berichtet, der beim Einsatz eines Eidotter-Verdünners nicht auftrat (SENGER et al. 1983; SCHENK et al. 1987). Es wird ein negativer Einfluss der Milch oder ein protektiver Effekt des Eidotters auf die Spermienchromatinstruktur diskutiert (KARABINUS et al. 1991).

Intraindividuell war der Anteil chromatininstabiler Spermien über einen längeren Zeitraum bei vier von neun Rüden sehr variabel. Die intraindividuellen Standardabweichungen lagen für neun Rüden bei 3,9 % (SCSAT) und 2,9 % (SCSAK). Dabei war die Verteilung des Anteils chromatininstabiler Spermien in den insgesamt 35 Ejakulaten mit Normospermie und Dysspermie intraindividuell ausgewogen. Nach EVENSON et al. (1991) kann für Schwankungen „testikulärer Stress“ die Ursache sein. In ihrer Langzeitstudie wurden in monatlichem Abstand je neun Ejakulate von 45 Männern mittels SCSA untersucht. Anhand der Standardabweichung von 5,0 % wurde auch beim Menschen eine relativ große intraindividuelle Variabilität

festgestellt. Des Weiteren ist anhand der eigenen Untersuchungen ebenso eine interindividuelle Variabilität der Chromatinstabilität deutlich geworden. Es ist nicht auszuschließen, dass die variierende Streuung chromatininstabiler Spermien beim Hund allgemein höher einzustufen ist als bei auf Fruchtbarkeit selektierten Spezies wie beispielsweise Rind und Schwein.

In der vorliegenden Studie wurde durchgängig mit zwei mfSCSA-Werten gearbeitet. Der SCSAT-Wert ist das Ergebnis der rein computergestützten Spermienchromatin-analyse. Um die Zuverlässigkeit dieses Wertes zu überprüfen, wurde eine Korrektur durch visuelle Kontrolle der Ausstriche bzw. Bilder durchgeführt und der SCSAK-Wert ermittelt. Aufgrund der hochsignifikanten Korrelation beider Werte ist somit davon auszugehen, dass beide mfSCSA-Werte aussagekräftig sind. Mängel der computergestützten Auswertung bestanden lediglich darin, dass in Fällen, in denen zwei oder drei Spermien dicht nebeneinander lagen oder sich teilweise überlagerten, die Differenzierung der einzelnen Spermien für den Computer nicht möglich war und nur eine Zelle gezählt wurde. Ferner führte das Auftreten von Zwischenfarbtönen wie gelb und orange in Einzelfällen zu einer Fehldetektion, d.h. die Zelle wurde sowohl als grün als auch als rot erkannt. Dies führte zu mehr oder weniger starken Diskrepanzen beider mfSCSA-Werte, von denen dann der SCSAK-Wert aussagekräftiger war. Um die Ursache für die Zwischenfarbtöne erklären zu können, wäre eine Analyse des molekularen Aufbaus von caninem Spermienchromatin erforderlich. Insbesondere der Protamingehalt des Spermienchromatins könnte Aufschluss über dessen Anfälligkeit gegenüber Säuredenaturierung in situ geben. Hypothetisch könnte ähnlich wie beim Menschen eine größere Destabilität in einem insgesamt geringeren Protamingehalt des Spermienchromatins und / oder mehreren Protamintypen mit unterschiedlich ausgeprägtem Cysteingehalt im Vergleich zu anderen Spezies begründet sein (LOVE u. KENNEY 1999).

5.2 Anteil chromatininstabiler Spermien im Kontext mit ausgewählten spermatologischen Parametern

Die in der vorliegenden Studie ermittelten mfSCSA-Werte von Ejakulaten mit Normospermie und Dysspermie zeigten keine signifikanten Unterschiede. In anderen Untersuchungen dagegen konnte beim Menschen ein signifikanter Unterschied zwischen Ejakulaten mit Normospermie und Dysspermie in Bezug auf die Spermienchromatinstruktur verzeichnet werden (ENGH et al. 1992; ANGELOPOULOS et al. 1998; ALVAREZ et al. 2002). Bei der Katze wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien in Ejakulaten mit Normospermie und Teratozoospermie festgestellt (PENFOLD et al. 2003). Beim Menschen, bei Maus und Rind (EVENSON et al. 1980) sowie beim Pferd (KENNEY et al. 1995) lag bei fertilen Individuen ein signifikant geringerer Anteil chromatininstabiler Spermien vor als bei subfertilen.

Die Untersuchungen bezüglich der Spermienmotilität und -geschwindigkeiten erbrachten teilweise signifikante negative Korrelationen zum Anteil chromatininstabiler Spermien, d.h., je geringer Motilität und Geschwindigkeiten, desto höher der Anteil chromatininstabiler Spermien. Zwischen Vorwärtsmotilität und SCSAK-Wert wurde eine signifikante Beziehung festgestellt, für die VAP (Velocity Averaged Path) lediglich Signifikanznähe. Die VAP (Velocity Averaged Path) korrelierte signifikant mit dem SCSAT-Wert. Die VCL (Velocity Curve Line) war mit beiden mfSCSA-Werten signifikant korreliert. Auch für Spermien des Menschen (EVENSON et al. 1991; ENGH et al. 1992), des Bullen (GUENIAT VON COURROUX 1988) und des Hengstes (KENNEY et al. 1995) wurde zwischen Vorwärtsmotilität und Anteil chromatininstabiler Spermien eine signifikante negative Beziehung festgestellt.

Anhand der eigenen Untersuchungen ergab der Anteil membrangeschädigter Spermien mittels Propidiumiodidfärbung bei beiden mfSCSA-Werten eine signifikante positive Korrelation gegenüber dem Anteil chromatininstabiler Spermien. Auch die Lebend-Tot-Färbung mit Eosin erbrachte in Spermien des Menschen (ENGH et al. 1992) und des Bullen (GUENIAT VON COURROUX 1988) eine positive Signifikanz.

Der Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien ergab für beide mfSCSA-Werte eine signifikante positive Korrelation bezüglich des Anteils chromatininstabiler Spermien. Beim Menschen (IBRAHIM u. PEDERSEN 1988; EVENSON et al. 1991; CLAASSENS et al. 1992; ENGH et al. 1992), beim Pferd (KENNEY et al. 1995) und bei der Katze (PENFOLD et al. 2003) konnte ebenfalls eine postive signifikante Korrelation zwischen der Spermienmorphologie und dem Anteil chromatininstabiler Spermien festgestellt werden.

Der Vergleich der Beziehung zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem Prozentsatz an Spermien mit Kopfveränderungen ≤ 5 % und > 5 % erbrachte einen statistisch signifikanten Unterschied. Auch beim Menschen war nach TEJADA et al. (1984) und EVENSON et al. (1991) der Anteil chromatininstabiler Spermien mit der Kopfmorphologie positiv korreliert. Die Einzelbetrachtung morphologisch abweichender Kopfveränderungen ergab nach LÖHMER (2003) beim Rind dagegen keine signifikante Korrelation in Bezug zum Anteil chromatininstabiler Spermien.

Im Gegensatz zu den dargelegten Daten konnten BALLACHEY et al. (1986a) bei ingezüchteten Mäusen, DOBRINSKI et al. (1994) beim Rind und HAMMADEH et al. (1996) und SPANÒ et al. (2000) beim Menschen keine Relationen zwischen einem Spermienchromatindefekt und Samenqualitätsparametern verzeichnen.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen schließen ein gemeinsames Auftreten eines erhöhten Anteils chromatininstabiler Spermien und eines oder mehrerer pathologisch veränderter spermatologischer Parameter nicht aus. Dysspermie ist aber nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Anteil chromatininstabiler Spermien gekoppelt. Diesbezüglich dürfte der jeweils außerhalb des Normbereichs liegende Ejakulatparameter eine Rolle spielen. Denn den eigenen Untersuchungen zufolge standen eine herabgesetzte Vorwärtsmotilität, eine verringerte VCL, ein erhöhter Anteil membrangeschädigter, morphologisch abweichender und insbesondere kopfmorphologisch abweichender Spermien in enger Relation zur Chromatinstruktur. Mit Ausnahme der Kopfmorphologie ist die Bedeutung der gefundenen Korrelationen im Hinblick auf funktionelle Zusammenhänge zwischen Spermienchromatin und anderen Ejakulatparametern (Anteil vorwärtsmotiler Spermien, Velocity Averaged Path, Velocity Curve Line, Anteil membrangeschädigter Spermien nach Propidium-

iodidfärbung, Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien) fraglich. Diesbezüglich sind auch im Schrifttum keine verwertbaren Ansätze zu finden. Da das Chromatin im Spermienkopf lokalisiert ist, ist es naheliegend, dass ein Spermienchromatindefekt auch morphologische Kopfveränderungen hervorrufen kann. TEJADA et al. (1984) sehen eine mögliche Erklärung hierfür in einem Verlust der Tertiärstruktur der Spermien-DNA. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Spermien, die Kopfveränderungen aufweisen, in der Mehrzahl auch mit den Spermien identisch sind, die eine Chromatininstabilität aufweisen. Denn kopfmorphologische Abweichungen müssen nicht zwangsläufig mit Chromatindefekten einhergehen (ROUX u. DADOUNE 1989).

Aufgrund der kontroversen Ergebnisse der Untersuchungen über Korrelationen und / oder Nicht-Korrelationen zwischen dem Spermiennchromatinstatus und spermatologischen Parametern halten einige Autoren die Untersuchung der Spermienchromatinstruktur für eine unabhängige Messung, die mehr oder weniger gut mit den Parametern der Spermatologie korreliert (GORCZYKA et al. 1993; HOSHI et al. 1996; DARZYNKIEWICZ et al. 1997; BOCHENEK et al. 2001). Die Tatsache, dass der SCSA nur schwach mit Parametern der Spermatologie korreliert, berechtige seinen Platz als neuen, eigenständigen Fertlitätsparameter erst recht und macht ihn für die männliche Infertiltätsdiagnostik prognostisch wertvoll (SPANÒ et al. 1998; EVENSON et al. 1999; LARSON et al. 2000).

Die Untersuchungen beim Rind betrafen in erster Linie Besamungsbullen, bei welchen Beziehungen zwischen der Spermienchromatinstruktur und anderen spermatologischen Parametern von vornherein nicht zu erwarten sind. Der durchschnittliche Wert chromatininstabiler Spermien betrug für Besamungsbullen 12,6±1,1 % (BALLACHEY et al. 1987) und für Testbullen 4,6±1,6 % (LÖHMER et al. 2003). Dagegen lag der durchschnittliche Anteil chromatininstabiler Spermien für Mastbullen bei 9,0±4,3 % (BALLACHEY et al. 1988), für deren Zuchtauswahl die Fruchtbarkeit eine geringere Rolle spielt. Die Standardabweichungen von den auf Fruchtbarkeit selektierten Rindern weisen vergleichsweise geringe Variabilität auf. Bei anderen Spezies (Hund, Pferd) steht das Exterieur als Zuchtkriterium im Vordergrund, während der Fruchtbarkeit nachgeordnete Bedeutung zukommt. In der vorliegenden

Studie wiesen Rüden mit Normospermie einen durchschnittlichen SCSAT-Wert von 4,2±3,5 % und einen durchschnittlichen SCSAK-Wert von 4,1±5,8 % auf. Die hohen Standardabweichungen weisen auf eine relativ große Variabilität hin. Ähnliches zeigte sich beim Pferd (KENNEY et al. 1995). Der mittlere Wert chromatininstabiler Spermien betrug beim Hengst 16±17 %.

5.3 Schlussbetrachtung

Die Fruchtbarkeit eines Rüden wird in erster Linie anhand der Ejakulatbeschaffenheit beurteilt. Hierfür werden in Anbetracht der bestehenden Rassevielfalt und der extremen Unterschiede in der Körpergröße zum Körpergewicht der Tiere korrelierte Normrichtwerte (Kap. 9.5) als Beurteilungsgrundlage zugrunde gelegt (GÜNZEL-APEL 1994). Da das Spermienchromatin als weiterer Parameter in der spermatologischen Diagnostik beim Hund zu sehen ist, galt es zunächst, einen fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assay für Rüdenspermien zu etablieren. Hierfür sollten zum einen methodische Einflüsse auf den modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assay untersucht werden. Zudem bestand die Frage, inwieweit die Ergebnisse des mfSCSA mit ausgewählten spermatologischen Parametern korrelierten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie lieferte der mfSCSA reproduzierbare Ergebnisse im Hinblick auf die Stabilität des Chromatins von Hundesperma gegenüber Säuredenaturierung in situ. Das Arbeiten mit verschiedenen Spermienkonzentrationen zeigte keinen Einfluss auf die mfSCSA-Werte. Das Sperma kann nach Samenentnahme abgedeckt und lichtgeschützt maximal 2h bei Raumtemperatur (18-21°C) vor Testdurchführung aufbewahrt werden. Eine längerfristige Lagerung ist nicht zu empfehlen, da aufgrund der Ergebnisse der 72-stündigen Lagerung von Nativsperma und Nativspermaausstrichen bei 5°C nach bereits 24h ein schädigender Einfluss auf das Spermienchromatin zu verzeichnen war. Die Durchführung des mfSCSA sollte bei Raumtemperatur (21°C) erfolgen, da der Anteil chromatinstabiler Spermien bei erhöhten Umgebungstemperaturen (26-27°C) bei drei von fünf Rüden

deutlich gestiegen ist. Die Auswertung gefärbter Ausstriche kann bei korrekter Lagerung (bei 5°C unter UV-Licht-ausschluss) auch noch bis zu vier Wochen nach dem Tag der Färbung vorgenommen werden. Die Untersuchung verschiedener Spermaarten (nativ, schockgefroren, kryokonserviert) ist mit dem mfSCSA grundsätzlich möglich. Allerdings sind die Ergebnisse von Nativspermaproben aufgrund signifikant mehr chromatininstabiler Spermien nicht mit den Ergebnissen kältebehandelter Proben (-196°C) vergleichbar. So müssen erhöhte mfSCSA-Werte in schockgefrorenen und kryokonservierten Proben kritischer beurteilt werden als die in Nativspermaproben. Die intra- und interindividuelle Variabilität der Spermienchromatinstruktur ist beim Hund relativ groß, was mit der bei dieser Spezies bestehenden genetischen Vielfalt und der fehlenden Selektion auf Fruchtbarkeit zusammenhängen dürfte. Da die beiden parallel ermittelten mfSCSA-Werte (SCSAT, SCSAK) signifikant korreliert sind, kann in Zukunft auf den SCSAK-Wert verzichtet werden. Lediglich im Einzelfall kann zum Ausschluss methodischer Fehlerquellen die Korrektur durch den SCSAK-Wert sinnvoll sein.

Rüden mit Dysspermie zeigten nicht zwangsläufig erhöhte Anteile chromatininstabiler Spermien auf. Hier ist der betreffende Ejakulatparameter von Bedeutung. So war eine mittels CMA gemessene verringerte Vorwärtsmotilität, eine verringerte VAP [Velocity Averaged Path (Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn)] und VCL [Velocity Curve Line (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn)], ein erhöhter Anteil membrangeschädigter, morphologisch abweichender und insbesondere kopfmorphologisch (> 5 %) abweichender Spermien mit einem erhöhten Anteil chromatininstabiler Spermien korreliert.

Der mfSCSA stellt im Vergleich mit der Flowzytometrie ein zeitaufwendigeres aber kostengünstigeres Verfahren dar. Der Vorteil des mfSCSA ist, dass neben der Spermienchromatinstruktur die Spermienmorphologie erfasst werden kann.

Es sind eine Reihe von weiterführenden Untersuchungen notwendig, um mehr Erkenntnisse über das canine Spermienchromatin gewinnen zu können.

Die von GUENIAT VON COURRUOX (1988) beim Rind gefundenen Hinweise für einen Zusammenhang des Chromatinstatus und der Rasse sollten weiter verfolgt

werden, da aufgrund der großen Rassevielfalt Entsprechendes bei der Spezies Hund denkbar ist.

Ferner wäre die Charakterisierung des im Spermienchromatin des Hundes vorhandenen Protamintyps von Interesse. Dies könnte genaueren Aufschluss über die Anfälligkeit des Spermienchromatins gegenüber Denaturierung in situ geben.

Um auch einen Bezug zum Fertilitätspotential von Rüden mittels des mfSCSA herstellen zu können, wären dahingehend weitere Versuchseinheiten erstrebenswert. Dazu wäre die Erstellung von Grenzwerten notwendig, mit deren Hilfe das Fertilitätspotential prognostisch wie diagnostisch definiert werden kann. In Bezug auf die Befruchtungskompetenz chromatininstabiler Spermien sind Studien über deren Bindungsfähigkeit am Eileiterepithel und an die Zona pellucida sowie über die embryonale Entwicklung nach der Befruchtung erforderlich.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Jasmin-Janina Biege

Etablierung eines fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assays im Rahmen der spermatologischen Diagnostik beim Hund

Ziel der Studie war es, den modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstruktur Assay (mfSCSA) für Hundesperma zu etablieren, indem methodische Einflüsse auf den mfSCSA und Beziehungen zwischen der Spermienchromatinstruktur und ausgewählten spermatologischen Parametern untersucht werden sollten.

In die Untersuchungen wurden Ejakulate von insgesamt 42 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von einem Jahr bis neun Jahren einbezogen. In die Samenuntersuchung gingen das Ejakulatvolumen, die Samendichte, die Spermiengesamtzahl, die mikroskopisch geschätzte und computergestützt ermittelte Spermienmotilität und -geschwindigkeit, der Anteil membrangeschädigter Spermien nach Eosin- und Propidiumiodidfärbung und der Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien ein. Das Sperma wurde je nach Fragestellung in nativer, aufgetauter schockgefrorener und / oder tiefgefrorener Form dem mfSCSA zugeführt. Die Untersuchungen mittels mfSCSA schlossen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die Einflüsse verschiedener Spermienkonzentrationen (50, 100, 300 und 600 Mio.), unterschiedlicher Raumtemperaturen (22 und 26-27°C), einer zweistündigen Exposition des Samens gegenüber verschiedenen Raumtemperatur- (18 und 20-21°C) und Lichtverhältnissen (lichtgeschützt und nicht lichtgeschützt, abgedeckt und nicht abgedeckt) sowie einer dreitägigen Lagerung von Nativsperma und Nativspermaausstrichen bei 5°C auf die Spermienchromatinstruktur ein. Ferner wurden die Auswirkungen einer vierwöchigen Lagerung Akridin Orange gefärbter Ausstriche bei 5°C unter UV-Lichtausschluss auf die Auswertbarkeit und der Einfluss der Schock- und Tiefgefrierung (-196°C) des Spermas auf die Spermienchromatinstruktur sowie die intraindividuelle Variabilität des Spermienchromatins in mehreren Ejakulaten unter-

sucht. Die mfSCSA-Werte (SCSAT = ausschließliche Computeranalyse, SCSAK = Computeranalyse, korrigiert) wurden mit Ejakulaten mit Normospermie und Dysspermie, dem Anteil vorwärtsmotiler Spermien, der Velocity Straight Line, der Velocity Averaged Path, der Velocity Curve Line, dem Anteil membrangeschädigter Spermien nach Propidiumiodidfärbung und dem Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien sowie mit dem Anteil an Veränderungen des Spermienkopfes korreliert.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

- Die geringen Standardabweichungen zwischen den Werten wiederholter Analysen der Spermienchromatinstruktur in Tiefgefrierspermaproben verschiedener Rüden (an fünf verschiedenen Untersuchungstagen: 0,7 % für SCSAT, 0,6 % für SCSAK; zwei Ausstriche pro Untersuchungstag und Ejakulat: 1,6 % für SCSAT, 1,4 % für SCSAK) kennzeichnen den mfSCSA als Testverfahren mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.
- Die Spermienkonzentration der Proben hatte keinen Einfluss auf die mfSCSA-Werte.
- Die Testdurchführung bei Raumtemperaturen von 22 und 26-27°C zeigte im Samen von drei der fünf Rüden einen deutlichen Anstieg des Anteils chromatininstabiler Spermien bei 26-27°C.
- Die zweistündige Exposition des Samens gegenüber verschiedenen Raumtemperatur- und Lichtverhältnissen hatte keinen Einfluss auf das Spermienchromatin.
- Die Spermienchromatinstabilität im Nativsperma war nach 48-stündiger Lagerung bei 5°C signifikant herabgesetzt ($p \leq 0,05$).
- Die 24- und 48-stündige Lagerung von Nativspermaausstrichen bei 5°C führte zu einer deutlichen Zunahme der Chromatininstabilität.
- Die Auswertbarkeit der Spermienchromatinstruktur in gefärbten, bei 5°C unter UV-Lichtausschluss aufbewahrten Spermaausstrichen war bis zu vier Wochen gegeben, was auf eine entsprechende Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes Akridin Orange hinweist.

- In Nativsperma wurden signifikant mehr chromatininstabile Spermien ermittelt als in aufgetautem schockgefrorenem und tiefgefrorenem Sperma (-196°C) ($p \leq 0,05$).
- Die intraindividuelle Variabilität des Prozentsatzes chromatininstabiler Spermien ist mit Standardabweichungen von 3,9 % (SCSAT) und 2,9 % (SCSAK) relativ groß.
- Die mittels SCSAT und SCSAK ermittelten Anteile chromatininstabiler Spermien sind hochsignifikant linear korreliert ($p < 0,001$).
- Der mittlere Anteil chromatininstabiler Spermien betrug bei Normospermie 4,2±3,5 % (SCSAT) bzw. 4,1±5,8 % (SCSAK), bei Dysspermie 15,7±24,3 % (SCSAT) bzw. 14,0±23,7 % (SCSAK). Dieser Unterschied war nicht signifikant.
- Es ergaben sich signifikante Korrelationen ($p \leq 0,05$) zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermien und dem durch Computeranalyse ermittelten Anteil vorwärtsmotiler Spermien, der Velocity Averaged Path und der Velocity Curve Line, dem Anteil membrangeschädigter Spermien nach Propidiumiodidfärbung sowie dem Gesamtanteil morphologisch abweichender Spermien.
- In Ejakulaten mit ≤ 5 % Veränderungen des Spermienkopfes betrug der mittlere SCSAT-Wert 7,9±14,0 % und der mittlere SCSAK-Wert 7,7±14,4 %. In Ejakulaten mit > 5 % Veränderungen des Spermienkopfes wurden mit 25,0±30,6 % und 24,3±30,8 % signifikant höhere mittlere SCSAT- und SCSAK-Werte nachgewiesen ($p \leq 0,05$).

Der mfSCSA zeichnet sich als Test mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zur Analyse der Stabilität des Chromatins caniner Spermien gegenüber Säuredenaturierung in situ aus. Zur Etablierung des mfSCSA als ergänzenden Parameter in der Fertilitätsdiagnostik beim männlichen Hund sind weiterführende Untersuchungen auf Zusammenhänge zwischen der Spermienchromatinstruktur und dem Fertiltätspotential sowie auf repräsentative Normbereiche notwendig.

7 SUMMARY

Jasmin-Janina Biege

Establishment of a fluorescence microscopical sperm chromatin structure assay in spermatological diagnosis of dogs

The aim of the study was to establish the modified fluorescence microscopical sperm chromatin structure assay (mfSCSA) for dog spermatozoa investigating methodical influences on the mfSCSA and relations between the sperm chromatin structure and selected semen parameters.

Ejaculates of a total of 42 dogs of different breeds aged between one year and nine years were included. The semen profile was composed of ejaculate volume, sperm density, total number of spermatozoa, microscopically estimated and computer analysed sperm motility and velocity, the proportion of spermatozoa with damaged plasma membrane stained by eosin and propidium iodide and the total percentage of morphologically abnormal spermatozoa. The mfSCSA was performed using native, thawed shock frozen or cryopreserved semen depending on the aspect examined. The investigations by mfSCSA included the repeatability of the results, the influences of different sperm concentrations (50, 100, 300 and 600 Mio.) and room temperatures (22 and 26-27°C), a 2h exposition of the semen to different room temperatures (18 and 20-21°C) and light conditions (light protected and not light protected, covered and not covered) as well as of storing native sperm and native sperm smears for three days at 5°C on the sperm chromatin structure. Further more the effects of storing Acridin Orange stained sperm smears under light protection at 5°C for four weeks, of semen shock freezing and cryopreservation (-196°C) on the sperm chromatin structure as well as the intraindividual variability of the sperm chromatin structure in different ejaculates were investigated.

The mfSCSA-values (SCSAT = computer assisted analysis, SCSAC = corrected computer assisted analysis) were correlated with normospermia and dysspermia, with the proportion of progressively motile spermatozoa, the Velocity Straight Line,

the Velocity Averaged Path, the Velocity Curve Line, the proportion of spermatozoa with damaged plasma membrane stained with propidium iodide (PI) and the total percentage of morphologically abnormal spermatozoa as well as the proportion of spermatozoa with abnormal heads ≤ 5 % and > 5 %.

The following results were obtained:

- The low standard deviations between the values of repeated analyses of the sperm chromatin structure in cryopreserved sperm samples of different dogs (at five different days of investigation: 0.7 % for SCSAT, 0.6 % for SCSAC; two smears per day and ejaculate: 1.6 % for SCSAT, 1.4 % for SCSAC) characterize the mfSCSA as test with a high repeatability of the results.
- The sperm concentration had no influence on the mfSCSA-values.
- Performance of the assay at room temperatures of 22 and 26-27°C showed a clear increase of the proportion of chromatin-instable cells at 26-27°C in semen of three of five dogs.
- Exposing native semen for 2h to different room temperatures (18 and 20-21°C) and light-conditions (light protected and not light protected, covered and not covered) had no influence on the sperm chromatin structure.
- The stability of the sperm chromatin was significantly decreased after storing native semen at 5°C for 48h ($p \leq 0.05$).
- Storage of native sperm smears at 5°C for 24 and 48h resulted in a marked increase of the proportion of chromatin-instable cells.
- The evaluation of the sperm chromatin structure in stained sperm smears is possible up to four weeks after staining if the stained smears are stored light protected at 5°C. This shows the high stability of the fluorescent stain Acridine Orange.
- In native semen significantly more chromatin-instable cells were found than in thawed shock frozen and cryopreserved semen (-196°C) ($p \leq 0.05$).
- Standard deviations of 3.9 % (SCSAT) and 2.9 % (SCSAC) indicate a marked intraindividual variability of the percentage of chromatin-instable cells.

- The proportions of chromatin-instable cells evaluated by SCSAT and SCSAC show a significantly linear correlation ($p < 0.001$).
- The average proportion of chromatin-instable cells of ejaculates with normospermia was 4.2±3.5 % (SCSAT) and 4.1±5.8 % (SCSAC), with dysspermia 15.7±24.3 % (SCSAT) and 14.0±23.7 % (SCSAC). This difference was not significant.
- The proportion of chromatin-instable cells was significantly correlated ($p \leq 0.05$) with the proportion of progressively motile spermatozoa, the Velocity Averaged Path and the Velocity Curve Line determined by computer analysis, the proportion of spermatozoa with damaged plasma membrane stained by propidium iodide as well as the total percentage of morphologically abnormal spermatozoa.
- In ejaculates with ≤ 5 % morphologically abnormal sperm heads the average SCSAT-value was 7.9±14.0 % and the average SCSAC-value was 7.7±14.4 %. In ejaculates with > 5 % morphologically abnormal sperm heads the mfSCSA-values (SCSAT: 25.0±30.6 %; SCSAC: 24.3±30.8 %) were significantly higher ($p \leq 0.05$).

The mfSCSA is characterized by a high repeatability of the results in analysing the stability of canine sperm chromatin against acid denaturation in situ. For establishing the mfSCSA as a supplementary parameter in the fertility diagnosis of male dogs continuing investigations with regard to connections between the sperm chromatin structure and the fertility potential as well as representative normal ranges are necessary.

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

ACEVEDO, N., J.H. BAME, L.A. KUEHN, W.D. HOHENBOKEN, D.P. EVENSON u. R.G. SAACKE (2001):
Effects of elevated testicular temperature on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine.
Biol.Reprod. 64, Suppl. 1, 217-218

AHMADI, A., u. S.C. NG (1999):
Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa.
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

ALMQUIST, J.O., u. R.P. AMANN (1976):
Reproductive capacity of dairy bulls. Pubertal characteristics and postpubertal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently.
J.Dairy.Sci. 59, 986-991

ALVAREZ, J.G. (2003):
Nurture vs. Nature: how can we optimize sperm quality?
J.Androl. 24, 640-648

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

AMANN, R.P., u. S.S. HOWARDS (1980):
Daily spermatozoal production and epididymal reserves of the human male.
J.Urol. 124, 211-215

ANDERSEN, K. (1975):
Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique.
Zuchthygiene 10, 1-4

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

ARAVINDAN, G.R., J. BJORDAHL, L.K. JOST u. D.P. EVENSON (1997):
Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis.
Exp.Cell.Res. 10, 231-237

BALHORN, R. (1982):
A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.
J.Cell.Biol. 93, 298-305

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., W.D. HOHENBOKEN u. D.P. EVENSON (1986a):
Sperm head morphology and nuclear chromatin structure evaluated by flow cytometry in a diallel cross in mice.
Can.J.Genet.Cytol. 28, 954-966

BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN u. D.P. EVENSON (1987):
Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.
Biol.Reprod. 36, 915-925

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

BARTH, A.D. (1992):
The relatiopnship between sperm abnormalities and fertility.
In: Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Colombia, MO, S. 47-63

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

BEDFORD, J.M., M.J. BENT u. H. CALVIN (1973):
Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa.
J.Reprod.Fertil. 33, 19-29

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

BIANCHI, P.G., G.C. MANICARDI, D. BIZZARO, U. BIANCHI u. D. SAKKAS (1993):
Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human spermatozoa.
Biol.Reprod. 49, 1083-1088

BLAZAK, W.F., u. J.W. OVERSTREET (1982):
Instability of nuclear chromatin in ejaculated spermatozoa of fertile men.
J.Reprod.Fertil. 65, 331-339

BOCHENEK, M., Z. SMORAG u. J.PILCH (2001):
Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination.
Theriogenology 56, 557-567

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

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., R. BLACHER, J.A. MAZRIMAS u. R. BALHORN (1987):
Analysis of hamster protamines: primary sequence and species distribution.
J.Cell.Biol. 105, 152a

COUROT, M., u. G. COLAS (1986):
The role of the male in embryonic mortality (cattle and sheep).
In: GREENAN, J.M., u. M.G. DISKIN (Hrsg): Embryonic Mortality in Farm Animals.
Verlag Martinus Nijhoff, Dordrecht, S. 195-206

CUMMINS, J.M., u. P.F. WOODALL (1985):
On mammalian sperm dimensions.
J.Reprod.Fertil. 75, 153-175

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

DARZYNKIEWIZC, Z. (1979):
Acridine orange as a molecular probe in studies of nuclei acids in situ.
In: MELAMED, M.R., P.F. MULLANEY u. M.L. MENDELSOHN (Hrsg.): Flow cytometry and sorting.
Verlag John Wiley and Sons, New York, S. 285-316

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

DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS u. M.R. MELAMED (1976):
Lymphocyte stimulation: A rapid multiparameter analysis.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 2881-2884

DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS u. M.R. MELAMED (1977):
Interphase and metaphase chromatin. Different stainability of DNA with acridine orange after treatment at low pH.
Exp.Cell.Res. 110, 201-214

DE JARNETTE, J.M., B.G. SAACKE, J. BAME u. C.J. VOGLER (1992):
Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle.
J.Anim.Sci. 70, 484-491

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 abscence of protamine p2 in humans.
J.Biol.Chem. 268, 10553-10557

DI GRASSIE, W.A. (2000):
Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric assays.
Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Blacksburg, Virginia, USA

DOBRINSKI, I., H.P.A. HUGHES u. A.D. BARTH (1994):
Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei.
J.Reprod.Fertil. 101, 531-538

DURAN, E.H., T. GÜRGAN, S. GÜNALP, M.E. ENGINSU, H. YARALI u. A. AYHAN (1998):
A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro.
Human Reprod. 13, 1235-1239

ELLIOT, F.I. (1978):
Semen evaluation.
In: SALISBURY, G.W., N.L. VAN DEMARK u. J.R. LODGE (Hrsg.): Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.
Verlag W.H. Freeman u. Co., San Francisco, S. 429-441

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., u. L.K. JOST (1993):
Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure.
Cell Proliferation 26, 147-159

EVENSON, D.P., u. L.K. JOST (1994):
Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability.
In: DARZYNKIEWICZ, Z., J.P. ROBINSON, H.A. CRISSMAN (Hrsg.): Methods in cell biology, vol. 42: Flow cytometry.
Verlag Orlando, FL: Academic press, S. 159-176

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

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., 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, 151-163

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

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.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., 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.P., 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., 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

EVENSON, D.P., L. THOMPSON u. L. JOST (1994):
Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.
Theriogenology 41, 637-651

FERNÀNDEZ, J.L., L. MURIEL, M.T. RIVERO, V. GOYANES, R. VAZQUEZ u. J.G. ALVAREZ (2003):
The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation.
J.Androl. 24, 59-66

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

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

GOGOL, P., M. BOCHENEK u. Z. SMORAG (2002):
Effect of rabbit age on sperm chromatin structure.
Reprod.Domest.Anim. 37, 92-95

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

HAINES, G., B. MARPLES, P. DANIEL u. I. MORRIS (1998):
DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the COMET assay.
Adv.Exp.Med.Biol. 444, 79-91

HAINES, G.A., J.H. HENDRY, C.P. DANIEL u. I.D. MORRIS (2001):
Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia.
Mutat.Res. 495, 21-32

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

HAMMADEH, M.E., A.S. ASKARI, T. GEORG, P. ROSENBAUM u. W. SCHMIDT (1999):
Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men.
Int.J.Androl. 22, 155-162

HARRISON, R.A.P., u. S.E. VICKERS (1990):
Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J.Reprod.Fertil. 88, 343-352

HOLSTEIN, A.F., C. SCHIRREN u. C.G. SCHIRREN (1973):
Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes.
J.Reprod.Fertil. 35, 489-491

HOSHI, K., H. KATAYOSE, K. YANAGIDA, Y. KIMURA u. A. SATO (1996):
The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm.
Fertil.Steril. 66, 634-639

HUGHES, C.M., S.E. LEWIS, V.J. MC KELVEY-MARTIN u. B.D. THOMPSON (1996):
A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay.
Mol.Hum.Reprod. 2, 613-619

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., D.P. EVENSON u. M.T. KAPROTH (1991):
Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm.
J.Dairy.Sci. 74, 3836-3848

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

KIRCHHOFF, C., u. R. IVELL (1995):
Molekulare Aspekte der Spermienreifung im Nebenhoden. Eine Übersicht.
Fertlität 11, 167-174

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

KRAUSE, D. (1965):
Zur Fertilitätsuntersuchung beim Hund.
Dtsch.Tierärztl.Wochenschr. 72, 3-10

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., J.D. BRANNIAN, N.P. SINGH, J.A. BURBACH, L.K. JOST, K.P. HANSEN, D.O. KREGER u. D.P. EVENSON (2001):
Chromatin structure in globozoospermia: A case report.
J.Androl. 22, 424-431

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, J.D., M.J. ALLEN u. R. BALHORN (1997a):
Atomic force microscope analysis of chromatin volumes in human sperm with head-shape abnormalities.
Biol.Reprod. 56, 42-49

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

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.

LOPES, S., J.G. SUN, A. JURISICOVA, J. MERIANO u. R.F. CASPER (1998):
Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.
Fertil.Steril. 69, 528-532

LOVE, C.C., u. R.M. KENNEY (1999):
Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion.
Biol.Reprod. 60, 615-620

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

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 A_3 accessibility.
Biol.Reprod. 52, 864-867

MANICARDI, G.C., A. TOMBACCO, D. BIZZARO, U. BIANCHI, P.G. BIANCHI u. D. SAKKAS (1998):
DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: Comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays.
Histochem.J. 30, 33-39

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 (1975):
Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa.
J.Biol.Chem. 250, 39-45

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., REID, B.O. u. BARCELLONA, W.J. (1976):
Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation.
Exp.Cell.Res. 99, 72-78

MILLAR, M.J., M.I. FISCHER, P.V. ELCOATE u. C.A. MAWSON (1958):
The effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of male rats.
Can.J.Biochem.Physiol. 36, 557-569

MONESI, V. (1965):
Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse.
Exp.Cell.Res. 39, 197-224

MONESI, V. (1976):
Spermatogenese und Spermatozoen.
In: AUSTIN, C.R. u. R.V. SHORT (Hrsg.):
Fortpflanzung der Säugetiere, 1. Keimzellen und Befruchtung.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 43-71

MOUSTAFA, M.H., R.K. SHARMA, J. THORNTEN, E. MASCHA, M.A. ABDEL-HAFEZ, 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

PARRISH, J.J., u. L. EID (1994):
In vitro fertilization and its relationship to bull fertility.
In: Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Colombia, MO, S. 68-73

PEDERSEN, H., u. H.J. REBBE (1974):
Fine structure of round-headed human spermatozoa.
J.Reprod.Fertil. 37, 51-54

PELUSO, J.J., A.A. LUCIANO u. J.C. NULSEN (1992):
The relationship between alterations in spermatozoal deoxyribonucleic acid, heparin binding sites, and semen quality.
Fertil.Steril. 57, 665-670

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

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

PONGSAWASDI, P., u. J.SVASTI (1976):
The heterogeneity of the protamines from human spermatozoa.
Biochim.Biophys. Acta 434 (2), 462

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

PRASAD, A.S., A. MIALE JR., Z. FARID, H.H. SANDSTEAD u. A.R. SCHULERT (1963):
Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism.
J.Lab.Clin.Med. 61, 537-549

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

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

ROUX, C., u. J.-P. DADOUNE (1989):
Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: Evaluation of the chromatin condensation.
Andrologia 21, 275-281

ROVAN, E. (2001):
Biochemie der Spermatozoa.
In: BUSCH, W. u. A. HOLZMANN, (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 23-54

SAACKE, R.G., J.M. DE JARNETTE, J.H. BAME, D.S. KARABINUS u. S. WHITMAN (1998):
Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle?
Theriogenology 51, 117-128

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.J., L.K. JOST u. D.P. EVENSON (1995):
Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay.
J.Androl. 16, 80-87

SAILER, B.L., L.J. SARKAR, J.A. BJORDAHL, L.K. JOST u. D.P. EVENSON (1997):
Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure.
J.Androl. 18, 294-301

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., 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

SAKKAS, D., F. URNER, D. BIZZARO, G. MANICARDI, P.G. BIANCHI, Y. SHOUKIR und A. CAMPANA (1998):
Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development.
Human Reprod. 13, Suppl. 4, S. 11-19

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

SCHENK, J.L., R.P. AMANN u. C.H. ALLEN (1987):
Effects of extender and insemination dose on post-thaw quality and fertility of bovine sperm.
J.Dairy.Sci. 70, 1458-1464

SCHIRREN, C.G., A.F. HOLSTEIN u. C. SCHIRREN (1971):
Über die Morphogenese rundköpfiger Spermatozoen des Menschen.
Andrologia 3, 117-125

SELIGMAN, J., u. R. SHALGI (1991):
Protein thiols in spermatozoa and epididymal fluid of rats.
J.Reprod.Fert. 93, 399-408

SENGER, P.L., J.R. MITCHELL u. J.O. ALMQUIST (1983):
Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25- and .5 ml straws.
J.Anim.Sci. 56, 1261-1268

SETCHELL, B.P., G. EPKE, J.L. ZUPP u. M.A. SURANI (1998):
Transient retardation in embryo growth in normal female mice made pregnant by males whose testes had been heated.
Human Reprod. 13, 342-347

SINGH, N.P., M.T. MC COY, R.R. TICE u. E.L. SCHNEIDER (1988):
A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell.
Exp.Cell.Res. 175, 184-191

SINGH, N., u. R. STEPHENS (1998):
X-ray-induced DNA double-strand breaks in human sperm.
Mutagenesis 13, 75-79

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

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

TANPHAICHITR, N., P. SOBHON, N. TALUPPETH u. P. CHALERMISARACHAI (1978):
Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man.
Exp.Cell.Res. 117, 347-356

TEJADA, R.I., J.C. MITCHELL, A. NORMAN, J.J. MARIK u. S. FRIEDMAN (1984):
A test for the practical evaluation of male fertility by acridin orange (AO) fluorescence.
Fertil.Steril. 42, 87-81

TWIGG, J.P., N. FULTON, E. GOMEZ, D.S. IRVINE u. R.J. AITKEN (1998a):
Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.
Human Reprod. 13, 1429-1436

TWIGG, J.P., D.S. IRVINE u. R.J. AITKEN (1998b):
Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection.
Human Reprod. 13, 1864-1871

VOGLER, C.J., J.H. BAME, J.M. DE JARNETTE, M.L. MC GILLIARD u. R.G. SAACKE (1993):
Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine.
Theriogenology 40, 1207-1219

VOGLER, C.J., R.G. SAACKE, J.H. BAME, J.M. DE JARNETTE u. M.L. MC GILLIARD (1991):
Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen.
J.Dairy.Sci. 74, 3827-3835

WAITES, G.M.H., u. B.P. SETCHELL (1969):
Physiology of the testis, epididymis and scrotum.
Adv.Reprod.Physiol. 4, 1-63

WARD, W.S. (1993):
Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa.
Biol.Reprod. 48, 1193-1201

WARD, W.S., u. D.S. COFFEY (1991):
DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells.
Biol.Reprod. 44, 569-574

WEITZE, K.-F. (2001):
Spermatologische Untersuchung.
In: BUSCH, W. u. A. HOLZMANN, (Hrsg.):
Veterinärmedizinische Andrologie.
Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 87-118

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 labaratory mice.
Reprod.Toxicol. 9, 21-33

World Health Organization (1999):
WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4. Aufl.
United Kingdom: Cambridge University Press

YANAGIMACHI, R. (1988):
Mammalian fertilisation.
In: KNOBIL, E., u. J.D. NEILL (Hrsg.):The physiology of reproduction.
Bd. 1, 1. Auflage
Raven Press, New York, S. 135-185

YANAGIMACHI, R. (1994):
Mammalian fertilization.
In: KNOBIL, E. u. J. NEILL et al. (Hrsg.): The Physiology of Reproduction.
Bd. 1, 2. Auflage
Raven Press, New York, S. 189-317

9 ANHANG

9.1 Laborbedarf

Laborbedarf für die Spermatologie:

Deckgläser (18 x 18 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co. KG
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
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. Jürgens, Hannover

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 mfSCSA:

Deckgläser (18 x 18 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co. KG (IDL), Nidderau
Eisschrank	Fa. Liebherr, Nürnberg
Kühlschrank	Fa. Liebherr, Nürnberg
Färbeküvetten nach Hellendahl	Fa. Roth, Karlsruhe
Laborwaage, Typ L310	Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Laborzentrifuge (Megafuge 2.0 R)	Fa. Heraeus Instruments, Hamburg
pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Pipette, einstellbar (200-1000 µl, 50-200 µl)	Fa. Socorex, Ecublens / Lausanne, Schweiz
Pipette, einstellbar (200-1000 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, gelb und blau	Fa. Greiner (685290 und 686290), Frickenhausen
Superfrost® plus Objektträger	Fa. Roth (867.1), Karlsruhe
Wasserstrahlpumpe (Haake)	Fa. Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden, Kunststoff, (10 ml)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden, Kunststoff, (10 ml)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Anlage zur Auswertung für den mfSCSA:

Fluoreszenzmikroskop und digitale Kamera:

Fluoreszenzmikroskop mit Phasen-Kontrasteinrichtung, Axioskop	Fa. Zeiss, Jena
Digitalkamera (Olympus DP 50 Microscope Digital Camera System für Windows 95 / 98 bzw. Windows NT)	Fa. Olympus, Hamburg

Software für Bildauswertung:

AnalySIS® 3.0	Soft Imaging System GmbH, Münster

9.2 Chemikalien

Chemikalien für die Spermatologie:

Citronensäure Monohydrat DAB ($C_6H_8O_7H_2O$)	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 mfSCSA:

Akridin Orange (Reinsubstanz)	Fa. Merck (1.15931.0025), Darmstadt
Citronensäure Monohydrat DAB ($C_6H_8O_7H_2O$)	Fa. Roth (5110.1), Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99,5 % p.a., wasserfrei gelagert)	Fa. Roth (4720.1), Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_42H_2O$)	Fa. Roth (4984.1), Karlsruhe
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) (Titrierkomplex III) ≥ 99 %, p.a. ACS	Fa. Roth (8043.2), Karlsruhe
1,4-Dithiothreit (DTT)	Fa. Roth (6908.1), Karlsruhe
Essigsäure 100 % DAB, Ph. Eur.	Fa. Roth (6755.2), Karlsruhe

Methanol ≥ 99,8 %. P.a., ACS, ISO	Fa. Roth (4627.2), Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck (1.06448.1000), Darmstadt

9.3 Rezepte

9.3.1 Formolcitrat

- 2,9 g tri-Natriumcitrat x $2H_2O$
- 100 ml Aqua bidest.
- Davon 4 ml verwerfen und durch 4 ml 37 %ige Formalinlösung ersetzen

Diese Lösung eignet sich zur Flüssigfixation von Spermien.

9.3.2 Tiefgefrierverdünner für Rüden (nach ANDERSEN 1975)

Stammlösung:

- Tris-(hydroxymethyl) aminomethan	30,28 g
- Citronensäure Monohydrat	17,8 g
- D(-)-Fructose	12,5 g
- Aqua dest.	ad 1000 ml

TRIS-Gebrauchslösung für 100 ml:

- 80 ml Stammlösung
- 20 ml Eidotter
- Glycerin*

* Berechnung des Glycerinanteils von 6 %:

6 : (100-6) x Volumen des verdünnten Samens = Glycerinzusatz (ml)

Das Ergebnis wird mit 1,14 (100 : 87) multipliziert, um die tatsächliche Glycerinmenge zu ermitteln.

Der Verdünner wird steril filtriert, auf pH 6,6 eingestellt und auf 39°C erwärmt. Der Anteil von Sperma und Verdünner wird je nach Dichte (Mio. / ml) der spermienreichen Phase im Verhältnis 1+3, 1+4 oder 1+5 bestimmt.

Dichte des Spermas	Anteil Sperma + Anteil Verdünner
300 - 500 Mio./ ml	1+3
500 - 800 Mio./ ml	1+4
> 800 Mio./ ml	1+5

Das TRIS-verdünnte Sperma wird in mittlere Pailletten à 0,5 ml abgefüllt, in Plastikracks verpackt und zunächst für 3h im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt. Dann wird es für 10 Minuten in Stickstoffdampf (-140°C) überführt und schließlich in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgesetzt und gelagert.

9.3.3 Rezepte für den mfSCSA

9.3.3.1 tri-Natriumcitratpuffer 2,9 %

Ansatz von 1000 ml:

- 29 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- 3,36 g EDTA
- 1000 ml Aqua bidest.

Der Puffer kann bei Raumtemperatur (ca. 21°C) bis zu drei Wochen gelagert werden.

9.3.3.2 Carnoy's solution, pH 2

Ansatz von 60 ml:

- 20 ml Essigsäure DAB
- 40 ml Methanol 99,8 %

9.3.3.3 0,1-molare Citronensäure-Stammlösung

Ansatz von 1000 ml:

- 21,01 g Citronensäure Monohydrat DAB
- 1000 ml Aqua bidest.

Die Lösung ist bei 5°C gelagert bis zu drei Wochen haltbar.

9.3.3.4 0,3-molare di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung

Ansatz von 100 ml:

- 5,34 g di-Natriumhydrogenphosphat
- 100 ml Aqua bidest.

Die Lösung ist bei 5°C gelagert bis zu zwei Wochen haltbar.

9.3.3.5 Akridin Orange (AO) Stammlösung

Ansatz von 100 ml:

- 0,1 g Akridin Orange (Reinsubstanz)
- 100 ml Aqua bidest.

Die Lösung wird unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 5°C gelagert und ist bis zu drei Wochen haltbar.

9.4 Softwareeinstellung für den mfSCSA

9.4.1 Klassifizierung

Funktion: Klassifizierung definieren

Klassifizierung: SCSA-Phase

	von	bis	Name
1	0,00	1,50	s-DNA
2	1,50	2,50	d-DNA

s-DNA = einsträngige DNA (single)
d-DNA = doppelsträngige DNA (double)

9.4.2 Detektion

Funktion: Detektion definieren

Ausschluss von Partikeln:

- Minimum: 1500 Pixel
- Löcher füllen: √
- Benutzte Bereiche: √
- Im Bereich: 0
- Gesamtanzahl: 0

Randpartikel:

- Abschneiden: -
- Einbeziehen: -
- 50 % einbeziehen: -
- nicht einbeziehen: √

Konnektivität der Pixel:

- nur Seitenkanten: -
- auch Diagonale: √

Suchbereich:

- Rahmen: √
- ROIs: -
- Maske: -

Funktion: Messung definieren

Partikel		
	Minimaler Bereich	**Maximaler Bereich**
ID Klasse	1	2
ID Partikel	keiner	keiner
Klassenname	keiner	keiner
Phase	keiner	keiner
Phasenname	keiner	keiner

Klassen		
	Minimaler Bereich	**Maximaler Bereich**
ID Klasse	1	2
Anzahl Partikel	keiner	keiner
Klassenname	keiner	keiner
Phasenname	keiner	keiner

Funktion: Klassifizierung

Auswahl:

- Kriterium: Phase
- Klasse: SCSA-Phase

Darstellung der Partikel:

- Stil: gefüllt

Bezeichnung der Messung:

- Typ: ID-Partikel
- Farbe: automatisch
- Text im Bild vergrößern: √
- Wenn Fläche größer als: 200 Pixel
- Name: -
- Einheit: -

Funktion: Ergebnisse

Tabelle:

- Darstellung der Klassen: -
- Ergebnis in Farbe anzeigen: √
- Formfaktor auf 1 begrenzen: √

9.4.3 Manueller Weißabgleich

Rot	0,9
Grün	0,9
blau	0,57

9.4.4 Farbschwellwertdateien

Die in dieser Studie am häufigsten genutzten Farbschwellwertdateien waren folgendermaßen definiert:

Farbschwellwertdatei 1

Rote Population:

	Minimum (nm)	Maximum (nm)
Rot	145	255
Grün	20	108
Blau	0	60

Grüne Population:

	Minimum (nm)	Maximum (nm)
Rot	61	122
Grün	42	125
Blau	0	60

Farbschwellwertdatei 2

Rote Population:

	Minimum (nm)	Maximum (nm)
Rot	160	255
Grün	40	98
Blau	0	60

Grüne Population:

	Minimum (nm)	Maximum (nm)
Rot	84	150
Grün	45	101
Blau	0	60

9.5 Beurteilungsgrundlage für Normo- und Dysspermie

Richtwerte und noch tolerierbare Grenzwerte ( ) der Ejakulatbeschaffenheit (nach GÜNZEL-APEL 1994)

	kg KGW				
	bis 10	**10 bis 20**	**20 bis 40**	**40 bis 60**	**> 60**
SGZ ($x10^6$) (min.)	450 (300)	800 (500)	1200 (800)	1500 (1000)	
V-Mots (%) (min.)	60-70 (50)				
EOS (%) (max.)	5-10 (15)				
MAS (%) (max.)	10-25 (30)				

SGZ = Spermiengesamtzahl
V-MOTS = vorwärtsmotile Spermien
EOS = eosingefärbte Spermien
MAS = morphologisch abweichende Spermien

9.6 Spermatologische Beispielbefunde mit unauffälligen und erhöhten mfSCSA-Werten

	Rüde A	Rüde B*	Rüde C	Rüde D	Rüde E
MS [%]	97,3	92,1	21,6	17,2	36,9
VSL [µm/sec]	77,9	92,4	71,5	49,8	75,1
VAP [µm/sec]	100,9	107,9	78,8	56,7	79,1
VCL [µm/sec]	135,6	132,4	97,3	76,8	97,1
PI [%]	3,5	4,5	78,8	72,5	71,5
MG [%]	9,5	12,5	86,0	75,5	84,0
SCSAT [%]	1,22	-	28,33	55,39	75,18
SCSAK [%]	1,14	25,09	28,43	54,47	77,92

Rüde A: Normospermie, Spermien mit ≤ 5 % Kopfveränderungen, unauffällige mfSCSA-Werte

Rüde B*: Normospermie, Spermien mit ≤ 5 % Kopfveränderungen, erhöhter SCSAK-Wert

Rüde C+D: Dysspermie, Spermien mit > 5 % Kopfveränderungen, erhöhte mfSCSA-Werte

Rüde E: Dysspermie, Spermien mit ≤ 5 % Kopfveränderungen, erhöhte mfSCSA-Werte

* Vorbericht von Rüde B:

Der achtjährige Rüde war seit sieben Jahren im Zuchteinsatz und hatte in dieser Zeit ca. 60 Hündinnen gedeckt. Die Wurfgröße betrug zwei bis neun Welpen. Im Jahr 2001 haben von 5 gedeckten Hündinnen alle geworfen. Zwei von Januar bis März 2002 gedeckte Hündinnen haben nicht geworfen. In beiden Fällen handelte es sich um Erstlingshündinnen.

10 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anne-Rose Günzel-Apel für die Überlassung des interessanten Themas, die persönliche Betreuung, die jederzeit gewährte Unterstützung und die wertvollen Erfahrungen, die ich auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin beim Hund sammeln konnte.

Frau Prof. Dr. Dagmar Waberski danke ich für ihr entgegengebrachtes Interesse an dieser Studie, ihre Hilfsbereitschaft in Fachfragen und ihre aufmunternden Worte.

Bei Herrn Dr. Martin Beyerbach, Maria Hartmann und Sabrina Bennack möchte ich mich ganz herzlich für die sehr freundliche und kompetente Unterstützung bei der Bearbeitung der statistischen Fragen bedanken.

Ein großer Dank gilt den Laborantinnen Erika Schröder, Inga Reinert und Petra Hasenleder, ohne deren stets entgegengebrachte Hilfe meine Arbeit nicht so zeitplanmäßig verlaufen wäre.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich dem gesamten Arbeitskreis der Hundeabteilung, insbesondere Barbara Gröpper, Etta Politt, Tatjana Höftmann, Dr. Joachim Schöne und Dr. Christina Bunck sowie dem gesamten Tierpflegerteam für die jederzeit gewährte, tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche sagen.

Bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Reproduktionsmedizin möchte ich mich für eine gute und lehrreiche Zeit, sowohl fachlich als auch privat, bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Dietmar Helms und Dr. Inken Löhmer, die mir das fachliche „know how“ für den mfSCSA nähergebracht und mir in vielen Fragen ein großes Maß an Hilfsbereitschaft entgegen gebracht haben.

Meinen Freundinnen Miriam-Jasmin Hemmes, Nike Schulte-Loh und Julia Hattendorf möchte ich für eine schöne gemeinsame Zeit während des Studiums in Hannover danken.

Meinem Bruder Aljosha danke ich für das gründliche Korrekturlesen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, auf die ich mich stets verlassen konnte, insbesondere meiner Mutter, die mir immer Mut gemacht hat und ständig an mich glaubt.

Schließlich geht mein ganz persönlicher Dank an Dr. Alpha Deen, der mir jederzeit väterlichen Halt geboten und das Promotionsstudium finanziell ermöglicht hat.