Aus dem Institut für Reproduktionsmedizin
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Untersuchung der in vitro Bindungsfähigkeit porciner Spermien im Ovidukt-Explant-Assay und im DudFinder® Sperm-Binding Assay und deren Beziehung zu spermatologischen Qualitätsparametern

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von

Frank Karl Magnus

aus Wittmund

Hannover 2002

Wissenschaftliche Betreuung:

Apl.-Prof. Dr. med. vet. Dagmar Waberski

1. Gutachter: Apl.-Prof. Dr. med. vet. Dagmar Waberski

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Christine Aurich

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2002

Meinen Eltern

als Dank und zur Freude

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 11

2 LITERATURÜBERSICHT 12

2.1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON SPERMIEN 12

2.1.1 Spermienbindung an das Oviduktepithel 12

2.1.2 Spermienbindung an die Eizelle 16

2.2 BINDUNGSASSAYS ZUR FERTILITÄTSPROGNOSE 20

2.2.1 Zonabindungsassay (ZBA) 21

2.2.2 Hemizonabindungsassay (HZA) 26

2.2.3 DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA) 29

2.2.4 Ovidukt-Explant-Assay (OEA) 32

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN 36

3.1 MATERIALIEN 36

3.1.1 Untersuchungsmaterialien 36

3.2 METHODEN 36

3.2.1 Konventionelle spermatologische Untersuchung 37

3.2.2 Percoll-Dichtegradientenzentrifugation und Verdünnung des Spermas 37

3.2.3 Darstellung der Membranintegrität mittels Propidiumiodidfärbung .. 38

3.2.4 Ovidukt-Explant-Assay 39

3.2.5 DudFinder® Sperm-Binding Assay 43

3.2.6 Statistische Auswertung 47

4 ERGEBNISSE 49

4.1 SPERMATOLOGISCHE ERGEBNISSE 49

4.1.1 Spermatologische Parameter 49

4.1.2 Einfluß der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation auf spermatologische Parameter 52

4.2 ERGEBNISSE DES OVIDUKT-EXPLANT-ASSAYS (OEA) 53

4.2.1 Beeinflussung der Spermienbindungskapazität durch die Herkunft des Eileiters 53

4.2.2 Einfluß der Lagerung auf die Spermienbindung 54

4.2.3 Spermienbindung in Abhängigkeit von der morphologischen Qualität der Ejakulate 57

4.2.4 Korrelation der Spermienbindungsfähigkeit zu konventionellen und modernen spermatologischen Parametern 59

4.3 ERGEBNISSE DES DUDFINDER® SPERM-BINDING ASSAYS (SBA) . 62

4.3.1 Einfluß der Lagerung auf die Spermienbindung 62

4.3.2 Spermienbindung in Abhängigkeit von der morphologischen Qualität der Ejakulate 65

4.3.3 Korrelation der Spermienbindungsfähigkeit zu konventionellen und modernen spermatologischen Parametern 66

4.4 VERGLEICH DER BINDUNGSFÄHIGKEIT VON EBERSPERMIEN IM OEA UND IM SBA 68

4.5 SPERMATOLOGISCHE DIAGNOSTIKA IN ANWENDUNG FÜR SUBFERTILE EBER 69

5 DISKUSSION 73

5.1 SPERMIENBINDUNGSFÄHIGKEIT IM OVIDUKT-EXPLANT-ASSAY 73
5.2 SPERMIENBINDUNGSFÄHIGKEIT IM DUDFINDER® SPERM-BINDING ASSAY 84
5.3 SCHLUSSFOLGERUNG 87

6 ZUSAMMENFASSUNG 88

7 SUMMARY 90

8 LITERATURVERZEICHNIS 92

9 ANHANG 115

9.1 LABORBEDARF 115
9.2 MEDIKAMENTE UND REAGENZIEN 116
9.3 PUFFER, LÖSUNGEN, MEDIEN UND VERDÜNNER 116
9.4 MATERIALIEN FÜR DEN OVIDUKT-EXPLANT-ASSAY 122
9.5 MATERIALIEN FÜR DEN DUDFINDER® SPERM-BINDING ASSAY 123

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 124

DANKSAGUNG 126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	**Abb**ildung
BI	**B**indungs**i**ndex
BSA	**B**ovines **S**erum**a**lbumin
BTS	**B**eltsville **T**hawing **S**olution
bzw.	**Bez**iehungs**w**eise
°C	Grad **C**elsius
ca.	cir**ca**
Ca^{2+}	Kalziumionen
cm	Zentimeter
dest.	**dest**illata (einfach destilliert)
d.h.	**d**as **h**eißt
EBP	**E**gg-**B**inding-**P**rotein
EDTA	**E**thylen**d**iamin**t**etra**a**cetat
et al.	**et a**lii (und andere)
g	**g**ramm / **G**ravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec^2)
GalTase	β-(1-4)-**Gal**actosyl**t**transfer**ase**
h	**h**our (Stunde)
Hepes	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethan
HZA	**H**emi**z**onabindungs**a**ssay
KB	**K**ünstliche **B**esamung
kg	**K**ilo**g**ramm
l	**L**iter
M	**M**olar
MAS	**M**orphologisch **a**bweichende **S**amenzellen
mg	**M**illi**g**ramm
min	**Min**ute
Mio.	**M**illionen
ml	**M**illi**l**iter
mM	**M**illi**m**olar
mod.	**Mod**ifiziert
mosm	**M**illi**osm**olar
mZP 1,2,3	**M**urines **Z**ona **P**rotein 1,2,3
n	Anzahl der Tiere / Untersuchungen
NaCl	**Na**trium**c**h**l**orid
NaOH	**Na**tronlauge
NAR	**n**ormaler **a**pikaler **R**and
Nr.	**N**umme**r**
n.s.	**n**icht **s**ignifikant
OEA	**O**vidukt-**E**xplant-**A**ssay
p	Wahrscheinlichkeitswert für die Nullhypothese
PBS	**p**hosphat **b**uffered **s**aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PI	**P**ropidium**i**odid

PVM	**P**eri**v**itelline **M**embran von Hühnereiern
R	Pearsonscher Korrelationskoeffizient
®	eingetragenes Warenzeichen
SBA	DudFinder® **S**perm-**B**inding **A**ssay
SD	**s**tandard **d**eviation (Standardabweichung)
Tab.	**Tab**elle
u.	**u**nd
u.a.	**u**nter **a**nderem
UTV	**U**tero**t**ubale **V**erbindung
µg	Mikro**g**ramm
µl	Mikro**l**iter
µm	Mikro**m**eter
z.B.	**z**um **B**eispiel
ZBA	**Z**ona**b**indungs**a**ssay
ZP	**Z**ona **p**ellucida
ZP A,B,C	**Z**ona **P**rotein A,B,C
z.T.	**z**um **T**eil

1 EINLEITUNG

Die Bindungsfähigkeit von Spermien an das Oviduktepithel ist essentiell für Überleben, Speicherung und Vorbereitung auf den Befruchtungsvorgang (Kapazitation) von Spermien im weiblichen Genitale. Mit dem Ovidukt-Explant-Assay wurde ein Testsystem etabliert, mit dem das Bindungsvermögen von Eberspermien an Eileiterepithel in vitro untersucht werden kann. Bislang vorliegende Daten (SUAREZ et al. 1991; PETRUNKINA et al. 2001a) stützten sich lediglich auf eine geringe Eberzahl und beschrieben vorrangig die Mechanismen der Eileiterepithelbindung. Weiterhin steht mit dem DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA) ein kommerzieller Test zur Verfügung, der die Bindung von Spermien an ein Hühnerei-Proteinextrakt, welches die Zona pellucida imitiert, erfaßt (BRABATO et al. 1998; GILL et al. 1999). Bei einigen Spezies wurde ein Zusammenhang zwischen der Bindungsfähigkeit von Spermien im SBA und der Befruchtungsleistung in vivo beschrieben (BRABATO et al. 1998; GILL et al. 1999).

Die eigenen Versuche sind vor dem Hintergrund des Einsatzes flüssigkonservierten Eberspermas geplant. Kurzzeitkonservierung (bis 72 h) von Ebersperma hat nachweislich einen Abfall der Befruchtungsleistung zur Folge, die eberindividuell sehr unterschiedlich ist und sich in den konventionellen spermatologischen Parametern (Motilität und Morphologie) oft nicht erkennen läßt (WABERSKI et al. 1994). Unter Umständen ist die funktionelle Eigenschaft von Spermien, an das Oviduktepithel zu binden lagerungsabhängig beeinträchtigt und durch einen in vitro-Test messbar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Spermienbindungseigenschaften einer größeren Stichprobe im Besamungseinsatz stehender Eber zu testen und diese in ihrer Beziehung zu konventionellen spermatologischen Parametern während einer 72-stündigen Lagerungsdauer zu untersuchen. Exemplarisch werden die Spermienbindungsfähigkeit und spermatologische Qualitätsparameter für eine Gruppe subfertiler Eber dargestellt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON SPERMIEN

2.1.1 Spermienbindung an das Oviduktepithel

Der kaudale Isthmus des Eileiters stellt das funktionelle Spermienreservoir als gemeinsame Reproduktionsstrategie bei vielen Säugetierspezies dar (TÖPFER-PETERSEN et al. 2002).
Dieses funktionelle Reservoir erfüllt folgende wichtige Funktionen (SUAREZ 2001; TÖPFER-PETERSEN et al. 2002):

- Selektion intakter, befruchtungsfähiger Spermien
- Aufrechterhaltung der Vitalität der Spermatozoen bis zum Zeitpunkt der Ovulation
- Begrenzung der Spermienanzahl am Befruchtungsort durch gezielte Loslösung und damit Verhinderung einer Polyspermie
- Regulation der Hyperaktivierung und Kapazitation

Obwohl noch nicht bei allen domestizierten Haussäugetieren nachgewiesen (vor allem nicht beim Menschen), nimmt man eine Speicherung von Spermatozoen im unteren Eileiterabschnitt an, die einer Synchronisation von Spermienaufstieg und Ovulation dient (HUNTER 1980, 1988; SMITH u. YANAGIMACHI 1991). Dieser Vorgang ist in Anbetracht der besseren Entwicklung von Embryonen nach einem früheren Befruchtungszeitpunkt der ovulierten Eizelle auch sinnvoll (YANAGIMACHI 1994).
Beim Schwein überleben Spermien in der uterotubalen Verbindung (UTV) und im unteren Oviduktisthmus bis zu 72 h nach der Insemination (HUNTER 1988). Ein Teil der Spermienpopulation befindet sich zentral im Lumen des Eileiters, davon sind die meisten Spermien in einer viskösen Masse gefangen. Ein anderer Teil bindet an das Epithel am Boden der Schleimhautfalten (MBURU et al. 1997). Die Spermien, die sich im Lumen des Ovidukts befinden, weisen Veränderungen ihrer Morphologie im Sinne eines Alterungsprozesses auf. In den Schleimhautfalten können die Sperma-

tozoen, geschützt vor dem Transport durch die Zilien gespeichert werden (BLANDAU u. GADDUM-ROSSE 1974). Als Voraussetzung für das Überleben und die Kapazitation der Spermatozoen wird der enge Kontakt zwischen dem apikalen Teil des Spermienkopfes und dem Eileiterepithel angesehen. Bei verschiedenen Haussäugetieren wurden nach Besamungen Beobachtungen in situ gemacht, die auf eine sehr enge Spermien-Epithel-Interaktion hinwiesen. In elektronenmikroskopischen Studien zeigten HUNTER et al. (1991) für das Rind, FLECHON und HUNTER (1981) sowie MBURU et al. (1997) für das Schwein und SCOTT et al. (2000) für das Pferd einen sehr innigen Kontakt der Spermien mit dem Epithel des Eileiters, den SMITH und YANAGIMACHI (1990) für den Hamster als „wie eingetaucht in die Mucosa“ beschrieben. Dieser Kontakt scheint das längere Überleben dieser Spermatozoen gegenüber den luminal ungebundenen Samenzellen zu sichern. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Mäusen, Rindern und Kaninchen gemacht werden (SUAREZ 1987; SUAREZ et al. 1997; OVERSTREET et al. 1980).

Für die Fledermaus, deren Spermien bis zu sieben Monate im Eileiter überleben (RACEY 1979), sind ultrastrukturelle und histochemische Unterschiede zwischen spermienfreien Oviduktepithelbereichen und den Bereichen, die mit Spermien interagieren, beobachtet worden (KRUTZSCH et al. 1982; KRISHNA 1997). Diese funktionellen Änderungen könnten die Spermienbindung und –ablösung regulieren. Erste Beweise für eine biochemische Bindung von Spermien an Eileiterepithel erbrachten DEMOTT et al. (1995) in einer Studie mit verschiedenen Glykoproteinen, deren inhibitorische Potenz auf die Eileiterepithelbindung von Hamsterspermien nach gemeinsamer Inkubation betrachtet wurde. Dabei zeigte Fetuin das größte hemmende Potential. Die dünne Beschaffenheit des Eileiters beim Hamster ermöglicht eine direkte transilluminatorische Beobachtung der gebundenen Samenzellen in vivo (SMITH u. YANAGIMACHI 1990; DEMOTT et al. 1995). Die Spermien-Eileiter-Interaktion für andere Tierarten kann nur indirekt an Oviduktexplanten oder Oviduktzellkulturen in vitro studiert werden. Mit diesen Untersuchungsmethoden sind bisher Studien an equinen, bovinen und porcinen Spermien durchgeführt worden. Die Bindung von equinen Spermatozoen an Eileiterepithel in vitro wurde effektiv durch Asialofetuin und dessen terminalen Zucker Galactose gehemmt (LEFEBVRE et al. 1995a;

DOBRINSKI et al. 1996a), bovine Spermienbindung an Explante wurde spezifisch durch Fucoidin und dessen Bestandteil Fucose geblockt (LEFEBVRE et al. 1997) und bei porcinen Spermien wurden Maltose, Laktose und Mannose als die Zucker mit der größten inhibitorischen Potenz festgestellt (GREEN et al. 2001; WAGNER et al. 2002).

Für alle untersuchten Tierarten wird ein gemeinsamer kohlenhydrat-vermittelter Prozeß der Spermien-Ovidukt-Bindung angenommen, der in seiner individuellen Charakteristik allerdings speziesspezifisch zu sein scheint.

Ein Beispiel für Zell-Zell-Erkennungen sind Lektin-Kohlenhydratbindungen (SHARON u. LIS 1989). Bei Lektinen handelt es sich um ubiquitär vorkommende kohlenhydratbindende Proteine aus nicht-immuner Herkunft. Lektine vermitteln als sogenannte Selektine im menschlichen und tierischen Immunsystem die Bindung von Leukozyten an das Gefäßendothel. Ein neue Klasse lektin-ähnlicher Moleküle wird durch Spermadhäsine repräsentiert. Es handelt sich um Bestandteile des Seminalplasmas, welche nach der Ejakulation die Spermienmembran mantelförmig umlagern (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998; JANSEN et al. 2001).

Eine Reihe von Autoren betrachten die Spermien-Eileiter-Bindung als lektinvermittelten Prozeß (SINOWATZ et al. 1997; ENSSLIN et al. 1998; TÖPFER-PETERSEN 1999). Parallelen zu anderen, natürlich vorkommenden, lektinvermittelten Kohlenhydratbindungen unterstützen diese Annahme. So zeigen strukturell ähnliche tierische Lektine verschiedene Kohlenhydratspezifitäten (GABIUS 1997; VON DER LIETH et al. 1998) und bereits der Wechsel einer einzelnen Aminosäure eines Lektins kann dessen Bindungsspezifität entscheidend verändern (SOLIS et al. 2001). Weitere Hinweise für die Theorie der lektinvermittelten Bindung erbrachten die Ergebnisse von GOLUBOFF et al. (1995) und GENG et al. (1997), die auf der Plasmamembran der Spermatozoen von Ratten und Menschen Lektine nachwiesen. Gleiches gelang REVAH et al. (2000) und IGNOTZ et al. (2001) an bovinen, sowie WAGNER et al. (2002) an porcinen Spermien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Frage des „Who-is-Who“ der Spermien-Eileiter-Bindung in Form einer Erkennung vom Eileiterepithel präsentierter Glykoproteine durch oberflächenassoziierte Spermienlektine beantwortet werden könnte. Der hemmende Einfluß von Monosacchariden auf die

Eileiterbindung von Eberspermien (GREEN et al. 2001; WAGNER et al. 2002) widerspricht allerdings einer alleinigen lektin-vermittelten Bindung, denn vergleichend binden Selektine in Entzündungsreaktionen nur sehr schlecht an Einfachzucker (WEIS u. DICKAMER 1996).

Die Bindung an das Oviduktepithel schützt die gebundenen Spermatozoen vor Schäden durch den Alterungsprozeß. Porcine Spermien, die zusammen mit Eileiterepithelien inkubiert wurden, blieben in vitro länger befruchtungskompetent als Spermien einer nur im Medium inkubierten Kontrollgruppe (SUAREZ et al. 1991; GUALTERI u. TALEVI 2000). Für an Eileiterepithel gebundene equine Spermien konnten DOBRINSKI et al. (1996b, 1997) geringere zytoplasmatische Kalziumgehalte im Vergleich zu freischwimmenden Spermien feststellen, zusätzlich kapazitierten die gebundenen Spermatozoen langsamer. Analog stellte sich dieser Sachverhalt für porcine Spermien in einer kinetischen Studie dar (PETRUNKINA et al. 2001b). Der hormonelle Status scheint das Bindungsverhalten von Spermien an Oviduktepithel nicht zu beeinflussen, denn sowohl bovine (LEVEBRE et al. 1995b) als auch porcine Spermatozoen (PETRUNKINA et al. 2001a) binden an Explante von prae-, postovulatorischen oder dieöstrischen Spendertieren. Es ist der Zustand des Spermiums, der die Bindung und damit auch die Ablösung bedingt. Kapazitierte Spermien besitzen ein, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermindertes Bindungspotential an Eileiterepithel (LEFEBVRE u. SUAREZ 1996; FAZELI et al. 1999). GUALTIERI und TALEVI (2000) zeigten für bovine Samenzellen, dass die gebundene Population ausschließlich aus akrosomenintakten Spermatozoen besteht. In einer Folgestudie konnte nach Behandlung von an Eileiterepithel gebundenen Bullenspermien mit Heparin, welches als Kapazitationsinduktor für bovine Samenzellen Anwendung findet, eine Ablösung der Spermatozoen vom Oviduktepithel in Verbindung mit hyperaktivierter Motilität erzielt werden (TALEVI u. GUALTIERI 2001). BUREAU et al. (2002) beobachteten eine vermehrte Ablösung von an Vesikeln aus Oviduktepithel-Zellkulturen gebundenen porcinen Spermatozoen nach Zugabe eines Kalziumionophors.

SUAREZ et al. (1998) sehen es daher als wahrscheinlich an, dass die Veränderungen der Spermienmembran während der Kapazitation die kohlenhydratbindenen

Lektine modifizieren bzw. reduzieren und es so zu einer Lockerung der Bindung kommt. Zudem wird eine mit der Kapazitation einhergehende Hyperaktivität der Spermien beobachtet (DEMOTT u. SUAREZ 1992). Beide Prozesse führen gemeinsam zur endgültigen Ablösung der Samenzellen vom engen Epithelkontakt (SUAREZ 2001).

Hyperaktivierte Spermien zeigen eine modifizierte Flagellenbewegung (SUAREZ et al. 1992), die zu einer kräftigeren und schnelleren Vorwärtsbewegung führt. Durch diesen mechanischen Vorteil ist es den kapazitierten Spermatozoen möglich, schneller durch das visköse Medium des Eileiters zum Ort der Befruchtung zu gelangen als frisch ejakulierten Spermien (SUAREZ u. DAI 1992).

CHIAN et al. (1995) und MAHMOUD und PARRISH (1996) beobachteten eine verstärkte Kapazitation boviner Spermien, die mit löslichen Oviduktproteinen inkubiert wurden. Darüber hinaus konnte ein enger zeitlicher Zusammenhang von Kapazitation bzw. Hyperaktivierung und Ovulation festgestellt werden, da gebundene Spermatozoen, die bereits praeovulatorisch endgültig freigesetzt wurden, zum Zeitpunkt der Ovulation nicht mehr befruchtungsfähig waren (HUNTER 1995). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme einer Kapazitationsinduktion der im Reservoir gebundenen Samenzellen durch Hormone, die um den Zeitpunkt der Ovulation im Eileiter auftreten. Spermienablösung und Ovulation werden dadurch zeitlich koordiniert (HUNTER 1995). Der gesamte Prozeß sichert die Anwesenheit von funktionell-kompetenten Gameten zur richtigen Zeit am Ort der Befruchtung (TÖPFER-PETERSEN et al. 2002).

2.1.2 Spermienbindung an die Eizelle

Man versteht unter der Spermien-Eizell-Bindung im engeren Sinne die Bindung der Spermien an die Zona pellucida, an die extrazelluläre Matrix also, die die Eizellen aller Säugetiere umgibt (SINOWATZ et al. 2001b). Grundlage für die Spermien-Zona-Bindung ist eine Aktivierung von Spermium und Eizelle. Beim Spermium wird diese durch den Vorgang der Kapazitation sichergestellt (DARSZON et al. 1996;

VISCONTI u. KOPF 1998). Aber auch die Eizelle unterliegt durch die Wandlung des Graaf'schen Follikels zur befruchtungsfähigen Oozyte einer meiotischen Reifung (WASSARMAN u. ALBERTINI 1994). Nach Aktivierung der Gameten entsteht entweder eine lebensfähige Zygote oder es kommt aufgrund der begrenzten Lebensdauer der aktivierten Gameten zur Degeneration.

EISENBACH und TUR-KASPA (1999) erbrachten den Beweis für eine chemotaktisch gesteuerte Annäherung der beiden Gameten in vitro. Ob diese Spermienchemotaxis, wie bei vielen Nicht-Säugetieren bereits nachgewiesen, auch in vivo entscheidend ist oder ob es sich um eine zufällige Begegnung von Spermium und Eizelle handelt, ist noch unklar.

Lange Jahre galt die Maus als Modelltier für die Erforschung der Spermien-Zona-Interaktion. So konnte schon vor über 20 Jahren gezeigt werden, dass die Zona pellucida der Maus aus drei Glykoproteinen besteht (mZP1, mZP2, mZP3). Jedes dieser drei Glykoproteine besteht aus einem Peptidskelett mit heterogen N- und O-glykosylierten Oligosaccharidseitenketten (BLEIL u. WASSARMAN 1980a; WASSARMAN 1988). Mittlerweile ist bekannt, dass die ZP sehr vieler Säugetiere und des Menschen ebenfalls aus drei Glykoproteinen besteht, die eine 40-90%-ige Homologie zu denen der Maus besitzen (WASSARMAN 1999). Diese drei Glykoproteine werden als ZPA, ZPB und ZPC bezeichnet. Dabei ist die Bezeichnung nach abnehmender Größe (Anzahl der Basenpaare) der kodierenden Gene vorgenommen worden (HARRIS et al. 1994).

Nur akrosomenintakte Mäusespermien binden an die ZP (FLORMAN u. STOREY 1982; BLEIL u. WASSARMAN 1983), dabei ist mZP3 der nachgewiesene Spermienrezeptor (BLEIL u. WASSARMAN 1980b, 1986; WASSARMAN 1990; MORTILLO u. WASSARMAN 1991; WASSARMAN u. LITSCHER 1995). Die Spermienbindung durch mZP3 scheint ein kohlenhydrat-vermittelter Prozeß zu sein, da eine enzymatische Entfernung der Oligosaccharidseitenketten von mZP3 eine komplette Dysfunktion dieses Glykoproteins als Spermienrezeptor zur Folge hat. Außerdem hemmen einzelne N- und O- glykosylierte Oligosaccharide bereits in geringen Konzentrationen die Spermien-Zona-Bindung (FLORMAN u. WASSARMAN 1985; BLEIL u. WASSARMAN 1988; MILLER et al. 1992; LITSCHER et al. 1995; JOHNSTON et al.

1998). Welche Oligosaccharide als Spermienrezeptor der Zona pellucida für eine kongruente Struktur an der Spermienmembran in Frage kommen, ist in den letzten Jahren widersprüchlich postuliert worden. Nachdem KINLOCH et al. (1995) durch gezielte Mutagenese nachwiesen, dass sich O- glykosylierte Oligosaccharide nur an zwei der fünf möglichen Serinpositionen von mZP3 befinden und dass diese zwei Serinmoleküle an den analogen Stellen der Aminosäuresequenz des humanen ZP3 lokalisiert sind, wurde angenommen, dass generell O- glykosylierte Oligosaccharide speziesübergreifend als Spermienrezeptor dienen und lediglich das Peptidskelett die Speziesspezifität der Spermienbindung begründet (WASSARMAN u. LITSCHER 1995).

Neuere Veröffentlichungen zweifeln die Übertragbarkeit des Mausmodells auf andere Säugetiere an (PRASAD et al. 2000; SINOWATZ et al. 2001a). Bereits der morphologische Aufbau der ZP unterscheidet sich hinsichtlich der Dicke bei Nagetieren (Maus 5-6 µm) und den Haussäugetieren (Schwein/Mensch 13-16 µm, Rind 27 µm) erheblich (DUNBAR u. WOLGEMUT 1984; DUNBAR et al. 1991, 1994). Trotz einer 40 – 90 %igen Homologie werden den Glykoproteinen der verschiedenen Spezies verschiedene Funktionen zugeordnet. Beispielsweise ist die Frage des jeweiligen Spermienrezeptors nur für wenige Tierarten eindeutig geklärt.

Speziesübergreifend geht man von einem kohlenhydrat-vermittelten Prozeß der Gametenerkennung aus, der in seiner individuellen Charakteristik allerdings speziesspezifisch ist. (SINOWATZ et al. 1998; TÖPFER-PETERSEN 1999; OEHNINGER 2001; WASSARMAN u. LITSCHER 2001; NAKANO u. YONEZAWA 2001). Einer alleinigen Beteiligung der O- glykosylierten Oligosaccharide wird in jüngster Zeit widersprochen, da auch die N- glykosylierten Zuckerketten an der Gametenerkennung beteiligt sind (NOGUCHI et al. 1992; YONEZAWA et al. 1995a). Mit der Herstellung rekombinanter cDNA konnten verschiedene Glykoproteine in ihrem Glykosylierungsmuster verändert werden, trotzdem behielten einige der ZP-Proteine Spermienbindungseigenschaften (VAN DUIN et al. 1994; BARRAT u. HORNBY 1995; PRASAD et al. 1996). YONEZAWA et al. (1995b) zeigten mit ebenfalls rekombinant erzeugten Zonaproteinen, dass offenbar auch das Polypeptidgerüst der Glykoproteine eine gewisse Spermienbindungsaffinität besitzt. Es scheint demnach ein Zusam-

menspiel von diversen biologisch aktiven Oligosacchariden für eine ausreichend starke Bindung nötig zu sein (TÖPFER-PETERSEN et al. 2000).
Auf der paternalen Seite der Gameteninteraktion ist die Erforschung eines „egg-binding-protein“ (EBP) gleichermaßen umfangreich wie widersprüchlich. Es wurden in den letzten Jahren bei verschiedenen Tierarten nicht weniger als zwei Dutzend verschiedene Spermienproteine/-glykoproteine beschrieben, die eine Rezeptorfunktion besitzen (SNELL u. WHITE 1996). Exemplarisch wird auf β–(1-4)-Galactosyltransferase (GalTase) hingewiesen, welche zumindest bei der Maus eine entscheidende Rolle spielen sollte (LU u. SHUR 1997). Die vollständige in vivo-Fertilität, die in einer Folgestudie für homozygot GalTase-defiziente Knock-out Mäuse, trotz einer negativen Affinität zu mZP3 in vitro festgestellt wurde, widersprach allerdings dessen Rolle als alleiniges EBP (LU u. SHUR 1997). Es untermauerte vielmehr die Vermutung, dass die GalTase die Gametenbindung in einem speziesspezifischen System von mehreren Rezeptoren lediglich unterstützt (TÖPFER-PETERSEN et al. 1995; SHUR 1998). Neben der GalTase scheinen die spermienassoziierten Proteine eine Rolle in der Gametenerkennung zu spielen. Beim Schwein sind die Vertreter dieser Gruppe (P47, Zonadhäsin, Spermadhäsin und Pro-/Akrosin) bereits eingehend untersucht. Das porcine Zonadhäsin und diverse Spermadhäsine binden speziesspezifisch an homologe ZP-Strukturen (TÖPFER-PETERSEN 1999; CALVETE et al. 1996), während Pro-/Akrosin als Penetrationsenzym fungiert (TÖPFER-PETERSEN et al. 1990). Das Vorkommen von spermienassoziierten Proteinen im Seminalplasma anderer Tierarten (ENSSLIN et al. 1998; REINERT et al. 1996) könnte eine speziesübergreifende Beteiligung bei der Spermien-Zona-Bindung vermuten lassen.

Für die große Anzahl verschiedener Proteine, denen eine Beteiligung an der Spermien-Zona-Bindung nachgewiesen wurde, gibt es nach WASSARMAN (1999) folgende Erklärungsansätze:

- Bei den verschiedenen Säugetieren dienen verschiedene Proteine als EBP
- Für eine Spezies stellen mehrere Membranproteine einzeln oder als Multiproteinkomplex das EBP dar

- Die Affinitäten zu dem Spermienrezeptor der Zona pellucida sind bei den einzelnen Spermienproteinen verschieden hoch
- Verschiedene in vitro Assays spiegeln die Situation in vivo nicht exakt wieder

Zusammenfassend kann die Spermien-Zona-Bindung als ein hochkomplexer Vorgang der Natur angesehen werden, in den sowohl auf der männlichen, als auch auf der weiblichen Seite mehrere Proteine und Proteinkomplexe eingebunden sind und der zusätzlich noch durch posttranslationale Modifikationen der Spermien- und Zonaproteine beeinflußt wird (PRASAD et al. 2000).

2.2 BINDUNGSASSAYS ZUR FERTILITÄTSPROGNOSE

Das Ziel der klassischen andrologischen Diagnostik ist die Entwicklung von Testsystemen, mit denen präzise Vorhersagen der Fertilität männlicher Individuen möglich sind (AMANN u. HAMMERSTEDT 2002). Vor allem in Bezug auf Tierarten mit einer Vielzahl von möglichen Paarungen eines Vatertieres mit einigen hundert (Schwein) bis zu hunderttausend (Rind) weiblichen Geschlechtspartnern durch künstliche Besamung, ist ein solches Testsystem zum Ausschluß sub- oder infertiler Individuen von großer wirtschaftlicher Bedeutung, da eine direkte Fruchtbarkeitsuntersuchung durch Auswertung der Paarungs- oder Besamungsergebnisse teuer und zeitaufwendig ist und nur eine begrenzte Auswahl an Probanden testen kann (LARSSON u. RODRIGUEZ-MARTINEZ 2000).
Es sind bisher viele Samenqualitätsparameter untersucht worden, die keine signifikanten und / oder reproduzierbaren Korrelationen zur Fertilität eines Vatertieres zeigten. Zu diesen Parametern zählen u.a.: Spermienmorphologie (BARTH 1992), Spermienmotilität (HOLT et al. 1997), Membranintegrität (PEREZ et al. 1997) sowie die Fähigkeit zur spontanen Kapazitation und zur Akrosomreaktion (JANUSKAUSKAS et al. 2000). Aufgrund der Komplexität des Befruchtungsvorganges und der vielfältigen Interaktionen der Spermien mit dem weiblichen Genitale ist es unrealistisch anzunehmen, eine Fertilitätsprognose aufgrund eines einzigen in

vitro-Test erstellen zu können. Realisierbar scheint dagegen das Ziel, mit der Kombination von verschiedenen Testsystemen subfertile Vatertiere zu identifizieren (AMMAN u. HAMMERSTEDT 1993).
Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung von Testsystemen verständlich, die es ermöglichen, verschiedene Qualitätsparameter von Spermatozoen in einem Assay zu untersuchen. Ein solches Testsystem wird z.B. durch die Untersuchung der Spermienbindung an die Eizelle repräsentiert, denn die bindende Population rekrutiert sich aus motilen, morphologisch intakten und kapazitierten Spermatozoen (STRÖM HOLST et al. 2001).

2.2.1 Zonabindungsassay (ZBA)

Die Zona pellucida-Bindung einer ausreichenden Spermienpopulation ist ein wichtiger Schritt innerhalb des Befruchtungsvorganges von Säugetieren. Assays, die auf der Eigenschaft von Spermien basieren, an homologe oder heterologe Zonae pellucidae zu binden, sind für viele Spezies als diagnostische Tests entwickelt worden. Grundlage dieser Zonabindungsassays (ZBA) war die Untersuchung der humanen Spermien-Zona-Interaktion (OVERSTREET u. HEMBREE 1976). Obwohl diese Arbeit eigentlich den Vorgang der Zonapenetration beschrieb, stellte die Methode einen Eckpunkt der Entwicklung von weiteren Spermien-Oozyten-Interaktionstests dar (FRANKEN 1998).
Diese methodischen Grundlagen sind über Jahre nicht entscheidend verändert worden. Zunächst werden Oozyten durch Punktion von Ovarialfollikeln gewonnen. Es folgen eine Motilitätsselektion der Spermien und die in der Regel mehrstündige Inkubation von Spermien und Oozyten bei 39°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Auch die abschließende Auswertung mit einem Phasenkontrast- bzw. einem Fluoreszenzmikroskop ist kontinuierlicher Bestandteil des Zonabindungsassays vieler andrologischer Labors.
Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Wege die Ergebnisse eines Zonabindungsassays darzustellen. Die einfachste Art ist die Formulierung als absolute An-

zahl der gebundenen Samenzellen pro Eizelle. Dieser absolute Wert leidet allerdings unter der relativ großen Variation des Spermienbindungsvermögens individueller Oozyten. Die Inkubation einer gewissen Menge von Oozyten mit einer Samenprobe kann Spermien-Oozytenkomplexe ergeben, in denen von einigen wenigen bis zu einigen hundert Spermien an eine Eizelle gebunden haben (FAZELI 1996). Verschiedene Faktoren wie die Qualität der Oozyten (MAHADIVAN et al. 1987) oder deren Reifegrad (FAMILIARI et al. 1988; OEHNINGER et al. 1989b, 1991) sind für diese Bindungsvariationen verantwortlich. Zur Zeit gibt es keine zuverlässige Methode, die Qualität von Eizellen - insbesondere die Zonaqualität - zuverlässig vorhersagen zu können. Studien, die mit absoluten Bindungswerten arbeiten, versuchen dieses Problem durch die Erhöhung der Anzahl verwendeter Oozyten zu umgehen. ZHANG et al. (1998) gelang es durch drei- bis viermalige Wiederholung der Inkubation einer bovinen Samenprobe mit einer Gruppe von 20 Oozyten, eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zonabindungskapazität und der in vivo-Fertilität von Bullen einer Besamungsstation zu berechnen. Die gleiche Arbeitsgruppe (ZHANG et al. 1999) konnte in einer neueren Studie durch Kombination der Untersuchung verschiedener Samenparameter, u.a. absoluter Wert der im ZBA gebundenen Spermien und IVF-Ergebnis, mit hochsignifikanten Korrelationen zu den später erzielten Non-Return-Raten, die Fertilität von Jungbullen vor ihrem Besamungseinsatz schätzen.

Die zweite Methode der Durchführung eines Zonabindungsassays ist eine parallele Inkubation der zu testenden Samenprobe mit einer Samenprobe eines weiteren Individuums (Kontrolldonor) an der gleichen Anzahl von Eizellen. Das Verhältnis der Zonabindungskapazitäten der Spermien von Test- und Kontrollindividuum kann als ZBA-Index quantifiziert werden. Die Methode dient zur Minimierung der individuellen Bindungseigenschaften verschiedener Eizellen. Mit dem ZBA-Index ist vor allem bei domestizierten Tierarten gearbeitet worden. Sowohl für porcine (BERGER et al. 1989), als auch für bovine (FAZELI 1996; ZHANG et al. 1998) Spermien konnte ein Bindungsniveau beobachtet werden, dessen Verhältnis zur Kontrollprobe auch bei unterschiedlichen Eizellpopulationen konstant blieb. Allerdings korrelierten die Ergebnisse in keiner der Studien mit der in vivo-Fertilität.

In der Humanmedizin arbeitet man, zum Ausschluß der Intra- und Interassayvariationen, gegenwärtig mit zwei verschiedenen Versionen des Zonabindungsassays. Das erste System des kompetitiven Zonabindungsassays (LIU et al. 1988) nutzt die verschiedenen Fluoreszenzen von zwei Fluorochromfarbstoffen, mit denen die Samenprobe der Test- und einer Kontrollperson markiert werden. Nach Inkubation mit einer Eizelle können die gebundenen Spermien unter dem Fluoreszenzmikroskop den jeweiligen Ausgangspopulationen zugeordnet und das Verhältnis beider berechnet werden. Das zweite System des Hemizonaassays (HZA) (BURKMAN et al. 1988) wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

Um einigermaßen reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, ist eine Wiederholung des kompetitiven Zonabindungsassays mit mindestens 20 Oozyten notwendig. Die Bereitstellung einer genügend großen Zahl von homologen Oozyten ist ein begrenzender Faktor für die Verwendung von Zonabindungsassays vor allem in der humanmedizinischen Routinediagnostik. Versuche, die mit rekombinanter Zona pellucida gemacht wurden (WHITMARSH et al. 1996), sind nicht dementsprechend erfolgreich, als das in absehbarer Zeit diese Technik Verwendung finden könnte (BARRAT u. PUBLICOVER 2001).

Die Lagerung von Eizellen ist ein Weg, dieses Problem zu umgehen. Sie kann durch drei verschiedene Methoden erfolgen:

- Lagerung in einer hypertonen Salzlösung
- Gekühlte Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank
- Lagerung durch Tiefgefrieren (Temperaturbereich -80 bis -120°C)

Bis dato ist der Einfluß der genannten Lagerungsbedingungen auf das Spermienbindungspotential von Eizellen bei verschiedenen Spezies untersucht worden. Humane und porcine Oozyten, die in einer Salzlösung gelagert wurden, unterschieden sich in ihrer Spermienbindungskapazität nicht von frischen Eizellen (YANAGIMACHI et al. 1979; LIU et al. 1988; FAZELI et al. 1995). FRANKEN et al. (1991a) konnten sogar eine vollständige Erhaltung der biologischen und funktionellen Eigenschaften der humanen Zona pellucida während einer 90-tägigen Salzlagerung zeigen. Im Gegensatz dazu ist die Zona pellucida salzgelagerter Rindereizellen weniger durchlässig für Spermien, als die von frischen Oozyten (CHIAN et al. 1991). In Bezug auf den bo-

vinen ZBA ist dieser Nachteil durch von Schlachthöfen bezogene „frische“ Ovarien auszugleichen. Ein größeres Problem ist die von STRÖM HOLST et al. (2000) beobachtete signifikant geringere Spermienbindung von salzgelagerten und tiefgefrorenen caninen Eizellen, da für diese Spezies eine Lagerung der überwiegend intraoperativ gewonnenen Oozyten zur Bildung eines ausreichend großen Eizellpools notwendig ist.
HENKEL et al. (2002) entwickelten das System eines enyzymgekoppelten Zonabindungsassays, der unter Verwendung von Leuchtkäferluciferase, die quantitative Interaktion zwischen Zona pellucida und Spermatozoen sehr präzise und technisch einfach wiedergibt. Dieses natürliche Biolumineszenzsystem besitzt eine Effektivität von 1, d.h. bei jeder Oxidation eines Substratmoleküls durch die Luciferase wird ein Lichtphoton emittiert (McELROY u. DeLUCA 1985). Die Reproduzierbarkeit dieses Assays konnte durch eine hochsignifikante Korrelation zu einem parallel durchgeführten HZA gezeigt werden. Die Verwendung von gelöster Zonae minimiert zusätzlich die Intra- und Interassayvariationen, so dass diese Version des Zonabindungsassays vor allem in der humanen Routinediagnostik zukünftig Anwendung finden könnte.

Schon der erste Ansatz, das Zonabindungspotential bzw. das Eizellpenetrationspotential von humanen Spermatozoen zu untersuchen (OVERSTREET u. HEMBREE 1976), ging mit einer Korrelationsberechnung zur Fertilität der Samenspender einher. In der Humanmedizin ist es üblich, Fertilitätsschätzungen durch IVF-Befruchtungen mit einer gewissen Anzahl von Eizellen (6-20 pro Samenprobe) durchzuführen. Dieser Methode fehlt die Vergleichbarkeit zur Situation mit der die Spermien im weiblichen Genitale in vivo konfrontiert werden, und sie ist dadurch fehlerbehaftet. (AMANN u. HAMMERSTEDT 2002). Allerdings stellt sie die einzige, aus ethischen Gesichtspunkten vertretbare Methode einer Fertilitätsprognostik in der humanen Andrologie dar, so dass durch die Korrelationen der Ergebnisse im ZBA mit den Ergebnissen in IVF auch umgekehrt die Befruchtungsrate der Spermien eines Mannes in einem später folgenden IVF-Programm eingeschätzt werden kann (OEHNINGER et al. 2000). Hier spielen in der Regel konkrete Fälle von Unfruchtbarkeit eine Rolle und

es gilt den therapeutischen Nutzen einer in vitro-Fertilisation zu prüfen. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von zwei neuen klinischen Studien, in denen zum einen an einer hohen Probandenzahl gezeigt werden konnte, dass in über der Hälfte der Fälle einer ungenügenden Befruchtung in vitro, morphologisch unauffällige Spermienpopulationen beteiligt waren. Von diesen unauffälligen Samenproben haben 75 % vermindert an die ZP gebunden (LIU u. BAKER 2000). In der zweiten Studie wiesen LIU et al. (2001) bei 25 % der untersuchten Männer mit physiologischer Zonabindung und Samenparametern eine defekte zonainduzierte Akrosomreaktion nach. Beide Studien sehen also eine defekte Zonabindung und / oder eine defekte zonainduzierte Akrosomreaktion als wichtige Ursachen einer Spermiendysfunktion bei Männern mit scheinbar normalen Samenzellen an. Es scheint damit möglich, solche Männer durch den ZBA zu identifizieren.

Von einem grundsätzlich anderen Standpunkt aus, muß der diagnostische Nutzen eines Bindungsassays, wie z.B. eines Zonabindungsassays, in der veterinärmedizinischen Andrologie beurteilt werden. Hier wird die Validität eines Assays durch die Vergleichbarkeit zur Fertilität bestimmt. Allerdings gibt es keinen einheitlichen Standard über die Erhebung von reproduzierbaren und vor allem nützlichen Fertilitätsdaten. Sowohl IVF als reine Labormethode, als auch Feldstudien sind in hohem Maße fehlerbehaftet. Sie spiegeln die in vivo-Situation des einzelnen Spermiums für eine erfolgreiche Befruchtung nicht korrekt wieder oder verdecken bestimmte Mängel der Samenzellen durch übermaximierte Besamungsdosen (AMANN u. HAMMERSTEDT 2002). Zusätzlich werden häufig unterschiedlich vorbehandelte Spermienproben miteinander verglichen, da die in Vorbereitung eines Assays durchgeführte Motilitätsselektion der Spermien für die Besamungsportionen fehlt. Zusammenfassend können die meisten Fertilitätsergebnisse als zu wenig sensitiv und spezifisch angesehen werden und dementsprechend sind sie nicht geeignet, den Nutzen eines diagnostischen Assays zu validieren (AMANN u. HAMMERSTEDT 2002).
Diese Erkenntnis hat die Anwendung von Bindungsassays in der veterinärmedizinischen Andrologie in jüngster Zeit erheblich eingeschränkt.

2.2.2 Hemizonabindungsassay (HZA)

Im HZA wird das Bindungspotential von zwei Samenproben an den Zonae von zwei Hälften derselben Eizelle verglichen. Dadurch können die nachteiligen Intra- und Interassayvariationen des Zonabindungsassays minimiert werden. BURKMAN et al. (1988) entwickelten den grundlegenden Hemizonabindungsassay für humane Spermatozoen und Oozyten. Die Idee war, durch die Teilung einer Eizelle zwei funktionell gleiche Hemizonae zu erhalten und dadurch einen reproduzierbaren Vergleich der Spermien-Zona-Interaktion zu gewährleisten. Nach der medianen mikrochirurgischen Teilung einer Eizelle mit Hilfe von Mikromanipulatoren werden die erzeugten Hemizonae analog zum ZBA-Index mit den Samenproben einer Test- und einer Kontrollperson inkubiert. Die Ergebnisformulierung stellt das Verhältnis des Bindungspotentials beider Samenproben zueinander dar.
Der HZA beruht auf der Hypothese einer äquivalenten Spermienbindung an beiden Hemizonae gleichen Ursprungs. Den speziesübergreifenden Beweis für diese Hypothese erbrachte FAZELI (1996) durch Inkubation je einer einzelnen Samenprobe von Rind, Pferd und Schwein mit zwei homologen Hemizonae. Für keine der untersuchten Tierarten konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der gebundenen Spermien zwischen den Hemizonae festgestellt werden; die hohe Anzahl an möglichen Spermienbindungslokalisationen an der Säugetierzona relativiert wahrscheinlich kleinere Bindungsdifferenzen (FAZELI 1996).
Dieser Assay kann dementsprechend zwei funktionell gleiche Oberflächen zur Verfügung stellen, die ein Studium der Spermien-Zona-Interaktion bei verschiedenen Säugetierspezies ermöglicht.

In der humanmedizinischen Andrologie sollte der HZA zur Fertilitätsprognose als Vorbereitung für ein therapeutisches IVF-Programm Anwendung finden. OEHNINGER et al. (1989a) formulierten in einer Studie sehr hohe Werte in Bezug auf Spezifität (95%) und Sensitivität (83%) des HZA. Die Autoren verglichen die HZA-Ergebnisse mit Fertilitätsergebnissen in IVF, in die allerdings nur die untersuchten männlichen Probanden einbezogen wurden. Eine spätere Studie (FRANKEN

et al. 1993) korrigierte Sensitivitäts- (75%) und Spezifitätswerte (75%) des humanen Hemizonabindungsassays deutlich nach unten, nachdem die Fertilität der Testpersonen mit einer IVF-Befruchtungsrate verglichen werden konnte, die zuvor durch eine hohe Anzahl von in vitro-Fertilisationen (589 Oozyten) mit physiologischen Ei- und Samenzellen ermittelt wurde.
Neben den Schwierigkeiten bezüglich der Erhebung humaner Fertilitätsdaten, wird die Interpretation von Bindungsergebnissen humaner Spermatozoen im HZA durch die Variation der Bindungsfähigkeit innerhalb und zwischen den Samenproben eines Individuums erschwert (FRANKEN et al. 1991b).
Trotz dieser Mängel behauptet sich der HZA im Bereich der humanmedizinischen Andrologie in der Diagnostik und Therapie männlicher Infertilität, denn durch den Gebrauch von nur wenigen Oozyten ergeben sich gegenüber anderen Zonabindungsassays deutliche ethische Vorteile. Der methodische Anspruch, insbesondere in Bezug auf die Teilung einer Eizelle ist allerdings problematisch. Durch den vielversprechenden Einsatz von neu entwickelten 1,48 µm Lasergeräten (RINK et al. 1996), die eine Anwendung ohne nötige Fixation des Objekts ermöglichen, könnten sich hier in nächster Zeit allerdings neue Perspektiven abzeichnen (EDENFELD et al. 2002).

Eine der umfangreichsten veterinärmedizinischen HZA-Studien veröffentlichte FAZELI (1996). Er verglich das Zonabindungsvermögen boviner, equiner und porciner Spermatozoen mit der in vivo-Fertilität dieser Tierarten, die retrospektiv durch deren Einsatz in der künstlichen Besamung ermittelt wurde. Einzig in Bezug auf porcine Spermien war es ihm nicht möglich, signifikante Korrelationen zur Fertilität zu errechnen. Der Grund für die unzureichende Vergleichbarkeit zwischen Fertilität und HZA-Ergebnissen porciner Spermien schien in der effektiven Fruchtbarkeitsselektion von Zuchtebern für den Besamungseinsatz zu liegen, die in einer geringen individuellen Variation der Fertilitätsergebnisse resultierte (FAZELI 1996). Im Gegensatz dazu ließen sich signifikant positive Korrelationen der HZA-Ergebnisse zur Fertilität bei Rindern, Pferden (FAZELI 1996) und Hunden (MAYENCO-AGUIRRE u. PEREZ-CORTEZ 1998) feststellen.

Dieser Erklärungsversuch scheint jedoch nicht ausreichend zu sein. MENDONCA FERREIRA (1998) untersuchte die Bindung porciner Spermien im HZA und führte parallel Versuche zur Fertilitätsüberprüfung der getesteten Eber durch. In dieser Studie konnte keine Rangfolge von Ebern, basierend auf der Spermienbindung im HZA, gebildet werden. Die mangelnde Wiederholbarkeit der Ergebnisse zeigte, dass trotz konstanter konservativer spermatologischer Parameter die Bindungsfähigkeit im HZA nicht unbedingt ein eberindividuelles Merkmal darstellen muß. HARRISON (1997) vermutet in diesem Zusammenhang, dass die Bindungsfähigkeit von Eberspermien in erster Linie nicht durch den Spermienkopf selbst, sondern durch den Gehalt anhaftender Seminalplasmaproteine (Spermadhäsine) bestimmt wird.

In Besamungsversuchen konnten weder MENDONCA FERREIRA (1998) noch BERGER et al. (1996) Übereinstimmungen der Bindung porciner Spermien im HZA mit Fertilitätsergebnissen ermitteln. Lediglich in einem heterospermen Besamungsexperiment mit einem Eber mit Teratozoospermie und einem normospermen, aber sich im Experiment als infertil erweisenden Eber, waren eindeutige Beziehungen zwischen den Ergebnissen des HZA und den in vivo-Ergebnissen feststellbar. Diese Beziehungen galten nicht beim heterospermen Einsatz des Teratozoospermieebers und eines normospermen, fertilen Kontrollebers (MENDONCA FERREIRA 1998).

Die Spermienbindungsfähigkeit im Hemizonaassay ist demnach nicht als Haupteinflußfaktor für die Variation der Befruchtungspotenz von Samenzellen, insbesondere bei der Spezies Schwein anzusehen und stellt die Anwendung des HZA in der veterinärmedizinisch-andrologischen Diagnostik in Frage.

Einsatzgebiet des HZA bleibt allerdings die Forschung in Bezug auf molekulare Mechanismen der Spermien-Zonabindung (BLASE et al. 1997), da solche Versuchsanordnungen allein die Bindung einer ausreichenden Spermienanzahl benötigen und nicht die Wiedergabe der individuellen Bindungsfähigkeit anstreben.

2.2.3 DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA)

Der DudFinder® Sperm-Binding Assay ist ein kommerzieller Test, der von der US-amerikanischen Firma Bio Pore, Inc. entwickelt wurde. Es handelt sich um einen Mikrotiterplattenassay, der dem von BRABATO et al. (1998) entwickelten und im Detail als Assay Nr. 3 beschriebenen Test, sehr ähnlich ist. Dieser Assay basiert auf einem spermienbindenden Protein als Bindungssubstrat, welches aus der perivitellinen Membran von Hühnereiern isoliert wird.

Im SBA wird die Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an dieser Substanz quantifiziert, wobei die genauen Bindungsmechanismen nicht bekannt sind. Nach BRABATO et al. (1998) wird durch eine Substanz, die der Zona pellucida von Säugetiereizellen ähnlich ist, die in vivo Spermien-Eizell-Bindung imitiert. Tatsächlich besitzt die innere Lamina der perivitellinen Membran von Hühnereiern substantielle Homologien zur Core-Region humaner und anderer Zonae pellucidae (TAKEUCHI et al. 1999); ein hydrophobes Profil und acht streng konservative Cystein-Residuen (AMANN et al. 1999c).

Die grundlegende Arbeit zur Entwicklung des SBA stammt von BRABATO et al. (1998). Diese Arbeitsgruppe wollte ein Testsystem etablieren, welches eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zur in vivo-Fertilität besitzt. Vorherige Arbeiten (WISHART 1987; WISHART et al. 1992) zeigten eine positive Korrelation der Anzahl von Spermien, die in der perivitellinen Membran von Hühnereiern gefunden wurden, mit der Befruchtung von gelegten Eiern und mit der Befruchtungsdauer, d.h. mit den Tagen, an denen befruchtete Eier gelegt wurden. Mit diesen Beobachtungen konnte das Phänomen der Bindung von Hühnerspermatozoen an der gesamten perivitellinen Membran erklärt werden, obwohl einzig der Spermieneintritt in die Germinalscheibe, die nur etwa 2% dieser Fläche ausmacht, zu einer erfolgreichen Befruchtung führt. BRABATO et al. (1998) versuchten diese Erkenntnisse in ein in vivo-Testsystem umzuwandeln und entwickelten als Methode zur Quantifizierung der Spermienbindung an der perivitellinen Membran von Hühnereiern, den von ihnen im Detail als Assay Nr. 3 beschriebenen Test. Dieser ist immer noch das Grundprinzip des kommerziellen SBA.

Die Aussagefähigkeit des SBA wird durch die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestimmt. Da aber bisher kein absoluter Standard zur Überprüfung dieses Assays existiert, wurde in allen bisherigen Studien die Präzision der Ergebnisse in Form der Intra- und Interplattenvariationen gemessen. Die bisherigen Studien sehen einen Intraplattenunterschied im Bindungsverhalten einer Spermienprobe von höchstens 12% und einen Unterschied von bis zu 22% im Bindungsverhalten einer Probe zwischen zwei Platten (Interplattenvariation) als hinreichend genau an (AMANN et al. 1999c)

Die erste Anwendung des Sperm-Binding Assays beschrieben GILL et al. (1999) für Truthahnspermatozoen. In dieser Studie konnten für subfertile Vatertiere signifikante Korrelationen der Spermienbindung im SBA zu Befruchtungsergebnissen gezeigt werden. Insofern bestätigten diese Ergebnisse die Arbeit von BRABATO et al. (1998), in der sich gleiche Zusammenhänge für subfertiler Haushähne ergaben. Beide Studien wurden unter dem Aspekt entworfen, gezielt potentiell subfertile Individuen zu entdecken und nicht, um die Ergebnisse der SBA-Bindung mit der Fertilität allgemein zu vergleichen.

Vor diesem Hintergrund ist in der Entwicklung des Sperm-Binding Assays, die direkte Umsetzung der Einschätzung verschiedener Autoren bezüglich eines Assays für die Fertilitätsprognostik (AMANN u. HAMMERSTEDT 1993; HAMMERSTEDT u. SCHULTZ 1994; HAMMERSTEDT 1996) zu sehen. Die Autoren beschreiben die Identifikation subfertiler Individuen als praktisch durchführbar, indem bestimmte Schritte der Spermienwanderung vom Ort der Insemination bis zum Ort der Befruchtung in vivo, durch ein in vitro-Testsystem imitiert werden. Ihrer Ansicht nach repräsentiert die Spermien-Eizell-Bindung so einen entscheidenen Schritt. Der Name DudFinder® Sperm-Binding Assay (Dud, *engl.* = Versager), der für den kommerziellen Assay gewählt wurde, deutet dieses Prinzip und die Beziehung zur Subfertilität an.

Die Arbeit von BRABATO et al. (1998) erbrachte aber noch ein weiteres Ergebnis. Nicht nur Spermien der aviären Spezies Huhn und Pute, sondern auch Spermatozoen der Säugetierspezies Rind, Ziege, Maus, Pferd und Mensch binden in einer dosisabhängigen Anzahl an das vorgelegte Substrat. Nach Ansicht der Autoren ist die

Spermien-Eizell-Bindung demnach kein speziesspezifischer Vorgang, sondern nur die Induktion verschiedener Spermienfunktionen zur Hydrolyse und Penetration der ZP ist als das spezies-spezifische Selektionsereignis der Gameteninteraktion zu werten. Sie schließen sich mit dieser Meinung verschiedenen anderen Arbeitsgruppen an (ROBERTSON et al. 1997; TULSIANI et al. 1997).

HAMMERSTEDT et al. (1997) identifizierten einen Faktor, der während der Kryokonservierung von Spermien eluiert wurde und für eine reduzierte Bindung aufgetauter Samenproben an das Substrat des SBA verantwortlich war. Es handelte sich dabei um das Peptid Prosaposin, welches identisch mit dem in der Literatur bereits beschriebenen SGP-1 (KISHIMOTO et al. 1992) war. Dieses Peptid schien die Spermienbindung an das Substrat des Sperm-Binding Assays zu vermitteln. In einer folgenden Studie konnte eine Bindungssteigerung humaner, porciner und boviner Spermien (AMANN et al. 1999a) durch Kurzeitinkubation mit einer synthetisch hergestellten Variante des Peptids erzielt werden. Weitere Arbeiten konnten einen fertilitätssteigernden Effekt des Peptids auf die Spermien bei zwei von drei Bullen (AMANN et al. 1999b), sowie für Spermatozoen aus einem Pool von 40 zufällig ausgewählten Truthähnen (GILL et al. 2000) zeigen. MAGARGEE et al. (2000) behandelten murine Spermatozoen mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen Peptids und erzielten ebenfalls einen bindungs- und fertilitätssteigernden Effekt. Allerdings wurden die Effekte in allen drei Studien jeweils nur mit einer einzigen Konzentration des Peptids erzielt, dosisabhängige Wirkungen ergaben sich nicht. Eine weitere Studie zur Fertilitätssteigerung in Bezug auf porcine Spermien schlug fehl (EVERT 2002).

Der bisherigen Ergebnisse unter Verwendung des SBA konnten zeigen, dass die Bindung von Spermien an ein Substrat der perivitellinen Membran von Hühnereizellen eine individuelle Eigenschaft ist, die wahrscheinlich auf ungeklärte Art und Weise durch Prosaposin vermittelt und gesteigert werden kann. Rückschlüsse auf die Spermien-Zona-Interaktion sind spekulativ.

2.2.4 Ovidukt-Explant-Assay (OEA)

Bei dem Ovidukt-Explant-Assay (OEA) handelt es sich um den von PETRUNKINA et al. (2001a) beschriebenen und charakterisierten Assay. Dieser Assay erfaßt die Fähigkeit von porcinen Spermatozoen, an Eileiterepithel zu binden. Ein wesentliches Merkmal dieser Methode ist die Simulation von in vivo-Bedingungen durch Verwendung von Eileiterabschnitten (Explanten) aus frisch gewonnenen Organen von Schlachttieren ohne einen anschließenden Kultivierungsvorgang. Über Videoimaging und mathematische Modellanalyse kann die Anzahl gebundener Spermien pro Explantflächeneinheit als Bindungsindex ermittelt werden.

PETRUNKINA et al. (2001a) verwendeten einen modifizierten Assay, basierend auf der Arbeit von SUAREZ et al. (1991) und erbrachten den Beweis einer linearen Abhängigkeit der Anzahl an das Eileiterepithel gebundenen Spermien von der Gesamtzahl inkubierter Spermien. Die Modifikation dieser Methode im Vergleich zu der von SUAREZ et al. (1991) beschriebenen lag in der Umrechnung der Anzahl von explantgebundenen Spermatozoen auf die gesamte Oberfläche der analysierten Region (für genauere Angaben siehe unter 3.3.4). Dadurch konnte die Bindungskapazität von porcinen Spermatozoen an Explante homologer Eileiter als ein quantitativer, sensitiver und reproduzierbarer Parameter gezeigt werden, dessen Eignung für quantitative Bindungstudien aufgrund der linearen Abhängigkeit von Bindungsindex und Gesamtzahl inkubierter Spermien möglich ist.

Die Idee einer Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an Eileiterepithel in vitro liegt über zehn Jahre zurück. SUAREZ et al. (1991) bezogen sich in ihrer Studie auf die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen, die für Mäuse (ZAMBONI 1972), Hamster (YANAGIMACHI u. CHANG 1963; BATTALIA u. YANAGIMACHI 1979; SMITH et al. 1987), Ratten (SHALGI u. KRAICER 1978), Kaninchen (OVERSTREET et al. 1978), Schweine (HUNTER 1981) und Schafe (HUNTER u. NICHOL 1983) in vivo eine Formierung eines Spermienreservoirs im kaudalen Isthmus des Eileiters während des Oestrus zeigen konnten. Über die Mechanismen zum Aufbau und zur Erhaltung, sowie über die Spermienablösung war bis zu dem Zeitpunkt nur wenig bekannt. Es existierten eine transilluminatorische in situ-

Studie über die Bindung muriner Spermien an Eileiterepithel (SUAREZ 1987) und Arbeiten über die Bindung boviner Spermien an Oviduktepithelzellkulturen (SUAREZ et al. 1990; POLLARD et al. 1990). Zur Klärung der Frage, ob die Spermien-Eileiterbindung von der anatomischen Region des Ovidukts beeinflußt oder während des Zyklus modelliert wird, haben SUAREZ et al. (1991) kleine Eileiterepithelstücke (sog. Explante) chirurgisch aus den verschiedenen Eileiterabschnitten Isthmus und Ampulle von Sauen zu verschiedenen Zykluszeitpunkten (Tag 0 und Tag 10) gewonnen. Zwei Gründe prädestinierten das Schwein zur Entwicklung dieser Methode. Zum einen laufen Befruchtungsvorgänge bei dieser Tierart in jedem Zyklus bilateral im Reproduktionstraktes ab (ROBERTS 1986), was die Nutzung beider Eileiter ermöglichte. Zum anderen erreichen porcine Spermien bereits nach ca. 10 – 15 Minuten post inseminationem den Eileiter, so dass für diese Spezies der Uterus als Kapazitationsorgan ausgeschlossen werden konnte (HUNTER u. HALL 1974; HUNTER 1981; HUNTER 1990).

Weitere Arbeiten, die sich der Explanttechnik zum Studium der Spermien-Eileiter-Interaktion bedienten, etablierten die Technik für Pferde (THOMAS et al. 1994a) und Rinder (LEFEBVRE et al. 1995b). Während in Bezug auf das Pferd, die von SUAREZ et al. (1991) für porcine Ovidukte vorgeschlagene Methode der mikrochirurgischen Gewinnung der Explante prinzipiell übertragen werden konnte, stellte sich dieses für Rindereileiter schwieriger dar. Aufgrund der dünnwandigen Beschaffenheit des Oviduktes konnten keine zusammenhängenden Gewebeteile herausgeschnitten werden, so dass sich LEFEBVRE et al. (1995b) der Technik des sogenannten „Melkens“ bedienten. Aus den Eileitern in toto oder getrennt in Isthmus und Ampulle wurden durch eine äußere Druckmassage Epithelstücke gewonnen, die durch eine Passage durch die englumige Nadel einer Tuberkulinspritze desaggregiert wurden. In einer 30-minütigen Ruheperiode formten sich anschließend aus den epithelialen Bruchstükken Vesikel mit apikaler Oberfläche. Diese Vesikel wurden als Explante bezeichnet. LEFEBVRE et al. (1995b) zeigten in ihrer Arbeit eine zu 90 % übereinstimmende Morphologie dieser Explante mit Eileiterepithelgewebe. Im Gegensatz zu den Studien an der Spezies Schwein konnten für Rinder und Pferde nur die Eileiter ipsilateral zum dominaten Follikel verwendet werden, da mögliche Unterschiede zwischen ipsi-

und kontralateralem Ovidukt durch lokale Signale des Follikels, wie von EINER-JENSEN (1992) erwogen, vermieden werden sollten.

Obwohl Explante eine begrenzte Lebensspanne von nur wenigen Stunden besitzen und aus diesem Grund nicht für Langzeitstudien verwendet werden können, besitzen sie alle Eigenschaften des originären Gewebes, vor allem dessen morphologische Differenzierung und die intensive Aktivität der Zilien. Daher repräsentieren Ovidukt-Explant-Assays die Situation in vivo genauer als Zellkultursysteme. BAILLIE et al. (1997) zeigten eine signifikant höhere Bindung humaner Spermatozoen an polarisierte Explante als an dissoziierte und passagierte epitheliale Zellkulturen. Diese Ergebnisse vermittelten die Wichtigkeit der Zellpolarität für die Spermienbindung in vitro und zeigten einen Vorteil von Explantsystemen gegenüber Zellkulturen zur Charakterisierung der ersten Schritte der Spermien-Ovidukt-Interaktion, die durch die initiale Bindung von Spermatozoen an Eileiterepithelzellen repräsentiert wird.

Darüber hinaus muß allerdings einschränkend gesagt werden, dass in vitro-Systemen die funktionelle Spezialisierung der verschiedenen Regionen des Oviduktes fehlt, weil die lokale endokrine Modulation durch die Ovarien nicht sichergestellt werden kann (HUNTER et al. 1998). Aufgrund dieser relativ unbekannten Komponente der hormonellen Regulation ist die Eignung von Explant-Assays für Studien in Bezug auf die Spermienreifung oder auf zeitabhängige Veränderungen der Spermatozoen eingeschränkt.

Widersprüchliche Ergebnisse von Studien, die sich mit dieser Thematik befaßten, verdeutlichen die problematische Anwendungn des Ovidukt-Explant-Assays in diesem Bereich. SUAREZ et al. (1991) konnten keinen Unterschied der Bindungskapazität porciner Spermien an Explante feststellen, die entweder aus dem Isthmus oder der Ampulle stammten. In einer anderen Arbeit konnte dieses für Rinder ebenfalls gezeigt werden (LEFEBVRE et al. 1995b). In Bezug auf Eileitergewebe von Frauen (BAILLIE et al. 1997) und Pferden (THOMAS et al. 1994a) wurden dagegen regionale Bindungsunterschiede entdeckt. Über hormonelle Einflüsse auf die porcine Spermien-Ovidukt-Bindung in vitro ist unterschiedlich berichtet worden (RAYCHOUDHURY u. SUAREZ 1991; SUAREZ et al. 1991). Obwohl Spermien im Isthmus und in der Ampulle gebunden haben, wiesen sowohl RAYCHOUDHURY et

al. (1993) als auch WALTER und BAVDEK (1997) eine regional unterschiedliche Verteilung der Lektinbindungsstellen nach, die vom Zyklusstand abhängig war.
Wesentlich repräsentativere Ergebnisse erzielten Arbeitsgruppen durch Anwendung des Ovidukt-Explant-Bindungssystems zur Charakterisierung der kohlenhydrat-vermittelten Vorgänge der Spermien-Eileiter-Bindung.
LEFEBVRE et al. (1997) verwendeten Explante zur Untersuchung der Bindungsmechanismen von Spermien an Eileiterepithel, um den hemmenden Einfluß verschiedener Kohlenhydrate auf die Bindungskapazität boviner Spermien zu testen. Ebenso gelang es GELHAAR (1999) und WAGNER et al. (2002) unter Verwendung des Explantmodells interessante Aspekte über die molekular-biologischen Grundlagen der Bindung porciner Spermatozoen an Oviduktepithel zu ermitteln, indem sie in kompetitiven Hemmungsversuchen den Einfluß verschiedener Glykoproteine auf die Spermien-Eileiter-Bindung untersuchten (vgl. Kap. 2.1.1).
Die von PETRUNKINA et al. (2001a) gezeigte Eignung des Ovidukt-Explant-Assays für quantitative Bindungsstudien eröffnete neue Möglichkeiten dieser Methode. Eine Anwendung als spermatologischer Parameter und zur weiteren Charakterisierung der Formierung des Spermienreservoirs für die Spezies Schwein ist Grundlage dieser Dissertation.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIALIEN

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien, daraus hergestellte Puffer, Lösungen, Medien und Verdünner und sämtliche Gebrauchsgegenstände sind im Anhang aufgeführt.

3.1.1 Untersuchungsmaterialien

In BTS (JOHNSON et al. 1988) verdünnter Samen von 44 Ebern aus vier verschiedenen Besamungsstationen wurde innerhalb von 24 Stunden nach Gewinnung gekühlt (15–17°C) ins Labor transportiert. Alle Eber befanden sich während der Versuchsdurchführung von April 2001 bis März 2002 im regelmäßigen Besamungseinsatz, d.h. es erfolgte ca. zweimal pro Woche eine Ejakulatgewinnung auf den jeweiligen Stationen. Hinsichtlich der Rassezugehörigkeit teilten sich die Probanden auf in 28 Pietraineber, 11 Eber des Bundeshybridzuchtprogramms, 3 Eber der Rasse „Deutsches Edelschwein“ und jeweils einen Eber der Rassen „Deutsche Landrasse“ und „Duroc“.

3.2 METHODEN

Wöchentlich wurden vier Ejakulate von vier verschiedenen Ebern jeweils 24 und 72 Stunden nach Verdünnung, entsprechend des unten beschriebenen Untersuchungsvorganges (s. 3.2.1-3.2.5), untersucht. Nach Ablauf von drei Wochen erfolgte jeweils ein Wechsel der Ebergruppe.

3.2.1 Konventionelle spermatologische Untersuchung

Der verdünnte Samen wurde nach 15 minütiger Inkubation eines 1 ml Aliquots in einem 38°C warmen Wasserbad, bei 160-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch der subjektiven Motilitätsschätzung unterzogen. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der vorwärts- und ortsbeweglichen Spermien zusammengefasst und in Relation zu den unbeweglichen Samenzellen protokolliert.
Die Ermittlung des Anteils der morphologisch abweichenden Samenzellen erfolgte durch Auszählung von 200 Spermien bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion unter dem Phasenkontrastmikroskop. Ein 750 µl Aliquot der Besamungsportionen wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 300 µl Formolcitrat vermischt. Von dieser Supension wurden drei etwa senfkorngroße Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht und mit Deckgläsern (18 x 18 mm) eingedeckelt. Die so fixierten Spermien wurden nach dem von KRAUSE (1965) beschriebenen, für Ebersperma angepassten Bewertungsschema untersucht.

3.2.2 Percoll-Dichtegradientenzentrifugation und Verdünnung des Spermas

Je ein im Winkel von ungefähr 60° schräg gestelltes Glaszentrifugenröhrchen mit konischem Boden wurde zunächst mit 2 ml 70 %iger Percoll-Lösung befüllt und dann mit 4 ml 35 %iger Percoll-Lösung überschichtet. Dabei wurde die 35 %ige Lösung tropfenweise an der Glaswand entlang auf die dichtere Phase pipettiert. Gleichermaßen erfolgte die Zugabe von 4 ml des verdünnten Samens.
Die befüllten Zentrifugenröhrchen wurden in zwei Schritten zentrifugiert.

- 10 min bei 170 g und 20°C
- 20 min bei 600 g und 20°C

Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Spermienpellet in 500 µl Androhep ohne EDTA resuspendiert. Mit der Zählkammer nach Thoma wurde anschließend die Dichte dieser Spermiensuspension ermittelt (KRAUSE 1976).

Die Verdünnung der Spermien-Suspension für den SBA, den OEA und die PI-Färbung erfolgte anschließend auf split-sample-Basis.
Für den OEA wurde ein 1000 µl Aliquot einer Spermien-Suspension der Konzentration 5 x 10^6 / ml mit Androhep ohne EDTA in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingestellt.
Die Verdünnungen für den SBA und die PI-Färbung wurden mit Androhep auf eine Konzentration von jeweils 10 x 10^6 Spermien / ml eingestellt. Für die Durchführung des SBA wurden insgesamt 2000 µl, aliquotiert zu je 1000 µl in zwei 1,5 ml Eppendorf Gefäßen benötigt. 970 µl verdünnter Samen wurde für die PI-Färbung verwendet.
Nach der Verdünnung wurde der Rest des resuspendierten Spermienpellets für 15 min bei 38 °C im Wasserbad erwärmt und anschließend erfolgte die subjektive Motilitätsschätzung der Spermien nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.
Eine Bestimmung des Anteils morphologisch abweichenden Samenzellen nach der Percoll-Zentrifugation erfolgte exemplarisch an einer Stichprobe von 9 Ebern.

3.2.3 Darstellung der Membranintegrität mittels Propidiumiodidfärbung

Propidiumiodid (PI) zählt zu den DNA-Farbstoffen und bindet aufgrund seiner membranimpermeablen Eigenschaft selektiv an die DNA von membranbeschädigten Spermien. Nur hier kann PI in den Zellkern gelangen, wo es zur Färbung der geschädigten Zelle führt. Spermatozoen mit intakten Membranen bleiben dagegen ungefärbt. Aufgrund des Absorptionsmaximums von 536 nm und des Emissionsmaximums von 617 nm zeigen Zellen, die den Farbstoff PI annehmen, eine rote Fluoreszenz. Propidiumiodid wurde in Aqua dest. zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml gelöst und bis zum Versuchstag bei –20°C im Dunkeln gelagert (HARRISON u. VICKERS 1990).
Zu 970 µl der Spermien-Suspension mit einer Konzentration von 10 x 10^6 Spermien / ml wurden 20 µl Formolcitrat und 10 µl PI gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend ausgewertet. Drei etwa

senfkorngroße Tropfen wurden auf einen Objektträger verbracht und bei einer Wellenlänge von 536 nm wurden unter 400-facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop 200 Samenzellen ausgezählt. Der Prozentsatz der roten (= membrangeschädigten) Spermien konnte damit objektiv ermittelt werden.

3.2.4 Ovidukt-Explant-Assay (OEA)

Grundlage des Ovidukt-Explant-Assays des eigenen Versuchs war die von PETRUNKINA et al. (2001a) beschriebene Methodik dieses Assays.

Gewinnung der Explante

An jedem Versuchstag wurden am örtlichen Schlachthof zwei Eileiter von zwei verschiedenen Altsauen gewonnen und diese in eisgekühlter (4°C) PBS-Lösung transportiert. In einer mit PBS-Lösung gleicher Temperatur gefüllten großen Petrischale wurden die Eileiter mit Hilfe einer anatomischen Pinzette, einer Schere mit zwei spitzen Schenkeln, einer Mikropinzette und einer Mikroschere präpariert. Zunächst wurde das Eileitergekröse (Mesosalpinx) nahezu vollständig vom Eileiter abpräpariert und der Eileiter mit Hilfe der Schere longitudinal auf ganzer Länge eröffnet. Der eröffnete Eileiter wurde durch zwei Kanülen Gr. 12 auf einer mit Paraffin gefüllten Glaspetrischale an beiden Enden unter leichtem Zug fixiert. Dabei wurde das Präparat ständig mit frischer PBS-Lösung feucht gehalten. Unter einem Stereomikroskop wurden nachfolgend mit Hilfe der Mikroinstrumente aus den freiliegenden Epithellängsfalten des caudalen Isthmus ca. 0,5 – 1 mm² große Explante geschnitten. Diese Explante wurden unter einem Inversmikroskop auf ihre Größe, den Epithelsaum und die Zilienbewegung geprüft und nur solche Explante für den Versuch verwendet, die ausreichenden Epithelsaum besaßen und einen kräftigen Zilienschlag aufwiesen. Bei diesem Versuchsansatz wurde die Bindungskapazität der Spermien eines Ebers an einem Versuchstag an jeweils zwei Explanten aus jedem der zwei Eileiter gemessen. Pro Versuchstag standen dementsprechend insgesamt vier Explante für die Untersuchung der Spermien jedes Ebers zur Verfügung. Das Inversmikroskop war mit einer

Videokamera verbunden, die mit einem Monitor und einem Videorecorder gekoppelt war.
Die Explante wurden bei 50,4-facher (6,3 x 8) Vergrößerung in einem Tropfen TALP-Medium betrachtet. Das Deckglas wurde vorher durch einen Silikonrahmen auf dem Objektträger befestigt. Taugliche Explante wurden bis zum Versuchsbeginn in kleinen, mit TALP-Medium gefüllten Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt.

Koinkubation der Explante mit den Spermatozoen

Es wurden jeweils zwei Explante eines Eileiters in eine kleine Petrischale mit 60 µl TALP-Medium verbracht und diese zusammen mit dem Eppendorf-Gefäß, in dem sich die entsprechend verdünnte Spermiensuspension befand, für 5 min im Brutschrank bei 39°C und 5% CO_2 äquilibriert. Zusätzlich befand sich eine kleine Gewebekulturschale mit 4 Nocken, die zuvor noch mit jeweils 60 µl TALP-Medium befüllt wurden, im Brutschrank.
Nach Ablauf der fünfminütigen Äquilibrierung wurden 20 µl der Spermiensuspension (entsprechen einer Gesamtmenge von 100.000 Spermien) zu den zwei Explanten in die 60 µl TALP-Medium gegeben und nachfolgend für weitere 15 Minuten unter den gleichen Bedingungen koinkubiert. Nach der Koinkubation wurden beide Explante mittels einer Mikropinzette in jeweils eine Nocke der Gewebekulturschale überführt, von dort in eine weitere Nocke verbracht, somit insgesamt zweimal gewaschen und anschließend auf einen vorbereiteten Objektträger gegeben. Der Objektträger wurde auf einer Wärmeplatte bei 39°C vorgewärmt und mit einem Silikonrahmen versehen. Innerhalb dieses Rahmens wurde ein 60 µl Tropfen TALP-Medium gegeben, in den beide gewaschenen Explante plaziert wurden. Nachfolgend wurden sie mit einem großen Deckglas, unter Vermeidung von Druckausübung auf die Explante, eingedeckelt.

Videomikrographie der gebundenen Spermien am Explant

Die an einem Explant gebundenen Spermatozoen wurden folgendermaßen erfaßt:
Der Objektträger mit dem Explanten wurde mit dem Deckglas nach unten auf den Mikroskoptisch des Inversmikroskops gelegt und beide Explante in ihrer Gesamtheit

bei einer 50,4-fachen Vergrößerung als Übersicht gefilmt. Anschließend wurden von jedem der beiden Explante jeweils drei Teilabschnitte, die größenmäßig durch den angeschlossenen Monitor vorgegeben waren, in der 256-fachen (32 x 8) Vergrößerung aufgenommen. Diese Teilabschnitte wurden als Fragmente definiert. Bei der Aufnahme der Fragmente wurden durch Drehen der Mikrometerschraube die Spermien aller Ebenen erfaßt und gezählt. Zum Auszählen der gebundenen Spermen wurde eine Folie über die Bildfläche des Monitors gelegt. Jedes gebundene Spermatozoon wurde mit einem Filzstift markiert und die Markierungen anschließend addiert und dokumentiert. Alle Versuchsansätze wurden nacheinander durchgeführt und auf Video aufgenommen, so dass die Aufnahmen zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden konnten.
Neben den gebundenen Spermien wurde an jedem Versuchstag eine Skalierung in den jeweiligen Vergrößerungen aufgenommen.
Die Ermittlung der Fläche der Explante und deren Fragmente wurde mit Hilfe des computergestützten Flächenmeßprogrammes „Aida“ durchgeführt. Dazu wurde der Computer mit einem Monitor und dem Videorecorder gekoppelt. Das zu messende Explant wurde im Standbild gespeichert, um dann durch Umfahren der Fläche mit der Maus die Fläche berechnen zu können. Damit der Computer die Berechnungen durchführen konnte, mußte zunächst die Skalierung für die jeweilige Vergrößerung gespeichert werden.

Berechnung des Bindungsindex

Der Bindungsindex (BI) wird definiert als die durchschnittliche Menge der gebundenen Spermien pro 0,01 mm² Explantfläche. Pro Explant wird nicht die gesamte Fläche aufgenommen, sondern der Bindungsindex exemplarisch an drei Fragmenten berechnet (s. Abb. 1).

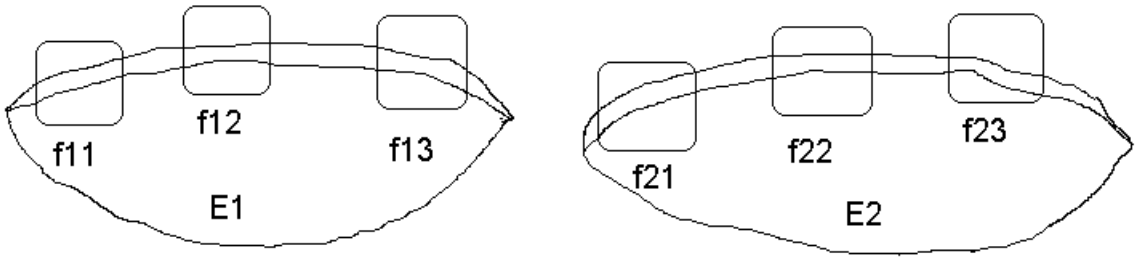


Abb. 1: Schematische Darstellung der Auswertung von zwei Explanten eines Eileiters. Nach der Gewinnung der Explante stellen diese sich mit einer epitheltragenden Seite und einer Schnittfläche dar. Die Fragmente des einzelnen Explants wurden immer an der spermienbindenen, epitheltragenden Seite aufgenommen. Innerhalb eines Versuchsansatzes wurden aus beiden Eileitern jeweils zwei Explante gewonnen und pro Explant drei Fragmente ausgewertet.

E_1, E_2 : Explant 1 und Explant 2

f_{11}, f_{12}, f_{13} : gefilmte Fragmente von Explant 1 (E1)

f_{21}, f_{22}, f_{23} : gefilmte Fragmente von Explant 2 (E2)

SE_1,SE_2 : Fläche des gesamten Explantes, gemessen mit dem Computerprogramm „Aida“

Sf_{11}, Sf_{12}, Sf_{13}, Sf_{21}, Sf_{22}, Sf_{23} : Flächen der entsprechenden Fragmente, gemessen mit dem Computerprogramm „Aida“

nf_{11}, nf_{12}, nf_{13}, nf_{21}, nf_{22}, nf_{23} : Anzahl der Spermien, gezählt an den gefilmten Explanten

Der Bindungsindex für ein Explant berechnet sich durch die Division der Anzahl der gebundenen Spermen aller drei Fragmente durch die Flächengröße dieser drei Fragmente:

$$\mathbf{BI\ (E_1) = (nf_{11} + nf_{12} + nf_{13}) / (Sf_{11} + Sf_{12} + Sf_{13})}$$

$$\mathbf{BI\ (E_2) = (nf_{21} + nf_{22} + nf_{23}) / (Sf_{21} + Sf_{22} + Sf_{23})}$$

Der Bindungsindex für beide Explante eines Eileiters errechnet sich aus dem Mittelwert der einzelnen Bindungsindizes:

$$\mathbf{BI(Eileiter_1) = (BI_{E1} + BI_{E2}) / 2}$$

$$\mathbf{BI(Eileiter_2) = (BI_{E1} + BI_{E2}) / 2}$$

Aus den Bindungsindizes beider Eileiter wurde abschließend ein Gesamtbindungsindex errechnet, dieser repräsentierte den Mittelwert beider Bindungindizes:

$$\mathbf{BI = (BI_{Eileiter1} + BI_{Eileiter2}) / 2}$$

3.2.5 DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA)

Befüllung und Inkubation der Mikrotiterplatten

Pro Versuchstag wurden zwei DudFinder® Sperm-Binding Assay Mikrotiterplatten benötigt, deren ID-Code auf die Arbeitsvordrucke übertragen wurde. Die Arbeitsvordrucke wurden entsprechend der Reihenfolge der zu testenden Eber auf der Platte beschriftet. Nach Überkleben der untersten waagerechten Reihe einer Mikrotiterplatte mit einem Klebestreifen („*Tesa*“) wurden die übrigen sieben Wells in den 12 senkrechten Säulen mit einer 8-Kanal-Multipipette, mit 100 µl Androhep („*AH*“) pro Well befüllt und anschließend gewaschen. Das Waschen der Platten geschah durch ein kräftiges Ausleeren der Platte in Verbindung mit einem sorgfältigen Abtrocknen auf mehreren Lagen Zellstoff. Zum Waschen wurden ausschließlich gelbe Pipettenspitzen mit einer weiten Öffnung verwendet.

Nach dem Waschvorgang wurden die beiden ersten und letzten senkrechten Säulen, sowie die oberste waagerechte Reihe mit 100 µl Androhep pro Well befüllt und in die verbleibenden 8 Säulen 100 µl Spermien-Suspension pro Well verbracht. Für die Spermien jedes Versuchsebers war pro Versuchstag jeweils eine senkrechte Säule vorgesehen, so dass die Säulen drei bis sechs mit den Spermien-Suspensionen der vier Versuchseber befüllt wurden. In den senkrechten Säulen sieben bis zehn wurde dieser Vorgang mit dem zweiten Aliquot jedes Ebers wiederholt.

Das Befüllen der Platte erfolgte grundsätzlich mit einer 100 µl Pipette mit einer englumigen gelben Pipettenspitze, die von Linie zu Linie, d.h. beim Wechsel der Spermien-Suspension erneuert wurde.
Die zweite Mikrotiterplatte wurde vor Gebrauch zur Hälfte mit Parafilm verschlossen, so dass nur die senkrechten Säulen ein bis sechs (Zeitpunkt 24 h), bzw. sieben bis zwölf (Zeitpunkt 72 h) zur Verfügung standen. Nach zweimaliger Waschprozedur mit jeweils 100 µl Androhep pro Well wurden die jeweils erste und letzte senkrechte Säule und die oberste waagerechte Reihe mit 100 µl Androhep pro Well und die vier verbleibenden senkrechten Säulen mit 100 µl Spermien-Suspension pro Well befüllt.
Zum besseren Verständnis sind die Mikrotiterplatten in Abb. 2 schematisch dargestellt:

Abb. 2: Darstellung der befüllten SBA-Platten. In Bezug auf die waagerechte Anordnung der Wells spricht man von einer Reihe, während die senkrechte Anordnung als Säule bezeichnet wird.

1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	**Zeitpunkt 24 h**				Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa

1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH
AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH
AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH
AH	**Zeitpunkt 24 h**				AH	AH	**Zeitpunkt 72 h**				AH
AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH
AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH
AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH
Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa

1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***	***8***	***9***	***10***	***11***	***12***
AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	**Zeitpunkt 72 h**				Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
AH	AH	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	Eber 1	Eber 2	Eber 3	Eber 4	AH	AH
Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa	Tesa

- AH entspricht Androhep (WEITZE 1990)
- Tesa bezeichnet die unterste, mit Klebeband verschlossene Reihe

Die oberste waagerechte Reihe ist nicht Bestandteil der 96-well Mikrotiterplatte, sondern als Kennzeichnung der senkrechten Säulen angegeben.

Die Platten wurden anschließend für 60 Minuten bei 37 °C in Aluminiumträgern in einem Heizinkubator inkubiert und nachfolgend dreimal mit Androhep gewaschen. Abschließend erfolgte eine Trocknung über Nacht mit geöffnetem Deckel und die Lagerung in einem sauberen Styroporbehältnis nach Verschluß am nächsten morgen.

Auswertung

Die Auswertung der Anzahl der gebundenen Spermien pro Well erfolgte bei BioPore, Inc. in den USA. Die Sendung der Platten konnte aus tierseuchenhygienischen Gründen erst nach einer 18 stündigen Erhitzung bei 60°C in einem Wärmeschrank stattfinden.

Die Firma BioPore, Inc. bediente sich dem System des ProgenyPlus® Sperm Evaluation Service, einem automatischen Plattenleser, um den prozentualen Anteil der pro Well gebundenen Spermien zu ermitteln. Im Einzelnen beruht das System der automatischen Auswertung auf einer Färbung der Spermien mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (Yo-Pro-1), der vergleichend zur Grundfluoreszenz des Extraktes der perivitellinen Membran gelesen und durch die Fluoreszenz des Verdünners korrigiert

wird. Um den prozentualen Anteil gebundener Spermien errechnen zu können, muß die gelesene Fluoreszenz mittels einer DNA-Standardkurve in ng DNA umgewandelt werden (BARBATO et al. 1998; GILL et al. 1999; AMANN et al. 1999a).
Zur Ermittlung der DNA-Standardkurve wurden verschiedene DNA-Standards (D 1501) in der Menge von 10 bis 150 ng DNA, in die unbehandelten Wells der untersten waagerechten Reihe der Platten des gesamten Versuchs gegeben. Die gemessene Steigung der Regressionsgrade dieser Standardkurve wird durch den Durchschnittswert der Steigung von anderen Regressionsgeraden aus vorangegangenen Versuchen korrigiert und damit der aktuelle Wert für den DNA-Standard erhalten. Das Verhältnis der relativ fluoreszierenden Einheiten pro Well wird nachfolgend ins Verhältnis zum DNA-Standard gesetzt und dieser Wert durch eine Reihe von Mittelwerten einzelner Korrekturfaktoren geteilt. Mit Hilfe dieser Rechnung kann die gemessene Floureszenz in ng DNA umgerechnet werden.

$$\mathbf{F_{(Spermien)} = bvalue \,/\, Mean_{(Korrekturfaktoren)}}$$

$F_{(Spermien)}$: tatsächlicher Wert der Fluoreszenz, die auf Spermienmasse zurückzuführen ist

bvalue : Verhältnis der gemessenen relativ fluoreszierenden Einheiten zum DNA-Standard

$Mean_{(Korrekturfaktoren)}$: Mittelwert der Korrekturfaktoren der Fluoreszenz der perivitellinen Menbran und des Verdünners

Da der durchschnittliche DNA-Gehalt in ng eines porcinen Spermatozoons bekannt ist (AMANN et al. 1999a), wird mit diesem aus dem Ergebnis der oberen Formel, die Anzahl der gebundenen Spermien pro Well berechnet.
Basierend auf der Gesamtzahl aller pro Well inkubierten Spermien kann anschliessend aus der Anzahl pro well gebundener Spermien der prozentualer Anteil gebildet werden.

Nach der Auswertung aller Mikrotiterplatten durch den automatischen Plattenleser des ProgenyPlus® Sperm Evaluation Service wurden die Einzelergebnisse der 6 Wells einer senkrechten Säule zu einem Mittelwert zusammengefaßt und die Standardabweichung angegeben. Für jeden Versuchstag wurden pro Ejakulat drei Mittelwerte aus den drei senkrechten Säulen, die pro Ejakulat befüllt wurden, ermittelt. Zwei dieser drei Werte stammen von einer Mikrotiterplatte und der dritte Wert von einer anderen (s.o.). Aus diesen drei Mittelwerten konnte abschließend für jeden Untersuchungszeitpunkt ein gemeinsamer Durchschnittswert der prozentual im SBA gebundenen Spermien eines Ejakulates gebildet werden.
Dieses wurde möglich, da die Intra- und Interassayvariationen des eigenen Versuches mit 12 % und 11,9 % unter den, von AMANN et al. (1999c) beschriebenen, maximal tolerierbaren Werten von 12 bzw. 22 %, lagen.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Berechnung und die graphische Darstellung der Daten erfolgten unter Verwendung der Excel-Software (Microsoft Inc., USA, Version MS-Excel 97), sowie des Statistik-Paketes SAS (SAS Institute Inc., Version V8 für Windows , Cary, North Carolina, USA).

Analyse der Ergebnisse des OEA

Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Bindungsindex wurden zunächst für die Explante jedes individuellen Eileiters getrennt errechnet (Prozedur MEANS). In gleicher Weise konnten dann die Bindungsindizes der Spermien für beide Eileiter zu einem Gesamtwert für jeden Eber und für jeden Zeitpunkt zusammengefasst werden. Dieser Wert diente als Berechnungsgrundlage für weitere Analysen eines Gesamtmittelwertes über alle Eber und für den Vergleich der verschiedenen Ebergruppen (Prozedur MEANS).
Um sowohl die eventuellen Unterschied zwischen den weiblichen Spendertieren, den Einfluss von Lagerungsdauer und Gruppe und die individuellen Unterschiede zwi-

schen den verwendeten Versuchsebern in Bezug auf den Bindungsindex der Spermien zu prüfen, wurden 2-faktorielle Varianzanalysen durchgeführt (GLM-Prozedur) (GOGOLOK et al. 1992; SCHUEMER et al. 1990).
Zur Bestimmung der Zusammenhänge zwischen Bindungsindex und den erhobenen spermatologischen Qualitätsparametern, einschließlich der Bindungsfähigkeit im SBA, wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Es erfolgte die Berechnung der Produktmonumentkorrelation R und des zugehörigen p-Wertes (Irrtumswahrscheinlichkeit) (Prozedur CORR).

Analyse der Ergebnisse des SBA

Zunächst erfolgte die Ermittlung der Intra- und Interassayvariationen durch Erhebung der Gesamtmittelwerte über alle Eber für die drei Lokalisationen auf beiden Platten (Prozedur MEANS). Die Ergebnisse des eigenen Versuchs lagen innerhalb der Vorgaben der Literatur bezüglich des Assays (s. 3.2.5), so daß anschließend zur Berechnung des prozentualen Anteils der im SBA gebundenen Spermien für jeden Eber für beide Zeitpunkte der Mittelwert dieser drei Lokalisationen auf beiden Platten und der Mittelwert aus drei Wiederholungen, einschließlich der jeweiligen Standardabweichungen errechnet werden konnte (Prozedur MEANS).
Nachdem die Grundwerte vorlagen zeigte der Test auf Normalverteilung (Prozedur UNIVARIATE) eine fehlende Normalverteilung der Daten aller Eber, so dass der Wilcoxon two-sample-test (U-Test) angewendet wurde (Prozedur NPAR1WAY), um den Einfluß von Eber und Untersuchungszeitpunkt auf die Bindungsfähigkeit von Spermien im SBA zu berechnen. Ebenso diente dieser Test zum Vergleich der Bindungsfähigkeit an verschiedenen Zeitpunkten für jeden einzelnen Eber.

Signifikanzlevel für die Irrtumswahrscheinlichkeit

Für die gesamte Studie gilt der Wert von $p \leq 0{,}05$ als signifikanter Grenzwert für die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese.
Neben dieser Angabe wird ein weiterer Level von $p \leq 0{,}001$ benutzt, der den Grenzwert einer hochsignifikanten Irrtumswahrscheinlichkeit angibt.
Alle Angaben erfolgen als Mittelwert ± Standardabweichung (SD).

4 ERGEBNISSE

4.1 SPERMATOLOGISCHE ERGEBNISSE

4.1.1 Spermatologische Parameter

Insgesamt 118 Ejakulate von 44 Ebern wurden ca. 24 Stunden nach ihrer Gewinnung einer ersten spermatologischen Untersuchung unterzogen. Mit Ausnahme von 7 Ebern, von denen nur zwei Ejakulate zur Verfügung standen, sind von den übrigen 37 Ebern drei Ejakulate untersucht worden.

2 Samenproben wiesen 24 Stunden nach Verdünnung eine Motilität < 70 % auf und wurden daher nicht verwendet.
Die morphologischen Qualitätsparameter MAS [%] und Plasmatropfen [%] der Ejakulate aller 44 Eber sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.
Die Samenproben von 4 Ebern wiesen ≥ 30 % MAS auf und wurden der Gruppe der spermienmorphologisch auffälligen Eber (maE) zugeordnet. 33 Eber hatten Ejakulate mit ≤ 30 % MAS und wurden in die Gruppe der spermienmorphologisch unauffälligen Eber (muE) eingeteilt (s. Abb. 3).
Bezüglich der am häufigsten vorkommenden morphologischen Abweichung, den Spermatozoen mit Plasmatropfen, die sich aus proximalen und distalen Plasmatropfen zusammensetzten, wurden ebenfalls Eber klassifiziert. 9 Eber mit Ejakulaten, deren Plasmatropfenanteil ≥ 15 % betrug, wurden als spermienmorphologisch auffällige Eber klassifiziert (s. Abb. 4). Die Samenproben von 7 dieser 9 Eber wiesen ≥ 30 % MAS auf und waren aus diesem Grund bereits in der Gruppe spermienmorphologisch auffälliger Eber vertreten. 2 Eber mit Untersuchungsergebnissen ihrer Ejakulate von ≤ 30 % MAS und ≥ 15 % Plasmatropfen wurden dieser Gruppe noch zusätzlich zugeordnet.

Abbildung 3 : Prozentualer Anteil morphologisch abweichender Spermien (MAS) in den Ejakulaten 24 Stunden nach Verdünnung (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)

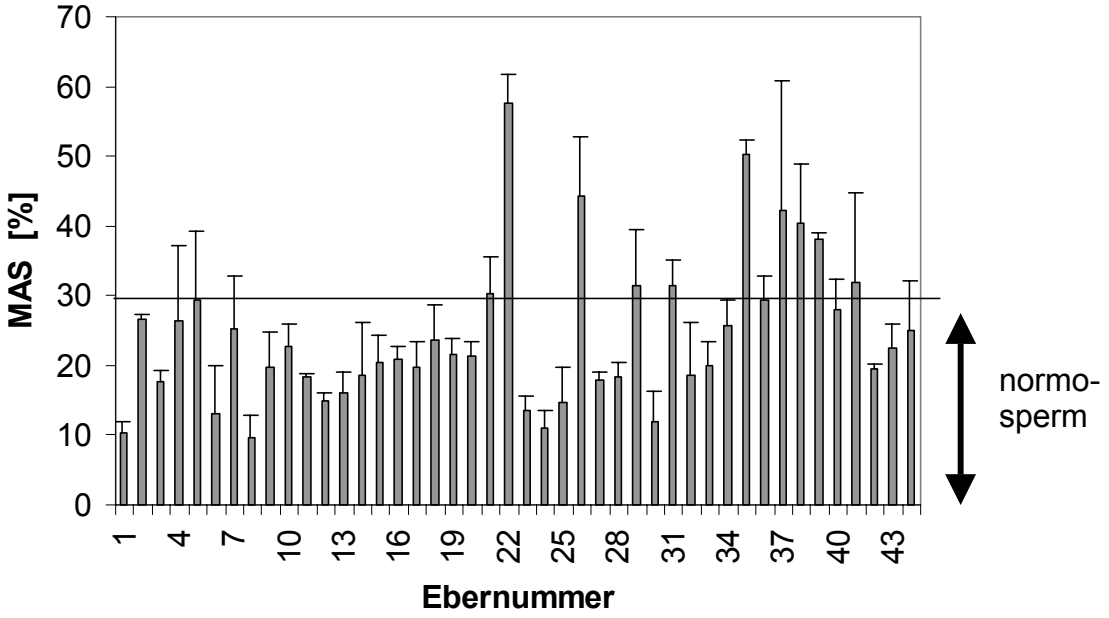
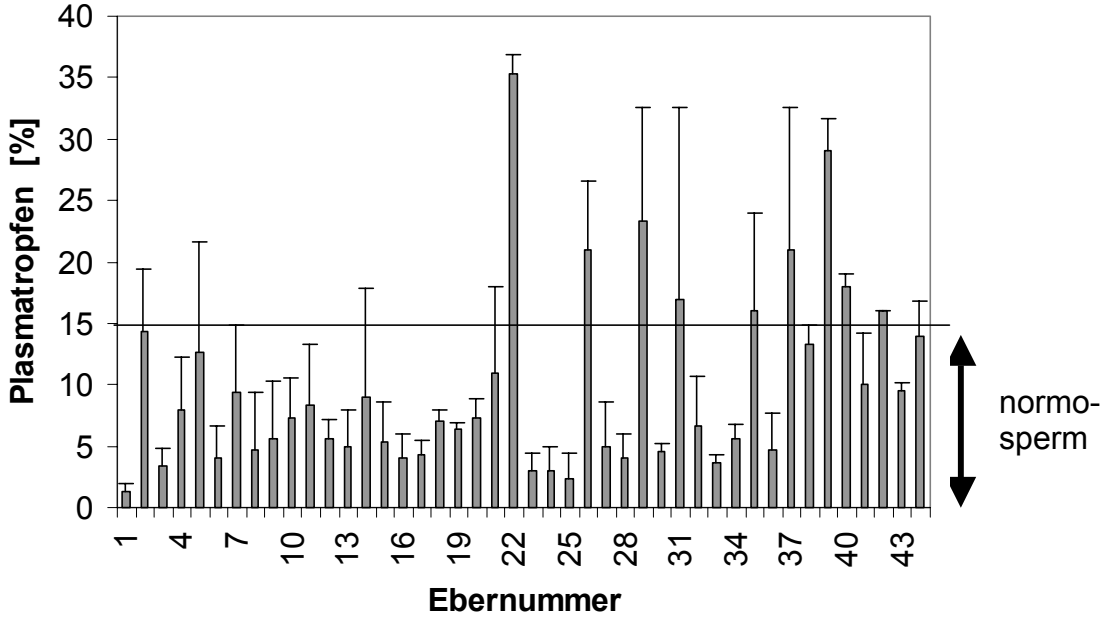


Abb. 4 : Prozentualer Anteil der Spermien mit Plasmatropfen in den Ejakulaten 24 Stunden nach Verdünnung (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)

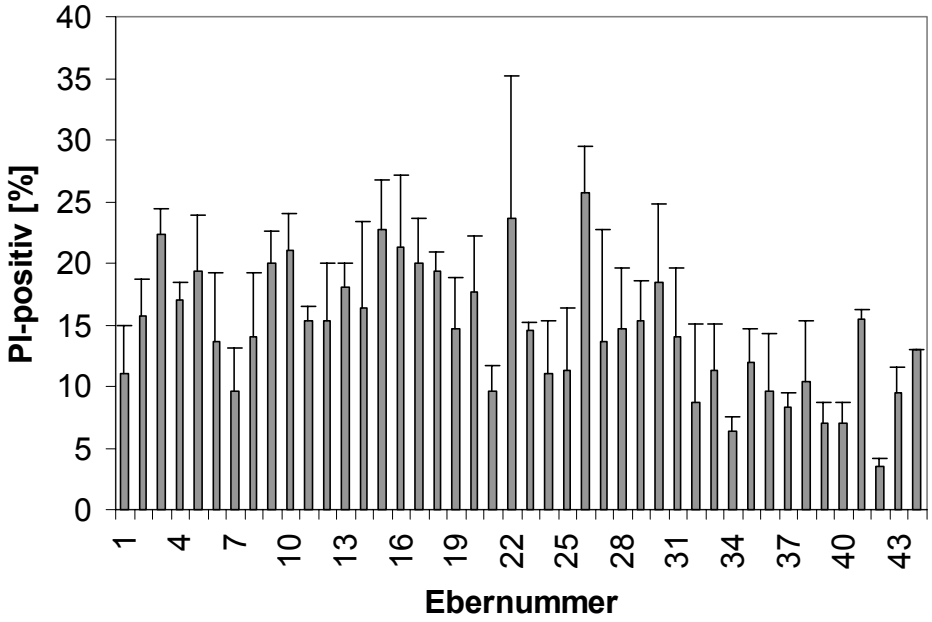


Das Streuungsmaß bezieht sich mit Ausnahme der Eber Nr. 4, 30, 31, 41, 42, 43 u. 44 von denen zwei Ejakulate untersucht wurden, für alle übrigen Eber auf drei Wiederholungen.

Die Gruppierung der Versuchseber orientierte sich alleine an den konventionellen spermienmorphologischen Parametern. Die Ergebnisse der modernen spermatologischen Untersuchungsmethode zur Membranintegrität (*PI*) fanden keine Berücksichtigung.
Dementsprechend teilten sich die 44 Versuchseber in 30 spermienmorphologisch unauffällige Eber (muE) und 14 spermienmorphologisch auffällige Eber (maE) auf.

Die Ergebnisse der PI-Färbung sind der Abbildung 5 zu entnehmen.

Abb. 5 : Prozentualer Anteil der PI-positiven Spermien in den Ejakulaten 24 Stunden nach Verdünnung (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)



Das Streuungsmaß bezieht sich mit Ausnahme der Eber Nr. 4, 30, 31, 41, 42, 43 u. 44 von denen zwei Ejakulate untersucht wurden, für alle übrigen Eber auf drei Wiederholungen.

Mit 36 der 44 Eber wiesen 82 % einen Anteil membraninstabiler Spermien zwischen 10 und 25 % auf. Ein Eber besaß einen höheren und 7 Eber niedrigere Prozentsätze PI-positiver Samenzellen.

4.1.2 Einfluß der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation auf spermatologische Parameter

Die Durchführung der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation beeinflusste die spermatologische Qualität der separierten Spermienpopulation. Tab. 1 veranschaulicht anhand einer Stichprobe von 28 Ejakulaten den Effekt auf bestimmte Qualitätsparameter und gibt damit die spermatologische Zusammensetzung des mit den Explanten inkubierten Spermienaliquotes wieder.

Tabelle 1: Einfluß der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation auf spermienmorphologische Parameter (n = 28 Ejakulate von 9 Ebern)

PARAMETER		KONTROLLE	PERCOLL- ZENTRIFUGIERT
Motilität	[%]	76,4 [a] ± 6,1	82,3 [b] ± 5,4
MAS	[%]	30,8 ± 17,6	25,1 ± 19,1
NAR	[%]	90,3 ± 5,3	92,1 ± 5,8
Plasmatropfen	[%]	13,1 ± 13,3	12,8 ± 14,9
Andere	[%]	8,0 [c] ± 7,4	4,4 [d] ± 4,8
PI-positiv	[%]	17,2 ± 4,2	16,1 ± 3,4

MAS : morphologisch abweichende Spermien
NAR : Spermien mit normalem akrosomalen Rand
Andere: morphologisch abweichende Spermien ohne Spermien mit Plasmatropfen und ohne akrosomendefekte Spermien
PI-positiv : membrandefekte Samenzellen; in der PI-Färbung rot gefärbt

a und b kennzeichnen hochsignifikant unterschiedliche Werte ($p \leq 0,001$)
c und d kennzeichnen signifikant unterschiedliche Werte ($p \leq 0,05$)

Im Vergleich zur Kontrolle ergab sich durch die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation eine hochsignifikante ($p \leq 0{,}001$) Steigerung der Motilität.
Die morphologischen Parameter blieben, mit Ausnahme der Kategorie *Andere*, in der alle morphologisch abweichenden Spermien, außer den akrosomendefekten und den Spermien mit Plasmatropfen, zusammengefaßt wurden, unbeeinflußt. Letztere nahm während der Zentrifugation signifikant ab ($p \leq 0{,}05$).
Der Anteil PI-positiver Samenzellen wurde durch die Zentrifugation nicht signifikant verändert.

4.2 ERGEBNISSE DES OVIDUKT-EXPLANT-ASSAY (OEA)

4.2.1 Beeinflussung der Spermienbindungskapazität durch die Herkunft des Eileiters

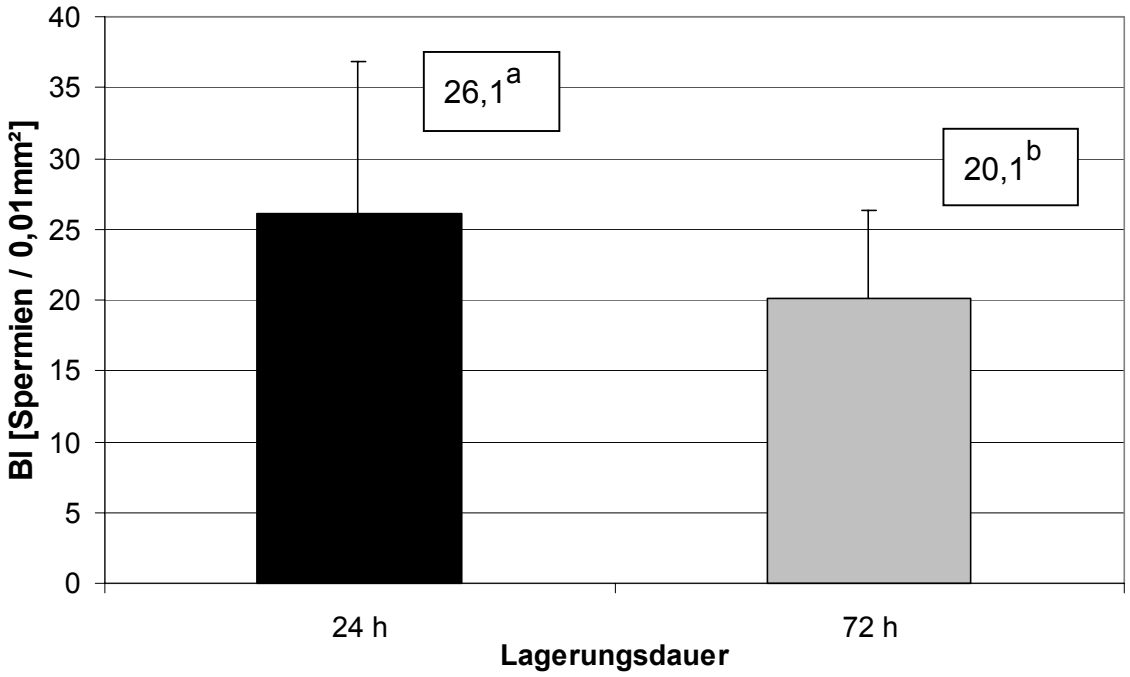
Der größte Teil aller verwendeten Eileiter stammte von Altsauen im Interöstrus.
An 60 von 62 Versuchstagen wurden Ejakulate von 3 bis 6 Ebern mit je zwei Eileitern von zwei verschiedenen Altsauen auf split-sample-Basis im OEA untersucht. Die übrigen zwei Versuchstage wurden lediglich mit zwei verschiedenen Ebern durchgeführt. Beide Versuchstage wurden aufgrund der geringen Eberzahl nicht in die Untersuchung des Eileitereinflusses einbezogen.
An 10 von 60 Versuchstagen mit ≥ 3 Ebern wurde ein signifikanter ($p \leq 0{,}05$) Einfluß des Eileiters auf die Spermienbindungsfähigkeit festgestellt.
Die Explantflächen variierten zwischen 2,7 und 9,8 mm², wobei 77,5 % der Eplantflächen im Bereich von 5 bis 9 mm² lagen. Die durchschnittliche Explantflächengröße betrug $7{,}3 \pm 1{,}2$ mm².
Die mittlere Differenz zwischen den Explantflächen zweier verschiedener Eileiter für identische Samenproben lag zwischen minimal 0 und maximal 2,2 mm²; in der Gruppe mit einem signifikanten Eileitereinfluß variierte diese Differenz lediglich zwischen 0,3 und 1,3 mm².

Eine Korrelation der Explantfläche zur Anzahl gebundener Spermien konnte weder auf der Basis aller Versuche (R = 0,01), noch bei isolierter Betrachtung der Gruppe mit signifikantem Eileitereinfluß (R = 0,09) festgestellt werden.

4.2.2 Einfluß der Lagerung auf die Spermienbindung

Während der Lagerung der flüssigkonservierten Eberejakulate verringerte sich die Explantbindungsfähigkeit porciner Spermien hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$). Abb. 6 veranschaulicht die Differenz des Bindungsniveaus zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten, dabei werden die über alle Versuchseber gemittelten Bindungsindizes miteinander verglichen.

Abb. 6: Spermienbindung im OEA in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer flüssigkonservierten Ebersamens (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)



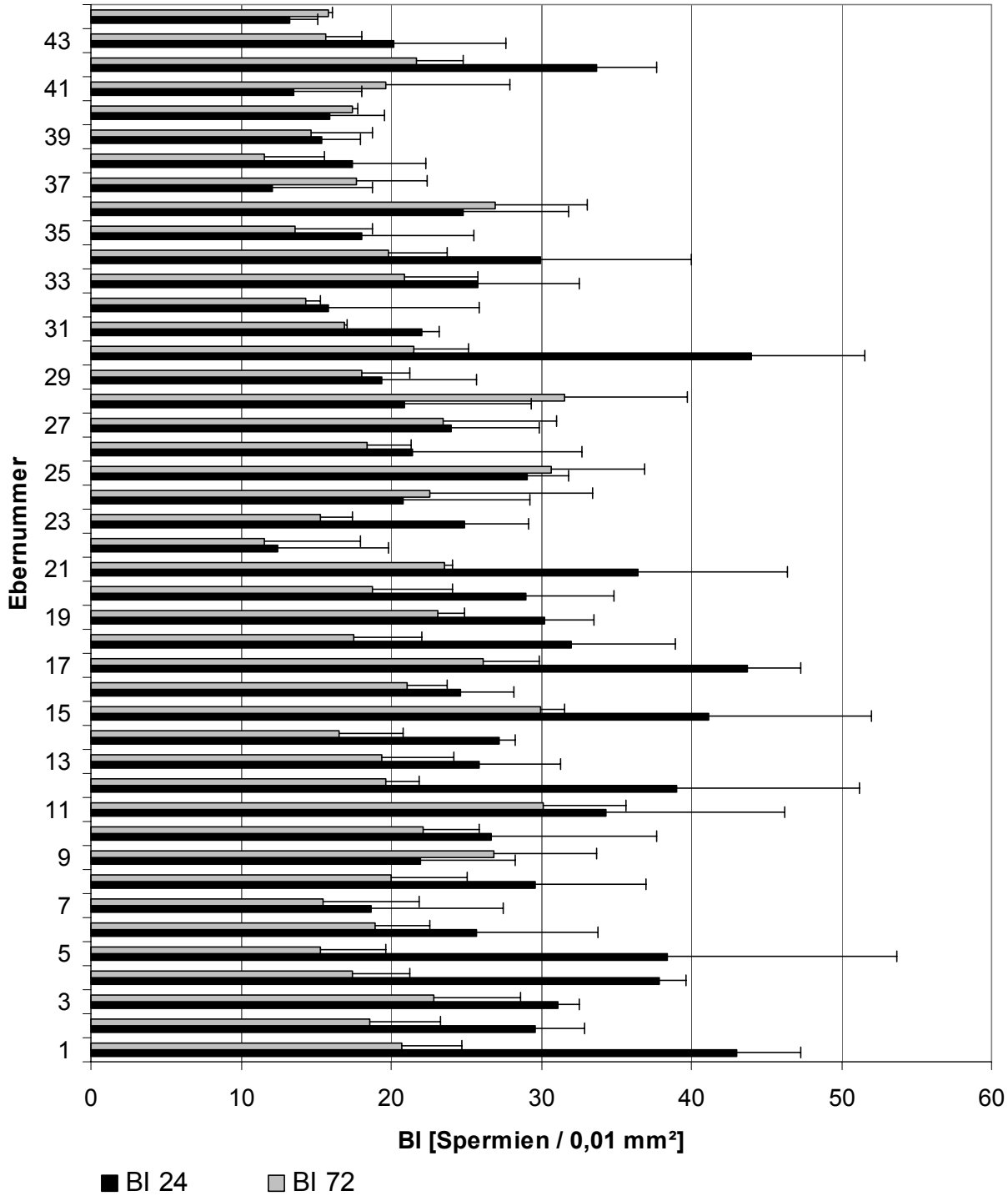
a,b kennzeichnen hochsignifikant unterschiedliche Werte ($p \leq 0{,}001$)

Die Abbildung 7 stellt die Bindungsfähigkeit der Spermien aller 44 Eber für beide Untersuchungszeitpunkte dar. In der Abbildung ist für jeden Eber der Mittelwert und die Standardabweichung der Spermien-Explant-Bindung aus allen Untersuchungen (2-3) und für jeden Untersuchungszeitpunkt (24 und 72 h nach Verdünnung) angegeben.

Abb. 7 zeigt für den Zeitpunkt 24 h eine Variation in der Bindungsfähigkeit an Eileiterexplante von minimal 12,1 (Eber Nr. 37) bis maximal 44,0 (Eber Nr. 30) gebundenen Samenzellen pro 0,01 mm² Explantfläche; dabei befanden sich mit 21 Ebern fast 50 % in einem Bereich von 20 – 30 gebundenen Spermien. Einen Bindungsindex von ≥ 30 wiesen die Samenzellen von 12 Ebern auf und 11 Eber lagen bezüglich des Bindungsniveaus ≤ 20 gebundenen Samenzellen.

Nach einer Lagerung von 72 Stunden wurden Bindungsindizes zwischen minimal 11,6 (Eber Nr. 38) und maximal 31,6 (Eber Nr. 28) festgestellt. Mit 25 der 44 Ebern hatten 57 % einen Spermienbindungsindex von ≤ 20. Bei 16 Ebern lag der Wert zwischen 20 und 30 und für 3 Eber erreichten die Spermatozoen ein Niveau von ≥ 30 gebundenen Samenzellen pro 0,01 mm² Explantfläche.

Abb. 7: Bindungskapazität im OEA für die Spermien aller Versuchseber 24 und 72 Stunden nach Verdünnung (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)



Das Streuungsmaß bezieht sich mit Ausnahme der Eber Nr. 4, 30, 31, 41, 42, 43 u. 44 von denen zwei Ejakulate untersucht wurden, für alle übrigen Eber auf drei Wiederholungen.

Die Bindung der Spermien im OEA war sowohl 24 Stunden nach Verdünnung, als auch nach 72-stündiger Lagerungsdauer für die Versuchseber unterschiedlich; es bestand ein hochsignifikanter ($p \leq 0{,}001$) Ebereinfluß auf die Anzahl der gebundenen Spermien.

Der Vergleich des Bindungsverhaltens der Samenzellen jedes Ebers für beide Zeitpunkte zeigt für 36 (82 %) Eber eine lagerungsbedingte Abnahme. Diese Abnahme war nicht für alle Probanden gleichmäßig. Mit 9 Ebern zeigten 20,5 % eine Abnahme der Spermienbindung um 5 – 10, während jeweils 13 (29,5 %) Eber ein verringertes Spermienbindungsniveau von ≤ 5 bzw. ≥ 10 gebundenen Samenzellen pro 0,01 mm² aufwiesen.

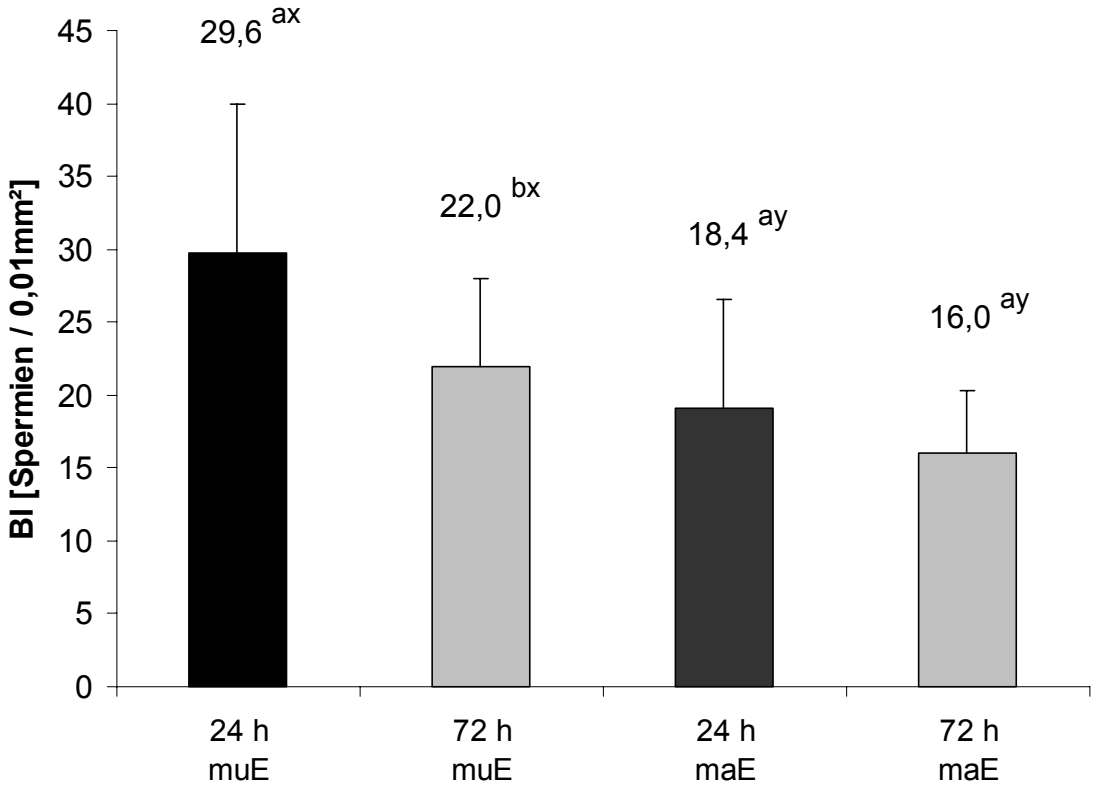
Es bestand eine signifikante ($p \leq 0{,}05$) Wechselwirkung zwischen den Samenzellen der Versuchseber und der Lagerungsdauer, sowohl Eber als auch Lagerungszeit hatten einen hochsignifikanten ($p \leq 0{,}001$) Einfluß auf die Explantbindung der Spermatozoen.

4.2.3 Spermienbindung in Abhängigkeit von der morphologischen Qualität der Ejakulate

Porcine Samenzellen aus spermienmorphologisch auffälligen Ejakulaten besaßen 24 und 72 Stunden nach Verdünnung ein hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$) niedrigeres Bindungsvermögen an Oviduktepithelexplante als Spermatozoen aus spermienmorphologisch unauffälligen Ejakulaten (Abb. 8).

In beiden Fällen nahm der Bindungsindex während der Lagerung ab. Diese Abnahme war relativ betrachtet mit 7,6 Samenzellen pro 0,01 mm² Explantfläche in der Gruppe der unauffälligen Ejakulate mehr als dreimal so hoch wie die Abnahme um 2,4 Spermien in der auffälligen Gruppe.

Abb. 8 : Spermienbindung im OEA nach 24 und 72 h Lagerungsdauer für Eber mit spermienmorphologisch auffälligen (n = 39 Ejakulate von 14 Ebern) und unauffälligen (n = 77 Ejakulate von 30 Ebern) Ejakulaten



muE : Gruppe der Eber mit spermienmorphologisch unauffälligen Ejakulaten
MAS ≤ 30 % und Plasmatropfen ≤ 15 % (n = 30)
maE : Gruppe der Eber mit spermienmorphologisch auffälligen Ejakulaten
MAS ≥ 30 % und / oder Plasmatropfen ≥ 15 % (n = 14)

a, b : hochsignifikant (p ≤ 0,001) unterschiedliche Werte zwischen 24 h und 72 h in der gleichen spermienmorphologischen Gruppe
x, y : hochsignifikant (p ≤ 0,001) unterschiedliche Werte zwischen muE und maE bei gleicher Lagerungsdauer

Die lagerungsbedingte Abnahme der Spermien-Explant-Bindung innerhalb der Gruppen war für Spermatozoen aus unauffälligen Ejakulaten hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$). Bezüglich der spermienmorphologisch auffälligen Ejakulate konnte kein statistisch signifikanter Unterschied (p = n.s.) der Spermienbindung zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden.
Sowohl die Gruppe, als auch die Lagerungsdauer hatten einen hochsignifikanten ($p \leq 0{,}001$) Einfluß auf die Explantbindung der porcinen Spermatozoen. Darüber hinaus bestand eine signifikante ($p \leq 0{,}05$) Wechselwirkung zwischen den beiden Gruppen und dem Lagerungseinfluß.

4.2.4 Korrelation der Spermienbindungsfähigkeit zu konventionellen und modernen spermatologischen Parametern

Die Fähigkeit von Eberspermatozoen an Explante aus Oviduktepithelien zu binden wurde durch Korrelationsberechnungen mit den konventionellen Parametern Motilität, Gesamtzahl morphologisch abweichender Samenzellen *(MAS)* und Prozentsatz der Spermien mit Plasmatropfen *(Plasmatropfen)*, sowie mit dem modernen spermatologischen Parameter Membranintegrität *(PI - positiv)* verglichen.
Der Parameter Motilität ist vor und nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation untersucht worden.
In Tabelle 3 sind die Ergebnisse dieser Korrelationsberechnungen angegeben, die Daten beziehen sich auf Basis der Mittelwerte jedes Versuchsebers.

Tab. 3: Korrelation von spermatologischen Parametern der Eberejakulate zur Eileiterepithelbindung (n = 44 Eber)

Qualitätsparameter		*Korrelation mit dem Bindungsindex (Zeitpunkt 24 h)*		*Korrelation mit dem Bindungsindex (Zeitpunkt 72 h)*	
		R	p	R	p
Motilität vor Percoll	[%]	0,12	n.s.	0,18	n.s.
Motilität nach Percoll	[%]	0,46	≤ 0,05	0,43	≤ 0,05
MAS	[%]	- 0,52	≤ 0,001	- 0,53	≤ 0,001
Plasmatropfen	[%]	- 0,51	≤ 0,001	- 0,52	≤ 0,001
PI – positiv	[%]	0,25	n.s.	0,09	n.s.

Die Abkürzungen der Beurteilungsparameter beziehen sich auf den vorherigen Text.

n.s. : nicht signifikant
R : Pearsonscher Korrelationskoeffizient

Unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt ergaben sich hochsignifikante ($p \leq 0{,}001$) negative Korrelationen des Bindungsindex mit der Gesamtzahl morphologisch abweichender Samenzellen und mit der Anzahl der Spermien mit Plasmatropfen.

Ebenfalls signifikant ($p \leq 0{,}05$) positive Korrelationen zeigten sich lagerungsunabhängig mit der Motilität nach der Percoll-Zentrifugation, während die Motilitätswerte der unbehandelten Samenzellen nicht in einer Beziehung zum Bindungsindex standen.

Bezüglich des modernen Beurteilungskriteriums Membranintegrität *(PI - positiv)* ergaben sich keine signifikanten Korrelationen mit der Bindungsfähigkeit porciner Spermatozoen im OEA.

Die Abb. 9 und 10 veranschaulichen graphisch die negative Korrelation des Bindungsindex mit dem prozentualen Anteil morphologisch abweichender Samenzellen bzw. der Spermien mit Plasmatropfen.

Abb. 9 : Korrelation der Anzahl morphologisch abweichender Samenzellen (MAS) im Ejakulat und der Menge der pro 0,01 mm² Explantfläche im OEA gebundenen Spermatozoen nach 24 h Lagerungsdauer (n = 44)

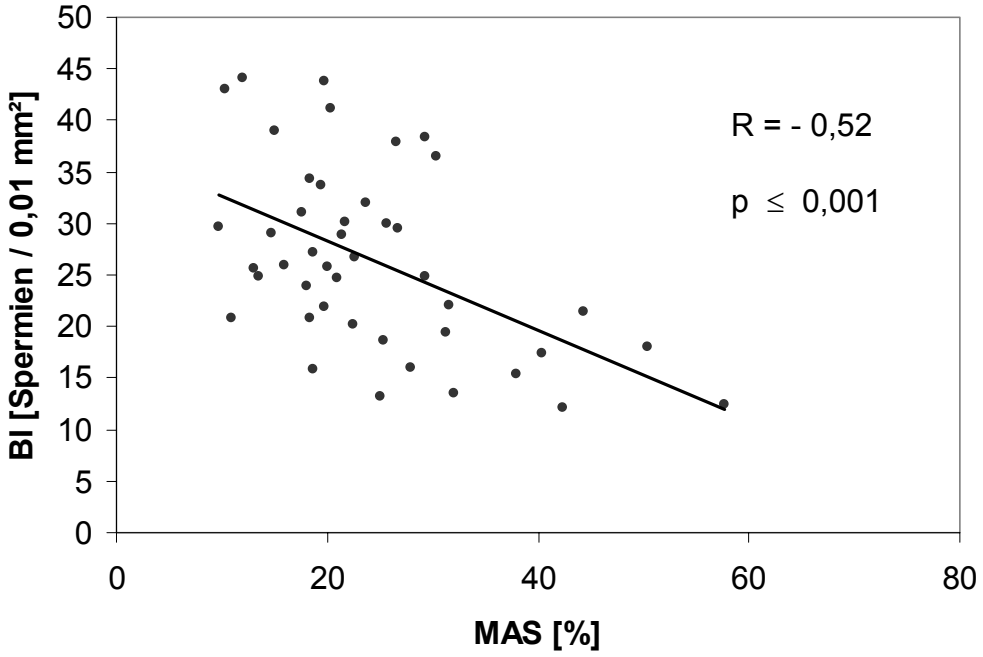
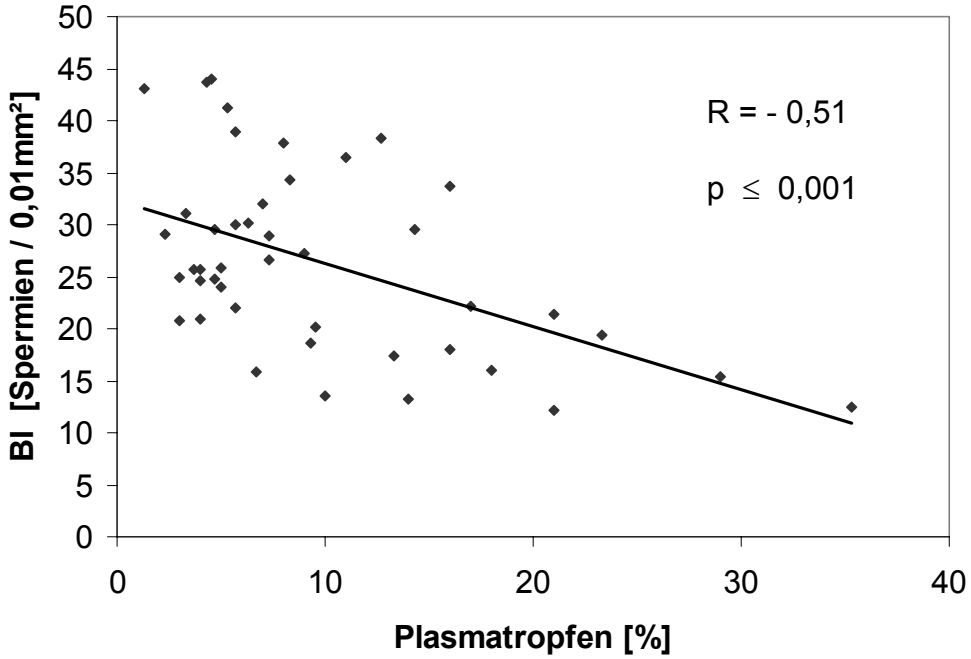


Abb. 10 : Korrelation der Anzahl von Spermien mit Plasmatropfen im Ejakulat und der Menge der pro 0,01 mm² Explantfläche im OEA gebundenen Spermatozoen nach 24 h Lagerungsdauer (n = 44)

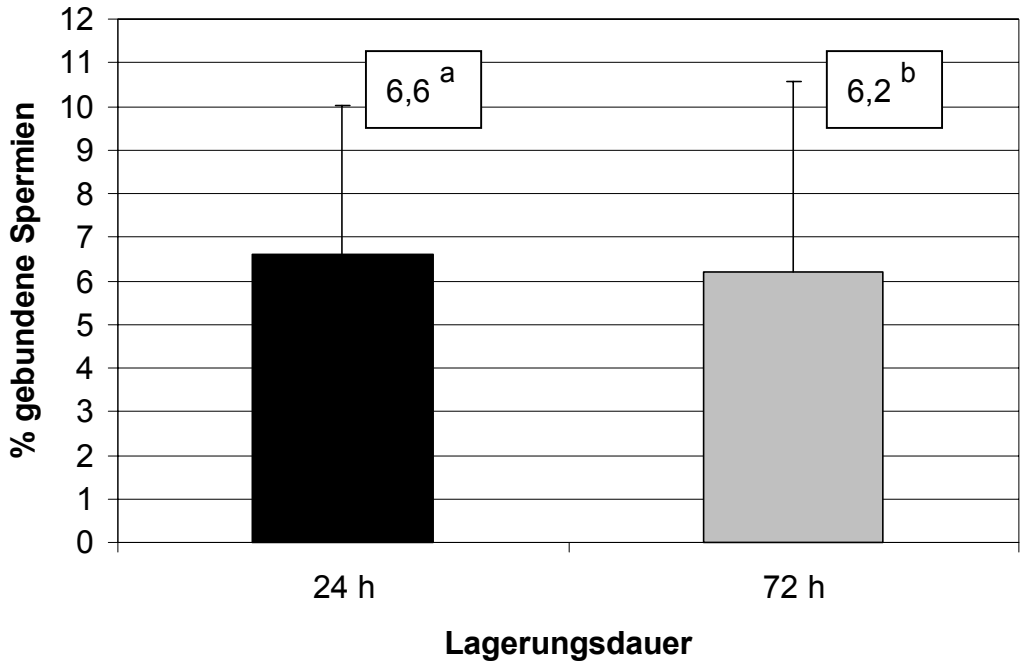


4.3 ERGEBNISSE DES DUDFINDER® SPERM-BINDING ASSAY (SBA)

4.3.1 Einfluß der Lagerung auf die Spermienbindung

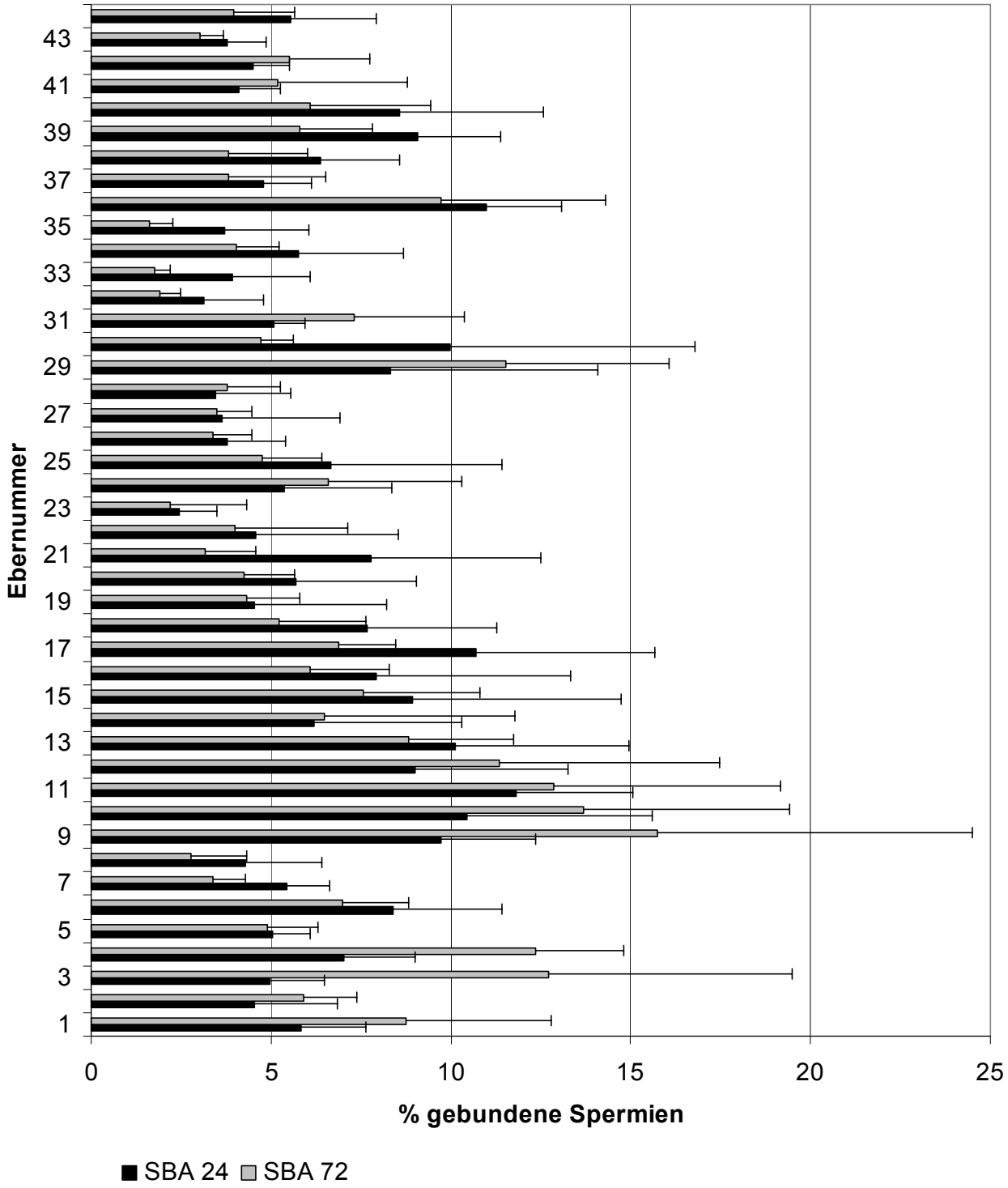
Ein Vergleich der Bindungsfähigkeit porciner Spermatozoen im SBA in Abb. 11 zeigt 24 Stunden nach Verdünnung die Bindung von durchschnittlich 6,6 % der inkubierten Samenzellen. Eine Lagerung über 72 Stunden verringerte die Bindung auf ein Niveau von durchschnittlich 6,2 % gebundenen Spermien. Die Differenz von 0,4 % stellt eine signifikante ($p \leq 0,05$) lagerungsbedingte Abnahme des SBA-Bindungsniveaus porciner Spermien dar.

Abb. 11 : Spermienbindung im SBA in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer flüssigkonservierten Ebersamens (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)



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

Abb. 12: Bindungskapazität im SBA für die Spermien aller Versuchseber 24 und 72 Stunden nach Verdünnung (n = 116 Ejakulate von 44 Ebern)



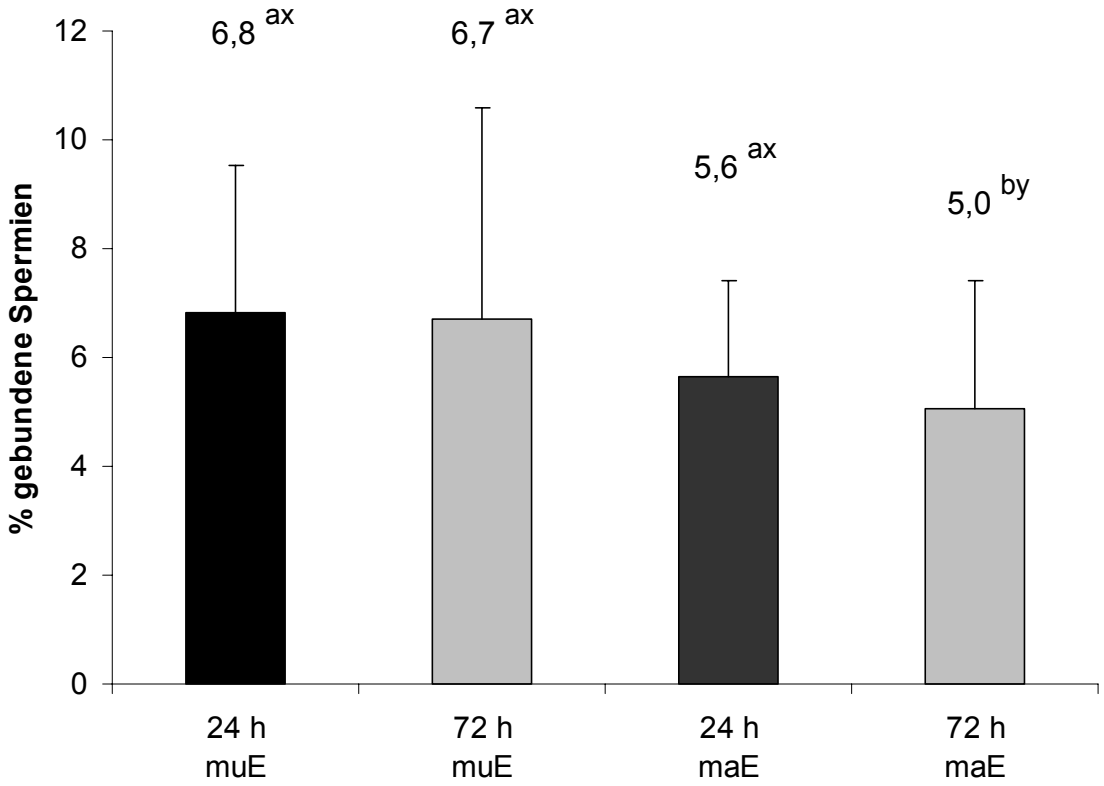
Das Streuungsmaß bezieht sich mit Ausnahme der Eber Nr. 4, 30, 31, 41, 42, 43 u. 44 von denen zwei Ejakulate untersucht wurden, für alle übrigen Eber auf drei Wiederholungen.

Die Darstellung des eberindividuellen Spermienbindungspotentials im SBA (Abb. 12) als Mittelwert der untersuchten Ejakulate, zeigt für den Zeitpunkt 24 Stunden nach Verdünnung einen hochsignifikanten ($p \leq 0{,}001$) Ebereinfluß auf den Prozentsatz der gebundenen Spermien. Dabei variierte der Bereich des Anteils gebundener Spermien zwischen minimal 2,4 % (Eber Nr. 23) und maximal 11,8 % (Eber Nr. 11). Mit insgesamt 24 der 44 Eber lagen 54,5 % in einem mittleren Bindungsbereich von 4 – 8 % gebundener Spermien, während 12 Ebern (27,3 %) $\geq$ 8 % und 8 Eber (18,2 %) $\leq$ 4 % Spermienbindung im SBA aufwiesen.
Die Variation der Spermienbindung nach einer Lagerung von 72 Stunden wird in der Abbildung mit minimal 1,6 % (Eber Nr. 35) und maximal 15,8 % (Eber Nr. 9) wiedergegeben. Der Ebereinfluß auf den Prozentsatz gebundener Spermien war ebenfalls hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$). Die Verteilung in analoge Bindungsklassen wie nach 24-stündiger Lagerung zeigt für 23 Eber (52,3 %) einen Anteil gebundener Spermien im mittleren Bereich zwischen 4 – 8 %. Die Spermien von 10 der 44 Eber (22,7 %) hatten eine SBA-Bindung $\geq$ 8 % und 11 Eber (25 %) wiesen einen Prozentsatz von $\leq$ 4 % gebundener Spermien auf.

Ein eberindividueller Vergleich der SBA-Bindung zwischen 24- und 72 Stunden gelagerten Spermien zeigte für 39 der 44 Versuchseber keinen signifikanten Unterschied, für 5 Eber konnte ein signifikanter Unterschied der Spermienbindung zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten berechnet werden, darunter wiesen die Spermien von vier Ebern eine Abnahme der Bindungsfähigkeit auf.

4.3.2 Spermienbindung in Abhängigkeit von der morphologischen Qualität der Ejakulate

Abb. 13 : Spermienbindung im SBA nach 24 und 72 h Lagerungsdauer für Eber mit spermienmorphologisch auffälligen (n = 39 Ejakulate von 14 Ebern) und unauffälligen (n = 77 Ejakulate von 30 Ebern) Ejakulaten



muE : Gruppe der Eber mit spermienmorphologisch unauffälligen Ejakulaten
MAS ≤ 30 % und Plasmatropfen ≤ 15 % (n = 30)
maE : Gruppe der Eber mit spermienmorphologisch auffälligen Ejakulaten
MAS ≥ 30 % und / oder Plasmatropfen ≥ 15 % (n = 14)

a, b : signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedliche Werte zwischen 24 h und 72 h in der gleichen spermienmorphologischen Gruppe
x, y : signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedliche Werte zwischen muE und maE bei gleicher Lagerungsdauer

Die Spermatozoen der beiden verschiedenen spermienmorphologischen Ebergruppen unterschieden sich 24 Stunden nach Verdünnung nicht signifikant voneinander, der errechnete Wahrscheinlichkeitswert ($p = 0,06$) beschreibt allerdings eine deutliche Tendenz. Nach 72 stündiger Lagerungsdauer war im Vergleich zu Spermien aus morphologisch unauffälligen Ejakulaten, der Anteil gebundener Spermien aus auffälligen Ejakulaten mit 5,0 % gegenüber 6,7 % signifikant ($p \leq 0,05$) geringer.
Der zeitpunktabhängige Vergleich innerhalb der beiden Gruppen ergab für die spermienmorphologisch unauffälligen Eber keinen signifikanten Unterschied (p = n.s.) des prozentualen Anteils gebundener Samenzellen zwischen 24- und 72-stündiger Lagerungsdauer. Spermien von auffälligen Ebern nahmen dagegen in ihrer SBA-Bindungskapazität bei steigender Lagerungszeit signifikant ab ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Korrelation der Spermienbindungsfähigkeit zu konventionellen und modernen spermatologischen Parametern

Die Ergebnisse der Korrelationsberechnungen des Prozensatzes im SBA gebundener Spermien mit den untersuchten konventionellen und modernen spermatologischen Parametern sind in Tab. 4 dargestellt. Es gelten die gleichen Erklärungen wie in Kapitel 4.2.4.
Mit Ausnahme des Anteils an membrangeschädigten Spermatozoen *(PI - positiv)*, der nach einer Lagerung von 72 Stunden signifikant positiv ($p= 0,02$) mit der Spermienbindung korrelierte, ergab sich für keinen weiteren Parameter zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation zum Anteil der im SBA gebundenen Spermatozoen.

Tab. 4: Korrelation von spermatologischen Parametern der Eberejakulate zur Bindung im SBA (n = 44 Ebern)

Qualitätsparameter		*Korrelation mit dem Bindungsindex (Zeitpunkt 24 h)*		*Korrelation mit dem Bindungsindex (Zeitpunkt 72 h)*	
		R	p	R	p
Motilität vor Percoll	[%]	0,09	n.s.	- 0,22	n.s.
Motilität nach Percoll	[%]	0,27	n.s.	0,01	n.s.
MAS	[%]	- 0,16	n.s.	- 0,24	n.s.
Plasmatropfen	[%]	- 0,11	n.s.	- 0,06	n.s.
PI – positiv	[%]	0,18	n.s.	0,34	≤ 0,05

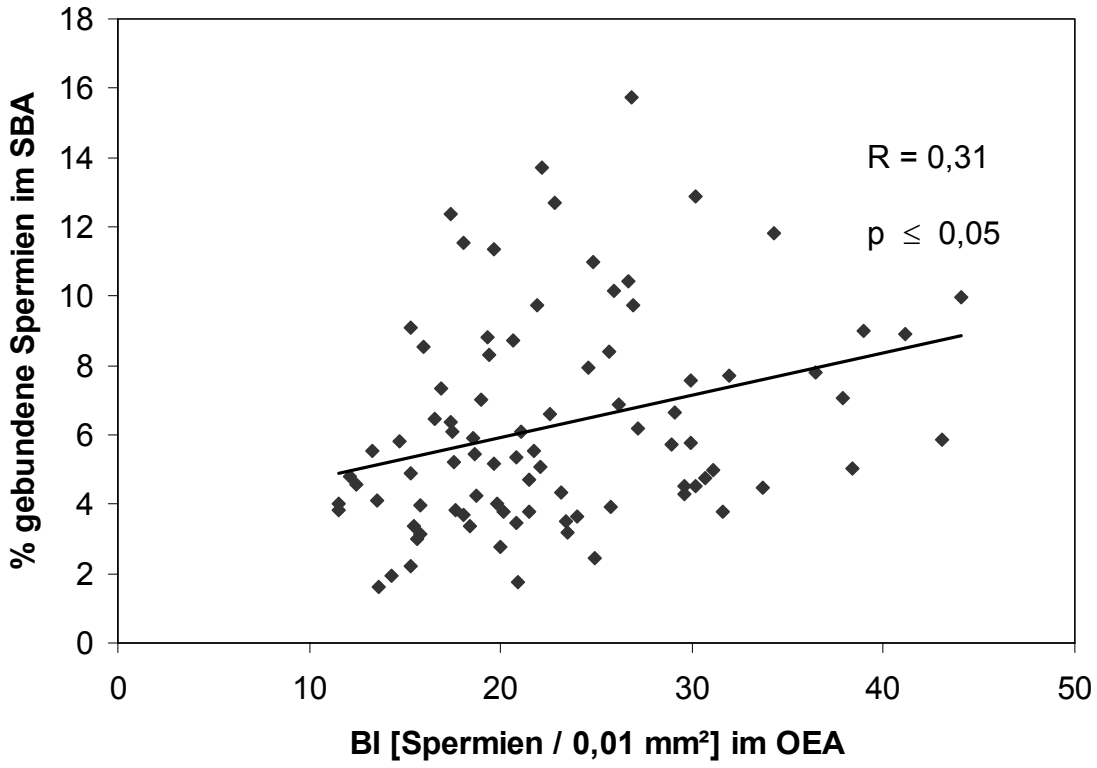
Die Abkürzungen der Beurteilungsparameter beziehen sich auf die Erklärungen in Kapitel 4.2.4.

n.s. : nicht signifikant
R : Pearsonscher Korrelationkoeffizient

4.4 VERGLEICH DER BINDUNGSFÄHIGKEIT VON EBERSPERMIEN IM OEA UND IM SBA

Der Vergleich der beiden verwendeten Assays miteinander ist in Form einer weiteren Korrelationsberechnung durchgeführt worden.
Die Korrelation der Bindungsfähigkeit der Spermien im OEA und SBA ist auf Basis der Mittelwerte unabhängig von der Lagerungsdauer in Abb. 14 dargestellt.
Der Korrelationskoeffizient betrug 0,31 ($p \leq 0,05$).

Abb. 14 : Korrelation der Bindungsfähigkeit von Eberspermien im OEA und im SBA unabhängig von der Lagerungsdauer (n = 44 Ebern)



Die angegebenen 88 Datenpunkten sind dadurch zu erklären, dass der Vergleich unabhängig von der Lagerungsdauer berechnet wurde. Für 44 Eber ergaben sich bei einer wiederholenden Untersuchung dementsprechend 88 Werte.

4.5 Spermatologische Diagnostika in Anwendung für subfertile Eber

Fertilitätsergebnisse, die in Form eines Fruchtbarkeitsmonitorings von einer der beteiligten Besamungsstationen ausgewertet wurden, standen für 5 der 44 Eber zur Verfügung. In Tab. 5 sind die Werte der Eber 36 – 40 dargestellt. Alle fünf Eber wurden als subfertil eingestuft, da sie in den Non-Return-Raten und / oder in der Anzahl lebend geborener Ferkel negativ vom Stationsdurchschnitt abwichen.

Das Fruchtbarkeitsmonitoring beschreibt die Daten der stationseigenen Eber in Bezug auf die Non-Return-Rate und die Anzahl der lebend geborenen Ferkel in Relation zum Durchschnitt aller Eber der Station. Die Non-Return-Rate errechnet sich aus allen Sauen, die bis zum 60. Tag nach der Belegung nicht umgerauscht haben und nicht gemerzt wurden und ist damit der Trächtigkeitsrate am Tag 60 p.i. vergleichbar. Für eine Auswertung der Daten eines Ebers müssen ca. 50 Belegungen bzw. Würfe vorliegen.

Die Auswertungszeiträume, die den Daten der Tab. 5 zugrunde liegen überschneiden sich nicht mit dem Zeitraum der in vitro-Versuche mit den Ejakulaten dieser fünf Eber (14. – 30.11.01). Die Station hat zunächst das Fruchtbarkeitsmonitoring ausgewertet und dann nachweislich subfertile Eber für den Versuch zur Verfügung gestellt.

Tab. 5 : Ergebnisse des Fruchtbarkeitmonitorings einer Besamungsstation für 5 Eber

Eber	*Auswertungs-zeitraum*	*Anzahl aus-wertbarer Belegungen*	*Abweichung Non-Return-Rate zum Durchschnitt*	*Anzahl aus-wertbarer Würfe*	*Abweichung leb. geb. Ferkel pro Wurf vom Durchschnitt*
36	22.03.00 - 30.08.01	92	- 17,00	56	- 0,13
37	01.01.98 - 30.08.01	125	- 7,87	101	+ 0,32
38	20.10.99 - 30.08.01	105	- 0,44	85	- 2,97
39	20.04.99 - 30.08.01	389	+ 3,13	335	- 1,31
40	22.06.99 - 30.08.01	120	+ 5,50	101	- 2,03

Tab. 6 beschreibt für diese fünf subfertilen Eber die Ergebnisse aller im Versuch erhobenen konventionellen und modernen spermatologischen Qualitätsparameter, sowie die Ergebnisse der beiden Bindungsassays. Dabei sind positive (⇑) und negative (⇓) Abweichungen zum Durchschnitt der gesamten Versuchseberpopulation gekennzeichnet.

Tab. 6 : Spermatologische Diagnostik bei subfertilen Ebern

Parameter	*Ebernummer*				
	36	*37*	*38*	*39*	*40*
Motilität vor Percoll [%]	83,3 ⇑	78,3	76,7	75,8	72,5
Motilität nach Percoll [%]	87,5 ⇑	79,2	77,5	81,7	70,0 ⇓
MAS [%]	29,0	42,0 ⇓	44,2 ⇓	40,8 ⇓	32,2
NAR [%]	91,3	92,7	86,7 ⇓	91,8	92,0
Plasmatr. [%]	4,2	20,5 ⇓	14,3	28,0 ⇓	18,2 ⇓
Andere [%]	16,2 ⇓	14,2 ⇓	16,5 ⇓	4,7	6,0
PI – positiv [%]	10,0 ⇑	10,3 ⇑	11,8	7,7 ⇑	9,3 ⇑
OEA [BI]	25,9	14,9 ⇓	14,5 ⇓	15,0 ⇓	16,7 ⇓
SBA [%]	10,4 ⇑	4,3	5,1	7,5	7,3

In der Tabelle sind die Werte für jeden Eber als Durchschnitt aller untersuchten Ejakulate und als Mittelwert beider Untersuchungszeitpunkte angegeben.

⇑ : Kennzeichnet ein Ergebnis, welches um mehr als eine Standardabweichung vom Mittelwert zugunsten der spermatologisch besseren Werte abweicht

⇓ : Kennzeichnet ein Ergebnis, welches um mehr als eine Standardabweichung vom Mittelwert zugunsten der spermatologisch schlechteren Werte abweicht

Von den 5 subfertilen Ebern mußten vier Eber (Nr. 37-40) nach den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Kriterien in die Gruppe der spermienmorphologisch auffälligen Tiere gruppiert werden. Bezüglich des spermatologischen Parameters der PI-Anfärbbarkeit zeigten vier Eber (36, 37, 39, 40) um mehr als eine Standardabweichnung bessere Werte als der Populationsdurchschnitt, d. h. die Spermien dieser Tiere waren weniger stark membranbeschädigt.

Der Bindungsindex des OEA wies für die Spermien von vier der fünf Eber (37-40) Werte auf, die mehr als eine Standardabweichung unter dem Durchschnittswert porciner Samenzellen der untersuchten Population lagen. Der Bindungsindex des Ebers 36 lag mit 25,9 gebundenen Spermien pro 0,01 mm² Explantfläche ungefähr im Bereich des Mittelwertes von 23,2.

Der Anteil prozentual im SBA gebundener Spermien zeigte für den Eber 36 ein um mehr als eine Standardabweichung besseres Bindungsniveau, die übrigen vier differierten nicht entscheidend von den 6,3 % gebundenen Spermien des Populationsmittels.

5 DISKUSSION

5.1 SPERMIENBINDUNGSFÄHIGKEIT IM OVIDUKT-EXPLANT-ASSAY

Seit dem Wissen um die Existenz eines Spermienreservoirs im Eileiter bei verschiedenen Säugetieren ist die Charakterisierung der Spermien-Eileiter-Bindung zunehmend in das Interesse internationaler reproduktionsmedizinischer Arbeitsgruppen gerückt. Während bei Mäusen (SUAREZ 1987) und Hamstern (SMITH u. YANAGIMACHI 1991) die anatomische Beschaffenheit des Eileiters eine direkte transilluminatorische Beobachtung der Spermienbindung erlaubt, bleibt das Studium der Spermien-Eileiter-Interaktion bei den meisten anderen Haussäugetierarten in vitro-Modellen vorbehalten. Neben der Verwendung von Oviduktepithelzellkulturen (OEC) hat sich der Ovidukt-Explant-Assay (OEA) als weiteres Modellsystem in den letzten 15 Jahren etabliert. Die Bedingungen des OEA können als eine Art Mittelweg zwischen der Situation in vivo und in vitro verstanden werden, da die aus den Oviduktepithellängsfalten gewonnenen Explante unmittelbar nach der Gewinnung aus Schlachtorganen ohne Kultivierung und damit einhergehender Entdifferenzierung des Gewebes verwendet werden. Mit Hilfe von Explanten konnten in der Vergangenheit weitreichende Erkenntnisse über die Beteiligung verschiedener Kohlenhydrate in der Spermien-Eileiter-Bindung, u.a. beim Hamster (DEMOTT et al. 1995), Rind (LEFEBVRE et al. 1995b, 1997) und Schwein (GREEN et al. 2001; WAGNER et al. 2002), gewonnen werden.

In der Arbeit von PETRUNKINA et al. (2001a) gibt es erstmals Hinweise auf quantitative Bindungsunterschiede im OEA zwischen Ebern in Abhängigkeit von morphologischen Spermienparametern. Daraus wurde die Bedeutung der Spermienbindung an das Eileiterepithel zur Selektion intakter, befruchtungskompetenter Spermien abgeleitet.

Diese lediglich an einer kleinen Tierzahl gewonnenen Zusammenhänge sollten an einer größeren Anzahl im Besamungseinsatz stehender Eber überprüft werden.
Besonderes Gewicht wurde auf den Bezug der Ergebnisse des Ovidukt-Explant-Assays zu konventionellen und modernen spermatologischen Parametern, sowie zu den Ergebnissen des DudFinder® Sperm-Binding Assays, einem kommerziellen Testsystem zur Ermittlung der Spermienbindungsfähigkeit an ein Substrat der perivitellinen Membran aus Hühnereiern, gelegt. Die Anwendung des in vitro-Modells OEA zur Untersuchung physiologischer fertilitätsrelevanter Zusammenhänge sollte durch Prüfung der Bindungsfähigkeit in Abhängigkeit der Lagerung flüssigkonservierten Eberspermas und exemplarisch für einige nachweislich subfertile Eber untersucht werden.

Die Bedeutung der Herkunft des Eileiters (Alt- / Jungsau, Zyklusstand, anatomische Lokalisation, etc.) und der Explantgröße für die Ergebnisse des Ovidukt-Explant-Assays werden in der Literatur kontrovers diskutiert (LEFEBVRE et al. 1995b; THOMAS et al. 1994a; SUAREZ et al. 1991; RAYCHOUDHURY u. SUAREZ 1991; RAYCHOUDHURY et al. 1993; WALTER u. BAVDEK 1997; DE PAUW et al. 2000). Um einen möglichen Eileitereinfluß zu minimieren, wurde in den eigenen Versuchen jede Samenprobe auf split-sample-Basis mit Explanten aus Eileitern von zwei verschiedenen Sauen untersucht.
Für 17 % der verwendeten Eileiterpaare konnte ein signifikanter Einfluß des Eileiters auf die Bindungsfähigkeit festgestellt werden, dessen Ursachen in der vorliegenden Studie nicht eindeutig geklärt werden können.
Der anatomische Ursprung der Explante ist verschiedentlich für Bindungsunterschiede verantwortlich gemacht worden. In einer Explantstudie mit equinen Spermien (THOMAS et al. 1994a) war der Anteil gebundener Spermien an Explanten aus der Isthmus-Region höher als an solchen, die aus der Ampullen-Region gewonnen wurden. Gleiche Zusammenhänge zeigten RAYCHOUDHURY und SUAREZ (1991) für die Bindung von Eberspermien an Oviduktepithelzellkulturen, während SUAREZ et al. (1991) in einer Explantstudie keinen Einfluß der Region der Entnahme auf die Anzahl gebundener porciner Samenzellen feststellen konnte. Durch die einheitliche

Gewinnung der Explante aus dem Eileiteristhmus sind regional bedingte Bindungsunterschiede in der eigenen Studie auszuschließen. Ebenso ist ein Einfluß des Zyklusstandes auf die Spermienbindung unwahrscheinlich, da fast ausschließlich Altsauen im Interöstrus als Spendertiere verwendet wurden. DE PAUW et al. (2000) zeigten eine signifikant negative Korrelation der Anzahl gebundener boviner Spermien zur Größe der Explante in einer Studie mit Oviduktepithelzellkulturen. Die Übertragbarkeit auf das Modell des porcinen Ovidukt-Explant-Assays ist zweifelhaft, denn die vesikelartig geformten bovinen Explante der Zellkulturen entstehen aus ausgestreiftem Zellmaterial von Isthmus und Ampulle und unterscheiden sich somit von porcinen Explanten. In der eigenen Studie konnten keine Korrelationen der Explantflächengröße mit dem Bindungsindex festgestellt werden. Darüber hinaus ergab sich auch an den Versuchstagen mit signifikantem Eileitereinfluß keine größere Differenz zwischen den Explanten der verwendeten Eileiter.

Die in den verschiedenen in vitro-Assays zum Studium der Spermien-Eileiter-Interaktion gezeigten Einflußfaktoren wie Zyklusstand des Spendertieres oder anatomische Lokalisation der Materialentnahme unterstreichen deren Bedeutung für die in vivo-Situation. Die vor allem von HUNTER (1995) und HUNTER et al. (1998) beschriebenen Zusammenhänge zwischen Ovulation und Spermienablösung vom Oviduktepithel weisen auf eine sensible Regulation der Spermien-Eileiter-Interaktion in vivo durch hormonelle Einflüsse, insbesondere durch zyklusabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung des Sekretes, sowie Veränderungen der Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur und andere lokale Mediatoren hin.

Mit dem OEA können keine Aussagen über die Aufrechterhaltung der Spermienvitalität, der Kapazitation oder über andere funktionelle Spermieneigenschaften getroffen werden. Aufgrund der von PETRUNKINA et al. (2001a) gezeigten linearen Abhängigkeit der Anzahl der inkubierten Samenzellen und der Anzahl der gebundenen Spermien ist der OEA als Modellsystem geeignet, die initiale Bindungsfähigkeit von Spermien an Oviduktepithel zu untersuchen. Mit der Untersuchung der Spermienbindung auf der Basis von zwei verschiedenen Eileitern ist versucht worden, den möglichen Einflußfaktor der Herkunft des Eileiters zu minimieren und dadurch die Repräsentativität der Ergebnisse zu steigern.

Abweichend von der bei PETRUNKINA et al. (2001a) beschriebenen Methodik wurden in der eigenen Studie motile, gewaschene Spermien durch die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation anstelle der „swim up-Methode“ separiert.
Beide Methoden sind in der Literatur eingehend beschrieben worden und dementsprechend anerkannt. Sie unterscheiden sich in Bezug auf Temperatur und Dauer des Separationsvorganges; beides kann prinzipiell den Kapazitationszustand der separierten Spermienpopulation beeinflussen. Der 60-minütige Aufenthalt im 39°C temperierten Wasserbad während des „swim up-Prozesses“ stellt kapazitationsfördernde Bedingungen dar, die während der 30-minütigen Zentrifugation bei 20°C mit Percoll eingeschränkt werden können. Der Begriff „Kapazitation“ bezeichnet eine Abfolge von Zell- und Membranveränderungen, die ein Spermatozoon aktivieren und nachfolgend die Akrosomreaktion ermöglichen (AUSTIN u. CHANG 1952). In bisherigen Studien konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass kapazitierte Spermien ein vermindertes Bindungspotential an Eileiterepithel besitzen (LEFEBVRE u. SUAREZ 1996; FAZELI et al. 1999). HUNTER (1995) wies zum Zeitpunkt der Ovulation bei den an Epithelzellen des Ovidukts gebundenen Spermien verschiedene Membranveränderungen nach, die im Sinne der Kapazitation gedeutet werden konnten und machte dieses für die Ablösung der Spermien verantwortlich.
Im Hinblick auf diese Ergebnisse wurde für die vorliegende Arbeit die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation angewendet, um eine eventuell auf Kapazitationsprozesse zurückzuführende verminderte Spermienbindung minimieren zu können.

Bei der Interpretation der Zusammenhänge zwischen Spermaqualität und Bindungsfähigkeit in vitro ist daher zu beachten, dass eine selektierte Spermienpopulation mit den Explanten (OEA) oder dem Substrat (SBA) koinkubiert wurde, die sich qualitativ von der Spermienpopulation der Ausgangsprobe unterschieden hat. Diese Unterschiede betreffen vorrangig die Motilität. Damit geht dieses Ergebnis mit vielen vorherigen Percoll-Beschreibungen konform, einschließlich der Studie von GRANT et al. (1994) über porcine Spermien.
Die signifikant positive Korrelation zwischen Motilität und Bindungsindex ist in dieser Studie insofern beachtlich, als dass die Motilität bei allen Percoll-zentrifugierten

Spermienpopulationen in einem engen, hohen Bereich zwischen 70 und 90 % lag. Zudem ist in dem in vitro-System des Ovidukt-Explant-Assays eine hohe Motilität nicht zwangsläufig von Vorteil, da die Inkubation von Spermien und Explanten in einem kleinen Tropfen erfolgt und im Gegensatz zur in vivo-Situation die Spermien keine physiko-chemischen Barrieren zu überwinden haben. Es ist daher anzunehmen, dass nicht die Motilität per se für eine höhere Bindungsfähigkeit verantwortlich ist, sondern sie einen Indikator für eine vitale und bindungsfähige Spermienpopulation darstellt.

Die nachgewiesene Korrelation bezieht sich auf die Motilität von durch Percoll zentrifugierten Spermien und nicht auf die Motilität der Ausgangsejakulate. Dieses Ergebnis stellt einen Gegensatz zur Studie von PETRUNKINA et al. (2001a) dar, die auf der Grundlage einer kleinen Eberanzahl (n = 5) weder eine Korrelation der nativen Motilität noch der Motilität nach „swim up“ beschreibt. Durch die ausschließliche Verwendung von Ausgangsejakulaten mit Motilitätswerten ≥ 70 % wurde bereits grundsätzlich eine hohe Motilität der Samenzellen gewährleistet, die in unterschiedlichem Maße durch die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation zu steigern war.

Bezüglich der weiteren untersuchten morphologischen Qualitätsparameter konnten, mit Ausnahme des Parameters „Andere morphologische Abweichungen“, der fast ausschließlich schleifenförmig veränderte Spermien beschrieb, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spermienpopulationen vor und nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation ermittelt werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von HARRISON et al. (1982) unterschied sich damit in der eigenen Arbeit der Prozentsatz von Spermien mit Plasmatropfen vor und nach Percoll-Zentrifugation nicht, so dass die nachgewiesene Korrelation zwischen Bindungskapazität der Spermien im OEA und dem Prozentsatz morphologisch abweichender Formen vorrangig dem Plasmatropfenanteil zugeschrieben werden konnte.

Die vorliegende Studie bestätigt an einer größeren Besamungseberpopulation die Beobachtungen von PETRUNKINA et al. (2001a), dass Ejakulate mit einem erhöhten Prozentsatz an Plasmatropfen eine verminderte Bindungsfähigkeit an das Oviduktepithel in vitro haben. Im Videoimaging zeigte sich prinzipiell eine existierende Bindung von plasmatropfenbehafteten Samenzellen an die Oviduktexplante. Diese rein

deskriptive Feststellung konnte allerdings nicht quantifiziert werden. Es ist derzeit nicht klar, ob und in welchem Umfang Spermien mit Plasmatropfen unter in vivo-Bedingungen in den Eileiter gelangen und an der Formierung des Spermienreservoirs beteiligt sind. HUNTER et al. (1991) untersuchten elektronenmikroskopisch die Morphologie boviner Spermatozoen im unteren Eileiter und entdeckten keine abnormalen Formen, ohne jedoch eine Aussage über Plasmatropfen zu treffen. Die bereits sehr lange bekannten Plasmatropfen (RETZIUS 1909) gelten als klassisches Kennzeichen einer Reifungsstörung von Spermien mit begrenzter fertilitätsprognostischer Bedeutung beim Eber (KAPLAN 1984). Besamungsstudien lassen allerdings den Schluß zu, dass ein Anteil > 15 % von Spermien mit Plasmatropfen mit einer Fertilitätsminderung einhergeht (WABERSKI et al. 1994). Die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Plasmatropfen offensichtlich mit einer herabgesetzten Bindungsfähigkeit porciner Samenzellen an das Oviduktepithel einhergehen und dass der Anteil von Spermien mit Plasmatropfen eine Indikatorfunktion für das gesamte Ejakulat besitzt.
Die Abhängigkeit der Anzahl im OEA gebundene Spermien zum Anteil der Spermien mit Plasmatropfen und zur Gesamtzahl morphologisch abweichender Spermien (MAS) unterstreicht die Ergebnisse von PETRUNKINA et al. (2001a) und steht im Einklang mit Arbeiten über bovine (HUNTER et al. 1991) und equine Spermien (THOMAS et al. 1994b; THOMAS u. BALL 1996). Diese negative Korrelation morphologischer Abweichungen mit der Anzahl im OEA gebundener Spermien läßt den Schluß zu, dass morphologische Veränderungen die Spermienbindungsfähigkeit an Oviduktepithel einschränken. Grundsätzlich sprechen diese Beobachtungen damit für eine Selektionsfunktion des Eileiters in Bezug auf morphologisch und funktionell intakte Samenzellen.

Bezüglich der Selektionsfähigkeit des Eileiters für membraninstabile Samenzellen geben die eigenen Ergebnisse keine ausreichende Auskunft. Die fehlende Korrelation des Bindungsindex zur Anzahl PI-positiver Spermien, die unabhängig vom Einfluß der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation betrachtet werden kann, da diese Färbung nur nach dem Separationsvorgang erfolgte, zeigte, dass die Anzahl membrange-

schädigter Spermien keinen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit der Spermienpopulation hatte. Dieses Ergebnis ist insofern verwunderlich, als dass die Bindungstellen für die Spermien-Eileiter-Bindung auf der Spermienmembran vermutet werden und demnach membranbeschädigte Spermien nicht mehr bindungsfähig sein dürften. Zwei Studien mit porcinen (MBURU et al. 1996) und humanen (ELLINGTON et al. 1999) Eileitern haben gebundene und abgelöste Spermien mit nicht-bindungsfähigen Samenzellen der gleichen Ausgangspopulation verglichen und deutlich höhere Anteile membrandefekter Samenzellen im ungebundenen Teil gefunden, allerdings wurden auch in der zuvor gebundenen Population membrandefekte Spermien nachgewiesen und damit die grundsätzliche Bindungsfähigkeit membraninstabiler Spermien gezeigt.
Eine mögliche Erklärung der fehlenden Korrelation zwischen PI-Färbung und dem Prozentsatz gebundener Spermien könnte darin zu sehen sein, dass der Membrandefekt ein kompensierbarer Mangel ist, der durch andere spermatologische Kriterien wie Motilität und Morphologie überlagert wird. Für Membranschädigungen, die generell als gleichbedeutend mit dem Tod der gefärbten Samenzelle eingeschätzt werden, würde dieses bedeuten, dass die PI-Färbung nicht als Indikator einer ungenügenden Bindungsfähigkeit am Oviduktepithel dienen kann.
Betrachtet man dieses Ergebnis allerdings mehr von einer methodischen Perspektive aus, könnte eine andere Ursache für dieses relativ unerwartete Ergebnis in der unzureichenden Genauigkeit der PI-Färbung liegen, die durch die manuelle Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop sicherlich noch gesteigert werden dürfte.

Eine morphologisch einwandfreie Samenzellpopulation ist Grundlage für eine numerisch hohe Bindung porciner Samenzellen im OEA. Damit kann der OEA als Assay betrachtet werden, der nicht nur die Spermien-Explant-Bindungsfähigkeit untersucht, sondern gleichzeitig morphologisch intakte Spermatozoen rekrutiert. Der OEA besitzt dadurch in der Betrachtungsweise von AMANN und HAMMERSTEDT (1993) bzw. HAMMERSTEDT (1996) eine Schlüsselfunktion. Er testet eine einzelne funktionelle Fähigkeit der Spermien, schließt damit aber indirekt die Diagnostik morphologischer Defekte ein. Solche Testsysteme sind besonders geeignet, das grundlegende Ziel

der andrologischen Diagnostik, die Vorhersage der Fruchtbarkeit eines Individuums zu erreichen (AMANN u. HAMMERSTEDT 1993). In umfangreichen Veröffentlichungen haben beide Autoren außerdem darauf hingewiesen, dass das Ziel der Fertilitätsprognostik mit spermatologischen Testsystemen auf die Erkennung subfertiler Vatertiere präzisiert werden sollte. Dieses Ziel kann allerdings nur unter Verwendung sogenannter „robuster“ Fertilitätsdaten erreicht werden.

Die für den eigenen Versuch vorliegenden Fertilitätsdaten aus dem Fruchtbarkeitsmonitoring einer Besamungsstation können in diesem Sinn nicht als robust bezeichnet werden. Sie lassen aber zumindest Tendenzen bei fünf nachweislich subfertilen Ebern erkennen. Interessanterweise zeigten vier der fünf Eber ein Spermienbindungsniveau im OEA, welches um mehr als eine Standardabweichung unter dem durchschnittlichen Bindungsindex der untersuchten Eberpopulation lag. Dieses Ergebnis unterstützt damit die diagnostische Aussagekraft des Assays. Von einem physiologischen Standpunkt aus scheint die Subfertilität dieser Tiere in der geminderten Fähigkeit zur Formierung des Spermienreservoirs begründet, so dass weniger befruchtungskompetente Samenzellen für die ovulierten Eizellen zur Verfügung stehen.

Eine Ausnahme stellt der Eber 36 dar. In diesem Fall konnte kein vermindertes Spermienbindungsniveau festgestellt werden, so dass eine Klassifizierung als subfertiler Eber allein mit den Ergebnissen des OEA nicht möglich ist. Der Eber 36 wurde mit 29 % morphologisch abweichenden Spermien zwar nicht in die Gruppe der morphologisch auffälligen Eber eingeordnet, aber die Ejakulate zeigten einen hohen Anteil von schleifenförmig veränderten Samenzellen. Diese Veränderungen wurden durch die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation signifikant verringert. Vermutlich waren die Ergebnisse des OEA aus diesem Grund unauffällig. Nimmt man diese Tatsache als Anlaß zur kritischen Überprüfung der Spermienselektion mit Percoll, so wäre es durchaus denkbar, ohne einen Selektionsprozess vermeindlich bessere Ergebnisse bezüglich der Erkennung subfertiler Individuen erhalten zu können. Auf die Spermienselektion in einem in vitro Test zu verzichten ist allerdings gleichbedeutend mit einer weiteren Entfernung von der Situation in vivo, wo eine Selektion der inseminierten Samenportion auf jeden Fall stattfindet. Der ursprüngliche Gedanke der

eigenen Versuchsanordnung war es, mit einem in vitro Testsystem theoretisch eine möglichst nahe in vivo Vergleichbarkeit zu erreichen. Als zweiter Schritt folgte dann die Betrachtung der Ergebnisse für eine eventuelle Fertilitätsdiagnostik. Der OEA ist nicht als absolutes Fertilitätskriterium zu verstehen, denn dafür ist dieser Vorgang zu komplex und immer noch zu unverstanden, er ist aber durchaus geeignet einen Teil des gesamten Puzzels repräsentativ wiederzugeben. Dass der nachweislich subfertile Eber 36 nicht als solcher erkannt wurde, ist mit den fast 30 % schleifenförmig veränderten Spermien zu erklären, die in vivo bereits vor der Eileiterbindung aufgrund der stark eingeschränkten Eigenmotilität zu einer starken Reduzierung der bindungsfähigen Population führen werden. Die Inkubation der Spermien und Explante in einem kleinen Tropfen während der Durchführung des OEA erfordert für die Bindung nicht zwangsläufig eine Eigenmotilität der Spermatozoen, hier ist allein die potentielle Bindungsfähigkeit entscheidend und nur diese wird getestet.

Mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit wird erstens die Indikatorfunktion der Spermienmorphologie für die Befruchtungskompetenz des gesamten Ejakulates und die Bedeutung der Einhaltung von bisher beschriebenen Grenzwerten unterstrichen. Zweitens manifestieren die Ergebnisse die Funktion des Eileiters zur Selektion befruchtungskompetenter Spermien. Wird der mittlere Bindungsindex der in der eigenen Arbeit untersuchten Eberpopulation minus einer Standardabweichung als eine Art Cut-off-Level betrachtet, würden acht der 44 Testeber als auffällig eingestuft werden. Sechs dieser acht Eber mit reduziertem Bindungsindex sind aus der Gruppe der morphologisch auffälligen Eber, so dass der Verdacht nahe liegt, dass sie subfertil sind. Bei zwei (Nummer 32 und 44) dieser acht Eber, sind die Ursachen für die verminderte Eileiterbindungsfähigkeit weder in der Motilität noch in der Morphologie zu vermuten. Damit gewinnt der OEA ein hohes diagnostisches Potential, da er offensichtlich über die klassische Spermatologie hinausgehende Informationen über die Spermaqualität liefert. Leider konnten von den betreffenden Stationen für diese beiden Eber keine aussagefähigen Fertilitätsdaten bezogen werden, die diese Vermutung verifizieren könnte.

Einschränkend ist anzumerken, dass der vergleichsweise hohe Aufwand des Ovidukt-Explant-Assays einen Einsatz in der spermatologischen Routinediagnostik in der derzeitigen Form unwahrscheinlich macht, möglicherweise aber in speziellen Fällen der idiopathischen Sub- oder Infertilität eine aufschlußreiche weiterführende Methode ist.

Die Sensitivität und die Fertilitätsrelevanz des Ovidukt-Explant-Assays zeigt sich insbesondere durch die Abnahme des Bindungsindex während einer dreitägigen Konservierung des flüssigverdünnten Ebersamens.
Verschiedene Autoren beschreiben eine signifikante Abnahme der Befruchtungsleistung flüssigkonservierter und länger als 48 Stunden gelagerter Eberspermien (JOHNSON et al. 1982; WABERSKI et al. 1994). Diese Abnahme der Befruchtungsleistung ist eberindividuell verschieden und läßt sich bislang nicht zufriedenstellend durch Veränderungen der konservativen spermatologischen Parameter erklären. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung einer um im Mittel 25 % reduzierten Spermienbindungsfähigkeit im OEA bei 72 Stunden gelagerten im Vergleich zu 24 Stunden konservierten Ejakulaten. Ähnlich wie von in vivo-Befruchtungsergebnissen mit langzeitkonserviertem Ebersperma bekannt, waren auch im OEA große individuelle Eberunterschiede hinsichtlich der Bindungsfähigkeit an das Eileiterepithel in vitro festzustellen.
Diese Beobachtungen geben Hinweise auf den möglichen Grund für die lagerungsbedingte Abnahme der Befruchtungsleistung von flüssigkonserviertem Ebersperma. Aufgrund der verminderten Fähigkeit porciner Samenzellen an Oviduktepithel zu binden, rekrutieren mehr als 48 Stunden gelagerte Ejakulate bei unveränderter Inseminationsdosis eine kleinere Population befruchtungskompetenter Spermien im kaudalen Isthmus des Eileiters. Für das polyovulatorische Schwein könnte dieses zu einer abnehmenden Befruchtungswahrscheinlichkeit aller ovulierten Oozyten und zu einer nachfolgend kleineren Abferkelrate und/oder Wurfgröße führen. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass die Abnahme der Befruchtungsleistung über 48 Stunden gelagerter Eberejakulate durch Steigerung der Inseminationsdosis vermieden bzw. abgeschwächt werden kann (JOHNSON et al. 1988).

Die individuell unterschiedliche Abnahme des Bindungsindex während der Lagerung erklärt sich auch durch die Beobachtung, dass Spermien aus morphologisch auffälligen Ejakulaten und mit einem vergleichsweise niedrigen Bindungsniveau nach 24-stündiger Lagerung keine weitere lagerungsabhängige Reduzierung der Bindungsfähigkeit aufwiesen. Die Bedingung für eine Verringerung der Bindungsfähigkeit schien also eine hohe initiale Spermien-Ovidukt-Bindung zu sein. Demnach wäre die graphische Darstellung der lagerungsabhängigen abnehmenden Bindungsfähigkeit bei Ebern mit bereits niedrigen Bindungseigenschaften frischer Samenzellen nicht linear, sondern wahrscheinlich eine exponentiell fallende Kurve, die sich asymptotisch einem unteren Schwellenwert annähert.
Nachfolgend werden zwei denkbare Theorien für eine lagerungsbedingte Abnahme der Bindungsfähigkeit porciner Spermien an das Oviduktepithel angeführt :

- Verschiebungen in der Zusammensetzung der Fettsäuren in der Plasmamembran: CEROLINI et al. (2000) konnten in einer Studie über den Nutzen des Antioxidants α -Tocopherol als Bestandteil eines Verdünnermediums Veränderungen des Fettsäuremusters der Spermienmembran während der Lagerung feststellen. Beginnend ab einer Lagerungsdauer von etwa 48 Stunden wurde eine signifikante Abnahme mehrfach ungesättigter Fettsäuren zugunsten gesättigter Fettsäuren nachgewiesen. Diese Lipidperoxidation durch freie Sauerstoffradikale ist ein unvermeidbarer Vorgang des physiologischen Metabolismus einer Zelle. Durch die Veränderungen des Fettsäuremusters kann es zu Beschädigungen der porcinen Plasmamembran kommen und einem damit verbundenen Verlust bzw. einer Inaktivierung der Bindungsstellen auf der äußeren Spermienmembran.
- Unterschiedliche Verteilung bestimmter Seminalplasmaproteine in Abhängigkeit zur morphologischen Qualität eines Eberejakulates: Die Bindung porciner Spermien an Oviduktepithelien wird wahrscheinlich durch eine Lektin-Kohlenhydrat-Bindung vermittelt. Diese Lektine werden beim Schwein durch bestimmte Seminalplasmaproteine (z.B. AQN-1) repräsentiert, die ähnlich einem Mantel die äußere Spermienmembran umhüllen und während des Kapazitationsvorganges entfernt werden (TÖPFER-PETERSEN 1999; JANSEN et al. 2001). Denkbar wäre

eine zunehmende Inaktivierung dieser Proteine während der Lagerung und ein damit verbundener Verlust der Bindungsfähigkeit. Die stärkere Abnahme der Bindungsfähigkeit für Spermien aus morphologisch unauffälligen Ejakulaten könnte mit einem höheren Gehalt dieser Proteine im Seminalplasma solcher Ejakulate bzw. mit einem höheren Proteingehalt der Spermien aus unauffälligen Ejakulaten erklärt werden, deren Inaktivierung aufgrund der größeren Ausgangskonzentration schneller erfolgt als die Inaktivierung von geringeren Proteinausgangskonzentrationen in spermienmorphologisch auffälligen Ejakulaten, deren Abbau eher einer Gleichgewichtsreaktion entsprechen würde. Diese Ansicht wird unterstützt durch eine nachgewiesene Beziehung zwischen der Menge zweier sogenannter „High fertility proteins“ im porcinen Seminalplasma und dem Anteil der Nachkommen dieser Eber in heterospermen Besamungsversuchen (FLOWERS 1998).

Neben diesen voneinander unabhängigen Theorien wäre auch ein Zusammenspiel von beiden Ansätzen denkbar.

5.2 Spermienbindungsfähigkeit im DudFinder® Sperm-Binding Assay

Mit dem DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA) stand ein zweites Testsystem zur Überprüfung der Spermienbindungsfähigkeit zur Verfügung. Bei diesem kommerziell verfügbaren Assay wird die Bindung von Spermien an ein Peptid aus dem Extrakt der perivitellinen Membran von Hühnereiern getestet. Dieses Peptid hat bestimmte substantielle Homologien zur Zona pellucida von Säugetieren.
Es konnten keine Beziehungen der SBA-Ergebnisse zu anderen konventionellen und modernen spermatologischen Parametern erzielt werden, was nicht zwangsläufig eine negative Bewertung des SBA als spermatologisches Testsystem impliziert. Der Nutzen neuer spermatologischer Diagnostika definiert sich unter anderem darin, dass sie neue Informationen liefern, die über die Aussagen bestehender Informationen hinausgehen.

Auffällig war jedoch, dass keiner der spermatologischen Parameter, einschließlich des Ovidukt-Explant-Assays, in signifikanter Beziehung zum SBA stand. Unter dem gleichen Gesichtspunkt ist auch der Einfluß einer zunehmenden Lagerungsdauer auf das Bindungsverhalten im SBA zu sehen. Es wird eine signifikante Abnahme der Bindungsfähigkeit porciner Spermien im SBA zwischen 24- und 72-stündiger Lagerungsdauer angegeben. Diese beschreibt aber lediglich einen Zahlenwert von 0,4 % (von 6,6 % auf 6,2 %) und scheint biologisch nicht relevant. Auch der Vergleich der Bindungswerte zwischen den Ebern läßt keinen Lagerungseinfluß erkennen, denn mit 39 der 44 untersuchten Eber zeigten fast 90 % bei zunehmender Lagerungsdauer keine unterschiedliche Spermienbindung im SBA.
Mit Mittelwerten von ca. 6 % gebundener Spermien liegt die absolute Anzahl der gebundenen Spermien auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau, welches möglicherweise vorhandene Unterschiede nur eingeschränkt sichtbar lassen werden kann. Im Vergleich dazu binden im OEA, der zweifelsfrei aufwendiger in der Durchführung, aber der physiologischen Situation im Eileiter vergleichbar ist, durchschnittlich 35 % der inkubierten Spermienpopulation. Die relativ geringe Spermienbindung im SBA könnte eventuell in Zusammenhang mit der 18-stündigen Erwärmung bei 60 °C vor dem Versand stehen (s. 3.2.5). Die Erfahrung der Firma BioPore, Inc. mit der Auswertung dieses Assays machen diese Annahme allerdings sehr unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass nicht einer der fünf nachweislich subfertilen Eber im SBA unterdurchschnittlich abgeschnitten hat – im Gegenteil, Eber 36 zeigte sogar eine um mehr als eine Standardabweichung bessere Spermienbindung - läßt jedoch Zweifel über die Eignung dieses Testsystems aufkommen, bei Ebern sog. *Duds* (engl.: „Versager“) ausfindig machen zu können. Hierzu sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl zuverlässiger Fertilitätsdaten notwendig.
In der Literatur finden sich bisher zwei Studien, die eine mögliche Identifizierung potentiell subfertiler Vatertiere mit Hilfe des Sperm-Binding Assays für Hähne (BRABATO et al. 1998) und Truthähne (GILL et al. 1999) beschreiben. In beiden Arbeiten sind qualitativ hochwertige Fertilitätsdaten verwendet worden, die geeignet scheinen, die beschriebenen Ergebnisse zu verifizieren. Die Übertragbarkeit dieser

Annahme auf Säugetierspezies scheint allerdings nicht ohne weiteres möglich, zumal der Mechanismus der Spermienbindung an das im SBA vorgelegte Substrat noch nicht bekannt ist. Trotz der substantiellen Homologie zur Zona pellucida von Säugetieren vermuten sowohl BRABATO et al. (1998) als auch AMANN et al. (1999a) eine Bindung , die durch ein Protein vermittelt wird, welches in der Literatur als Prosaposin (HAMMERSTEDT et al. 1997) bzw. SPG-1 (KISHIMOTO et al. 1992) beschrieben ist. Das speziesübergreifende Vorkommen einer homologen 10-Aminosäuresequenz dieses Proteins im Reproduktionstrakt von Hähnen, Ratten, Mäusen und Männern scheint auf die Bedeutung von SPG-1 für das Fortpflanzungsgeschehen hinzuweisen. Eine Reihe von Autoren (BRABATO et al. 1998; AMANN et al. 1999a, 1999b, 1999c) haben nachfolgend den Umkehrschluß vollzogen, dass dieses Protein ebenso in die Spermien-Eizellbindung der Säugetiere involviert ist. Sie wurden möglicherweise durch SBA-Ergebnisse mit Säugetierspermien bestätigt:
Der Zusatz dieses Proteins zu bovinen und humanen Samen resultierte in einer signifikant höheren Bindungsfähigkeit im SBA (AMANN et al. 1999a) und bei zwei von drei Bullen konnte eine Fertilitätssteigerung beobachtet werden (AMANN et al. 1999b).
Über die Bindung porciner Spermien im SBA beschreiben AMANN et al. (1999a) uneinheitliche Ergebnisse, die nicht direkt auf den Nutzen des Prosaposins schließen lassen. Die für andere Spezies vermuteten Bindungsmechanismen im SBA scheinen zumindest für Eberspermien dementsprechend nicht übertragbar zu sein.

Der SBA scheint damit beim Schwein keinen Vorteil gegenüber Zona- oder Hemizonabindungsassays zu besitzen, die sich – obwohl sie physiologisch näher an der in vivo-Situation sind - ebenfalls als unzureichend für eine zuverlässige Fertilitätsprognose zur Identifizierung subfertiler Vatertiere erwiesen haben (BERGER et al. 1996; HARRISON 1997; MENDOCA FEREIRRA 1998).

5.3 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Bindung von porcinen Spermien an das Oviduktepithel erfolgt selektiv und ist eine eberspezifische Eigenschaft, die in engem Zusammenhang mit der morphologischen Beschaffenheit der Samenzellen steht. Jedoch können auch Spermien aus morphologisch unauffälligen Ejakulaten herabgesetzte Bindungseigenschaften aufweisen, so dass der OEA trotz eines hohen methodischen Aufwandes, als nützlicher Test für die andrologische Diagnostik bewertet werden kann.

Die bei zunehmender Lagerungsdauer eberindividuell abnehmende Bindungsfähigkeit kann als ein Grund für eine lagerungsbedingt abnehmende Befruchtungsleistung betrachtet werden, dessen molekulare Ursachen noch nicht bekannt sind.

Um gesicherte Aussagen über die Validität des OEA als diagnostischen Assay machen zu können, müßten weitere Studien folgen, die insbesondere darauf zielen „robuste“ Fertilitätsdaten zu erheben.

Die Aussagefähigkeit von Ergebnissen des Sperm-Binding Assays ist unsicher. Wahrscheinlich wird die Spermienbindungsfähigkeit mehr von nicht-spermienassoziierten Faktoren beeinflußt, als dass ein bestimmtes Spermienfunktionsmerkmal wiedergegeben wird. Auch hier ist eine Absicherung durch zuverlässige Fertilitätsdaten notwendig.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Frank Karl Magnus

Untersuchung der in vitro Bindungsfähigkeit porciner Spermien im Oviduk-Explant-Assay und im DudFinder® Sperm-Binding Assay und deren Beziehung zu spermatologischen Qualitätsparametern

Ziel dieser Arbeit war es, das Bindungsverhalten porciner Spermien im Oviduk-Explant-Assay (OEA) und im DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA) in Relation zu konventionellen spermatologischen Qualitätsparametern und zur Lagerungsdauer flüssigkonservierten Samens zu untersuchen.

116 verdünnte Samenproben von 44 verschiedenen Ebern aus vier verschieden Besamungsstationen wurden nach 24- und nach 72-stündiger Lagerungsdauer untersucht. Es wurde eine konventionelle spermatologische Untersuchung von Motilität und morphologisch abweichenden Samenzellen sowie eine Vitalitätsuntersuchung (PI-Färbung) durchgeführt. Eine Selektion motiler Spermien erfolgte mit der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Die Bindungsfähigkeit der Spermien wurde auf split-sample-Basis im OEA an 124 frischen, aus Schlachtorganen von Altsauen gewonnenen Eileiterepithelexplanten, sowie im kommerziellen SBA an ein Proteinsubstrat aus der perivitellinen Membran von Hühnereiern untersucht. Für fünf nachweislich subfertile Eber wurde die Beziehung zwischen Befruchtungsleistung und der Spermienbindungsfähigkeit in vitro ermittelt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Die Motilität der Spermien lag bei allen Ebern mit ≥ 70 % über den Mindestanforderungen. Hinsichtlich der Spermienmorphologie und hinsichtlich der Plasmatropfen als häufigste morphologische Abweichung wurden morphologisch auffällige Eber (Gesamtzahl morphologisch abweichender Spermien ≥ 30 % und / oder Spermien mit

Plasmatropfen ≥ 15 %) und morphologisch unauffällige Eber (Gesamtzahl morphologisch abweichender Spermien ≤ 30 % und Spermien mit Plasmatropfen ≤ 15 %) klassifiziert.
Die Bindung porciner Spermien im OEA war für beide Untersuchungszeitpunkte zwischen den Ebern unterschiedlich und lag mit einer durchschnittlichen Abnahme des Bindungsindex von 25 % nach 72-stündiger Lagerungsdauer hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$) unter dem Niveau des 24 Stunden konservierten Samens. Der Bindungsindex im OEA korrelierte lagerungsunabhängig hochsignifikant negativ mit morphologischen Parametern, d.h. mit der Gesamtzahl morphologisch abweichender Formen ($R = -0{,}52$; $p \leq 0{,}001$) und mit dem Prozentsatz der Spermien mit Plasmatropfen ($R = -0{,}52$; $p \leq 0{,}001$) und signifikant positiv zur Motilität der durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation selektierten Samenzellen ($R = 0{,}45$; $p \leq 0{,}05$). Zur Motilität der unbehandelten Spermien, zum Vitalitätsparameter nach Propidiumiodidfärbung und zur Stabilität der Spermienchromatinstruktur ergaben sich keine signifikanten Korrelationen.
Die Spermienbindungsfähigkeit im SBA nahm zwischen 24- und 72-stündiger Lagerungsdauer von 6,6 % auf 6,2 % gebundene Spermien signifikant ab ($p \leq 0{,}05$). Es waren keine Korrelationen zu anderen spermatologischen Parametern einschließlich des Ovidukt-Explant-Assays festzustellen.
Fünf subfertile Eber hatten spermienmorphologisch auffällige Ejakulate. Spermien aus Ejakulaten von vier der fünf Eber wiesen eine gegenüber dem Populationsdurchschnitt um mehr als eine Standardabweichung niedrigere Bindungsfähigkeit im OEA auf, während der Samen von keinem dieser Eber eine verminderte Spermienbindung im SBA zeigte.

Anhand dieser Ergebnisse wird geschlußfolgert, dass der OEA geeignet ist, die eberspezifisch selektive Bindungseigenschaft porciner Spermien an das Oviduktepithel in vitro zu untersuchen, während die Aussagekraft des Sperm-Binding Assays fraglich erscheint.
Die molekulare Ursache abnehmender Oviduktbindung bei gelagerten Spermien bedarf weiterer Untersuchungen.

7 SUMMARY

Frank Karl Magnus

In vitro binding capacity of boar spermatozoa in relation to sperm quality parameters using the Oviduct-Explant-Assay and in the DudFinder® Sperm-Binding Assay

The objective of this study was to investigate the binding ability of porcine spermatozoa in the Oviduct-Explant-Assay (OEA) and in the DudFinder® Sperm-Binding Assay (SBA) in relation to conventional parameters of sperm quality and in relation to storage time of liquid semen.

116 diluted semen samples of 44 boars from four different insemination centres were examined after 24 h and after 72 h of cold-storage. The conventional assessment of sperm motility, of morphological abnormal forms and of sperm viability (PI-staining) was performed in the diluted ejaculates. Motile spermatozoa were selected by Percoll gradient centrifugation. Binding of sperm was investigated using explants from 124 fallopian tubes of sows obtained at the local abattoir in the OEA and using heat-solubilized extract of perivitelline membranes from hens eggs in the commercial SBA on a split-sample-basis. The relation between sperm-binding ability in vitro and fertility was investigated in five boars proved as being subfertile.

Following results were achieved:

Sperm motility of all boars was ≥ 70 %. Concerning sperm morphology and cytoplasmic droplets as being the most frequent morphological abnormal form, boars were classified as being morphologically conspicuous (morphologically abnormal spermatozoa ≥ 30 % and / or spermatozoa with cytoplasmic droplets ≥ 15 %) or as being morphologically inconspicuous (morphologically abnormal spermatozoa ≤ 30 % and spermatozoa with cytoplasmic droplets ≤ 15 %).

At both times of investigation binding of porcine sperm in the OEA differed highly significant between boars ($p \leq 0{,}001$) and decreased highly significant during storage time ($p \leq 0{,}001$) about 25 %. Regardless of storage time the binding index showed a highly significant negative correlation with both the percentage of morphologically abnormal spermatozoa ($R = -0{,}52$; $p \leq 0{,}001$) and the percentage of spermatozoa with cytoplasmic droplets ($R = -0{,}52$; $p \leq 0{,}001$). There was also a significant positive correlation between the binding index and the motility of Percoll-selected sperm ($R = 0{,}45$; $p \leq 0{,}05$). No correlation was found between the binding index and either motility of untreated sperm or the viability after Propidiumiodid-staining or the stability of the sperm chromatin structure.

Sperm binding in the SBA decreased significantly ($p \leq 0{,}05$) from 6,6 % to 6,2 % bound sperm during storage of the extended semen. There were no correlations between % bound sperm in the SBA and any other parameter of sperm quality including the results of the OEA.

The ejaculates of five boars classified as being subfertile were morphologically conspicuous. Spermatozoa from the ejaculates of four out of five boars showed a binding index in the OEA more than one standard deviation lower than the mean of the investigated population while none of those boars had spermatozoa showing a diminished binding ability in the SBA.

It can be concluded that the OEA is an useful approach to investigate the boar specific and selective character of porcine sperm binding to oviductal epithelium in vitro. In contrast, the validity of the SBA must be considered as being questionable.

Further research activities in this field are mandatory and should focus on the molecular basis of the observed reduced binding ability of long-term stored boar spermatozoa to oviductal epithelium.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AMANN, R.P. (1989):
Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately ?
J.Androl. 10, 89-98

AMANN, R.P., u. R.H. HAMMERSTEDT (1993):
In vitro evaluation of sperm quality : an opinion.
J.Androl. 14, 397-406

AMANN, R.P., u. R.H. HAMMERSTEDT (2002):
Detection of differences in fertility.
J.Androl. 23, 317-325

AMANN, R.P., R.H. HAMMERSTEDT u. R.B. SHABANOWITZ (1999a):
Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate.
J.Androl. 20, 34-41

AMANN, R.P., G.E. SEIDEL, J.R. BRINK u. Z.A. BRINK (1999b):
Exposure of thawed frozen bull sperm to a synthetic peptide before Artificial Insemination increases fertility.
J.Androl. 20, 42-46

AMANN, R.P., R.B. SHABANOWITZ, G. HUZAR u. S.J. BRODER (1999c):
In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation.
J.Androl. 20, 648-654

AUSTIN, C.R., u. M.C. CHANG (1952):
The capacitation of the mammalian sperm.
Nature 107, 326-329

BAILLIE, H.S., A.A. PACEY, M.A. WARREN, I.W. SCUDAMORE u. C.L. BARRAT (1997):
Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla.
Hum.Reprod. 12, 1985-1992

BARBATO, G.F., P.G. CRAMER u. R.H. HAMMERSTEDT (1998):
A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males.
Biol.Reprod. 58, 686-699

BARRATT, C.L.R., u. D.P. HORNBY (1995):
Induction of the human acrosome reaction by rhuZP3.
In: P. FENICHEL u. J. PARINAUD (Eds): The Human Sperm Acrosome Reaction.
John Libbey Eurotext, Montrague, pp. 105-122

BARRATT, C.L.R., u. S.J. PUBLICOVER (2001):
Interaction between sperm and zona pellucida in male fertility.
Lancet 358, 1660-1662

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

BATTALIA, D.E., u. R. YANAGIMACHI (1979):
Enhanced and coordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period.
J.Reprod.Fertil. 56, 515-520

BERGER, T., A. DAVIS, N.J. WARDRIP u. L. HEDRICK (1989):
Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida.
J.Reprod.Fertil. 86, 559-565

BERGER, T., D.L. ANDERSON u. M.C.T. PENEDO (1996):
Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities.
Anim.Reprod.Sci. 44, 231-239

BLANDAU, R., u. P. GADDUM-ROSSE (1974):
Mechanism of sperm transport in pig oviducts.
Fertil.Steril. 25, 61-67

BLASE, N., A.R. FAZELI, E. TOPPER, M.M. BEVERS, H. WOELDERS, E. TÖPFER-PETERSEN u. B. COLENBRANDER (1997):
Inhibition of boar sperm binding to homologous zona pellucida by antibodies against ZP3α and ZP3β glycoproteins.
Reprod.Domest.Anim. 33, 21-25

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1980a):
Structure and Function of the Zona pellucida : identification and characterisation of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida.
Dev.Biol. 76, 185-202

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1980b):
Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm.
Cell 20, 873-882

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1983):
Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein.
Dev.Biol. 95, 317-324

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1986):
Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm.
J. Cell Biol. 102, 1363-1371

BLEIL, J.D., u. P.M. WASSARMAN (1988):
Galactose at the non-reducting terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity .
Proc.Natl. Acad. Sci.USA 85, 6778-6782

BUREAU, M., J.L.BAILEY u. M.-A. SIRARD (2002):
Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles in vitro.
J.Androl. 23, 188-193

BURKMAN, L.J., C.C. CODDINGTON, D.R. FRANKEN, T.F. KRUGER, Z. ROSENWAKS u. G.D. HODGEN (1988):
The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential.
Fertil.Steril. 49, 688-697

CALVETE, J.J., E. CARRERA, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):
Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics.
Biol.Chem. 377, 521-527

CEROLINI, S., A. MALDJIAN, P. SURAI u. R. NOBLE (2000):
Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage.
Anim.Reprod.Sci. 58, 99-111

CHIAN, R.C., K. NIWA u. K. OKUDA (1991):
In vitro penetration of zona pellucida of salt-stored bovine oocytes before and after maturation by frozen-thawed spermatozoa.
Theriogenology 36, 209-219

CHIAN, R.I.-C., S. LAPOINTE u. M.-A. SIRARD (1995):
Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct cell monolayer conditioned medium.
Mol.Reprod.Dev. 42, 318-324

DARSZON, A., A. LIEVANO u. C. BELTRAN (1996):
Ion channels: key elements in gamete signaling.
Curr. Topics Dev. Biol. 34, 117-167

DEMOTT, R.P., u. S.S. SUAREZ (1992):
Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct.
Biol.Reprod. 46, 779-785

DEMOTT, R.P., R. LEFEBVRE u. S.S. SUAREZ (1995):
Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium.
Biol.Reprod. 52, 1395-1403

DE PAUW, I., A. VAN SOOM, S. VERBERCKMOES, H. LAEVENS u. A. DE KRUIF (2000):
Binding of bovine spermatozoa depends on the size of the oviduct vesicles.
J.Reprod.Fertil.Suppl. 26, Abstract 68

DOBRINSKI, I., G.G. IGNOTZ, P.G.A. THOMAS u. B. A. BALL (1996a):
Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro.
Am.J.Vet.Res. 57, 1635-1639

DOBRINSKI, I., S. S. SUAREZ u. B. A. BALL (1996b):
Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelium cells in vitro.
Biol.Reprod. 54, 783-788

DOBRINSKI, I., T.T.SMITH, S.S. SUAREZ u. B. A. BALL (1997):
Membrane contact with oviductal epithelium modulates intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro.
Biol.Reprod. 56, 861-869

DUNBAR, B.S., u. D.J. WOLGEMUTH (1984):
Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix.
Mod.Cell.Biol. 3, 77-111

DUNBAR, B.S., S.V. PRASAD u. T. TIMMONS (1991):
Comperative mammalian zonae pellucidae.
In: B.S. DUNBAR u. M. O'RAND (Eds): Comperative Overview of Mammalian Fertilization.
Plenum Press, New York, pp. 97-114

DUNBAR, B.S., S. AVERY, V. LEE, S. PRASAD, D. SCHWAHN, E. SCHWOEBEL, S. SKINNER u. B. WILKINS (1994):
The mammalian zona pellucida: Its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and development expression.
Reprod.Fertil.Dev. 6, 331-347

EDENFELD, J., B. SCHÖPPER, R. STURM, K. DIEDRICH u. S. AL-HASANI (2002):
Application of a 1,48 µm diode laser for bisecting oocytes into two identical hemizonae for the hemizona assay.
Int.J.Androl. 25, 100-105

EINER-JENSON, N. (1992):
Counter current transfer between blood vessels in the ovarian adnexa.
ActaObstet.Gynecol.Scand. 71, 566-567

EISENBACH, M., u. I. TUR-KASPA (1999):
Do human eggs attract spermatozoa?
Bioessays 21, 203-213

ELLINGTON, J.E., D.P. EVENSON, R.W. WRIGHT, A.E. JONES, C.S. SCHNEIDER, G.A. HISS u. R.S. BRISBOIS (1999):
Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro.
Fertil.Steril. 71, 924-929

ENSSLIN, M., T. VOGEL, J.J. CALVETE, H.H. THOLE, J. SCHMIDTKE, T. MASUDA u. E. TÖPFER-PETERSEN (1998):
Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins.
Biol.Reprod. 58, 1057-1064

EVERT, M. (2002):
Einfluss eines Bindungspetids auf spermatologische Parameter in vitro und Befruchtungsergebnisse bei Jungsauen.
Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

FAZELI, A. R. (1996):
Clinical and physiological aspects of the sperm zona pellucida interaction.
Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, Diss.

FAZELI, A.R., C. HOLT, W. STEENWEG, M.M. BEVERS, W.V. HOLT u. B. COLENBRANDER (1995):
Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen.
Theriogenology 44, 17-27

FAZELI, A., A.E. DUNCAN, P.F. WATSON u. V.W. HOLT (1999):
Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species.
Biol.Reprod. 60, 879-886

FAMILIARI, G., S.A. NOTTOLA, G. MICARA, C. ARAGONA u. P.M. MOTTA (1988):
Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human in vitro fertilization.
J.In.Vitro.Fert.EmbryoTransfer 5, 134-143

FLECHON, J.E., u. R.H.F. HUNTER (1981):
Distribution of spermatozoa in the utertubal junction and isthmus of pigs and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study.
TissueCell 13, 127-139

FLORMAN, H.M., u. B.T. STOREY (1982):
Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro.
Dev. Biol. 91, 121-130

FLORMAN, H.M., u. P.M. WASSARMAN (1985):
O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity.
Cell 41, 313-324

FLOWERS, W.L. (1998):
Boar fertility and artificial insemination.
In: Proceedings of the 15th IPVS Conference, Birmingham, England, pp. 45-52

FRANKEN, D.R. (1998):
New aspects of sperm-zona pellucida binding.
Andrologia 30, 263-268

FRANKEN, D.R., A.A. ACOSTA, T.F. KRUGER, C.J. LOMBARD, S. OEHNINGER u. G.D. HODGEN (1993):
The hemizona assay: its role in identifying male factor infertility in assisted reproduction.
Fertil.Steril. 59, 1075-1080

FRANKEN, D.R., W.T. OOSTHUIZEN, S. COOPER, T.F. KRUGER, L.J. BURKMANN, C.C. CODDINGTON u. G.D. HODGEN (1991a):
Electron microscopic evidence on the acrosomal status of bound sperm and their penetration into human hemizionae pellucida after storage in a buffered salt solution.
Andrologia 23, 205-208

FRANKEN, D.R., S.C. OEHNINGER, C.C. CODDINGTON, T.F. KRUGER, L.J. BURKMANN, G.D. HODGEN u. W.T. OOSTHUIZEN (1991b):
Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellucidae and within semen samples from fertile males
Fertil.Steril. 56, 1156-1157

GABIUS, H.-J. (1997):
Animal Lectins.
Eur.J.Biochem. 243, 543-576

GEHLHAAR, R. (1999):
Etablierung eines porcinen Ovidukt-Explant-Assays zum Studium der Spermatozoen-Ovidukt-Interaktion.
Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

GENG, J.G., T.J. RAUB, C.A. BAKER, G.A. SAWADA, L.M.A. ELHAMMER u. A.P. ELHAMMER (1997):
Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oozytes and P-selectin on a acrosomal membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions.
J.Cell.Biol. 137, 743-754

GILL, S.P.S., A.M. DONOGHUE, D.R. HOLSBERGER, R.P. AMANN u. R.M. HULET (1999):
Identifying potentially subfertile toms via a sperm-binding assay.
Poult.Sci. 78, 1208-1218

GILL, S.P.S., A.M. DONOGHUE u. R.P. AMANN (2000):
Exposure of turkey sperm to a synthetic peptide before insemination increases fertility.
Poult.Sci. 79, 426-429

GOGOLOK, J., R. SCHUEMER u. G. STÖHLEIN (1992):
Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS.
Bd 1: Einführung in das Programmsystem, Datenmanagement und Auswertung.
Verlag Fischer, Stuttgart, Jena

GOLUBOFF, E.T., J.R. MERTZ, L.L. TRES u. A.L. KIERSZENBAUM (1995):
Galactosyl receptor in human testis and sperm is antigenically related to the minor C-type(Ca^{2+} -dependent) lectin variant of human and rat liver.
Mol.Reprod.Dev. 40, 460-466

GRANT, S.A., S.E. LONG u. T.J. PARKINSON (1994):
Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation.
J.Reprod.Fertil. 100, 477-483

GREEN, C.E., J. BREDL, W.V. HOLT, P.F. WATSON u. A. FAZELI (2001):
Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro.
Reproduction 122, 305-315

GUALTIERI, R., u. R. TALEVI (2000):
In vitro cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release.
Biol.Reprod. 62, 1754-1762

HAMMERSTEDT, R.H. (1996):
Evaluation of sperm quality: identification of subfertile male and course of action.
Anim.Reprod.Sci. 42, 77-87

HAMMERSTEDT, R.H., u. F.T. SCHULTZ (1994):
Long-duration semen holding: description, consequences and preparation for optimum use.
In: Proceedings of the 17th Annual Turkey Technical Conference; Renfrew, Scotland, UK., pp. 67-80

HAMMERSTEDT, R.H., P. CRAMER, G.F. BRABATO u. R.P. AMANN (1997):
A role for SGP-1 in binding of sperm to eggs.
J.Androl.Suppl. 18, 29 Abstract 20

HANCOCK, J.L. (1956):
The morphology of boar spermatozoa.
J.R.Micr.Soc. 76, 84-97

HARRIS, J.D., D.W. HIBLER, G.K. FONTENO, K.T. HSU, E.C. YUREWICZ u. A.G. SACCO (1994):
Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB, and ZPC gene families.
DNASeq 4, 361-393

HARRISON, R.A.P. (1997):
Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility.
J.Reprod.Fertil.Suppl. 52, 195-211

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

HARRISON, R.A., H.M. DOTT u. G.C. FOPSTER (1982):
Bovine serum albumin, sperm motility, and the „dilution effect“.
J.Exp.Zool. 222, 81-88

HENKEL, R., C. FINKENZELLER, T. MONSEES, D.R. FRANKEN, W.-B. SCHILL u. W. MISKA (2002):
Development of a new, highly sensitive zona pellucida binding assay using a bioluminescence-enhanced detection system.
Andrologia 33, 215-221

HOLT, C., W.V. HOLT, H.D. MOORE, H.B. REED u. R.M. CURNOCK (1997):
Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials.
J.Androl. 18, 312-323

HUNTER, R.H.F. (1980):
Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals.
Academic Press, New York

HUNTER, R.H.F. (1981):
Sperm transport and the reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation.
J.Reprod.Fertil. 63, 109-117

HUNTER, R.H.F. (1988):
The Fallopian Tubes: Their Role in Fertility and Infertility.
Springer-Verlag, New York

HUNTER, R.H.F. (1990):
Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro.
J.Reprod.Fertil.Suppl. 40, 211-226

HUNTER, R.H.F. (1995):
Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes.
In: H.M. CHARLTON (Ed.): Oxford Reviews of Reproductive Biology.
Oxford University Press, Bd. 17, pp. 85-124

HUNTER, R.H.F., u. J.P. HALL (1974):
Capacitation of boar spermatozoa: synergism between uterine and tubal environments.
J.Exp.Zool. 188, 203-214

HUNTER, R.H.F., u. R. NICHOL (1983):
Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus.
J.Exp.Zool. 228, 121-128

HUNTER, R.H.F., B. FLECHON u. J.E. FLECHON (1991):
Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study.
TissueCell 23, 641-656

HUNTER, R.H.F., W.T. HUANG u. W. HOLTZ (1998):
Regional influences of the Fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts.
J.Reprod.Fertil. 114, 17-23

IGNOTZ, G.G., M.C. LO, C.L. PEREZ, T.M. GWATHMEY u. S.S. SUAREZ (2001):
Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir.
Biol.Reprod. 64, 1806-1811

JANSEN, S., M. EKHLASI-HUNDRIESER u. E. TÖPFER-PETERSEN (2001):
Sperm adhesion molecules. Structure and function.
CellsTissuesOrgans 168, 82-92

JANUSKAUSKAS, A., A. JOHANNISSON, L. SÖDERQUIST u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2000):
Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull.
Theriogenology 53, 859-875

JOHNSON , L.A., J.G. AALBERS, C.M.T. WILLEMS, J.H.M. RADEMAKER u. C.E. REXROAD, Jr. (1982):
Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18 C.
J.Anim.Sci. 54, 132-136

JOHNSON, L.A., J.G. AALBERS u. H.J.G. GROOTEN (1988):
Artifical insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS) Modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection.
Zuchthygiene 23, 49-55

JOHNSTON, D.S., W.W. WRIGHT, J.H. SHAPER, C.H. HOKKE, D.H. VAN DEN WEIJDEN u. D.H. JOZIASSE (1998):
Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand.
J. Biol. Chem. 273, 1888-1895

KAPLAN, M., L.D. RUSSELL, R.N. PETERSON u. J. MARTAN (1984):
Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes.
Tissue and Cell 16, 455-468

KINLOCH, R.M., Y. SAKI u. P.M. WASSARMAN (1995):
Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site –directed mutagenesis.
Proc.Natl. Acad. Sci. USA 92, 263-267

KISHIMOTO, Y., M. HIRAIWA u. J.S. O'BRIEN (1992):
Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics.
J.Lipid.Res. 33, 1255-1267

KRAUSE, D. (1965):
Contributions to the andrology of the bull.
Dtsch.tierärztl.Wochenschr. 72, 454-458

KRAUSE, D. (1976):
Mikroskopische Untersuchung des Ejakulates.
In: G. ROSENBERGER (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 2. Auflage, S. 359

KRISHNA. A. (1997):
The relationship between spermatozoa and epithelium of the female genital tract during sperm storage in the greater yellow bats (*Scotophilus heathi*): the light and electronmicroscopic observations.
Proc.Natl.Sci.Counc., Repub.China, Part B: Life Sci. 21, 31-36

KRUTZSCH P.H., E.G. CRICHTON u. R.B. NAGLE (1982):
Studies on prolonged spermatozoa survival in chiroptera: a morphological examination of storage and clearance of intrauterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats *Myotis lucifugus* and *M. velifer.*
Am.J.Anat. 21, 421-434

LARSSON, B., u. H. RODRUIGEZ-MARTINEZ (2000):
Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?
Anim.Reprod.Sci. 60-61, 327-336

LEFEBVRE, R., u. S.S. SUAREZ (1996):
Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium.
Biol.Reprod. 54, 575-582

LEFEBVRE, R., R.P. DEMOTT, S.S. SUAREZ u. J.C. SAMPER (1995a):
Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium.
Equine.Reprod.VI.Biol.Reprod.Mono 1, 689-696

LEFEBVRE, R., P.J. CHENOWETH, M. DORST, C.T. LECLEAR, M. MACCUBBIN, J.T. DUTTON u. S.S. SUAREZ (1995b):
Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle.
Biol.Reprod. 53, 1066-1074

LEFEBVRE, R., M.C. LO u. S.S. SUAREZ (1997):
Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition.
Biol.Reprod. 56, 1198-1204

LITSCHER, E.S., K. JUTUNEN, A. SEPPO, L. PENTTILÄ, R. NIEMELÄ, O. RENKONEN u. P.M. WASSARMAN (1995):
Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro.
Biochemistry 34, 4662-4669

LIU, D.Y., u. H.W.G. BAKER (2000):
Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilisation in clinical in-vitro fertilisation.
Hum.Reprod. 15, 702-708

LIU, D.Y., G.N. CLARKE, M. MARTIC, C. GARRETT u. H.W.G. BAKER (2001):
Frequency of disordered zona pellucida (ZP) –induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-binding.
Hum.Reprod. 16, 1185-1190

LIU, D.Y., A. LOPATA, W.I.H. JOHNSTON u. H.W.G. BAKER (1988):
A human sperm –zona pellucida test using oocytes that failed to fertilize in vitro.
Fertil.Steril. 50, 782-788

LU, Q., u. B.D. SHUR (1997):
Sperm from β1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona poorly.
Development 124, 4121-4131

MAGARGEE, S.F., P.G. CRAMER u. R.H. HAMMERSTEDT (2000):
Increased in vitro binding and fertilizing ability of mouse sperm exposed to a synthetic peptide.
Mol.Reprod.Dev. 57, 406-411

MAHADEVAN, M.M., A.O. TROUNSON, C. WOOD u. J.F. LEETON (1987):
Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes inseminated in vitro.
J.In.Vitro.Fert.EmbryoTransfer 4, 223-227

MAHMOUD, A.I., u. J.J. PARRISH (1996):
Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation.
Mol.Reprod.Dev. 43, 554-560

MAYENCO-AGUIRRE, A.M., u. A.B. PEREZ-CORTEZ (1996):
Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa.
Theriogenology 50, 195-204

MBURU, J.N., S. EINARSSON, N. LUNDEHEIM u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1996):
Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation.
Anim.Reprod.Sci.45, 109-121

MBURU, J.N., H. RODRIGUEZ-MARTINEZ u. S. EINARSSON (1997):
Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation.
Anim.Reprod.Sci. 47, 137-148

McELROY, W.D., u. M. DeLUCA (1985):
Firefly luminescence.
In: J.G. BURR (Ed.): Chemi- and Bioluminescence.
Marcel Dekker, New York, pp. 387-400

MENDOCA FERREIRA, F. (1998):
Functional aspects of porcine sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay.
Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

MILLER, D. J., M.B. MACEK u. B.D. SHUR (1992):
Complementarity between sperm surface β1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding.
Nature 357, 589-593

MORTILLO, S., u. P.M. WASSARMAN (1991):
Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments.
Development 113, 141-151

NAKONA, M., u. N. YONEZAWA (2001):
Localization of sperm-ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins.
CellsTissuesOrgans 168, 65-75

NUGUCHI, S., Y. HATANAKA, T. TOBTA u. M. NAKANO (1992):
Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (pZP3) from the porcine zona pellucida.
Eur.J.Biochem. 209, 1089-1100

OEHNINGER , S., C.C. CODDINGTON, R. SCOTT, D.A. FRANKEN, L.J. BURKMAN, A.A. ACOSTA u. G.D. HODGEN (1989a):
Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of in vitro fertilization outcome.
Fertil.Steril. 51, 665-670

OEHNINGER , S., D.A. FRANKEN, R.T. SCOTT, A.A. ACOSTA, C.C. CODDINGTON u. G.D. HODGEN (1989b):
Validation of the hemizona assay in a monkey modell: influence of oocyte maturational stages.
Fertil.Steril. 51, 881-885

OEHNINGER , S., D.R. FRANKEN, E. SAYED, G. BARROSO u. P. KOLM (2000):
Sperm function assays and their predictive value for fertilisation outcome in IVF therapy: a meta-analysis.
Hum.Reprod.Update 6, 160-168

OEHNINGER , S., T.F. KRUGER, L.VEECK, A.A. ACOSTA, D. FRANKEN u. G.D. HODGEN (1991):
Human preovulatory oocytes have a higher sperm-binding ability than immature oocytes under hemizona assay conditions: evidence supporting the concept of „zona maturation“.
Fertil.Steril. 55, 1165-1170

OVERSTREET, J.W., u. W.C. HEMBREE (1976):
Penetration of the zona pellucida of non-living human oozytes by human spermatozoa in vitro.
Fertil.Steril. 27, 815-831

OVERSTREET, J.W., G.W. COOPER u. D.F. KATZ (1978):
Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport.
Biol.Reprod. 19, 115-132

OVERSTREET, J.W., D.F. KATZ u. L.L JOHNSON (1980):
Motility of rabbit spermatozoa in the secretions of the oviduct.
Biol.Reprod. 22, 1083-1088

PARRISH,J., J. SUSKO-PARRISH, R. HANDROW, M. SIMS u. N. FIRST (1988):
Capacitation of bovine spermatozoa in oviduct fluid.
Biol.Reprod. 40, 1020-1025

PEREZ, L.J., A. VALCARCEL, M.A. DE LAS HERAS U. H. BALDASSARRE (1997):
Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples.
Reprod.Domest.Anim. 32, 157-160

PETRUNKINA, A., R. GEHLHAAR, W. DROMMER, D. WABERSKI u. E. TÖPFER-PETERSEN (2001a):
Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro.
Reproduction 121, 889-896

PETRUNKINA, A., J. FRIEDRICH, W. DROMMER, G. BICKER, D. WABERSKI u. E. TÖPFER-PETERSEN (2001b):
Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phophorylation of membranes, cytosolic Ca^{2+} concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells.
Reproduction 122, 469-480

POLLARD, J.W., C. PLANTE, W.A. KING, P.J. HANSEN, K.J. BETTERRIDGE u. S.S. SUAREZ (1990):
Sperm fertilizing capacity is maintained by binding to oviductal epithelial cells.
Biol.Reprod. 44, 102-107

PRASAD S.V., S.M. SKINNER, C. CARINO, N. WANG, J. CARTWRIGHT u. B.S. DUNBAR (2000):
Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida.
CellsTissuesOrgans 166, 148-164

PRASAD S.V., B. WILKINS, S.M. SKINNER u. B.S. DUNBAR (1996):
Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to 55-kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system.
Mol.Reprod.Dev. 43, 519-529

RACEY P.A. (1979):
The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera.
J.Reprod.Fertil. 56, 391-402

RAYCHOUDHURY, S.S., u. S.S. SUAREZ (1991):
Porcine sperm binding to oviductal explants in culture.
Theriogenology 36, 1059-1070

RAYCHOUDHURY, S.S., S.S. SUAREZ u. W.C. BUHI(1993):
Distribution of lectin binding sites in the oviducts of cycling and hormone-treated pigs.
J.Exp.Zool. 265, 659-668

REINERT, M., J.J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):
Primary structure of stalllion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida-binding protein of the spermadhesin family.
Eur.J.Biochem. 242, 636-640

RETZIUS, G. (1909):
Die Spermien der Huftiere.
Biol.Untersuch.N.F.H. 14, 163-178

REVAH, I., B.M. GADELLA, F.M. FLESH, B. COLENBRANDER u. S.S. SUAREZ (2000):
Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose- binding properties.
Biol.Reprod. 62, 1010-1015

RINK, K., G. DELACRETAZ, R.P. SALATHE, A. SENN, D. NOCERA, M. GERMOND, P. DeGRANDI u. S. FAKAN (1996):
Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective –delivered 1.48 µm diode laser.
Lasers.Surg.Med. 18, 52-62

ROBERTS, S.J. (1986):
Veterinary Obstretics and Genital Diseases (Theriogenology).
North Pomfret, VT: David and Charles Inc.

ROBERTSON, L., H.L. BROWN, H.J. STAINES u. G.J. WISHART (1997):
Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs.
J.Reprod.Fertil. 110, 205-211

SCHUEMER, R., G. STÖHLEIN u. J. GOGOLOK (1990):
Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS.
Band 2: Komplexe statistische Analyseverfahren
Verlag Fischer, Stuttgart, Jena

SCOTT, M. A. (2000):
A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract.
Ani.Repro.Sci. 60-61, 337-348

SCOTT, M.A., I.K.M. LIU, J.W. OVERSTREET u. A.C. ENDERS (2000):
The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy.
J.Reprod.Fertil.Suppl. 56, 415-421

SHALGI, R., u. P.F. KRAICER (1978):
Timing of sperm transport, sperm penetration and cleavage in the rat.
J.Exp.Zool. 204, 353-360

SHARON, N., u. H. LIS (1989):
Lectins as cell recognition molecules.
Science 246, 227-234

SHUR, B.D. (1998):
Is sperm galactosyltransferase a signalling subunit of a multimeric gamete receptor?
Biochem.Biophys.Res.Com. 250, 537-543

SINOWATZ, F., S. KÖLLE u. J. PLENDL (1998):
Protein-carbohydrate interactions during fertilization.
Acta.Anat. 161, 196-205

SINOWATZ, F., S. KÖLLE u. E. TÖPFER-PETERSEN (2001a):
Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals.
Cell Tissues Organs 168, 24-35

SINOWATZ, F., E. TÖPFER-PETERSEN u. J.J. CALVETE (1997):
Glycobiology of fertilization.
In: H.J. GABIUS u. S. GABIUS (Eds.): Glycosciences.
Chapman and Hall, Weinheim, pp. 595-610

SINOWATZ, F., E. TÖPFER-PETERSEN, S. KÖLLE, u. G. PALMA (2001b):
Functional morphology of the zona pellucida..
Anat.Histol.Embryol. 30, 257-263

SMITH, T.T., u. R. YANAGIMACHI (1990):
The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm epithelium contact for sperm survival.
Biol.Reprod. 42, 450-457

SMITH, T.T., F. KOYANAGI u. R. YANAGIMACHI (1987):
Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after mating and artificial insemination.
Biol.Reprod. 37, 225-234

SNELL, W.J., u. J.M. WHITE (1996):
The molecules of mammalian fertilization.
Cell 85, 629-637

SOLIS, D., J. JIMINEZ-BARBERO, H. KALTNER, A. ROMERO, H.-C. SIEBERT, C.-W. VON DER LIETH u. H.-J. GABIUS (2001):
Towards the role of glycans as hardware in information storage and transfer: basic principles, experimental approaches and recent progress.
CellsTissuesOrgans 168, 5-23

STRÖM HOLST, B., B. LARSSON, C. LINDE-FORSBERG u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2000):
Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes.
J.Reprod.Fertil. 119, 77-83

STRÖM HOLST, B., B. LARSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, A.-S. LAGERSTEDT u. C. LINDE-FORSBERG (2001):
Zona pellucida binding assay – a method for evaluation of canine spermatozoa.
J.Reprod.Fertil.Suppl. 57, 137-140

SUAREZ, S.S. (1987):
Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ.
Biol.Reprod. 36, 203-210

SUAREZ, S.S. (2001):
Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals.
CellsTissuesOrgans 168, 105-111

SUAREZ, S.S., u. X. DAI (1992):
Hyperaction enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media.
Biol.Reprod. 46, 686-691

SUAREZ, S.S., K. BROCKMAN u. R. LEFEBVRE (1997):
Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir.
Biol.Reprod. 56, 447-453

SUAREZ, S.S., X. DAI, R.DEMOTT, K. REDFERN u. M. MIRANDO (1992):
Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro.
J.Androl. 13, 60-75

SUAREZ, S.S., M. DROST, K. REDFERN u. W. GOTTLIEB (1990):
Sperm motility in the oviduct.
In: B.D. BAVISTER, J. CUMMINS u. E.R.S. ROLDAN (Eds.): Fertilization in Mammals.
Serono Symposia, Norwell, pp. 111-124

SUAREZ S.S., K. REDFERN, P. RAYNOR, F. MARTIN u. D.M. PHILLIPS (1991):
Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir.
Biol.Reprod. 44, 998-1004

SUAREZ, S.S., I. REVAH, M. LO u. S. KÖLLE (1998):
Bull sperm binding to the oviductal epithelium is mediated by CA^{2+} -dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-α trisaccharide.
Biol.Reprod. 59, 39-41

TAKEUCHI, Y., K. NISHIMURA, N. AOKI, T. ADACHI, C. SATO, K. KITAJIMA u. T. MATSUDA (1999):
A 42-hDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family of glycoproteins in mammalian zona pellucida.
Eur.J.Biochem. 260, 736-742

TALEVI, R., u. R. GUALTIERI (2001).
Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro.
Biol.Reprod. 64, 491-498

THOMAS, P., u. B. BALL (1996):
Cytofluorescent assay to quantify adhesion of equine spermatozoa to oviduct epithelial cells in vitro.
Mol.Reprod.Dev. 43, 55-61

THOMAS, P., B. BALL u. S. BRINSKO (1994a):
Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explants.
Biol.Reprod. 51, 222-228

THOMAS, P.G.A., B.A. BALL, P.G. MILLER, S.T. BRINSKO u. L. SOUTHWOOD (1994b):
A subpopulation of morphologically normal motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers.
Biol.Reprod. 51, 303-309

TÖPFER-PETERSEN, E. (1999):
Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization.
Hum.Reprod.Update 5, 314-329

TÖPFER-PETERSEN, E., J.J. CALVETE, L. SANZ u. F. SINOWATZ (1995):
Carbohydrate- and heparin-binding proteins in mammalian fertilization.
Andrologia 27, 303-324

TÖPFER-PETERSEN, E., D. CECHOVA, A. HENSCHEN, M. STEINBERGER, A.E. FRIESS u. A. ZUCKER (1990):
Cell biology of acrosomal proteins.
Andrologia 22, 110-121

TÖPFER-PETERSEN, E., A.M. PETRUNKINA u. M. EKHLASI-HUNDRIESER (2000):
Oocyte-sperm interactions.
Anim.Reprod.Sci. 60-61, 653-662

TÖPFER-PETERSEN, E., A. ROMERO, P.F. VARELA, M. EKHLASI-HUNDRIESER, Z. DOSTALOVA, L. SANZ u. J.J. CALVETE (1998):
Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypothesis, perspectives.
Andrologia 30, 217-223

TÖPFER-PETERSEN, E., A. WAGNER, J. FRIEDRICH, A. PETRUNKINA, M. EKHLASI-HUNDRIESER, D. WABERSKI u. W. DROMMER (2002):
Function of the mammalian oviductal sperm reservoir.
J.Exp.Zool. 292, 210-215

TULSIANI, D.R.P., H. YOSHIDA-KOMIYA u. Y. ARAKI (1997):
Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event.
Biol.Reprod. 57, 487-494

VAN DUIN M., J. POLMAN, I. DE BREET, K. GINNEKEN, H. BUNSCHOTEN, A. GROOTENHUIS, J. BRINDLE u. R.J. AITKEN (1994):
Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg interaction.
Biol.Reprod. 51, 607-617

VISCONTI, P.E., u. G.S. KOPF (1998):
Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation.
Biol. Reprod. 59, 1-6

VON DER LIETH, C.-W., H.-C. SIEBERT, T. KOZAR, M. BURCHERT, M. FRANK, M. GILLERON, H. KALTNER, G. KAYSER, E. TAJKHORSHID, N.V. BOVIN, J.F.G. VLIEGENHART u. H.-J. GABIUS (1998):
Lectin ligands: New insights into conformation and their dynamic behavoir and the discovery of conformer selection by lectins.
Acta.Anat. 161, 91-109

WABERSKI, D., S. MEDING, G. DIRKSEN, K.F. WEITZE, C. LEIDING u. R. HAHN (1994):
Fertility of long term stored boar semen: influence of extenders (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen.
Anim.Reprod.Sci. 36, 145-151

WAGNER, A. (2001):
Das funktionelle Spermienreservoir im Säugetier: Charakterisierung der kohlenhydratvermittelten Vorgänge der Spermien-Oviduktbindung beim Schwein
Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss.

WAGNER, A., M. EKHLASI-HUNDRIESER, C. HETTEL, A. PETRUNKINA, D. WABERSKI, M. NIMTZ u. E. TÖPTER-PETERSEN (2002):
Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation – studies in the pig.
Mol.Reprod.Dev. 61, 249-257

WALTER I., u. S. BAVDEK (1997):
Lectin binding patterns of porcine mucosa and endometrium during the estrous cycle.
J.Anat. 190, 299-307

WASSARMAN, P.M. (1988):
Zona pellucida glycoproteins.
Annu.Rev.Biochem. 57, 415-442

WASSARMAN, P.M. (1990):
Profile of a mammalian sperm receptor.
Development 108, 1-17

WASSARMAN, P.M. (1999):
Egg zona pellucida glycoproteins.
In: T. KREIS u. R. VALE (Eds.): Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins.
Oxford University Press, Oxford, pp. 411-414

WASSARMAN, P. M. (1999):
Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. Review.
Cell, Vol. 96, 175-183

WASSARMAN, P.M., u. D.F. ALBERTINI (1994):
The mammalian ovum.
In: E. KNOBIL u. J.D. NEILL (Eds.): The Physiology of Reproduction.
Raven Press, New York, 2nd Edition, pp. 79-122

WASSARMAN, P.M., u. E.S. LITSCHER (1995):
Sperm-egg recognition mechanisms in mammals.
Curr.Top.Dev.Biol. 30, 1-19

WASSARMAN, P.M., u. E.S. LITSCHER (2001):
Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization.
CellsTissuesOrgans 168, 36-45

WEIS W.I., u. K. DRICKAMMER (1996):
Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.
Ann.Rev.Biochem. 65, 441-473

WEITZE, K.F. (1990):
The use of long-term extender in pig AI – a view of the international situation.
PigNewsInformation 11, 23-26

WHITMARSH, A.J., M.J. WOOLNOUGH, H.D.M. MOORE, D.P. HORNBY u. C.L.R. BARRATT (1996):
Biological activity of recombinant human ZP3 produced *in vitro*: potential for a sperm function test.
Molec.Hum.Reprod. 2, 911-919

WISHART, G.J. (1987):
Regulation of the lenght of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviductal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs.
J.Reprod.Fertil. 80, 493-498

WISHART, G.J., H.J. STAINES u. M.G. STEELES (1992):
A method for predicting impending fertility in naturally-mated chickens and gross variation in sperm transfer efficiency.
In: Proceedings of the 19th World's Poultry Congress; Amsterdam, Netherlands, pp. 631-634

YANAGIMACHI, R. (1994):
Mammalian Fertilization.
In: E. KNOBIL u. J.D. NEILL (Eds.): The Physiology of Reproduction.
Raven Press, New York, 2nd Edition, pp. 189-317

YANAGIMACHI, R., u. M.C. CHANG (1963):
Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation.
J.Reprod.Fertil. 6, 413-420

YANAGIMACHI, R., A, LOPATA, C.B. ODOM, R.A. BRONSON, C.A. MAHI u. G.L. NICOLSON (1979):
Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa.
Fertil.Steril. 31, 562-574

YONEZAWA, N., H. AOKI. Y. HATANAKA u. M. NAKANO (1995a):
Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg-binding.
Eur.J.Biochem. 233, 35-41

YONEZAWA, N., Y. HATANAKA, H. TAKEYAMA u. M. NAKANO (1995b):
Binding of pig sperm receptor in the zona pellucida to the boar sperm acrosome.
J.Reprod.Fertil. 103, 1-8

ZAMBONI, L. (1972):
Fertilization in the mouse.
In: K.S. MOGHISSI u. E.S.E. HAFEZ (Eds.): Biology of Mammalian Fertilization and Implantation.
CharlesC. Thomas, Springfield, pp. 213-262

ZHANG, B.R., B. LARSSON, N. LUNDEHEIM u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1998):
Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy bulls.
Int.J.Androl. 21, 207-216

ZHANG, B.R., B. LARSSON, N. LUNDEHEIM, M.G.H. HAARD u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1999):
Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme.
Int.J.Androl. 22, 253-260

9 ANHANG

9.1 LABORBEDARF

Aqua dest. Aufbereitungssystem, Umkehr-Osmose-Anlage	Fa. Kloos, Langenhagen, Hannover
Deckgläser (50 x 24 mm) und (18 x 18 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG (IDL), Nidderau
Ethanol (96%)	Fa. CG Chemikalien, Laatzen
Einmalfilter, 0,2 µm (Minisart®)	Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Fa. Greiner, Frickenhausen
Fluoreszenzmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung	Fa. Zeiss (Axioskop), Jena
Glaszentrifugenröhrchen mit konischem Boden (10 ml)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Kühlschrank	Fa. Liebherr, Nürnberg
Laborflaschen mit Gewinde, 250 u. 1000 ml	Fa. Jürgens (9.072 0025), (9.072 010), Hannover
Laborwaage, Typ L310	Fa. Sartorius GmbH, Göttingen
Laborzentrifuge (Megafuge 2.0 R)	Fa. Heraeus Instruments, Hamburg
Objektträger (76 x 26 mm)	Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG (IDL), Nidderau
Parafilm®	Fa. American National Can™, USA
Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch	Fa. Zeiss (1697), Jena
Phasenkontrastmikroskop ohne Heiztisch	Fa. Zeiss, Jena
Pipetten, einstellbar (100-1000 µl, 20-200 µl, 1-20 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen, gelb und blau	Fa. Greiner (685290 und 686290), Frickenhausen
Wärmeplatte (Hotplate SH 2 D)	Fa Stuart Scientific, England
Wasserbad mit Temperaturregelung (Typ 1008)	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL), Burgwedel
Wasserstrahlpumpe (Haake)	Fa. Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
Zählkammern nach Thoma	Fa. Glaswarenfabrik Hecht, Sontheim

9.2 MEDIKAMENTE UND REAGENZIEN

BSA (Cohn's Fraktion V)	Fa. Merck (1.12018.0025), Darmstadt
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Fa. Merck (1.02382.0500), Darmstadt
EDTA	Fa. Merck (1.08418.0100), Darmstadt
Gentamycinsulfat	Fa. Serva (22185.02), Heidelberg
Glucose	Fa. Merck (1.04074.0500), Darmstadt
Hepes	Fa. Merck (1.10110.0250), Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck (1.04938.0500), Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Fa. Merck (1.05033.0500), Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Fa. Merck (1.04873.0250), Darmstadt
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Fa. Merck (1.05833.1000), Darmstadt
Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$)	Fa. Merck (1.06329.0500), Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Roth (9265.2), Karlsruhe
Natriumcitrat	Fa. Merck (1.06448.0500), Darmstadt
Natriumlaktat	Fa. Fluka AG, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Fa. Merck (1.06346.0500), Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Fa. Merck (1.06586.0500), Darmstadt
Natriumpyruvat	Fa. Merck (1.06619.0500), Darmstadt
Penicillin (1 Mega I.E.)	Fa. Jenapharm GmbH & Co KG, Jena
Percoll®	Fa. Sigma-Aldrich (P-1644), Deisenhofen
Propidiumiodid (PI)	Fa. Calbiochem Novabiochem GmbH, (537059), Bad Soden / Taunus
Streptomycin (Strepto-Hefa)	Fa. Hefa Pharm GmbH & Co KG, Werne
tri-Natriumcitrat	Fa. Merck (1.06448.1000), Darmstadt

9.3 PUFFER, LÖSUNGEN, MEDIEN UND VERDÜNNER

Puffer und Lösungen

Natriumchloridlösung 10%

NaCl	1,7	M
Aqua dest. ad.	1000	ml

Formolcitrat

4 Teile einer 37%igen Formalinlösung werden mit 96 Teilen einer 2,9%igen Natriumcitratlösung gemischt.

Diese Lösung eignet sich zur Flüssigfixation von Spermatozoen.

(Methode modifiziert nach HANCOCK 1956)

Percoll® -Lösungen [35 % und 70 %] (Zusammensetzung nach HARRISON et al. 1982)

I. 10-fach konzentrierte Saline-Hepes-Stammlösung:

NaCl	1,4	M
Hepes	200	mM
Glucose x H_2O	90	mM
KOH *(1 M)*	2,5	ml

Alle Chemikalien werden in 70 ml Aqua dest. gelöst. PH-Wert auf 7,4 einstellen. Nachfolgend wird mit Aqua dest bis auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

Die Saline-Hepes-Stammlösung kann eingefroren gelagert werden.

II. Lösung M

10,8 g der Lösung I (Saline-Hepes-Stammlösung) werden sterilfiltriert und mit sterilfiltriertem Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Nachfolgend 250 µl Gentamycinsulfat *(Konz.: 20mg/ml)* zugeben.

PH-Wert auf 7,4 einstellen und Osmolarität messen. Messwert ⇒ m (in Formel s. V.).

(sollte ~ 295 mOsm/kg betragen)

III. Percoll® - unverdünnt –

Aus dem Kühlschrank nehmen und Osmolarität bestimmen.

Messwert ⇒ p (in Formel s. V.) (sollte ~ 15 mOsm/kg betragen)

IV. Lösung 1 + 9

5,4 g der Lösung 1 (Saline-Hepes-Stammlösung) werden sterilfiltriert und mit 50,9 g unverdünntem Percoll® aufgefüllt.

Osmolarität messen: Messwert ⇒ dp (in Formel s. V.) (sollte ~ 350 mOsm/kg betragen)

V. Rechnung

1.) Oa = 0,1 x (10m + 9p)

= ~ 310

2.) R = [Oa – (0,1 x dp)] / (0,9 x dp)

= ~ 0,85

3.) Vp = (10m – 295) / [R x (295 – p)]

= ~ 11

VI. Percoll® -Gebrauchslösungen

1.) 100 %ige Percoll® -Gebrauchslösung:

= (Vp – 9) x 1,13 x 5g Percoll® + Lsg 1 + 9

= (Vp – 9) x 5,65g Percoll® + Lsg 1 + 9

Vorsichtig schwenken

Osmolarität messen (sollte ~ 295 mOsm/kg betragen)

2.) 35 %ige Percoll® -Gebrauchslösung:

- Eine Hälfte (ca. 33 ml) der 100 % -Lösung nehmen (entspricht V_1)
- Mit Lösung M auf V_2 auffüllen
- $V_2 = V_1 \times 100 / 35$
- Vorsichtig schwenken

3.) 70 %ige Percoll® -Gebrauchslösung:

- Andere Hälfte (ca. 33 ml) der 100 % -Lösung nehmen (entspricht V_1)
- Mit Lösung M auf V_3 auffüllen
- $V_3 = V_1 \times 100 / 70$
- Vorsichtig schwenken

Die Gebrauchslösungen können bei 4°C im Kühlschrank gelagert und ungefähr zwei Wochen verwendet werden.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

NaCl	1,5	M
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	91	mM
KH_2PO_4	27	mM
Aqua dest. ad.	1000	ml

Dieser Ansatz entspricht einer 10-fach konzentrierten Stammlösung.
Für die Gebrauchslösung ist die Stammlösung entsprechend 1 : 10 zu verdünnen und wird auf pH 7,4 und 280-320 mOsm/kg eingestellt.
100 ml der Gebrauchslösung werden für einen Versuchstag sterilfiltriert und danach erfolgt die Zugabe von 50 mg Streptomycin und 75 mg Penicillin.

Medien

TALP-Medium [Tyrode-Albumin-Laktat-Pyruvat-Medium (Zusammensetzung nach PARRISH et al. 1988)]
a) Stammlösungen (Ansatz von jeweils 100 ml):

NaCl	2,3	M
KCl	158	mM
$NaHCO_3$	150	mM
NaH_2PO_4 x H_2O	35	mM
$CaCl_2$ x $2H_20$	200	mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	100	mM

Die Stammlösungen werden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Gentamycinsulfat	50	mg/ml
Natriumpyruvat	2,2	mg/ml

Die Stammlösungen von Gentamycinsulfat und Natriumpyruvat werden in 1 ml Aliquoten eingefroren und pro Versuchstag wird jeweils ein Aliquot verbraucht.

b) Gebrauchslösung :

NaCl	*(21,7 ml der Stammlsg.)*	99	mM
KCl	*(9,8 ml der Stammlsg.)*	3,1	mM
$NaHCO_3$	*(50 ml der Stammlsg.)*	15	mM
NaH_2PO_4 x H_2O	*(5 ml der Stammlsg.)*	0,4	mM
$CaCl_2$ x $2H_2O$	*(5 ml der Stammlsg.)*	2	mM
$MgCl_2$ x $6H_2O$	*(5,5 ml der Stammlsg.)*	1,1	mM
Hepes		9,2	mM
Natriumlaktat		21,6	mM
Aqua dest. ad.		500	ml

Die 500 ml des Talp-Mediums werden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und in 15 ml-Portionen eingefroren.

Am Versuchstag werden nach dem Auftauen des Mediums hinzugegeben:

Gentamycin	*(150 µl der Stammlsg.)*		
Natriumpyruvat	*(16,5 µl der Stammlsg.)*		
BSA	*(Cohn's Fraktion V)*	90	Mg

Die Osmolarität der Gebrauchslösung sollte zwischen 280-320 mOsm / kg liegen.

Verdünner

Androhep (Zusammensetzung nach WEITZE 1990)

Glucose x H_2O	144	mM
tri-Natriumcitrat x 2 H_2O	27,2	mM
$NaHCO_3$	14,3	mM
Hepes	37	mM
EDTA x $2H_2O$	6,5	mM
BSA (Cohn's Fraktion V)	0,25	g
Gentamycinsulfat	26	mg
Aqua dest. ad.	100	ml

Die Androhep-Lösung wird eingestellt auf pH 7,4 und 280-320 mOsm/kg und in Portionen von 100 ml ohne BSA abgefüllt. BSA wird am Versuchstag nach dem Auftauen frisch zugesetzt.

Androhep ohne EDTA (mod. Androhep, Zusammensetzung nach WABERSKI et al. 1994)

Glucose x H_2O	144	mM
tri-Natriumcitrat x 2 H_2O	27,2	mM
$NaHCO_3$	14,3	mM
Hepes	37	mM
BSA (Cohn's Fraktion V)	0,25	g
Gentamycinsulfat	26	mg
Aqua dest. ad.	100	ml

Die Androhep-Lösung ohne EDTA wird eingestellt auf pH 7,4 und 280-320 mOsm/kg und in Portionen von 50 ml ohne BSA abgefüllt. BSA wird am Versuchstag nach dem Auftauen frisch zugesetzt.

BTS (Beltsville-Thawing-Solution) – (Zusammensetzung nach JOHNSON et al. 1988)

Glucose x H_2O	186,7	mM
Natriumcitrat x $2H_2O$	20,4	mM
$NaHCO_3$	15,5	mM
EDTA x $2H_2O$	3,5	mM
KCl	10,7	mM
Gentamycinsulfat	25	mg
Aqua dest. ad.	100	ml

Einstellung der Lösung auf pH 7,4 und 280-320 mOsm/kg.

Lösung kann eingefroren werden.

9.4 MATERIALIEN FÜR DEN OVIDUKT-EXPLANT-ASSAY

Anatomische Pinzette	Fa. TBH GmbH, Langenhagen, Hannover
Arterienklemme	Fa. Aesculap, TBH GmbH, Langenhagen, Hannover
Brutschrank mit CO_2 Begasung (CO_2-Auto-Zero)	Fa. Heraeus, Hamburg
Computer mit angeschlossenem Monitor (Triniton)	Fa. Dell, USA Fa. Sony, Japan
Computergestütztes Flächenmeßprogramm „Aida“	Fa. Mika medical GmbH (Bildanalyse Vers. 2.0, Copyright 1992), Rosenheim
Einmalspritzen (2 ml)	Fa. Heiland, Hamburg
Glaspetrischale mit Paraffin gefüllt	Eigene Herstellung
Inversmikroskop (IM 35) mit aufgesetzter Videokamera (Kappa, CF 8 / 1)	Fa. Zeiss, Jena
Kanülen Gr. 12 (0,7 x 30 mm)	Fa. Heiland, Hamburg
Mikropinzette (Dumont forceps 45°)	Fa. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mikroschere mit einer Schnittfläche von drei Millimetern und zwei spitzen Schenkeln (Mini-Vannas)	Fa. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Monitor (WV-3M 1400)	Fa. Panasonic, Japan
Overheadprojektorfolie + -folienschreiber	
Petrischalen, groß (100 x 15 mm)	Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen
Petrischalen, klein (35 x 10 mm)	Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen
Petrischalen, klein (35 x 10 mm) für Zellkulturen	Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen

Schere mit zwei spitzen Schenkeln	Fa. Aesculap, TBH GmbH, Langenhagen, Hannover
Silikon (Silicone Stopcock Grease, Dow Corning)	Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Skalierung (OT, 0,01mm)	Fa. Olympus, Japan
Stereomikroskop	Fa. Zeiss (475003), Jena
Videokassetten (300 min)	Fa. Sony, Japan
Videorecorder (SLV-E 720, VHS)	Fa. Sony, Japan
Wärmeplatte (HT 200)	Fa. Minitüb GmbH, Heidelberg

9.5 MATERIALIEN FÜR DEN DUDFINDER® SPERM-BINDING ASSAY

Arbeitsvordrucke für die Beschriftung der Mikrotiterplatten	Fa. BioPore Inc., USA
DudFinder® Sperm-Binding Assay Mikrotiterplatten (8 x 12 well)	Fa. BioPore Inc., USA
Heizinkubator (Slide Warmer, 581 A Mod 1 37°C) mit Aluminiumträgern	Fa. Animal Reproduction Systems, USA
Klebeband (*Tesa)*, weiß (10mm Breite)	Fa. Beiersdorf, Hamburg
Pipettenspitzen, gelb (20-200 µl) mit einer weiten Öffnung (Big-Mouth-Pipettes)	Fa. BioPore Inc., USA
Styroporbehälter	
Wärmeschrank (Typ B 5042 E)	Fa. Heraeus, Hamburg
Zellstoff (Industriewischtuch 4-lagig / A-Tork™-Soft)	Fa. SCA Hygiene Products, Germany
8-Kanal-Multipipette	Fa. Brand GmbH & Co, Wertheim

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung der in vitro Bindungsfähigkeit porciner Spermien im Ovidukt-Explant-Assay und im DudFinder® Sperm-Binding Assay und deren Beziehung zu spermatologischen Qualitätsparametern

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

1. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nach Beratung mit und unter Anleitung von Frau Dipl.-Phys. Dr. Anna Petrunkina unter Verwendung des Statistikprogrammes SAS vorgenommen.
2. Am Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover habe ich die Versuche mit den im Kapitel „*Eigene Untersuchungen*“ aufgeführten Hilfen und Hilfsmitteln durchgeführt.
3. Die fachliche Beratung wurde von Frau Apl.-Prof. Dr. med. vet. Dagmar Waberski –Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover - übernommen.

Ich habe keine entgeldliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeldliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation an folgenden Instituten angefertigt:
Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

_____

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Waberski für die Überlassung des interessanten Themas, die persönliche Betreuung und die motivierende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Weitze und Frau Prof. Dr. Dr. Töpfer-Petersen danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Reproduktionsmedizin und für die selbstverständliche Bereitstellung des jeweiligen Arbeitsplätzes.

Insbesondere bedanke ich mich bei Bio Pore, Inc. für die Bereitstellung des DudFinder® Sperm-Binding Assay‘s und die finanzielle Unterstützung, sowie bei Prof. Dr. Amann für die interessanten und motivierenden Anregungen während der Planungsphase dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Anna Petrunkina für ihre freundliche und kompetente Hilfe bei der Durchführung der statistischen Auswertung und für ihr fachliches Interesse an dieser Arbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Frau Dr. Meike Grotjahn und Frau Dorothe Gondert für die interessante gemeinsame Zeit und für ihre Mitarbeit bei zahlreichen Versuchen.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Reproduktionsmedizin möchte ich mich für das gute Arbeitsklima bedanken, insbesondere bei Christiane Hettel, Edith Podhajsky und Inga Reinhardt für die jederzeit gewährte Hilfestellung.

Den Doktoranden des gesamten Institutes Inis Graue, Katrin Simon, Inken Löhmer, Xuyen Le Thi, Bettina Thomas, Katrin Gohr und Dietmar Helms danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und für die interessante, nicht immer an das Institut gebundene Zeit.

Ebenso möchte ich es nicht versäumen, den Mitarbeitern des Schlachthofes Hannover für ihr unkompliziertes Entgegenkommen bei der Beschaffung des Probenmaterials zu danken.

Der Joachim und Irene Hahn-Stiftung und dem Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e. V. (ZDS) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie. Meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglichten und mir alle notwendige Unterstützung nicht nur finanzieller Art zukommen ließen, sowie bei meinem Bruder Jörg. Auf unser gutes Verhältnis konnte ich mich jederzeit verlassen.

Schließlich auch Dir Bettina, ein besonders liebes und warmes Dankeschön für Dein großes Verständnis für mich und für Deine Geduld mit meiner Doktorarbeit.