

Aus der Tierklinik für Fortpflanzung und Geburtshilfe
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fruchtbarkeitskriterien aufgetauter Bullenspermien in vitro und die Beeinflussung dieser durch Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Vitt
Tierärztin aus Siegen
Berlin, 1997
Journal-Nr. 1989

Diese Arbeit wurde von der Dr.Dr. h.c. Karl Eibl-Stiftung unterstützt

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Professor Dr. K. Hartung

1. Gutachter: Univ.-Professor Dr. W. Busch

2. Gutachter: Univ.-Professor Dr. H. Tönhardt

Tag der Promotion: 08.01.1997

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Kapazitation	2
2.1.1. Biochemische Aspekte der Kapazitation	4
2.1.2. Kapazitation in vitro	6
2.1.3. Kapazitation mit Heparin	7
2.2. Akrosomenreaktion	8
2.2.1. Morphologie des Akrosoms und der Akrosomenreaktion	8
2.2.2. Interaktion der Gameten	10
2.2.3. Biochemische Veränderungen vor und während der Akrosomenreaktion	12
2.2.4. Weitere Möglichkeiten zur Auslösung der Akrosomenreaktion	15
2.2.5. Spontane Akrosomenreaktion	16
2.2.6. Bisherige funktionelle Fertilitätstests	17
2.3. Beeinflussung der Spermienfunktion durch Seminalplasma	21
2.3.1. Dekapazitationsfaktoren des Seminalplasmas	22
2.3.2. Kapazitationsfördernde Faktoren des Seminalplasmas	24
2.4. Spermienmotilität	25
2.4.1. Physiologie der Spermienbewegung	25
2.4.2. Erfassung der Motilitätsparameter	27
2.4.3. Beziehung der Motilität zur Befruchtung	29

2.5. ATP-Haushalt der Spermienzelle	30
2.5.1. Synthese und Bedeutung von ATP	30
2.5.2. ATP-Gehalt von Spermien	31
3. Ziele der eigenen Untersuchungen	33
4. Material und Methoden	35
4.1. Gewinnung und Aufbereitung der Spermeproben der ersten Versuchsreihe	35
4.2. Gewinnung und Aufbereitung der Spermeproben der zweiten Versuchsreihe	36
4.3. Erfassung der Non Return Rate	36
4.4. In-vitro-Verfahren zur Untersuchung der gefrierkonservierten Spermienproben	37
4.4.1. Erfassung der Akrosomenreaktion	39
4.4.1.1 Kontrollversuche	41
4.4.2. Motilitätsanalyse	43
4.4.3. Bestimmung des ATP-Gehaltes der Spermien	44
4.4.4. Bestimmung der Zellkonzentration	44
4.5. Statistik	45
5. Ergebnisse	46
Versuchsreihe I: Spermatologische Parameter verschiedener Bullen	
5.1. in Beziehung zur NRR	46
5.1.1. Untersuchung der aufgetauten Spermienproben	47
5.1.2. Ermittlung konventioneller Parameter der Swim-up-Proben	49
5.1.3. Akrosomreaktion der Swim-up-Spermien	51
5.1.4. Erfassung der Spermienmortalität bzw. -resistenz	56
5.1.5. Kontrollversuche	58
5.1.6. Ergebnisse der Motilitätsanalyse	60
5.1.6.1. Motilitätsparameter der aufgetauten Proben	60
5.1.6.2. Motilitätsparameter der Swim-up-Proben	63
5.1.7. Bestimmung des ATP-Gehaltes	65
5.2. Versuchsreihe II: Untersuchung des Seminalplasmaeinflusses	67
5.2.1. Untersuchung der aufgetauten Proben	68
5.2.1.1. Zusätzlich beobachtete Merkmale der aufgetauten Proben	70
5.2.2. Untersuchung der Swim-up-Proben	71
5.2.3. Erfassung der Akrosomenreaktion	73
5.2.4. Spermienmortalität bzw. -resistenz	75
5.2.5. Motilitätsanalyse	77
5.2.6. ATP-Gehalt	77
5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	78
6. Diskussion	79

6.1.	Versuchsreihe I: Spermatologische Parameter verschiedener Bullen in Beziehung zur NRR	79
6.2.	Versuchsreihe II: Untersuchung des Seminalplasmaeinflusses	86
6.3.	Ausblick	89
7.	Zusammenfassung	90
8.	Summary	91
9.	Literaturverzeichnis	92

Abkürzungsverzeichnis

AR	= Akrosomenreaktion bzw. Akrosomenreaktionen
ALH	= Amplitude der lateralen Kopfauslenkung
ASF	= Akrosomstabilisierender Faktor
BCF	= Frequenz der Kopfbewegung
BSA	= Bovines Serumalbumin
cAMP	= Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CASA	= Computergestützte Motilitätsanalyse
DAG	= Diacylglycerol
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
GAG	= Glykosaminoglykane
G-Protein	= Guaninukleotidbindendes Protein
GP	= Glykoproteine
IAM	= Innere akrosomale Membran
InsP ₃	= Inositol-1,3,5-Trisphosphat
IVF	= In vitro Fertilisation
LPC	= Lysophosphatidylcholin
NRR	= Non Return Rate
OAM	= Äußere akrosomale Membran
PC12	= Dilauroyl-Phosphatidylcholin
PLA ₂	= Phospholipase A ₂
PM	= Plasmamembran
SP	= Seminalplasma
TCA	= Trichloressigsäure
VR	= Versuchsreihe
ZP	= Zona pellucida

1. Einleitung

Der Einsatz von gefrierkonserviertem Bullensperma zur künstlichen Befruchtung ist mit einem erheblichen finanziellen und zeitlichen Aufwand verbunden. Daher ist es von großem Interesse, Kriterien zu finden, die es ermöglichen, die Befruchtungskompetenz der aufgetauten Spermaproben in vitro einzuschätzen. Die Aussagen über korrelative Zusammenhänge von Sameneigenschaften und Befruchtungsergebnissen sind sehr widersprüchlich. Dies liegt unter anderem daran, daß noch längst nicht alle Prozesse, die bei der Befruchtung stattfinden, verstanden werden, und daß nicht alle Eigenschaften der Spermien gerätetechnisch zu erfassen sind. Es ist außerdem notwendig, immer mehrere Merkmale im Zusammenhang zu betrachten, da nicht nur eine einzige Eigenschaft der Spermien alleine für den Befruchtungserfolg verantwortlich ist.

Bereits 1966 führte KRAUSE zahlreiche Untersuchungen verschiedener Spermienparameter durch. In Besamungsstationen werden meistens die Bewegungsaktivität und die Morphologie der Spermien betrachtet. Von Bedeutung sind auch quantitative Merkmale der Ejakulate (z.B. Volumen und Spermiedichte). In den meisten Stationen wird die Anzahl der Spermienzellen pro Inseminat für alle Bullen auf eine bestimmte Anzahl motiler Zellen gleichermaßen eingestellt. Häufig zeigt sich aber eine hohe Variabilität der

Befruchtungsergebnisse bei Bullen mit gleichen konventionellen Spermienparametern und gleicher Inseminationsdosis. Diese konventionelle Parameter eignen sich nicht zuverlässig zur Prognose der Fertilität (HIRAO, 1975; SALISBURY et al., 1978). Die Untersuchung nativer Ejakulate liefert nicht immer eine Aussage über die Fertilität der gefrierkonservierten Proben. Da Bullenspermien routinemäßig gefrierkonserviert eingesetzt werden, ist es notwendig, auch die wieder aufgetauten Proben zu untersuchen. Die Ermittlung funktioneller Spermienparameter gefrierkonservierter Bullenspermien nach dem Auftauen, die eine Korrelation zur Fertilität zeigen, steht bei dieser Arbeit im Vordergrund.

Große Bedeutung für die Fertilität wird den verschiedenen Bestandteilen des Seminalplasmas beigemessen. Es wird angenommen, daß Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas zwischen verschiedenen Bullen vorliegen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das homologe Seminalplasma vor der Gefrierkonservierung von den Ejakulaten "schlechter" Bullen entfernt und durch das Seminalplasma von "guten" Bullen ersetzt. Der Einfluß dieses Seminalplasmaaustausches auf die Spermienfunktion wird untersucht.

2. Literatur

Zur Befruchtung müssen Spermien verschiedene Umhüllungen der Eizelle durchdringen. Die äußere Hülle, der Cumulus oophorus, wird von Follikelepithelzellen gebildet. Die interzelluläre Matrix dieser Zellen besteht überwiegend aus Hyaluronsäure. Darunter befindet sich die zweite schützende Schicht der Eizelle, die Zona pellucida. Sie wird durch Vernetzung verschiedener Glykoproteine gebildet. Um diese Schichten zu durchdringen, benötigen Spermien eine progressive Beweglichkeit und lytische Enzyme. Diese Enzyme befinden sich innerhalb des Spermiums im Kopfbereich und müssen zuerst durch die sogenannte Akrosomenreaktion (AR) freigesetzt werden.

Nach der Spermio-genese im Hoden werden Spermien verschiedenen Veränderungen unterzogen, bevor die Befruchtung der Eizelle in vivo erfolgt. Die Vorbereitung und Kontrolle der AR läßt sich in drei Phasen einteilen. Als erstes werden während des Aufenthaltes in den männlichen Geschlechtsorganen bzw. durch den Kontakt mit dem Seminalplasma die Membranen des Spermiums stabilisiert, um eine frühe Schädigung oder eine AR zu verhindern. Gelangen die Spermien in den weiblichen Genitaltrakt, werden stabilisierende Faktoren entfernt und das Spermium für die AR vorbereitet. Dieser Vorgang wird als Kapazitation bezeichnet. Schließlich wird durch Kontakt mit den Hüllen der Eizelle die AR ausgelöst.

Bisherige Erkenntnisse über den biochemischen Hintergrund und die Regulation dieser drei Phasen sollen im folgenden genauer betrachtet werden. Auf den Einfluß der männlichen Geschlechtsorgane wird zuletzt eingegangen. Zur übersichtlichen Gestaltung werden die den drei Stadien zugrundeliegenden Mechanismen getrennt erläutert. Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß es fließende Übergänge gibt und eine exakte Trennung der verschiedenen Reaktionsketten nicht immer möglich ist.

2.1. Kapazitation

Die Notwendigkeit einer Veränderung von ejakulierten Spermien im weiblichen Genitaltrakt wird 1951 von CHANG und 1952 von AUSTIN festgestellt und Kapazitation genannt. Die Kapazitation befähigt die Spermien zur AR und somit zur Befruchtung. Sie ist beendet, sobald eine AR ausgelöst werden kann. Die Zeitspanne, die zur Kapazitation notwendig ist, variiert von Spezies zu Spezies und ist von den Spermien abhängig, die auch im heterologen Uterus eine Kapazitation gemäß ihrer Herkunft benötigen (SALING u. BEDFORD, 1981). Die Dauer der Kapazitation boviner Spermien wird mit 4 bis 6 Stunden angegeben (FLORMAN u. FIRST, 1988a; PARRISH et al., 1988). Die Kapazitation der einzelnen Spermien eines Ejakulates verläuft asynchron, da zu verschiedenen Zeitpunkten AR auftreten können. Der Zyklus von Kapazitation und AR mit anschließendem Zelltod verläuft unterschiedlich schnell innerhalb der Spermienpopulation eines Ejakulates. Dies ermöglicht eine Bereitstellung von kapazitierten Spermien zu verschiedenen Zeitpunkten im weiblichen Genitaltrakt und eine flexible Anpassung an den Ovulationszeitpunkt (DIDION u. GRAVES, 1986). Das Milieu des Uterus während der östrischen Zyklusphase wirkt sich vorteilhaft auf die Kapazitation aus, während eine hohe Progesteronkonzentration einen negativen Einfluß zeigt (CHANG, 1958).

Morphologische Veränderungen an den Spermien, die einen Hinweis auf die Kapazitation liefern, können selbst elektronenmikroskopisch nicht festgestellt werden (BEDFORD, 1967). Es ist anzunehmen, daß mikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen an den Membranoberflächen der Spermien stattfinden, die einen Abbau der Membranstabilität bedingen. Die Kapazitation kann als Gleichgewichtszustand zwischen stabilen Membranverhältnissen vor der Ejakulation und der AR angesehen werden (BEDFORD, 1970).

Die Spermienmembranen (Plasmamembran und akrosomale Membran) bestehen, wie andere Zellmembranen auch, aus einer Lipiddoppelschicht aus Phospholipiden, Cholesterin und Glykolipiden. In diese integriert sind Glykoproteine, wobei die Kohlenhydratseitenketten nach außen bzw. ins Akrosominnere gerichtet sind und hier eine negative Oberflächenladung bewirken. Außerdem befinden sich nicht-kovalent gebundene Glykoproteine und Polysaccharide auf der Oberfläche. Die Proteine sind innerhalb der Membranen lateral beweglich ("fluid mosaic" Modell von Singer und Nicholson).

Einige Autoren sind der Meinung, daß die Kapazitation hauptsächlich durch Entfernung von Seminalplasma-proteinen auf der Spermienmembran zustande kommt. Bereits 1957 stellt CHANG fest, daß Seminalplasma die Kapazitation verhindern kann. Diese "Dekapazitation" ist reversibel, sobald die Spermien wieder in den weiblichen Genitaltrakt verbracht werden. Werden kapazitierte

Spermien erneut mit Seminalplasma versetzt, kann keine AR ausgelöst werden. Dies deutet an, daß ein Dekapazitationsfaktor des Seminalplasmas Rezeptoren für Induktoren der AR auf der Spermienoberfläche maskiert oder diese auf andere Weise stabilisiert (BEDFORD, 1969). Die Entfernung dieser Faktoren von der Membranoberfläche durch Verdünnung im weiblichen Genitaltrakt ist ein wichtiger Aspekt für die Kapazitation (JOHNSON u. HUNTER, 1972; OLIPHANT u. BRACKETT, 1973).

Neuere Untersuchungen stellen immer mehr die Rolle verschiedener Seminalplasmaproteine in den Vordergrund (MANJUNATH et al., 1994; THEREN et al., 1995). Auch komplexe transversale Umverteilungen von Membranbestandteilen sind bekannt. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, das an die Zona pellucida bindet, wird während der Kapazitation von der äußeren akrosomalen Membran zur Plasmamembran transportiert. Erst nach dieser Modifikation ist das Spermium zur Bindung an die Eizelle fähig (SPUNGIN et al., 1995).

Die Membranstabilität wird zum großen Teil auch durch das Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden bedingt. Ein hoher Gehalt an Cholesterin in der Membran erhöht ihre Stabilität (DAVIS, 1976). Die Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von Phospholipiden führt zu einer Destabilisierung der Membran. Die Entfernung des Cholesterins aus der Plasmamembran resultiert in einer Änderung der Membranfluidität und -permeabilität. Die Entfernung des Cholesterins, unter Verwendung von Liposomen, kann eine Kapazitation erwirken. Im weiblichen Genitaltrakt kommt es wahrscheinlich durch eine Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase bzw. durch verschiedene Lipidtransferproteine in der Follikelflüssigkeit zur Entfernung des Cholesterins aus der Spermienmembran (LANGLAIS u. ROBERTS, 1985; EHRENWALD et al., 1988).

2.1.1. Biochemische Aspekte der Kapazitation (siehe auch Abb. 2, S. 20)

Während der Kapazitation kommt es zu einer Abnahme der negativen Oberflächenladung (VAIDYA et al., 1971) und der Lektinbindung (GORDON et al., 1975). Die Spermien zeigen eine verstärkte Atmungsaktivität (HAMMER u. WILLIAMS, 1963), und die Ionenpermeabilität der Membran wird gesteigert (SUMMERS et al., 1976).

Mehrere Autoren berichten über einen stetigen und langsamen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration während der Kapazitation (ADEOYA-OSIGUWA u. FRASER, 1993; SINGH et al., 1978). Die Hemmung einer membranständigen Ca^{2+} -ATPase, einer Na^+H^+ -ATPase oder eines $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Antiportsystems wird als Ursache angenommen (ROLDAN u. FLEMING, 1989). Die Kapazitation kann in einem calciumfreien Medium stattfinden, allerdings unterstützen Calciumkonzentrationen im mikromolaren Bereich die Kapazitation (DIDION u. GRAVES, 1989). Im Gegensatz dazu sind andere Autoren der Meinung, daß extrazelluläres Calcium essentiell für die Kapazitation ist (YANAGIMACHI, 1982). FRASER stellt 1987 fest, daß die Kapazitation von Mäusespermien Calciumionen in einer Konzentration von $90\mu\text{M}$ benötigt. Speziesspezifische Unterschiede in diesem Punkt sind möglich.

Während der Kapazitation kommt es auch zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes und nachfolgend zu einem erhöhten Calciumeinstrom (BABCOCK u. PFEIFFER, 1987). YANAGIMACHI beschreibt 1988 die Kapazitation als einen Prozeß, der einhergeht mit einer Veränderung der Membranproteine, gesteigerter Fluidität von Komponenten innerhalb der Membran, einem Anstieg des Gehaltes an cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) und einer Hyperaktivierung der Spermienbewegung. Inwiefern der Anstieg des cAMP-Gehaltes, der Calciumionen und des pH-Wertes während der Kapazitation zusammenhängen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Zur Kapazitation tragen auch Natriumionen bei. Der Einsatz von Monensin als Ionophor für monovalente Ionen führt zu einer Unterstützung der Kapazitation. In der Spermienzellmembran befindet sich eine Na^+K^+ -ATPase, welche Natrium aus der Zelle heraus und Kalium in die Zelle hinein transportiert. Die Hemmung dieser ATPase fördert die Kapazitation durch den Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration (HYNE et al., 1985).

Durch welche Mechanismen die verschiedenen Ionenflüsse über die Membranen geregelt werden, ist noch nicht geklärt. Von großer Bedeutung für die Kapazitation in vivo sind die im weiblichen Genitaltrakt vorhandenen Glykosaminoglykane (GAG) (LEE u. AX, 1984). Die GAG bilden Seitenketten von Proteoglykanen und wurden früher als saure Mukopolysaccharide bezeichnet. Die Saccharidketten aus Aminosackern bedingen eine polyanionische Struktur und Bindung von diversen Kationen. GAG sind in allen Regionen des weiblichen Genitaltraktes als Bestandteile von Proteoglykanen vorhanden und binden an die Spermienoberfläche. Die Konzentration von GAG verändert sich während des Zyklus: Besonders in der östrischen Phase sind vermehrt GAG vorhanden (LEE et al., 1986). Die Kapazitation, die in vitro durch Verwendung von Eileitermedium oder Follikelflüssigkeit ausgelöst werden kann, wird u.a. auch auf GAG zurückgeführt (LENZ et al., 1982; PARRISH et al., 1989).

Von den verschiedenen Regionen des weiblichen Genitaltraktes hat in erster Linie der Eileiter einen Einfluß auf die Kapazitation. In vivo binden Spermien während der Kapazitation mit ihrem apikalen Rand an die Oberfläche von sowohl zilientragenden als auch zilienlosen Eileiterepithelzellen. In vitro kann durch Inkubation mit Eileiterepithelien die Fähigkeit zur Befruchtung längere Zeit (bis zu 30 h) aufrechterhalten werden (POLLARD et al., 1991). Die Bindung dient vermutlich der Selektion der motilen Spermien mit intakter Plasmamembran im präovulatorischen Eileiter und verzögert die AR. Es wird angenommen, daß kontinuierlich Spermien von den Eileiterepithelien freigesetzt werden (HUNTER et al., 1991). Bullenspermien verbleiben bis zu 18h vor der Ovulation im Isthmus des Eileiters. Die Eileiterepithelien sezernieren während des Östrus insbesondere in diesem Bereich ein Glykoprotein von 85-95 kDa, welches die Kapazitation fördert (KING et al., 1994).

2.1.2. Kapazitation in vitro

Die Kapazitation *in vitro* wurde entwickelt, um die künstliche Befruchtung von Oozyten zu ermöglichen. Bevor Spermien zur In-vitro-Fertilisation (IVF) fähig sind, bedarf es wie *in vivo* einer Kapazitation. Es sind viele verschiedene Substanzen bekannt, die eine Kapazitation induzieren können. BAVISTER berichtet (1969), daß eine spontane Kapazitation möglich ist, ohne besondere Faktoren hinzuzufügen, allerdings enthält sein Verdünnungsmedium Albumin. Dieses ist auch physiologisch im Uterinsekret enthalten und entfaltet eine kapazitierende Wirkung (MEIZEL, 1984).

Es werden in der Folgezeit verschiedene Inkubationsmedien entwickelt, die sich in ihrer Zusammensetzung sehr ähneln. Ein Grundmedium für die IVF wird anhand von Untersuchungen mit Hamsterspermien zusammengestellt und besteht aus Tyrode Medium mit Glucose, Albumin, Laktat und Pyruvat (TALP) (BAVISTER u. YANAGIMACHI, 1977). Später stellt sich heraus, daß die Kapazitation, im Gegensatz zur AR, keine Glukose benötigt (FRASER u. QUINN, 1981). Aufgrund der Annahme, daß die Kapazitation durch Entfernung von Seminalplasmabestandteilen initiiert wird, werden auch Medien mit hoher Osmolarität eingesetzt. Die Inkubation von Spermien in einem Medium mit hoher Ionenstärke (HIS-Medium von BRACKETT u. OLIPHANT, 1975) löst die Oberflächenproteine ab und steigert die Oozytenpenetrationsrate von Kaninchenspermien.

Zahlreiche andere Substanzen werden aufgrund ihrer kapazitierenden Wirkung den verschiedenen Medien zugesetzt. Einige davon sind c-AMP, Calciumionen, Katecholamine, Steroidsulfatase, Neuraminidase. Die beiden zuletzt genannten Enzyme befinden sich im Uterus und führen zu einem Abbau von Neuraminsäure und Sulfaten mit nachfolgendem Abfall der negativen Oberflächenladung, woraus eine Destabilisierung der Membran resultiert (FAROOQUI, 1982).

Schließlich werden auch verschiedene GAG zur Unterstützung der Kapazitation eingesetzt. Zur Familie der GAG, die physiologisch als Seitenketten saurer Mukopolysaccharide vorkommen, gehören Heparin, Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Hyaluronsäure. Sämtliche genannten Substanzen unterstützen die Kapazitation von Kaninchenspermien. Heparin als stark sulfatiertes Polysaccharid hat die effektivste Wirkung auf die Kapazitation von Bullenspermien (MILLER u. AX, 1990). Aber auch ein Zusatz von Hyaluronsäure zum Kapazitationsmedium fördert die IVF-Rate, besonders bei Bullen mit sehr schlechter Fruchtbarkeit (SHAMSUDDIN et al., 1993). In neuerer Zeit werden weitere, die Spermienfunktion beeinflussende Substanzen entdeckt. Interleukin-6 des Menschen fördert die Kapazitation und erhöht die Anzahl sowohl spontaner AR, als auch durch Calciumionophor induzierbarer AR (NAZ u. KAPLAN, 1994). Pentoxifyllin fördert auch die Anzahl an Calciumionophor-induzierter AR (FORD et al., 1994). Bei vielen der genannten Substanzen ist nicht bekannt, über welche Mechanismen sie die Kapazitation fördern.

2.1.3. Kapazitation mit Heparin

Wie bereits oben erwähnt fördert Heparin die Kapazitation. Heparin führt zu einem Verlust von Antigenen auf der Plasmamembran (MILLER u. HUNTER, 1986). Die mehrstündige Inkubation von Spermien mit Heparin erhöht die Fähigkeit zur AR nach entsprechender Induktion und ermöglicht die Befruchtung von Oozyten *in vitro* (PARRISH et al., 1988).

Der biochemische Wirkungsmechanismus von Heparin oder anderen GAG ist noch nicht völlig aufgeklärt. Die Bindung von ³H-Heparin an Bullenspermien wird 1984 von HANDROW et al. nachgewiesen. Diese Bindung unterliegt einer Sättigung, ist reversibel und abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und der Calciumkonzentration. Die Bindungsstellen befinden sich am Spermenschwanz und an der apikalen Spermienmembran. Die Bindungsaffinität entspricht einer Hormon-Rezeptor-Affinität und ist abhängig vom Sulfatierungsgrad des Heparin (MILLER u. AX, 1989). Auf der Plasmamembran werden verschiedene heparinbindende Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten isoliert, die als Heparinrezeptoren angesehen werden (HURST et al., 1988). Die heparinbindenden Proteine scheinen von ihrer Struktur her dem Fibronectin zu ähneln, wie es auch schon auf Humanspermien gefunden wurde (KOEHLER et al., 1980).

Eine zentrale Rolle bei der heparininduzierten Kapazitation von Bullenspermien nimmt wiederum Calcium ein. Der Zusatz von Calcium in micromolaren Konzentrationen ist notwendig. Der Calciumstoffwechsel wird unter anderem durch Calmodulin modifiziert. Dies ist ein calciumbindendes Protein, welches sowohl AR als auch Kapazitation beeinflusst (JONES et al., 1980). Heparin beeinträchtigt die Bindung von Calmodulin an Proteine der Akrosomenmembran und verursacht dadurch eine herabgesetzte Bindung von Calcium an Calmodulin (LECLERC et al., 1989). Heparin erhöht den Gehalt an freiem intrazellulärem Calcium (HANDROW et al., 1989).

Eine weitere intrazelluläre Veränderung bei der Inkubation mittels Heparin ist der Anstieg des pH-Wertes um 0,2-0,4 (HANDROW et al., 1986). Durch gesteigerte Glykolyse kommt es zu einem pH-Abfall, der dem intrazellulären pH-Anstieg der Kapazitation entgegenwirkt. Daher hemmen Glukose bzw. andere glykolytische Substanzen die Kapazitation durch Heparin. Diese Hemmung spielt *in vivo* keine allzu große Rolle, da die Konzentration an Glukose im weiblichen Genitaltrakt sehr gering ist. Eine Inkubation mit Heparin führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes. Durch Zufuhr von cAMP kann die hemmende Wirkung der Glukose auf Bullenspermien aufgehoben werden (UGUZ et al., 1992). Nach wie vor ist ungeklärt, wie Heparin die oben beschriebenen Veränderungen während der Kapazitation (Calcium-, pH-, cAMP-Anstieg) herbeiführt.

2.2. Akrosomenreaktion

2.2.1. Morphologie des Akrosoms und der Akrosomenreaktion (siehe auch Abb.1)

Das Akrosom ist ein abgeflachtes Vesikel, welches kappenförmig den vorderen Abschnitt des Spermienkernes umhüllt. Im Längsschnitt liegen von innen nach außen drei Membranen übereinander. Die innere akrosomale Membran (IAM) liegt auf der Kernmembran. Zwischen ihr und der äußeren akrosomalen Membran (OAM) befindet sich die akrosomale Matrix. Die OAM wird schließlich noch von der Plasmamembran (PM) umgeben. Zwischen der OAM und der Plasmamembran befindet sich ein schmaler cytoplasmatischer Spalt. IAM und OAM gehen am äquatorialen Segment der Spermienzelle ineinander über (SCHÜLKE, 1991).

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Spermienkopfes (Bulle) nach BARTH u. OKO (1989).

Funktionell entspricht das Akrosom einem sekretorischen Vesikel mit lytischen Enzymen, dessen Membran auf einen adäquaten Stimulus hin mit der Plasmamembran fusioniert. Tatsächlich entsteht das Akrosom während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat, welcher auch in anderen sekretorischen Zellen die sezernierten Vesikel bildet. Das Akrosom erfüllt eine Speicherfunktion für Enzyme und Proteine, die während der Kapazitation und der AR exponiert werden.

BEDFORD beschreibt 1969 als erster die morphologischen Details der echten AR, die sich von der unspezifischen akrosomalen Degeneration unterscheiden. Die AR entspricht einer Exozytose. Es kommt zur Fusion und zur Vesikulation der OAM mit der PM in vielen einzelnen Abschnitten des apikalen Spermienbereiches. Dies führt zur Freisetzung des akrosomalen Inhaltes. Nach der AR bleibt die IAM über dem Spermienkern erhalten (BRACKETT et al., 1978; YANAGIMACHI, 1988). Zur Fusion der Membranen muß die OAM erst den cytoplasmatischen Spalt überwinden. Dazu ist eine Modifizierung von Elementen des Cytoskeletts im cytoplasmatischen Spalt nötig (JAMIL, 1984). Die AR unterscheidet sich von anderen Exozytosevorgängen dadurch, daß sie sehr langsam und asynchron in der Spermienpopulation abläuft. Die Zeitspanne zwischen Stimulation der AR und Membranfusion kann bis zu mehreren Minuten dauern (TALBOT et al., 1976).

Kurz nach Induktion der AR kommt es zu einer Neuverteilung von Glykoproteinen, die durch Modulierung des Cytoskeletts lateral mobilisiert werden (AGUAS u. PINTO DA SILVA, 1985). Die Fusion der Membranen findet in den Bereichen statt, die frei von diesen Glykoproteinen sind. Sie beginnt an der Grenze zwischen dem äquatorialen und dem vorderen Akrosomenabschnitt und breitet sich von dort labyrinthartig aus. An der Initiationsstelle der AR treten auch am ehesten Schädigungen des Akrosoms durch Kälteschock auf (WATSON, 1981). Diese Stelle scheint besonders labil zu sein, während die Region direkt am apikalen Rand mit einer hohen Dichte an Glykoproteinen innerhalb der Membran zuletzt reagiert (FLCHON et al., 1986).

Diverse akrosomale Enzyme werden bei der AR freigesetzt. Hyaluronidase unterstützt das Durchdringen der Cumuluszellschicht, deren Matrix aus Hyaluronsäure besteht. Die Hyaluronidase befindet sich in einer löslichen Fraktion des Akrosoms und wird während der AR an die Umgebung abgegeben (HARRISON, 1983). Hauptbestandteil des Akrosoms ist Akrosin, welches ein Durchdringen der Zona pellucida ermöglicht. Akrosin ist eine Serinproteinase, die im intakten Akrosom fast völlig in einer inaktiven Form (Proakrosin) vorliegt. Ein geringer Prozentsatz des Proakrosins befindet sich auf der Plasmamembran, der größte Anteil ist im Lumen des Akrosoms lokalisiert. Erst durch die Fusion und durch einen Anstieg des pH-Wertes kommt es zur Konvertierung in die aktive Form. Akrosin wirkt dann lytisch auf das umgebende Gewebe. Eine voreilige Lyse von Gewebe während der Kapazitation wird demnach verhindert. Proakrosin wird nicht direkt nach der AR freigesetzt, sondern bleibt einige Minuten über die akrosomale Matrix noch gebunden an die IAM. Der Nachweis der Akrosin-Aktivität dient bei Untersuchungen von LEIDL u. WENDT (1976) zur Beurteilung von Ejakulaten.

2.2.2. Interaktion der Gameten

Die einzelnen Mechanismen, die zur Fusion von Spermium und Eizelle führen, sind noch nicht völlig aufgeklärt. Daß die einzelnen Reaktionen, die zur Befruchtung notwendig sind, wahrscheinlich durch komplementär bindende Moleküle auf den Gameten reguliert werden, wird zwar schon 1913 von LILLIE vorgeschlagen, aber es dauert Jahrzehnte, bis genauere Fakten gefunden werden.

Die Zona pellucida der Säugetiereizellen besteht aus einer komplexen Anordnung von 2-4 verschiedenen Glykoproteinen. Die Interaktionen zwischen Spermium und Eizelle sind bisher bei Gameten der Maus am genauesten untersucht worden. Bei der Maus gibt es 3 verschiedene Glykoproteine, die als ZP1, ZP2 und ZP3 bezeichnet werden. Sie werden von der Eizelle während der Follikelreifung sezerniert (BLEIL u. WASSARMAN, 1983). Neuere Untersuchungen zeigen, daß diese Proteine auch von Granulosazellen synthetisiert

werden können (LEE u. DUNBAR, 1993).

Das Spermium haftet über Rezeptoren auf seiner Oberfläche an eine Bindungsstelle des ZP3. Die AR wird ebenfalls durch ZP3 ausgelöst. Das ZP2 bindet akrosomenreagierte Spermien. Da bei der Maus nur akrosomintakte Spermien an die Zona pellucida haften (SALING et al., 1979), wird vermutet, daß ZP2 zur Bindung der Spermien dient, die nach Bindung an ZP3 akrosomenreagiert sind. ZP1 ist für die Aufrechterhaltung der räumlichen Struktur durch Querverbindungen verantwortlich.

Diese Ergebnisse sind nicht alle auf andere Tierarten übertragbar. Humanspermien binden ebenfalls nur mit intaktem Akrosom an die Zona pellucida (KOEHLER et al., 1982). Aber Meerschwein-, Kaninchen- und Hamsterspermien können auch nach der AR an die Zona pellucida binden (CUMMINS u. YANAGIMACHI, 1982). Dies könnte mit dem Gehalt an akrosomaler Matrix zusammenhängen, da die Bindung an ZP2 über Akrosin erfolgt. Der Verlust der akrosomalen Matrix führt zu einer Fertilitätseinbuße (HARDY et al., 1991). Meerschweinspermien haben, im Gegensatz zu Mäusespermien, große Mengen akrosomaler Matrix. Kaninchenspermien verlieren ihr Akrosom bereits während der Passage durch den Cumulus oophorus. Es kommt zur Modifizierung der Spermienoberfläche, so daß ein an die Zona pellucida bindendes Protein frei wird. Die Eizellender Tierarten, bei denen die Spermien auch nach der AR an die Zona pellucida binden sind von einer sehr dichten Follikelepithelschicht umgeben, für deren Durchdringen möglicherweise die freigesetzten lytischen Enzyme der AR nötig sind (RICHARDSON et al., 1994). Bullenspermien zeigen eine AR nach Bindung an die Zona pellucida (FLORMAN u. STOREY, 1982). Es ist noch nicht geklärt, ob auch bereits akrosomenreagierte bovine Spermien binden können. Allerdings schildert CROZET (1984) nach Betrachtung von in vivo befruchteten Eizellen, daß Spermien in der Umgebung der Zona pellucida ein intaktes Akrosom aufweisen, während nur akrosomenreagierte Spermien innerhalb der Zona pellucida zu finden sind.

Nach der AR kann das Spermium die Zona pellucida durchdringen und den perivitellinen Raum überwinden. Schließlich bindet es mit der äquatorialen Region des Spermienkopfes an die Eizellmembran (YANAGIMACHI, 1988; ARTS et al., 1993). Bei einigen Spezies sind nur akrosomenreagierte Spermien in der Lage, mit ihrem äquatorialen Segment mit der Eizelle zu fusionieren (YANAGIMACHI u. NODA, 1970). Nach dem Eindringen des Spermienkopfes kommt es zum Freisetzen von Kortikalgranula durch die Eizelle. Diese Kortikalreaktion verhindert in den meisten Fällen eine Polyspermie (WASSARMAN, 1987). Die freigesetzten Enzyme führen zu einer Modifikation der Struktur von ZP2 und ZP3, so daß keine weiteren Spermien binden bzw. eindringen können (KOPF u. WILDE, 1990).

Die Interaktion zwischen Proteinen der Zona pellucida und entsprechenden Bindungsstellen auf der Spermienoberfläche entspricht der Ligand-Rezeptor-Bindung anderer Zellen. Das ZP3 als Ligand bindet spezifisch an die Rezeptoren auf der Spermienmembran und löst die AR selbst im nanomolaren Bereich aus (BLEIL u. WASSARMAN, 1986). Das ZP3 besteht aus einem Polypeptidgrundgerüst mit N- und O-gebundenen Oligosaccharidseitenketten und hat ein Molekulargewicht von 83kDa (WASSARMAN, 1994). Als Bindungsstelle für die membranständigen Rezeptoren des Spermiums dient die Kohlenhydratkomponente, während der Proteinanteil von ZP3 die AR auslöst (FLORMAN et al., 1984).

Es werden Proteine auf der Spermienoberfläche verschiedener Tierarten gefunden, die als Rezeptoren für ZP3 angesehen werden können. Beim Eber wird die Galaktosyltransferase auf der Spermienoberfläche als möglicher Rezeptor in Betracht gezogen. Sie bindet an Lactosaminoglykane der Zona pellucida (SHUR u. HALL, 1982). Die Galaktosyltransferase bleibt selbst nach der AR in geringerer Konzentration durch laterale Verteilung in der Spermienmembran erhalten (LOPEZ u. SHUR, 1987). Sie könnte somit auch eine Rolle bei der Bindung von bereits akrosomenreagierten Spermien an die Zona pellucida spielen.

Bei mehreren Tierarten finden sich auf der Spermienoberfläche Lektin-ähnliche Proteine, die an die Zona pellucida binden. Es handelt sich bei diesen um Rezeptorproteine mit einem Molekulargewicht von 14-31 kDa, die aus dem Seminalplasma stammen und bei der Ejakulation an die Spermien binden. Eine Bindung von ZP3 an diese Proteine führt über eine Rezeptoraggregation auf der Spermienoberfläche zur Auslösung der AR. Die Rezeptoren für ZP2 befinden sich auf der IAM. (LEYTON u. SALING, 1989).

Auf der Oberfläche von Humanspermien werden CD59- Moleküle entdeckt. Dies sind Proteine, welche die Membran vor Angriffen des Komplementsystems schützen. Außer einer möglichen Schutzfunktion vor dem Immunsystem im weiblichen Genitaltrakt sind diese Moleküle auch an der Bindung zur Zona pellucida beteiligt, da entsprechende Antikörper diese Bindung hemmen (FENICHEL et al., 1994). Ähnliche Befunde bei anderen Tierarten stehen noch aus.

2.2.3. Biochemische Veränderungen vor und während der AR (siehe Abb. 2; S. 20)

DAN beschreibt bereits 1954 die AR als einen calciumabhängigen Exozytosevorgang. Tatsächlich steht bei sämtlichen Mechanismen, die in vivo und in vitro die AR auslösen, immer wieder Calcium im Mittelpunkt. YANAGIMACHI u. USUI schildern 1974, daß nach einer Kapazitation die AR von Meerschweinspermien ausschließlich durch Calciumionen ausgelöst werden kann. Eine Calciumkonzentration im millimolaren Bereich ist notwendig, um die AR zu ermöglichen (FRASER, 1987). Der Calciumeinstrom wird nach heutigem Standpunkt als der auslösende Faktor der Membranfusion angesehen (ZANEVELD et al., 1991). Über welche Mechanismen die verschiedenen Induktoren der AR einen Calciumeinstrom veranlassen bzw. Calcium die Fusion vermittelt und welche davon in vivo wichtig sind, ist noch nicht geklärt.

ENDO et al. zeigen 1987, daß die Bindung der ZP3-Liganden an die Rezeptoren auf der Spermienoberfläche zu einer Aktivierung von guaninnukleotidbindenden Proteinen (G-Proteinen) führt. Die Aktivierung dieser G-Proteine induziert die AR (KOPF, 1988). Möglich ist

eine direkte Aktivierung von Calciumkanälen durch dieses G-Protein (BABCOCK u. PFEIFFER, 1987). Bisher konnten bei allen untersuchten Säugetierspermien, auch beim Rind, G-Proteine gefunden werden (GARTY et al., 1988). Sie befinden sich in der akrosomalen Region. Eine Inkubation von Bullenspermien mit Pertussis-Toxin (hemmt G-Proteine) verhindert zwar nicht die Bindung an ZP3, aber die AR wird gehemmt, obwohl das Spermium gebunden ist. Das Pertussis-Toxin beeinträchtigt auch die Veränderungen des pH-Wertes und des intrazellulären Calciumgehaltes, die mit der AR bei Bullenspermien einhergehen (FLORMAN et al., 1989).

G-Proteine führen zu Veränderungen in der Zelle durch Bildung von sogenannten "second messenger"-Molekülen. Welche intrazellulären Wege durch die G-Proteine aktiviert werden, ist noch nicht völlig geklärt. Ein second messenger ist cAMP. Es bewirkt die Aktivierung einer Proteinkinase A, die wiederum verschiedene Proteine phosphoryliert (DE JONGE et al., 1991).

Von anderen Zellen ist bekannt, daß G-Proteine auch zur Aktivierung von Phospholipase C führen. Dieses Enzym hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP₃). DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche Enzyme phosphoryliert und dadurch deren Aktivität ändert. InsP₃ führt zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Untersuchungen an Spermien zeigen, daß im frühen Stadium der AR ein Abbau von Phosphatidylinositol stattfindet (ROLDAN u. HARRISON, 1989). Bei Bullenspermien kann die dafür notwendige Phospholipase C nachgewiesen werden. Es kommt zu einer Anreicherung von DAG in der Zelle. Eine Zugabe an DAG erhöht die Anzahl der akrosomenreagierten Spermien bei Induktion durch Ionophor. Der Nachweis der Proteinkinase C bei Spermien gelang bisher noch nicht. Deshalb wird angenommen, daß DAG die Phospholipase A₂ (PLA₂) direkt aktiviert (ROLDAN u. MURASE, 1994). Die calciumabhängige PLA₂ bildet Arachidonsäure und Lysophospholipide durch Abbau von Membranphospholipiden. Diese beiden Abbauprodukte führen zu Störungen im Membranaufbau und zur Fusion. Auch die Bildung von Prostaglandinen in Spermien und die Aktivität von Cyclooxygenase in der Spermienmembran sind inzwischen nachgewiesen. Prostaglandin E führt zur Steigerung der Calciumaufnahme während der Kapazitation (SHALEV et al., 1994).

Die oben beschriebene Reaktionskette benötigt nicht unbedingt die Stimulierung über G-Proteine. Es ist vorstellbar, daß Calciumionophor durch den Calciumeinstrom einen calciumabhängigen Abbau von Phosphatidylinositol einleitet und damit über die Reaktionskette von DAG und PLA₂ zur AR führt (ROLDAN u. HARRISON, 1992). Dies bedingt, daß alle Faktoren, die einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration bei Spermien herbeiführen eine AR auslösen können.

Spermien besitzen verschiedene Ionentransportsysteme innerhalb ihrer Membranen. So wird die Aktivität einer ATP-abhängigen Calciumpumpe (Ca²⁺-ATPase) bei verschiedenen Spezies nachgewiesen. Die Ca²⁺-ATPase von Bullenspermien ist u.a. in der OAM lokalisiert (GORDON et al., 1978). Dieses energieabhängige Transportsystem sorgt für einen niedrigen Calciumgehalt im Cytoplasma der Spermien. Eine Hemmung dieser ATPase führt zu einer Beschleunigung der Kapazitation und Auslösung der AR (VIJAYASARATHY et al., 1980). Im Gegensatz dazu können VIJAYARAGHAVAN et al. (1994) keinen ATP-abhängigen Transport von Calcium in der Spermienmembran feststellen.

Die Ionentransportsysteme führen zur Bildung eines Membranpotentials. Dieses Potential wird, wie bei anderen Zellen auch, durch ungleiche Verteilung von Ionen aufrechterhalten. Eine Na⁺K⁺-ATPase transportiert entgegen dem entsprechenden Konzentrationsgefälle Na⁺ aus der Zelle heraus und K⁺ in die Zelle hinein. Ist die Konzentration an Natriumionen im Außenmedium sehr groß, kann die Konzentrationsdifferenz nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration. Eine Hemmung der ATPase bewirkt dies ebenfalls.

Ein Na⁺Ca²⁺-Antiportsystem wurde bei bovinen Spermien nachgewiesen (RUFO et al., 1984). Ist die intrazelluläre Konzentration an Na⁺-Ionen hoch, wird über diesen Carrier vermehrt Calcium in die Zelle transportiert. Eine hohe Na⁺-Ionen Konzentration im Inkubationsmedium führt auch zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration und ist notwendig zur Induktion einer AR. Als Folge des vermehrten Natriumgehaltes kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. HYNE et al. beschreiben 1984 die Notwendigkeit von mindestens 125 mmol Na⁺ im Medium, um eine AR bei Meerschweinspermien auszulösen.

Eine hohe intrazelluläre Konzentration an Kaliumionen hemmt die Auslösung der AR, eine niedrige Kaliumkonzentration unterstützt die Induktion einer AR. Im weiblichen Genitaltrakt ist die Konzentration an Na⁺-Ionen vor der Ovulation relativ gering, während die Kaliumkonzentration gleichzeitig sehr hoch ist. Dies wirkt einem zu starken Natriumeinstrom entgegen und verhindert so eine vorzeitige AR (FRASER, 1983). Der NaCl-Gehalt im Eileiter wird nach der Ovulation durch die einströmende Follikelflüssigkeit erhöht und der Kaliumgehalt gesenkt. Eine Inkubation von Spermien mit Follikelflüssigkeit kann daher eine AR induzieren, wobei aber auch weitere Bestandteile der Follikelflüssigkeit dazu beitragen (TESARIK, 1985).

Durch die passive Diffusion von Na⁺ entlang dem durch die ATPasen aufgebauten Konzentrationsgefälle kommt es zu einer Ausschleusung an Protonen. Dieses Na⁺H⁺-Antiportsystem führt zur Steigerung des pH-Wertes innerhalb der Zelle. Eine hohe extrazelluläre Natriumkonzentration im Inkubationsmedium erwirkt einen drastischen Anstieg des pH-Wertes im zytoplasmatischen Spalt. Diese Vorgänge ziehen eine Depolarisation des Membranpotentials und eine Öffnung von Calciumkanälen nach sich. Es handelt sich um spannungsgesteuerte Calciumkanäle, da sie durch einen entsprechenden Antagonisten, Nifedipin, gehemmt werden können. Diese Kanäle spielen nur bei der AR eine Rolle und werden nicht bei der Kapazitation aktiviert. Ein alkalisches Inkubationsmedium kann ebenfalls zur Öffnung dieser spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle führen und damit die AR auslösen (FLORMAN et al., 1992). Es

ist schon länger bekannt, daß das pH-Optimum für die AR im alkalischen Bereich bei 7,5-8,2 liegt. Bei niedrigerem pH-Wert nimmt der Prozentsatz an zur AR fähigen Spermien schnell ab und ist kaum noch vorhanden bei einem pH-Wert von 6,1. Die hohe Protonenkonzentration verhindert die Aufnahme von Calcium, wodurch die AR gehemmt wird (MURPHY, 1984).

Die Bedeutung dieser Ionentransporte in vivo ist noch nicht völlig geklärt. Nach FRASER (1993) wird das Na^+H^+ -Antiportsystem durch die Bindung von kapazitierten Spermien an ZP3 phosphoryliert und damit aktiviert. Der Anstieg des pH-Wertes in der Zelle öffnet wiederum Calciumkanäle und führt damit zur AR. Spermien besitzen auch unspezifische Kanäle für divalente Kationen, die nicht spannungsgesteuert sind. Ein Einstrom von Calcium über diese Kanäle während der Kapazitation könnte das Membranpotential verändern und die spannungsabhängigen Calciumkanäle aktivieren, der anschließende starke Calcium-Influx führt dann zur AR (FLORMAN, 1994).

2.2.4. Weitere Möglichkeiten zur Auslösung der AR

Die Auslösung der AR an der Zona pellucida kann als der natürliche Vorgang betrachtet werden. In vitro können multiple andere Substanzen auch eine AR auslösen. Einige davon sind im weiblichen Genitaltrakt vorhanden und könnten bereits vor dem Kontakt der Spermien mit der Zona pellucida zu vermehrten AR führen. Aufgrund der oben dargestellten Mechanismen, die in vivo zur Auslösung der AR führen, teilt man in vitro die induzierenden Faktoren nach ihrer Wirkungsweise ein (TARIN u. TROUNSON, 1994).

Die physiologischen Induktoren lösen über Membranrezeptoren und/oder "second messenger" die AR aus und sind im weiblichen Genitaltrakt enthalten. Bereits 1969 zeigt YANAGIMACHI, daß Follikelflüssigkeit die AR bei Bullenspermien des Rindes auslösen kann. Follikelflüssigkeit enthält große Mengen an Chondroitinsulfat, welches die AR beim Rind induziert (LENZ et al., 1982).

Glykoproteine in der interzellulären Matrix des Cumulus oophorus können ebenfalls zur Auslösung der AR bei Humanspermien führen (TESARIK, 1985). ANDERSON u. KILLIAN (1994) charakterisieren ein atriales natriuretisches Peptid in der humanen Follikelflüssigkeit als Induktor der AR. Mehrere Faktoren tragen somit dazu bei, daß zum Zeitpunkt der Ovulation und des Zusammentreffens von Spermien und Oozyte eine verstärkte Induktion der AR stattfindet. Ein weiterer physiologischer Faktor ist Progesteron, welches AR bei Humanspermien verursachen kann (BLACKMORE et al., 1990).

Die unphysiologischen Faktoren wirken meist durch direkte Eingriffe in die Lipidstruktur der Membranen. Hierzu gehören Abkühlung und Erhitzen, bzw. der Einfluß von Substanzen wie Ethanol und Lysophosphatidylcholin (LPC) (MEIZEL, 1984). LPC führt zu einer Membrandestabilisierung durch Erhöhung des Anteils an Phospholipiden (s.o). Aufgrund seiner räumlichen Struktur verursacht dieses Phospholipid eine sehr starke Labilität der Membran.

Wie bereits oben beschrieben, ist das Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden wichtig für die Membranstabilität. Eine Erhöhung des Anteils an Phospholipiden führt zu einer Destabilisierung. Die Entfernung von Cholesterin allein vermag nicht die AR auszulösen, erhöht aber den Prozentsatz an AR bei nachfolgender Stimulation. Der Einbau von Dilauroyl-Phosphatidylcholinvesikel (PC12) in die Spermienmembran löst eine AR aus. Diese Methode führt ebenfalls wie Ionophor zu einer raschen calciumabhängigen AR vieler Zellen. Es kommt zu einer Diffusion von Phosphatidylcholin in die äußere Plasmamembran. Die Anreicherung kurzkettiger Lipide verändert die Membraneigenschaften. Eine erhöhte Permeabilität führt dann zu einem Einströmen von Calciumionen (NOLAN et al., 1992).

Einige Substanzen kombinieren physiologische mit unphysiologischen Mechanismen. Hierzu zählen Calciumionophor, hyperosmotisches Medium und Arachidonsäure. Ionophor ist als einer der stärksten Induktoren der AR bekannt. Es bewirkt einen starken Calciumeinstrom, unabhängig von der Kapazitationsdauer. Die Inkubation mit G-Protein-Inhibitoren führt dabei nicht zu einer Hemmung der AR. Calciumionophor löst die AR demzufolge nicht über Aktivierung von G-Proteinen aus (ENDO et al., 1987), es führt aber zu einer Anreicherung von DAG in Schafbockspermien (ROLDAN et al., 1994).

Eine Inkubation mit Heparin kann bereits zahlreiche AR bei Bullenspermien hervorrufen (HANDROW et al., 1982). Dies führt zu der Frage, ob Ejakulate von verschiedenen Bullen sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Heparin unterscheiden und ob dies in Zusammenhang mit der Befruchtungsfähigkeit steht. BLOTTNER et al. (1990) beschreiben die unterschiedliche Fähigkeit von verschiedenen Bullen zur AR nach einer Kapazitation mit Heparin und ermitteln eine Korrelation zur IVF.

2.2.5 Spontane Akrosomenreaktion

Spontane AR zeigen sich während der Inkubation von Spermaproben zur Kapazitation vor Zugabe eines spezifischen auslösenden Faktors. Sie entstehen während der Kapazitation durch wahllose Aggregationen von ZP3-Rezeptoren auf der Spermienoberfläche (LEYTON u. SALING., 1989). Bei Betrachtung der oben genannten Mechanismen, die bei der Kapazitation und AR eine Rolle spielen, ist ersichtlich, daß einige Faktoren, die eine Kapazitation auslösen, auch eine AR bewirken können. Von Bedeutung ist dabei auch die Variabilität der Spermienpopulation eines Ejakulates und die Handhabung dieser Spermien vor und nach der Gefrierkonservierung. Es ist nicht verwunderlich, daß spontane AR bereits zahlreich während der Kapazitation auftreten können.

Untersuchungen an Humanspermien ergeben, daß die Spermien, die in die Zona pellucida eindringen, ihren akrosomalen Inhalt bei der Bindung an diese verlieren. Nur die Spermien, die ihre AR in Nachbarschaft der Zona pellucida durchlaufen, können die Eizelle

penetrieren (FLORMAN u. STOREY, 1982). Eine AR vor Erreichen der Oozyte führt zu einem Verlust der Befruchtungsfähigkeit. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß die spontan auftretende AR eines Spermiums genau zu dem Zeitpunkt eintritt, bei dem dieses die Zona pellucida erreicht. Viele Autoren haben der spontanen AR keine Bedeutung beigemessen. Doch ist ein hoher Anteil an spontaner AR in einigen Ejakulaten gefunden worden. Dies wirkt sich negativ auf die Fruchtbarkeit aus (CUMMINS et al., 1991). Somit sollten bei Laboruntersuchungen im Hinblick auf die Fertilität möglichst wenig spontane AR auftreten und eine große Anzahl von Spermien erst bei adäquatem Stimulus entsprechend reagieren (TESARIK, 1989).

Der Prozentsatz an spontaner AR von Mäusespermien beträgt im Uterus selbst nach stundenlanger Inkubation 8%, während im Eileiter bereits 43% akrosomenreagiert sind, unabhängig von der Aufenthaltsdauer. Dies könnte auch in positivem Zusammenhang mit der Befruchtungsfähigkeit stehen, falls der akrosomale Inhalt dieser Spermien das Durchdringen des Cumulus oophorus für die verbleibenden akrosomintakten Spermien ermöglicht. (KLEMM u. ENGEL, 1991).

2.2.6. Bisherige funktionelle Fertilitätstests

Infertilität wird bei Spermienproben trotz normaler konventioneller Spermienparameter immer wieder beobachtet (JEULIN et al., 1986). Diese Parameter reichen nicht aus, um konkrete Prognosen treffen zu können. Die Entwicklung eines funktionellen Tests von Spermien steht daher im Vordergrund. Der Penetrationstest von Spermien in zonafreie Hamsteroozyten wird zuerst von YANAGIMACHI und MAHI (1976) erläutert. Dieser Test wird häufig eingesetzt, um die in-vitro-Fertilisationsfähigkeit von Ejakulaten des Menschen zu beurteilen und korreliert mit Ergebnissen der IVF. Die Beurteilung von Sperma anhand dieses Tests ist sehr aufwendig und nicht für Routineuntersuchungen von Bullenejakulaten geeignet. Im Gegensatz hierzu finden MARSHBURN et al. (1992) keine Korrelation zwischen diesem Penetrationstest und der IVF von Humanspermien. Auch die IVF ist für eine Routineuntersuchung aufwendig und benötigt Tiermaterial, welches teilweise schwierig zu beschaffen ist. Die Suche nach einfacheren funktionellen Fertilitätstests hält noch an. Im folgenden sind die Versuche aufgelistet, die die Fähigkeit zur Kapazitation und AR in Relation zur Fertilität bringen.

SAACKE (1972) ermittelt an aufgetauten und für 10 Stunden inkubierten Bullenspermien den Prozentsatz an Zellen mit intaktem Akrosom. Sie finden eine signifikante Korrelation zur 90-Tage-NRR der Bullen. Bei einer späteren sehr ähnlichen Untersuchung kann jedoch keine Korrelation zwischen Anzahl an Spermien mit intaktem Akrosom und NRR gefunden werden. Die Betrachtung der Spermien mit intaktem Akrosom liefert keine Aussage darüber, ob und wann diese Spermien eine AR durchlaufen können. Es wird eine hohe Variabilität des zeitlichen Auftretens von AR zwischen den untersuchten Bullen festgestellt. Dies wird auch von den Kapazitationsbedingungen beeinflusst (CUMMING, 1995).

Zahlreiche Autoren ermitteln bei verschiedenen Ansätzen eine Korrelation von diversen Kapazitationsparametern zur NRR. Darunter auch die Anzahl an AR von gefrierkonservierten Bullenspermien nach Inkubation mit Chondroitinsulfat und die Bindungsaffinität für ³H-Heparin (AX et al., 1985; MARKS u. AX, 1985). Der Nachweis der Kapazitation von Bullenspermien durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Mäusespermien gelingt RAJAMAHEDRAN et al. (1994). Diese kreuzreagierenden Antikörper binden nur an kapazitierte Spermien, nicht mehr nach der AR. Es zeigt sich eine Korrelation zwischen IVF-Rate bzw. induzierbarer AR durch LPC und der Bindung von Antikörpern.

Bei vielen weiteren Untersuchungen wird die Fähigkeit zur Oozytenpenetration bzw. die IVF-Rate mit den untersuchten Parametern verglichen. Die Oozytenpenetrationsrate von Bullenspermien korreliert mit der Anzahl an mit Ionophor induzierbarer AR (AITKEN et al., 1987) und dem Prozentsatz an AR nach Induktion durch Lysophosphatidylcholin (PARRISH et al., 1988). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht ohne weiteres aussagekräftig im Hinblick auf die Befruchtung nach künstlicher Besamung. Selbst neueste Arbeiten zeigen, daß beim Bullen keine Korrelation zwischen IVF und NRR besteht (KAWAGUCHI, 1992; SCHNEIDER et al., 1996).

Viele verschiedene Fertilitätstests werden an Humanspermien entwickelt. Das Anliegen dieser Untersuchungen ist die Einschätzung des IVF-Erfolges von Patienten mit Infertilität. Es liegen deutliche Fertilitätsunterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe vor. Dies spiegelt sich in den untersuchten Laborparametern wider. Im Gegensatz dazu liegen bei der Untersuchung verschiedener Zuchtbullen nur geringe Differenzen der Fertilität vor, die schwieriger durch diese Untersuchungen darstellbar sind. Aber die Ergebnisse zeigen, daß ein zu geringer Prozentsatz an AR nach Zugabe von verschiedenen Induktoren z.B. Follikelflüssigkeit oder Ionophor mit einer verminderten Fertilität einhergeht (CALVO et al., 1994; PAMPGLIONE et al., 1993).

Die oben erwähnten Tests und auch andere Ansätze zur Vorhersage von Befruchtungsergebnissen berücksichtigen nicht, daß spontane AR ohne äußeren Stimulus auftreten. Diese AR werden nicht von den induzierten AR unterschieden. Aber der Prozentsatz an spontaner AR variiert stark von Individuum zu Individuum und kann somit die Befruchtungsfähigkeit des Ejakulates beeinflussen (TESARIK, 1989). Deshalb konnte bei einigen Untersuchungen keine Korrelation zwischen gesamter AR (spontaner und induzierter) und Fertilität gefunden werden (FENICHEL et al., 1991; HENKEL et al., 1993). Die Bedeutung der spontanen AR wird auch deutlich bei Experimenten von LIU u. BAKER (1994). Die Anzahl an spontaner AR ist sowohl bei Patienten mit Infertilität als auch bei der Kontrollgruppe gleich hoch. Die Anzahl an durch Ionophor induzierbare AR ist bei der Gruppe mit Infertilität niedriger als bei der Kontrollgruppe. Trotz der Bindung an die Zona pellucida kommt es nicht in erwartetem Maße zur AR. Auch CUMMINS et al. (1991) finden bei subfertilen Männern einen erniedrigten Prozentsatz an induzierbarer AR durch Ionophor nach Abzug der spontanen AR (ARIC-Test = AR nach Stimulation durch Ionophor).

Abb. 2: Hauptprozesse der Kapazitation und Akrosomenreaktion

KAPAZITATION

		Veränderungen der Spermienzelle	
Auslöser:	<i>Wirkung über Rezeptoren ???</i>	- laterale und transversale Proteinumverteilung (Rezeptoren ???) für die AR ???	
in vivo:	GAG, Eileiterepithel ??	- Entfernung von Cholesterin	Folge:
in vitro:	z.B. Heparin, Albumin, HIS-Medium,	- Destabilisierung der Membran - Steigerung der Ionenpermeabilität - intrazellulärer cAMP-Anstieg - intrazellulärer pH-Wert-Anstieg - Hemmung versch. ATPasen	moderater intrazellulärer Ca ²⁺ -Anstieg

??

AKROSOMENREAKTION

		Veränderungen der Spermienzelle	
Auslöser			
in vivo:	ZP3, FF, Progesteron, Cumulus, GAG ???	- Aktivierung von G-Proteinen	direkte Aktivierung von Ca ²⁺ -Kanälen
in vitro:	Calciumionophor, Heparin HIS-Medium, LPC Abkühlen und Erhitzen Arachidonsäure etc.	ZP3 in vivo über Rezeptoraggregation - Hemmung v.ATPasen - pH-Wert-Anstieg	Folge: second messenger Öffnung spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanäle intrazellulärer Ca ²⁺ -Anstieg starker

2.3. Beeinflussung der Spermienfunktion durch Seminalplasma

Seminalplasma ist der spermienfreie Anteil des Ejakulates. Es wird überwiegend von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet und während der Ejakulation den Nebenhodenspermien beigemischt. Beim Bullen sind sowohl Ampulla ductus deferentis als auch die Glandula vesicularis, prostatica und bulbourethralis als akzessorische Geschlechtsdrüsen ausgebildet. Der größte Volumenanteil des Seminalplasmas wird von den Bläßchendrüsen (Glandulae vesiculares) gebildet. Sie sezernieren ein gelatinöses, fruktosehaltiges und alkalisches Sekret. Ein geringerer Anteil des Seminalplasmas wird im Nebenhoden den Spermien beigemischt. Das Seminalplasma ist ein komplex zusammengesetztes Sekret mit Makromolekülen wie Glykoproteinen, Enzymen, Prostaglandinen, Phospholipiden und kleineren Molekülen wie Fruktose, Zitrat, Laktat und verschiedenen Aminosäuren (SCHÜLKE, 1991). Die Wirkung der Seminalplasmabestandteile beschränkt sich nicht nur auf die Spermienfunktion. Das Seminalplasma des Ebers enthält hohe Konzentrationen an Östrogenen. Diese führen beim weiblichen Tier zu myometrialen Kontraktionen und zu einem Anstieg der Östrogenkonzentration im peripheren Blutkreislauf des weiblichen Tieres. Ein Zusammenhang zwischen diesem Östrogenanstieg, Duldung, LH-Freisetzung und Ovulation wird angenommen (CLAUS et al., 1987).

Hodenspermien sind unfähig zur Befruchtung (BEDFORD u. COOPER, 1978). Es bedarf nach Abschluß der Spermio-genese im Hoden einer Reifung der Spermien im Nebenhoden. Die Nebenhodenpassage dauert beim Bullen 8-11 Tage. Während dieser Zeit werden bis zu 90% der alkalischen Hodenflüssigkeit resorbiert. Die Nebenhodenepithelien sezernieren Glykoproteine, Lipide und Enzyme. Es kommt zu einem Verlust des Zytoplasmatropfens und zur Ausdehnung des Akrosoms mit strukturellen Veränderungen an Kopf, Hals und Mittelstück (GARNER u. HAFEZ, 1993). Die Veränderungen im Nebenhoden, besonders die testosteronabhängige Reifung der Spermienmembranen, sind Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit. Die Spermien erlangen hier auch die Fähigkeit zur Bewegung. Beide Eigenschaften werden erst im Nebenhodenschwanz vollständig entwickelt, welcher als Speicher der Spermien anzusehen ist.

Das Seminalplasma enthält sowohl Bestandteile zur Aufrechterhaltung des Spermienstoffwechsels als auch zur Beeinflussung von Kapazitation und AR. Neuere Untersuchungen führten zur Entdeckung zahlreicher hemmender und fördernder Elemente des Seminalplasmas. Es werden hier nur die für Bullensperma bedeutensten Faktoren genannt.

2.3.1. Dekapazitationsfaktoren des Seminalplasmas

Der Zusatz von Seminalplasma zu bereits kapazitierten Spermien hemmt ihre Befruchtungsfähigkeit. Dieser "dekapazitierte" Zustand ist reversibel, und die Spermien können durch abermalige Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt wieder "rekapazitiert" werden (CHANG, 1957). Die Substanzen, die eine Kapazitation reversibel verhindern, werden als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet. Sie stabilisieren die Spermienmembran und verhindern eine vorzeitige Kapazitation während der Passage durch den männlichen Geschlechtstrakt. Erst während der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt wird die Wirkung dieser Faktoren nach und nach aufgehoben.

Nebenhodenspermien benötigen eine Kapazitation, bevor sie befruchten können (WEINMAN u. WILLIAMS, 1964). Eine Stabilisierung der Spermienmembran erfolgt teilweise bereits im Nebenhoden. Die Reifung der Spermien im Nebenhoden beinhaltet eine Einlagerung von Neuraminsäure und Steroidsulfat in die Spermienmembran, die zu ihrer Stabilisierung führt (BEDFORD, 1963; GORDON et al., 1975). Durch Nebenhodenextrakt können Mäusespermien dekapazitiert werden (IWAMATSU u. CHANG, 1969).

HUNTER u. NORNES isolieren 1969 ein Glykoprotein von 170 kDA mit dekapazitierender Wirkung. Spätere Untersuchungen an Kaninchenspermien führen zur Isolation eines Glykoproteins, welches die AR bei Inkubation mit Follikelflüssigkeit hemmt. Dieses Protein wird akrosomstabilisierender Faktor genannt (ASF) (ENG u. OLIPHANT, 1978). ASF hat N-gebundene Seitenketten mit einem hohen Gehalt an Mannose. Dies verleiht dem ASF die Fähigkeit zur Blockierung der Galaktosyltransferase auf der Spermienoberfläche. Die Galaktosyltransferase ermöglicht eine Bindung an die Zona pellucida der Eizelle. Die Aktivität dieses Enzyms ist erst nach erfolgter Kapazitation nachweisbar (SHUR u. HALL, 1982). ASF wird von Epididymalzellen synthetisiert und bindet im Nebenhoden an die Spermien. Es verhindert die AR selbst in den Konzentrationen, die im Sperma nach Verdünnung durch das Seminalplasma der akzessorischen Geschlechtsdrüsen anzutreffen sind (THOMAS et al., 1984).

Eine Inkubation von Spermien mit cholesterinhaltigen Vesikeln führt zur Dekapazitation. Im Seminalplasma des Kaninchens befinden sich lipidhaltige Vesikel, die auf diese Weise die Kapazitation der Spermien verhindern. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Einbau von Cholesterin in die Plasmamembran der Spermien eine Stabilisierung bedingt (DAVIS, 1976). Allerdings erfolgt die Dekapazitation durch die Vesikel langsamer als mit vollständigem Seminalplasma, so daß noch weitere unterstützende Faktoren zu suchen sind. Eine Stabilisierung der Spermienmembran wird auch durch Spermin verursacht. Spermin ist ein reversibel an die Spermienoberfläche bindendes Polyamin, welches die laterale Proteindiffusion innerhalb der Membran von Schafbockspermien hemmt. Dies stabilisiert die Membran, und es kommt vermutlich aufgrund der Blockierung des Phosphatidylinositolabbaus zur Hemmung der Kapazitation. Während der Kapazitation kommt es zu einer Abnahme der Sperminbindung an die Membranoberfläche (RUBINSTEIN u. BREITBART, 1991).

Eine zentrale Rolle bei der Kapazitation, AR und auch Hyperaktivierung der Spermien spielt die Calciumaufnahme. Nebenhodenspermien zeigen im Vergleich zu ejakulierten Spermien einen intensiveren Calciumeinstrom. Die Calciumaufnahme von Nebenhodenspermien wird durch Zugabe von Seminalplasma verhindert (BABCOCK et al., 1979). RUFO et al. (1982) konnten ein alkalisches Protein aus bovinem Seminalplasma isolieren, welches die Calciumaufnahme blockiert und danach benannt wurde (Caltrin = calcium transport inhibitor). Caltrin bindet an die Plasmamembran über dem Akrosom und an Regionen des Spermienchwanzes, allerdings nicht postakrosomal oder über dem Mittelstück. Die Bindung hemmt das $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Antiportsystem der Plasmamembran. Ein frühzeitiger Calciumeinstrom und somit das Initialstadium der AR von Spermien im Seminalplasma wird dadurch gehemmt.

Während der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt kommt es zu einer Konformationsänderung mit resultierender Funktionsänderung des Caltrins. Bei Erreichen der Eizelle fördert Caltrin die Calciumaufnahme in die Zelle und somit die AR (SAN AGUSTIN et al., 1987). Beim leicht sauren pH-Wert des Seminalplasmas (pH = 6,9) enthält dieses amphiphile Molekül hauptsächlich positiv geladene Seitengruppen, an die vermehrt verschiedene Anionen binden. Diverse anionische Kofaktoren des Seminalplasmas unterstützen in unterschiedlichem Maße die Caltrinwirkung. Hauptsächlich Phosphatidylserin verstärkt die hemmende Caltrinfunktion. Werden die anionischen Komponenten entfernt, wird der Calciumeinstrom gefördert (CLARK et al., 1993).

Niedermolekulare Proteine (12-15 kDa) auf der Spermienoberfläche, die einen Einfluß auf die Kapazitation und Bindung an die Zona pellucida haben, werden unter dem Begriff Spermadhäsine zusammengefaßt und stammen überwiegend aus der Bläßchendrüse. Ein solches Spermadhäsin des Bullen ist aSFP (acidic seminal fluid protein). Dieses ist nach der Kapazitation nicht mehr auf der Spermienoberfläche nachweisbar, so daß eine dekapazitierende Wirkung angenommen wird (DOSTALOVA et al., 1994). Die meisten Untersuchungen über Spermadhäsine werden an Eberspermien durchgeführt. Sie unterstützen die Bindung an die Zona pellucida und besitzen heparinbindende Eigenschaften. Ihre Wirkung ist damit eher kapazitationsfördernd. Ähnliche Befunde beim Bullen stehen noch aus (CALVETE et al., 1995).

2.3.2. Kapazitationsfördernde Faktoren des Seminalplasmas

Verschiedene Untersuchungen deuten auf kapazitationsfördernde Faktoren im Seminalplasma hin. Die Bindung der Spermien an die Zona pellucida führt nur zur AR, wenn die Nebenhodenspermien vorher Kontakt mit Seminalplasma hatten (FLORMAN u. FIRST, 1988b). Spermien des Nebenhodenschwanzes benötigen eine wesentlich längere Inkubation mit GAG bis zur AR als ejakulierte Spermien (LENZ et al., 1982; Handrow et al., 1982). Werden Epididymalspermien mit Seminalplasma in Kontakt gebracht und anschließend, nach Abtrennung des Seminalplasmas, mit GAG inkubiert, so benötigen sie eine den ejakulierten Spermien entsprechende Inkubationszeit. Diese kapazitationsfördernde Wirkung des Seminalplasmas wird bereits nach 20 Minuten erreicht. Ein kurzer Kontakt mit dem Seminalplasma reicht daher aus, um die Kapazitation zu unterstützen (LEE et al., 1985)

Heparinbindende Proteine im Bullenseminalplasma sind inzwischen auch bekannt. Sie sind nur auf ejakulierten Spermien nachweisbar und nicht auf Nebenhodenspermien. Eine Inkubation mit diesen Proteinen alleine reicht nicht zur Kapazitation aus. Die Proteine vermitteln die Wirkung des Heparins durch Bindung an die Plasmamembran. Der Zusatz solcher Proteine zu Nebenhodenspermien erhöht die Anzahl an Heparinrezeptoren auf der Spermienoberfläche (MILLER et al., 1990). Dies erklärt auch, warum Heparin nicht in der Lage ist, Nebenhodenspermien zu kapazitieren, obwohl es an diese bindet. Die kapazitierende Wirkung von Heparin zeigt sich bei Nebenhodenspermien, die kurzfristig mit Seminalplasma inkubiert wurden (HANDROW et al., 1984).

Die heparinbindenden Proteine verschiedener Tierarten stimmen mit ihren Molekulargewichten, ihrer Fähigkeit, an Spermien zu binden und ihren lektinähnlichen Eigenschaften größtenteils überein (MILLER u. AX, 1990). Die Fähigkeit zur Heparinbindung dieser Proteine wurde beim Bullen untersucht. Sie fördern die AR bei Kontakt mit der Zona pellucida. Dies gelingt nicht bei Inkubation mit anderen Eiweißen des Seminalplasmas. Sie binden locker an die Spermienoberfläche und können durch hypertones Medium entfernt werden (MILLER et al., 1990). Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Bullen ist es möglich, durch Bindung an die Zona pellucida eine AR bei Hamster- und Mäusespermien des Nebenhodenschwanzes zu induzieren (FLORMAN u. STOREY 1982, WASSARMAN, 1988). Bei dieser Spezies vermitteln Proteine des Nebenhodens eine kapazitationsfördernde Wirkung (FLORMAN u. FIRST 1988b).

Die heparinbindenden niedermolekularen Proteine im Seminalplasma des Bullen werden nach ihrem Molekulargewicht BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 u. BSP-A30 genannt. Die Benennung der Proteine ist noch nicht einheitlich, so wird BSP-A1 auch als PDC-109 bezeichnet. Dieses Protein bindet an ejakulierte Spermien und ist nach der AR nicht mehr auf der Oberfläche der Spermien zu entdecken (CALVETE et al., 1994). MANJUNATH et al. (1994) zeigen, daß diese Proteine an Phospholipide der Plasmamembran binden. Sie beeinflussen dadurch die Aktivität der Phospholipase A₂ und den Phospholipidumsatz der Membranen während Kapazitation und AR. Sie modulieren auch die Kapazitation der Spermien durch Heparin (THEREN et al., 1995).

Im Seminalplasma des Ebers befindet sich von der Bläßchendrüse sezernierte Arylsulfatase. Erst bei der Ejakulation kommt es zum Kontakt der Spermien mit diesem Enzym. Die Arylsulfatase führt zu einer Desulfatierung eines Plasmamembranlipides der Spermien (Seminolipid). Dieses hat einen hohen Anteil an anionischen Seitengruppen, die zur Aufrechterhaltung der negativen Oberflächenladung beitragen. Durch die Enzymaktivität kommt es zur Änderung dieser Ladung und zu einer erhöhten Ionenpermeabilität. Dies fördert Kapazitation und AR (GADELLA et al., 1993). Bovines Seminalplasma enthält β -Glukuronidase in hoher Konzentration. Dieses Enzym bindet in vitro an die Spermienoberfläche und unterstützt das Auflösen des Cumulus oophorus vor der Befruchtung (RETHINASWAMY et al., 1994). Auch eine Aktivität von Phospholipase A₂ wird im Sekret der bovinen Bläßchendrüse nachgewiesen. Phospholipase A₂ kann in der Gegenwart von Heparin die AR auslösen (RÖNKKO et al., 1994).

2.4. Spermienmotilität

2.4.1. Physiologie der Spermienbewegung

Die Bewegungsfähigkeit der Spermien beruht auf der Struktur und Funktion des Spermischwanzes. Radiär angeordnete Mikrotubuli durchziehen den Spermischwanz in seiner vollen Länge. Entsprechend dem Aufbau von Zilien und Geißeln anderer Zellen sind neun äußere Doppeltubuli und zwei zentrale einzelne Mikrotubuli angeordnet. Die Mikrotubulstruktur wird als Axonem bezeichnet. Die Doppeltubuli sind untereinander durch Seitenarme aus Dynein verbunden. Die Bewegung erfolgt nach dem Prinzip des Filamentgleitmodells. Das kontraktile Protein ist Dynein. Dieses Protein zeigt eine ATPase-Aktivität und ist abhängig von zweiwertigen Kationen. Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, so daß es an den nächsten Tubulusabschnitt binden kann. Nach der Abspaltung der Produkte nimmt es wieder die alte Konformation an und verschiebt dabei die Filamente gegeneinander. Eine erneute Bindung von ATP wiederholt den Vorgang.

Die Spermienbewegung ist daher ein energieverbrauchender Prozeß. Substanzen, die in den Energiestoffwechsel der Zelle eingreifen, beeinflussen demnach auch die Motilität von Spermien (SCHÜLKE, 1991). Funktionell sind die verschiedenen Kompartimente des Spermiums vollständig voneinander getrennt. Eine Bewegung des Spermischwanzes erfolgt selbst nach Abtrennung des Kopfes und ohne die an der Basis des Flagellums befindlichen Mitochondrien. Notwendig ist lediglich die Zufuhr von Mg-ATP und Mg-ADP (LINDEMANN u. KANOUS, 1989).

Nach der Ejakulation zeigen Spermien eine deutliche progressive und lineare Vorwärtsbewegung. Dieser Bewegungsablauf ändert sich während der Kapazitation und resultiert schließlich in der hyperaktivierten Bewegung (YANAGIMACHI 1988). Zuerst wird die Änderung des Schwanzschlages im Zusammenhang mit der Kapazitation an Hamsterspermien beobachtet (YANAGIMACHI u. NODA, 1970). Die Hyperaktivierung ist gekennzeichnet durch eine heftige peitschenschlagähnliche Bewegung des Spermischwanzes, größerer Schlagamplitude und eher zirkulären Schwimmbahnen mit achterspurenzeichnender Kopfbewegung. Auch die laterale Kopfauslenkung (ALH) und die Frequenz der Kopfbewegung (BCF) nehmen zu.

Voraussetzung für die Hyperaktivierung ist die Calciumaufnahme der Spermien (YANAGIMACHI u. USUI, 1974; SUAREZ et al., 1983). Durch Zugabe von EDTA zum Inkubationsmedium wird die Motilität gehemmt. Eine Hemmung der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ innerhalb der Spermienmembran fördert die Motilität über die Öffnung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle. Eine Hemmung dieser Kanäle durch Nifedipin hemmt die Motilität (KANWAR et al., 1993). Die Calciumwirkung wird durch Bindung an Calmodulin innerhalb des Spermischwanzes vermittelt (FORRESTER u. BRADLEY, 1980). Die Steuerung des Calciumtransportes durch Caltrin vor und während der Kapazitation wurde oben beschrieben. Caltrin bindet außer am Spermienkopf auch an Regionen des Spermischwanzes und beeinflusst die Motilität. Direkt nach der Ejakulation fördert Caltrin die eher lineare Bewegung der Spermien, indem es einen zu starken Calciumeinstrom verhindert. Im Eileiter unterstützt es die hyperaktivierte Bewegung durch Erhöhung des Calciumeinstromes (CORONEL u. LARDY, 1992).

Die Notwendigkeit des Calciumeinstromes für die Hyperaktivierung bedingt auch eine Abhängigkeit der Motilität vom pH-Wert, da dieser spannungsgesteuerte Calciumkanäle reguliert. Die Motilität nimmt unterhalb eines pH-Wertes von 6,1 ab und ist deutlich gesteigert im alkalischen Medium (MURPHY, 1984; GOLTZ et al., 1988).

Ein weiterer motilitätsregulierender Faktor ist cAMP. Spermien erlangen die Fähigkeit zur Bewegung erst im Nebenhodenschwanz. Während der Passage durch den Nebenhoden wird der Gehalt an cAMP erhöht, und die Epithelien sezernieren einen motilitätsfördernden Faktor (HOSKINS et al., 1978; AMANN et al., 1982). Durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration wird eine Proteinkinase aktiviert, welche die Proteine des Axonems phosphoryliert. Es kommt zur Verstärkung der Motilität und Hyperaktivierung ejakulierter Spermien (YANAGIMACHI, 1988). Substanzen wie Koffein, Theophyllin oder Papaverin hemmen den Abbau von cAMP und halten so die Spermienmotilität über einige Stunden aufrecht.

Die Spermienmotilität kann durch Zusatz verschiedener Substanzen beeinflusst werden, von denen einige in vivo von Bedeutung sind. Follikelflüssigkeit enthält einen motilitätsstimulierenden Faktor (YANAGIMACHI, 1969). Dieser Faktor steigert die ALH und die Geschwindigkeit der Spermien (MCNUTT et al., 1994). Gleiches wird erreicht durch Inkubation von Spermien mit einem Medium, in dem sich vorher Cumuluszellen befanden (FETTEROLF et al., 1994). Spermien, die Cumulus oophorus zugesetzt werden, zeigen ein vermehrtes Kraftpotential (WESTPHAL et al., 1993; STAUSS et al., 1995). Werden Spermien mit isolierten Molekülen des Eileitersekretes inkubiert, kommt es zu einer Steigerung von ALH und BCF (ANDERSON u. KILLIAN, 1994). Die Spermienmotilität wird auch direkt durch die Eileiterepithelien reguliert. Die Spermienpopulationen, die an das Epithel haften, zeigen einen größeren Prozentsatz motiler Spermien als die gesamte Population (THOMAS et al., 1994).

2.4.2. Erfassung der Motilitätsparameter

Unter dem Begriff Motilität von Spermien werden verschiedene Parameter des Bewegungsablaufes zusammengefaßt. Früher wurde lediglich der Anteil vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und unbeweglicher Spermien geschätzt. Die erhaltenen Schätzwerte verschiedener Ejakulate sind nur vergleichbar, wenn sie von dem gleichen Personenkreis durchgeführt werden, da sie stark subjektiv beeinflusst werden.

In den letzten Jahren wurde unter Verwendung verschiedener Techniken versucht, die Beurteilung der Spermienbewegung zu objektivieren. Eine indirekte Messung der Motilität ist durch Erfassung des Streulichtes von Spermien, die durch gebündeltes Licht oder Laserstrahlen wandern, möglich (COOKE u. HALLET, 1976; ROSS et al., 1983). Eine andere Möglichkeit ist, die Bewegung von Spermien auf Videoaufnahmen festzuhalten und anschließend auszuwerten. (KATZ u. DOTT, 1975, RIEMKE, 1984). Die zeitaufwendige Auswertung dieser Aufnahmen wurde durch den Einsatz von Computern beschleunigt. Eine Auswertung digitalisierter

Filmaufnahmen von Bullenspermien per Computer erfolgt bereits 1977 durch LIU u. WARME.

Schließlich kommt es zur Entwicklung computergesteuerter Videomikrographiesysteme, mit denen eine objektivere und auch wesentlich schnellere Erfassung der Spermienmotilität ermöglicht wird (RIEMKE u. LEIDL, 1985; RATH et al., 1987). Zur Durchführung einer Messung wird verdünntes Sperma in eine 10 µm tiefe Makler-Kammer gegeben und im Phasenkontrastmikroskop mit einer Videokamera aufgenommen. Durch Mehrfachbelichtung werden mehrere Aufnahmen angefertigt. Die Köpfe der motilen Spermien werden mehrmals hintereinander an verschiedenen Positionen dargestellt, während immotile Spermien nur auf der gleichen Stelle erscheinen. Das analoge Bild wird vom Computer digitalisiert und die verschiedenen Motilitätsparameter berechnet. Die Erkennung der Spermienzelle erfolgt über den Grauwert, die Größe und den Bewegungsablauf der Kopfflächen.

Von den verschiedenen erfaßbaren Parametern seien hier nur einige genannt. Neben der Geschwindigkeit in µm/s wird die Linearität aus der Abweichung des tatsächlichen Spermienweges von der kürzesten Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt der Bewegungsbahn errechnet. Je geradliniger die Bahn, desto höher ist der Linearitätswert. Ein weiteres Maß für das Bewegungsmuster ist die laterale Pendelbewegung des Spermienkopfes. Sie wird errechnet aus der maximalen Kopfauslenkung in µm gegenüber dem Kurvenmittel der Spermienbahn. Zusätzlich wird die Frequenz der Kopfbewegung in Hz ermittelt.

Ein Vergleich zwischen geschätzten Motilitätsparametern und der computergesteuerten Motilitätsanalyse erfolgt durch MATHUR et al. (1986). Die "computerized sperm motion analysis" (CASA) wird unter Verwendung von Cellsoft Software durchgeführt. Es ergeben sich sowohl eine gute Wiederholbarkeit der Meßwerte als auch eine Korrelation zur geschätzten Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien. Zusätzlich kann die Geschwindigkeit der Spermien ermittelt werden. Auch BUDWORTH et al. (1988) beschreiben das Cellsoft System als ein präzises und akurates Meßsystem für die Bewegungsparameter von Bullenspermien, sofern der Verdünner gefiltert wird und eine entsprechend hohe Anzahl an Spermien und Bildern zur Messung genutzt wird.

Ein Problem videomikrographischer Spermienfassung stellt der im Verdünner häufig enthaltene Eidotter dar. Die Eidotterpartikel erscheinen im mikroskopischen Bild ähnlich wie Spermienköpfe und werden als immotile Spermien wahrgenommen. Eine zusätzliche Erkennung der Spermien aufgrund ihres Schwanzes erfolgt beim "Strömberg-Mika cell motion analysis system". Die Spermien werden in diesem Falle eindeutig von Partikeln gleicher Größe im Medium unterschieden (NEUWINGER et al., 1990; KRAUSE et al., 1993).

Auch die diversen computergestützten Analysesysteme sind noch subjektiv durch den Untersucher beeinflussbar. Wichtig ist die Verdünnung der Samenprobe vor der Untersuchung und die Einstellung der Softwareparameter. Diese sollten möglichst konstant gehalten werden. Anhaltspunkte liefern die Grundeinstellungen der Meßparameter für verdünnte Spermienproben von RATH et al. (1987).

2.4.3. Beziehung der Motilität zur Befruchtung

Beim natürlichen Deckakt setzt der Bulle das Ejakulat innerhalb der Scheide ab. Die Spermien benötigen ihre Vorwärtsbeweglichkeit zum Durchwandern der Zervix. Heutzutage erfolgt die Rinderzucht fast ausschließlich durch künstliche Besamung, bei der die Spermienprobe in den Uterus oder in den hinteren Zervixabschnitt inseminiert wird. Für den Weitertransport der Spermien zum Eileiter ist die Motilität nicht so entscheidend, da sie größtenteils auch passiv aufgrund der Uterusmotorik weitertransportiert werden können und selbst immotile Spermien den Eileiter erreichen (BAKER u. DEGEN, 1972). Im günstigsten Falle erfolgt die künstliche Besamung einige Stunden vor der Ovulation, so daß die Spermien nach der Kapazitation die Eizelle bereits im Eileiter erwarten. Schon 2 Stunden post inseminationem sind die meisten Spermien am Eileiteristhmus angelangt (LARSSON u. LARSSON, 1985).

Die unterschiedliche Anzahl motiler Spermien und die Geschwindigkeit sind somit bis zum Erreichen des Befruchtungsortes von untergeordneter Bedeutung für die Fertilität. Darüberhinaus sind nicht alle immotilen Spermien tot. Größere Bedeutung erlangt die Motilität innerhalb des Eileiters und beim Befruchtungsvorgang. Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien unterstützt besonders den Transport der Spermien vom Isthmus zur Ampulle des Eileiters (CUMMINS, 1982). Die hyperaktivierte Bewegung nach der Kapazitation liefert die notwendige Antriebskraft zur Penetration der Eizellhüllen (KATZ et al., 1978; FRASER u. QUINN, 1981).

Eine deutliche Motilitätsbeeinträchtigung nach längerer Inkubationsdauer von Humanspermien zeigte sich als Indikator einer schlechten Penetrationsrate (VAN DUREN u. DYONNE, 1987). Die Geschwindigkeit und Linearität motiler Spermien ist höher in Ejakulaten fertiler als in solchen von infertilen Männern. Der Prozentsatz an Spermien mit erhöhter Geschwindigkeit steht dabei eher in Relation zur Fertilität als die Durchschnittsgeschwindigkeit der gesamten Spermienpopulation (MATHUR et al., 1986). Bei einigen Untersuchungen zeigte sich eine Korrelation der Geschwindigkeit mit der Penetration zonafreier Oozyten (FETTEROLF u. ROGERS, 1990) und der IVF (HOLT et al., 1985). Die Möglichkeit einer Fertilitätsprognose nach Insemination von aufgetautem, gefrierkonserviertem Humansperma durch die Untersuchung verschiedener Motilitätsparameter wird von MARSHBURN et al. (1992) erläutert. Besonders die Geschwindigkeit und die absolute Anzahl motiler Spermien der Inseminationsdosis korrelieren mit der Fertilität.

Untersuchungen ergeben eine Korrelation der Amplitude der lateralen Kopfauslenkung (ALH) und dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien mit der Oozytenpenetrationsrate in vitro. Es fand sich jedoch keine Korrelation zur Anzahl von AR nach Induktion durch Ionophor. Die AR und die Oozytenpenetration unterscheiden sich im Hinblick ihrer Beziehung zur Motilität von Humanspermien (AITKEN et al., 1994). Die Erfassung der Motilität gibt einen Hinweis auf eine mögliche Infertilität bzw. herabgesetzte Fertilität. Die Motilität wird nach dem Auftauen gefrierkonservierter Bullenejakulate als Qualitätsparameter verwendet, wobei über 50% vorwärtsbewegliche Spermien als akzeptabel angesehen werden.

2.5. ATP-Haushalt der Spermienzelle

2.5.1. Synthese und Bedeutung von ATP

Adenosintriphosphat (ATP) als energiereiches Substrat ist besonders für die Bewegung des Spermenschwanzes essentiell. Die intrazelluläre ATP-Menge reicht für höchstens 30 Sekunden Bewegung und muß ständig neu synthetisiert werden (RIKMENSPOEL, 1964). Die ATP-Synthese kann in Spermienzellen durch anaeroben und aeroben Abbau glykolytischer Substrate und durch oxidative Phosphorylierung der Atmungskette erfolgen.

Sowohl anaerobe als auch aerobe ATP-Bildung ist bei verschiedenen Säugetierspermien möglich. Bullenspermien sind unter Stickstoff im glucosefreien Medium bewegungslos (SALISBURY u. LODGE 1962). Durch Zugabe von verschiedenen Zuckern bleibt die Motilität unter anaeroben Bedingungen bestehen. Bullenspermien können ihren ATP-Bedarf fast ausschließlich durch anaeroben glykolytischen Abbau von Hexosen decken. Bullensperma weist einen hohen Gehalt an Fruktose auf. Dieser Zucker wird als Hauptenergiequelle für Bullenspermien angesehen, aber Glucose und Mannose können ebenfalls anaerob abgebaut werden. Im weiblichen Genitaltrakt dient Glucose als Energiequelle. Die Enzyme des anaeroben Abbaues befinden sich entsprechend ihrer Bedeutung für die Motilität hauptsächlich im Spermenschwanz und sind im Spermienkopf nur geringfügig vorhanden.

Auch unter aeroben Bedingungen zeigen Bullenspermien eine hohe Glykolyserate mit Bildung von Laktat. Die bei der Glykolyse anfallenden Produkte Pyruvat und Laktat werden dem Citratzyklus zugeführt. Spermien besitzen ein Isoenzym der Laktatdehydrogenase innerhalb der Mitochondrien, welches Laktat zu Pyruvat umwandelt, dieses kann somit bei Anwesenheit von Sauerstoff im Citratzyklus verstoffwechselt werden. Zur Atmungskette können verschiedene Substrate verwendet werden, von denen im männlichen und weiblichen Genitaltrakt genügend vorhanden sind. Der Sauerstoffpartialdruck ist ebenfalls ausreichend. Aber auch im substratfreien Medium bleibt die Atmungskette von Bullenspermien erhalten, sofern Sauerstoff vorhanden ist. In diesem Fall wird die Atmungskette durch Abbau von Fettsäuren aufrechterhalten. Hauptquelle des ATP für die Motilität ist der glykolytische Abbau der Fruktose (SCHÜLKE, 1991).

Obwohl die zur Bildung von ATP notwendigen Enzyme nur in geringem Maße im Spermienkopf vorhanden sind, ist ATP auch für die Regulation der Kapazität und der AR von Bedeutung. Zahlreiche Ionentransportsysteme der Plasmamembran benötigen ATP zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion (ZANEVELD et al., 1991).

2.5.2. ATP-Gehalt von Spermien

Zur Ermittlung der ATP-Konzentration dient das Biolumineszenzverfahren (BROOKS, 1970). Das in der Feuerfliege vorhandene Luciferin wird mittels Luciferase durch Verbrauch von ATP in ein instabiles Produkt überführt, welches sich sofort unter Aussendung von Licht zersetzt. Die Lumineszenz dieser Reaktion ist der ATP-Menge direkt proportional.

Der ATP-Gehalt von Bullenspermien wird zuerst von NEWTON u. ROTHSCILD 1961 bestimmt. Sie geben 12,9 nmol ATP/10⁸ Zellen an. Messungen durch andere Autoren ergeben Variationen von 11 bis 34 nmol ATP /10⁸ Spermien. Dies kann durch Unterschiede der Luziferase-Chargen bedingt sein (HOLM-HANSEN u. KARL, 1978). ATP muß zur Messung aus dem Spermium extrahiert werden. Nach Extraktion durch Erhitzung der Proben sind die Werte niedriger (KÄHN et al., 1982; BERGER, 1983) als bei Säureextraktion (HAMMERSTEDT u. HAY, 1980).

Die ATP- und ADP-Konzentration eines Ejakulates korreliert mit dem Prozentsatz lebender Spermien. Sie korreliert auch mit der Anzahl motiler Spermien der Probe. Es sind aber auch einige immotile, lebende Zellen vorhanden. Die Konzentration des ATP ist entscheidend für die Schlagfrequenz der Spermien (AMELAR et al, 1980). Bei gesteigerter Bewegungsaktivität wird vermehrt ATP verbraucht, und der Gehalt in den Spermien nimmt ab. Liegt ein Substratmangel vor, kann nicht genügend ATP gebildet werden. Beim Vergleich verschiedener Ejakulate bzw. Bullen unter äquivalenten Bedingungen ist ein verminderter ATP-Gehalt ein Indiz für herabgesetzte Spermienqualität. Der ATP-Gehalt nimmt mit erhöhter Inkubationsdauer ab und ist in aufgetauten Proben deutlich niedriger als vor der Gefrierkonservierung. Der Einfluß der Gefrierkonservierung kann eher durch Erfassung des ATP-Gehaltes ermittelt werden als durch die Motilitätseinbußen. Mit diesem Parameter lassen sich die durch Gefrierkonservierung erfolgten Noxen sensibler ermitteln als durch Erfassung der Motilität (KÄHN et al., 1982).

Untersuchungen über die Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Fertilität sind widersprüchlich. BERGER ermittelt 1983 eine signifikante positive Korrelation zum ATP-Gehalt, SÖDERQUIST et al. (1991) hingegen finden eine negative Korrelation zur NRR bei Untersuchungen gefrierkonservierter Bullenejakulate, während die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien keine Beziehung zur NRR zeigt.

3. Ziele der eigenen Untersuchungen

Hauptziel dieser Arbeit ist es, Kriterien zu finden, die eine bessere Einschätzung der Fertilität eines Bullen anhand gefrierkonservierter Ejakulate ermöglichen. In Ergänzung dazu wird untersucht, ob die Funktionsfähigkeit der aufgetauten Spermien eines "schlechten" Bullen verbessert werden kann, wenn das homologe Seminalplasma vor der Gefrierkonservierung durch das eines "guten" Bullen ausgetauscht wird.

Aus der Literaturübersicht wird deutlich, daß Spermien vor der Fusion mit der Eizellmembran zahlreiche komplexe biochemische Prozesse durchlaufen müssen. Im Mittelpunkt stehen dabei die zum Durchdringen der Eizellhüllen notwendige AR und die vorangehende Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt. Bei beiden Prozessen spielt die Calciumdynamik eine zentrale Rolle. Kapazitierende Faktoren führen zu einem moderaten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, während ein starker Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration den Fusionsprozessen der AR vorausgeht.

Vor der künstlichen Besamung werden Bullenspermien gefrierkonserviert gelagert. Das Einfrieren der Spermien führt nicht nur zu einem hohen Verlust motiler Spermien, sondern auch zu Veränderungen an der Spermienmembran und zu einem intrazellulären Anstieg der Calciumionenkonzentration (BAILEY u. BUHR, 1993; FULLER u. WHITTINGHAM, 1995). Gefrierkonservierte Spermien kapazitieren daher schneller als frisch ejakulierte Spermien. Die Einwirkung des Gefrierprozesses auf die Spermien ist bei den aufgetauten Proben nicht immer im gleichen Maße zu erkennen, so daß von einer Labilität bestimmter Ejakulate bzw. bestimmter Bullen gegenüber der Gefrierkonservierung ausgegangen werden kann.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit (Versuchsreihe I) wird ein funktioneller Fertilitätstest mit den gefrierkonservierten Bullenejakulaten durchgeführt und die Ergebnisse mit der Non Return Rate (NRR) verglichen. Bisherige funktionelle Fertilitätstests beschränken sich auf die Erhebung des Prozentsatzes von spontaner oder induzierter Akrosomenreaktion. Es ist aber nicht nur von Bedeutung, ob viele Spermien in einer Besamungsportion vorhanden sind, die prinzipiell zur AR fähig sind. Zusätzlich müssen diese Spermien über einen langen Zeitraum die Integrität des Akrosoms trotz externer Stimuli (z.B. auch nach Gefrierkonservierung) aufrechterhalten. Erst bei Kontakt mit der Zona pellucida sollte die AR ausgelöst werden. Findet die AR vor Erreichen der Eizelle, bzw. vor der der Ovulation statt, dann verliert das Spermium den akrosomalen Inhalt zu früh und damit seine Befruchtungsfähigkeit.

Der hier genutzte Fertilitätstest berücksichtigt diesen Aspekt: Nach Inkubation mit Heparin - den GAG im weiblichen Genitaltrakt entsprechend - sollten in der Spermienpopulation möglichst wenige AR auftreten, während die Inkubation mit Calciumionophor bei möglichst vielen Spermien die AR auslösen sollte. Ein weiterer Vorteil des genutzten Fertilitätstestes besteht in der Erfassung der wahren AR, da diese nur, im Gegensatz zur Degeneration post mortem, bei vitalen Spermien berücksichtigt wird.

Zusätzlich zum funktionellen Test wird zur Objektivierung der Motilitätsfassung ein computergestütztes Analysesystem (CASA) eingesetzt. Einen Hinweis auf den Energiestatus der Spermien gestattet die Messung des ATP-Gehaltes. Die mit diesen Methoden ermittelten Spermienparameter werden sowohl vor als auch nach der Kapazitation erfaßt und ebenfalls mit der Non Return Rate (NRR) verglichen.

Im Abschnitt 2.3. wurden einige Bestandteile des Seminalplasmas und deren Funktionen dargestellt. Die individuelle Zusammensetzung des Seminalplasmas, z.B. der Gehalt an heparinbindenden Molekülen, und die dadurch bedingte Beeinflussung der Spermienfunktion spielt eine große Rolle bei der Befruchtungsfähigkeit eines Ejakulates. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit (Versuchsreihe II) werden ausgewählte Bullen mit schlechten Befruchtungsergebnissen herangezogen, um die Wirkung des Seminalplasmas auf die funktionellen Spermienparameter zu untersuchen. Vor der Gefrierkonservierung der Ejakulate dieser Bullen erfolgt ein Austausch des SP durch solches von Bullen mit besseren NRR. Die hierbei anfallenden Varianten werden mit den gleichen Verfahren wie in der ersten Versuchsreihe untersucht.

4. Material und Methoden

4.1. Gewinnung und Aufbereitung der Spermaproben der ersten Versuchsreihe (VR I).

Es wurden 15 Testbullen im Alter von 16 bis 23 Monaten untersucht. Von jedem der Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh wurden drei bis fünf Ejakulate in den Monaten Juli und August 1994 gewonnen. Die Gewinnung erfolgte in wöchentlichem Abstand mittels künstlicher Vagina unter Nutzung des Doppelsprungs. Das Ejakulat wurde zuerst grobsinnlich untersucht. Die Farbe wurde beurteilt, um ungewünschte Beimengungen wie beispielsweise Blut auszuschließen, und die Dichte wurde mittels eines Spermiodensimeters ermittelt. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und die Massenbewegung wurden mikroskopisch geschätzt.

Die uns zugesandten gefrierkonservierten Spermaproben waren wie folgt aufbereitet:

Nach der Gewinnung wurden die Ejakulate jeweils 15 min im Wasserbad bei 32°C inkubiert und auf 15 ml mit Verdünner aufgefüllt. Der Verdünner bestand aus TRIS-Puffer mit 20% Eidotter und 6,6% Glycerol. Zusätzlich enthielt der Verdünner folgende Antibiotika: Tylosin (0,06875 g/l), Gentamycin (0,475 g/l), Spectinomycin (0,6075 g/l) und Lincomycin (0,2194 g/l).

Nach der Endverdünnung (80 Mio Sp./ml) erfolgte die Konfektionierung. Die Spermaproben wurden bei Raumtemperatur in Pailletten mit einem Volumen von 0,25 ml abgefüllt und drei bis vier Stunden bei 5°C gelagert. Anschließend erfolgte das Einfrieren mit Stickstoffdampf bei -120°C und das Umsetzen in flüssigen Stickstoff.

Zusätzlich zur konventionellen Aufbereitung der Ejakulate wurden während dieses Zeitraumes auch Seminalplasma-Proben der Bullen gewonnen. Dazu wurde das native Ejakulat 15 min mit 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum bei 20°C für 15 min zentrifugiert, diesmal mit einer Beschleunigung von 10.000xg. Hiernach wurde der spermienfreie Seminalplasmaüberstand abgehoben und zur späteren Verwendung eingefroren.

4.2. Gewinnung und Aufbereitung der Spermaproben der zweiten Versuchsreihe (VR II)

Von den in der ersten Versuchsreihe untersuchten Bullen wurden die Bullen mit den schlechtesten Non Return Raten (Bullen Nr. 13, 14 und 15) abermals herangezogen, um die Wirkung des Seminalplasmas auf die Fertilität zu eruieren. Es wurden 8 Ejakulate pro Bulle in wöchentlichem Abstand in den Monaten Juni und Juli 1995 gewonnen. Das gefrierkonservierte Seminalplasma der Bullen Nr. 1 bis 10 wurde aufgetaut und gepoolt.

Das native Ejakulat wurde mit 300xg für 15 min zentrifugiert, um es in Spermienfraktion und Seminalplasma-Überstand zu trennen. Der Seminalplasma-Überstand wurde zur Entfernung von Restspermien wiederum bei 10000xg für 15 min zentrifugiert. Von der Spermienfraktion wurden drei Varianten erstellt:

Var. A: Keine Zugabe von Seminalplasma, nur Zugabe von Verdüner.

Var. B: Zugabe von Seminalplasma aus dem Seminalplasmapool der ersten VR (Seminalplasma der Bullen Nr. 1-10).

Var. C: Zugabe von frischem Seminalplasma des jeweiligen Bullen, gewonnen aus dem Ejakulat desselben Tages.

Im Anschluß an den Seminalplasmaaustausch erfolgte die oben bereits beschriebene konventionelle Verdünnung, Abfüllung und Gefrierkonservierung jeder Charge. Die Pailletten mit den verschiedenen Proben wurden codiert beschriftet, um einen möglichen Einfluß durch den Untersucher zu verhindern.

4.3. Erfassung der Non Return Rate

Die in der ersten Versuchsreihe gewonnenen gefrierkonservierten Spermaproben wurden im Zeitraum von Oktober 1994 bis März 1995 eingesetzt. Die Insemination erfolgte nach sachgerechter Überprüfung der spontanen Brunst. Die Spermaproben der verschiedenen Bullen wurden gleichmäßig auf die zu betreuenden Rinderbestände verteilt, um mögliche Einflußfaktoren der verschiedenen Betriebe auszuschließen. Die NRR von Bulle Nr. 10 wurde von vier Ejakulaten, die NRR der Bullen Nr. 1,2 und 7 von drei Ejakulaten und die NRR der restlichen Bullen von fünf Ejakulaten ermittelt.

Es wurden im Durchschnitt 350 Erstbesamungen mit den gewonnenen Ejakulaten pro Bulle durchgeführt. Aus der Anzahl der Rinder, die bis zu 60 Tage post inseminationem nicht zur Zweitbesamung vorgestellt wurden, errechnete sich die Non Return Rate für den Bullen. Die Non Return Rate von allen Ejakulaten eines Bullen wurde nach 60 Tagen ermittelt. Es war leider keine Auswertung der NRR pro Ejakulat möglich.

4.4. In-vitro-Verfahren zur Untersuchung der gefrierkonservierten Spermaproben

Im gleichen Zeitraum, in dem die Spermaproben zur Erfassung der NRR eingesetzt wurden, erfolgte die Untersuchung derselben im Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. Von jedem Bullen wurden 3 der verwendeten Ejakulate untersucht. Die Laborwerte wurden für jedes Ejakulat getrennt ermittelt.

- Jeweils zwei Pailletten des zu untersuchenden Ejakulates (insgesamt 0,5 ml) wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 25 Sekunden in ein 38°C warmes Wasserbad verbracht.

- Nach dem Auftauen wurden die Pailletten aufgeschnitten und der Inhalt beider Pailletten in ein Zentrifugenglas mit einem Durchmesser von 10 mm gegeben. Anschließend wurden die Pailletten mit Inkubationsmedium durchspült und die Spermienprobe im Zentrifugenglas mit Inkubationsmedium auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt (Verdünnung von 1:4).

Als Inkubationsmedium wurde ein modifiziertes Tyrodemedium (BAVISTER u. YANAGIMACHI, 1977) verwendet.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums:

NaCl	112,0	mM
KCl	2,7	mM
NaH ₂ PO ₄	0,4	mM
NaHCO ₃	25,0	mM
MgCl ₂	0,5	mM
Pyruvat	1,0	mM
Laktat	10,0	mM
Glucose	13,8	mM
HEPES	5,0	mM
BSA (Fluka 05471 fraction V)	6,0	g/l

- Die verdünnte Spermaprobe wurde für 10 Minuten im Wasserbad (38°C) inkubiert.

- Danach wurden drei Proben entnommen.

Diese dienten (i) der Erfassung der Akrosomenreaktion (50 µl),

(ii) der Messung des ATP-Gehaltes (50 µl) und

(iii) der Motilitätsanalyse (2 x 5µl).

- Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe im Zentrifugenglas für 8 min bei 1200xg.

- Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig mit 0,6 ml Inkubationsmedium überschichtet. Die Probe wurde in einem Thermoblock bei 38°C für 45 min inkubiert.

Während dieser "Swim-up"-Phase bewegten sich die motilen Spermien aus dem Sediment in das darüberliegende Inkubationsmedium.

- Durch vorsichtige Entnahme von 0,4 ml des Überstandes (Swim-up-Proben) nach der Inkubation war es möglich, überwiegend motile Spermien zu gewinnen.

Dieser Swim-up-Probe wurden wiederum drei Proben entnommen.

Diese dienten (i) der Erfassung der Akrosomenreaktion (50 µl),

(ii) der Messung des ATP-Gehaltes (50 µl) und

(iii) der Motilitätsanalyse (2 x 5 µl).

- Nach Entnahme dieser Proben wurde der Rest der Swim-up-Probe mit 1 IE/ml Spermisuspension Heparin (Sigma H 8514; Herkunft: Darmschleimhaut des Schweines) versetzt.

- Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten, in deren Anschluß abermals eine Probe (50 µl) zur Erfassung der AR entnommen wurde.

- Dem Rest der Swim-up-Spermien wird 2 mM Calciumchlorid und 1µM Calciumionophor A23187 zugegeben. Die Stammlösung enthielt 2 mM Calciumionophor gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma D8779). Sie wurde unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit Inkubationsmedium verdünnt und in einer Konzentration von 5µl/ml Spermisuspension zugesetzt. Die Endkonzentration des DMSO in der Spermisuspension war 0,05%.

- Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten wurde schließlich die letzte Probe (50 µl) zur

Erfassung der Calciumionophor-induzierten Akrosomenreaktion entnommen.

Das Swim-up-Verfahren mußte für die zweite Versuchsreihe aufgrund der schlechten Probenqualität nach dem Auftauen modifiziert werden. In dieser Versuchsreihe wurde das Sediment nach der Zentrifugation wurde mit 0,6 ml Inkubationsmedium resuspendiert und anschließend stehen gelassen. Nach 45 Minuten Inkubation wurde das Zentrifugenglas um 45°C gekippt und die oberen 0,4 ml vorsichtig abgenommen. Dieses Verfahren ermöglichte eine Gewinnung größerer Spermienzahlen.

4.4.1. Erfassung der Akrosomenreaktion

Während des oben beschriebenen Versuchablaufes wurden der aufgetauten und verdünnten Spermaprobe insgesamt vier Proben zur Erfassung der Akrosomenreaktion entnommen:

1. Direkt nach dem Auftauen (aufg)
2. Nach dem Swim up Verfahren (sw)
3. Nach Inkubation mit Heparin (he)
4. Nach Inkubation mit Calciumionophor (ion)

Die Proben (jeweils 50 µl) wurden mit Formol (2% Formaldehyd in phosphatgepufferter NaCl) fixiert. Am gleichen Tag des Versuches erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Spermien wie folgt. Der fixierten Probe wurden jeweils 5 µl entnommen und mit 5 µl des Lebend-Tot-Farbstoffes Hoechst 33258 (Stammlösung 100µg/ml, Sigma B 2883) für 30 s auf einem fettfreien Objektträger vermischt. Von diesem gemischten Tropfen wurde ein Feuchtpräparat angefertigt.

Der normale apikale Rand (NAR) des Spermienakrosoms wurde unter Phasenkontrast-Optik bei 1000facher Vergrößerung beurteilt. Gleichzeitig wurde die Membranintegrität gegenüber dem schnell penetrierenden Hoechst-Farbstoff innerhalb von 10 min nach der Färbung fluoreszenzmikroskopisch erfaßt (Methode nach DE LEEUW et al., 1991). Die gleichzeitige Erfassung des akrosomalen Zustandes und des Eindringens des Hoechst-Farbstoffes ermöglichten die Einteilung von 200 ausgezählten Spermien pro Probe in vier Kategorien. Diese werden in Abb. 3 dargestellt.

Abb. 3: Unterscheidung von vier Spermienkategorien mittels Fluoreszenzmikroskopie (Hoechst-Farbstoff H 33258) unter gleichzeitiger Nutzung der Phasenkontrast-Optik.

```
Grafikname :  
Erstellt in :  
Erstellt am :
```

NAR/leb. = ungefärbte Spermien mit intaktem Akrosom

NAR/tot = gefärbte Spermien mit intaktem Akrosom

AR/leb. = ungefärbte Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand*

AR/tot = gefärbte Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand*

*Von einer Akrosomenreaktion bzw. Akrosomdegeneration post mortem wurde ausgegangen, sofern am Spermienkopf kein deutlich scharfer akrosomaler Rand erkannt werden konnte. Dies beinhaltet sowohl sämtliche Formen von Vesikelbildung im Rahmen der AR, als auch ein vollständig fehlendes Akrosom.

Für jedes untersuchte Ejakulat und für jede der während des Versuchsablaufes gewonnen Proben wurde der prozentuale Anteil von Spermien in jeder der vier Kategorien errechnet. Die gleichzeitige Erfassung der beiden Parameter ermöglicht eine Ermittlung der lebenden Spermien, die eine Akrosomenreaktion zeigen und eine Abgrenzung von der "falschen" Akrosomenreaktion post mortem.

4.4.1.1. Kontrollversuche:

Von vier der 15 Bullen wurden Wiederholungsversuche mit dem gleichen Ejakulat durchgeführt, um die Methodik zu überprüfen. Zur Überprüfung der Wirkung von Heparin und Calciumionophor wurde ein split-sample-Verfahren mit aufgetauten Spermienproben durchgeführt. Da leider nicht von allen Ejakulaten mehr als zwei Pailletten vorhanden waren, konnten nicht genügend swim-up-Spermien gewonnen werden, um ein split-sample-Verfahren mit den zu untersuchenden Bullen durchzuführen. Diese Kontrolle wurde daher mit gefrierkonservierten Ejakulaten des IFN-Schönow durchgeführt. Bei diesen split-sample-Untersuchungen erfolgte parallel zum oben beschriebenen Versuchsablauf die mikroskopische Untersuchung der Proben unter jeweils folgenden Bedingungen:

- Nach 35 min Inkubation ohne Heparin oder Calciumionophor
- Nach 35 min Inkubation mit Heparin ohne Zusatz von Calciumionophor
- Nach 5 min Inkubation ohne Heparin folgt Zusatz von Calciumionophor und weitere 30 min Inkubation

Zur Kontrolle der Wirkung von DMSO und Calciumchlorid erfolgte die mikroskopische Untersuchung unter folgenden Bedingungen:

- Nach 5 min Inkubation mit Heparin folgt Zusatz von DMSO ohne Calciumionophor und weitere 30 min Inkubation.
- Nach 5 min Inkubation mit Heparin folgt Zusatz von Calciumchlorid ohne Calciumionophor und weitere 30 min Inkubation.

Zur Überprüfung des veränderten Swim-up-Verfahrens in der zweiten VR wurden mehrere Pailletten desselben Ejakulates aufgetaut und vermischt. Von diesem Pool wurde dann jeweils das alte und das neue Swim-up-Verfahren parallel durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

```
G r a f i k n a m e :  
E r s t e l l t   i n :  
E r s t e l l t   a m :
```

4.4.2.**Motilitätsanalyse**

Die computergestützte Motilitätsanalyse (CASA) wurde mit einem Strömberg-Mika System und der Software "Cell motion analysis, Version 4.4" durchgeführt (SEIBERT, 1988). Dazu wurden zweimal je 5 µl der Spermaprobe entnommen und in eine vorgewärmte Makler-Kammer pipettiert. Die Bewegung der Spermien wurde bei 37°C unter negativem Phasenkontrast mit einer Videokamera und Videorecorder aufgenommen.

Nach dem Auftauen wurden jeweils vier Gesichtsfelder pro Makler-Kammer aufgezeichnet. Da die Spermienkonzentration in den Swim-up-Proben zum Teil recht gering war, mußten von diesen mehrere Gesichtsfelder aufgenommen werden, um die Werte von mindestens 200 Spermien pro Probe messen zu können. Die gesammelten Aufzeichnungen wurden im Anschluß an den Versuch ausgewertet.

Die Einstellung der Meßparameter der Software war folgende:

FRMAX	32	Anzahl der Bilder pro Sequenz
FRMIN	14*	Anzahl der Bilder, in denen ein Spermium mindestens erkannt werden muß, um gezählt zu werden.
ZEIT [ms]	40	Pausenzeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern

AREAMIN [pix]	30	Untere Flächengrenze des Spermienkopfes
AREAMAX [pix]	250	Obere Flächengrenze des Spermienkopfes
OBJEKTE	HELL	Aufgrund des Mikroskopierverfahrens sind die Spermien heller als der Hintergrund
KLASS [µm/s]	5	Geschwindigkeitsdifferenz für die Klasseneinteilung
IMO [µm/s]	10	Geschwindigkeitsgrenze für immotile Objekte
LOC [µm/s]	30	Geschwindigkeitsgrenze für lokal bewegliche Objekte
TIEFE [µm]	10	Tiefe der Meßkammer
VERDÜNNUNG 1/	1.0	Verdünnungsfaktor der Probe zur Errechnung der Originalkonzentration
TEMPERATUR [°C]	37	Temperatur der Probe

* Bei der Messung der Swim-up-Proben wurde die Mindestanzahl an Bildsequenzen, während der ein Spermium erfaßt wird (FRMIN), von 14 auf 5 herabgesetzt. Dies war erforderlich, da die Spermien aufgrund ihrer teils hohen Geschwindigkeit nur kurz auf dem Bildschirm zu erkennen waren und ansonsten nicht von dem System erfaßt worden wären.

Bei ca. 200facher Vergrößerung können Kopf und Schwanz des Spermiums von dem System unterschieden werden. Das System erkennt das Spermium anhand der Fläche des Spermienkopfes (Pixel) auf dem Bildschirm und führt eine Schwanzerkennung entlang der Spermienlängsachse durch. Zur Berechnung der Motilität wird der Schwerpunkt des Spermiums in einer Bildsequenz von maximal 50 Einzelbildern identifiziert und miteinander verbunden.

4.4.3. Bestimmung des ATP-Gehaltes der Spermien

Die Erfassung des ATP-Gehaltes der Spermien erfolgte mittels des Biolumineszenzverfahrens. Hierzu wurden die entnommenen Proben 1:10 mit Trichloressigsäure-Medium aufgeschlossen. Das Medium enthielt 2 mM EDTA zur Hemmung der ATPasen und 4% Trichloressigsäure.

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben eingefroren. Im Anschluß an die Untersuchung der Ejakulate wurden die gesammelten Proben aufgetaut und 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Tris-Puffer (0,1 M Trisacetat und 2 mM EDTA) verdünnt und bis zur Messung auf Eis gekühlt. Das verwendete ATP-Reagenz (ATP Monitoring Kit 1243-102, Colora) und der ATP-Standard (ATP-Biolumineszenz-Kit 567 736, Boehringer Mannheim) wurden während der Messung in Eiswasser aufbewahrt.

Vor jeder Meßreihe erfolgte die Eichung mittels des Standards. Für jede Messung wurde zuerst der Leerwert der ATP-Reagenz ermittelt. Anschließend wurde die verdünnte Probe hinzugegeben, gut gemischt und die Biolumineszenz gemessen. Die Messung der Luciferin/Luciferase Reaktion erfolgte am Bio-Orbit-Luminometer 1253 der Firma Colora. Aus dem Meßwert und der Zellzahl wurde die ATP-Konzentration der Proben für 10^8 lebende Spermien errechnet.

4.4.4. Bestimmung der Zellkonzentration

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden den für die mikroskopische Untersuchung fixierten Proben 20 µl entnommen und in eine Bürker-Thürk-Kammer gegeben. Es erfolgte die Auszählung von 2x5 Quadraten und die Errechnung der Zellzahl sowohl für die aufgetaute als auch für die Swim-up-Probe. Der Prozentsatz an Spermien, die durch das Swim-up-Verfahren gewonnen werden konnten, wurde errechnet.

4.5. Statistik

Die statistische Beurteilung der erfaßten Daten erfolgte nach Beratung durch Frau Ochsmann, Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung, FU Berlin.

In der ersten Versuchsreihe wurden von den drei untersuchten Ejakulaten jedes Bullen die arithmetischen Mittelwerte (mean) und die Standardabweichung (SD) errechnet. Es wurde der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson für die Stärke des linearen Zusammenhanges zwischen diesen Mittelwerten und der erfaßten NRR ermittelt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den jeweiligen Parametern der aufgetauten Probe im Vergleich zur Swim-up-Probe wurden mittels Welch-t-Test ermittelt. Zum Vergleich der Variation der Werte zwischen den Bullen mit der Variation zwischen den einzelnen Ejakulaten eines Bullen wurde für jeden Parameter eine Varianzanalyse (F-test) durchgeführt.

In der zweiten Versuchsreihe wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der 8 untersuchten Ejakulate für jede Variante errechnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Varianten wurde bei jedem Bullen einzeln mittels Welch-t-Test ermittelt. Der Vergleich zwischen den Bullen und zu den Werten der ersten Versuchsreihe erfolgte ebenfalls mittels Welch-t-Test.

Zur Überprüfung, ob sich der Korrelationskoeffizient jeweils signifikant von Null unterscheidet und zur Beurteilung der t-Werte in der ersten Versuchsreihe wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen. Der kritische Grenzwert des Korrelationskoeffizienten und der kritische Wert der Students-t-Verteilung für die Anwendung des Welch t-Tests wurden aus Tabellen in LORENZ (1988) S. 219 und S. 230 entnommen. Die kritische Grenze des F-Wertes der Varianzanalyse wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen. In der zweiten Versuchsreihe wurden 3 Welch t-Tests parallel durchgeführt und ebenfalls eine globale Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% festgelegt, womit sich für den einzelnen Test eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1,67 % ergibt.

5. Ergebnisse

5.1. Versuchsreihe I (VR I): Spermatologische Parameter verschiedener Bullen in Beziehung zur NRR

Von insgesamt 15 Bullen wurden je 3 bis 5 Ejakulate gewonnen und gefrierkonserviert. Diese Ejakulate wurden zur Ermittlung der NRR verwendet. Die Auflistung der Bullen erfolgt anhand der ermittelten NRR in der Reihenfolge abfallender Fertilität. Diese Reihenfolge wird in allen folgenden Tabellen beibehalten. Die 60-Tage-NRR der Bullen wird in Tabelle Nr. 1 gezeigt. Die NRR von Bulle Nr. 10 wurde von vier Ejakulaten, die NRR der Bullen Nr. 1,2 und 7 von drei Ejakulaten und die NRR der restlichen Bullen von fünf Ejakulaten ermittelt.

Von jedem Bullen wurden 3 der zur Erfassung der NRR verwendeten Ejakulate in vitro untersucht. Da die NRR nicht von jedem Ejakulat einzeln erfaßt wurde, konnte die Korrelation zwischen der Fertilität in vivo und den Ergebnissen in vitro nicht für jedes einzelne Ejakulat ermittelt werden. Stattdessen werden jeweils die Mittelwerte der drei untersuchten Ejakulate in vitro zur Fertilität in vivo korreliert. Der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson der einzelnen Parameter zur NRR aller Bullen wird immer in der letzten Zeile der jeweiligen Tabelle dargestellt. Da der Bulle Nr. 15 von den anderen Bullen stark abweichende Werte aufwies, wird darüber hinaus der Korrelationskoeffizient nur unter Berücksichtigung der ersten 14 Bullen angezeigt. Zusätzlich wird jeweils der Mittelwert (mean) und die Standardabweichung (SD) angegeben. Der größte und kleinste Wert jedes Parameters wird durch einen schraffierten Hintergrund hervorgehoben.

Folgende Abkürzungen werden in den Spaltenköpfen der Tabellen verwendet:

Sp. = Spermien

NAR/leb. = ungefärbte Spermien mit intaktem Akrosom

NAR/tot = gefärbte Spermien mit intaktem Akrosom

AR/leb. = ungefärbte Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

AR/tot = gefärbte Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

lebende Sp. = Summe von NAR/leb. und AR/leb.

tote Sp. = Summe von NAR/tot und AR/tot

vorw.Motil. = vorwärtsbewegliche Spermien

Zuw. = Zuwachs von Schritt zu Schritt des Versuches

5.1.1. Untersuchung der aufgetauten Spermienproben

Im Rahmen der Motilitätsanalyse wurde der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in der aufgetauten Probe erfaßt. Dieser und der bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ermittelte Prozentsatz lebender Spermien werden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: NRR, Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und lebender Spermien der aufgetauten Proben.

(In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher bzw. dem Prozentsatz lebender Spermien und der NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Non Return Rate der Bullen (ermittelt von 3-5 Ejakulaten)

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der aufgetauten Proben (Mittelwert von drei Ejakulaten)

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien der aufgetauten Proben
(NAR/leb. + AR/leb.) (Mittelwert von drei Ejakulaten)

		NRR	vorw. Motil.	lebende Sp.
Bullen		[%]	[%]	[%]
1		77,90	66,33	66,70
2		77,10	54,67	68,78
3		76,76	60,00	65,39
4		73,84	58,00	60,55
5		73,80	62,00	58,63
6		73,25	40,33	64,05
7		72,64	58,33	62,62
8		72,12	40,00	52,95
9		71,71	49,50	55,24
10		71,40	39,33	46,89
11		70,80	49,33	64,67
12		69,39	49,33	63,25
13		68,01	47,00	55,83
14		64,21	67,33	62,83
15		43,21	34,67	80,09
mean		70,41	51,54	61,90
SD		8,03	9,88	7,43
Korrelations-	Bullen 1-15	/	0,46	- 0,48
koeffizient [r]	Bullen 1-14	/	0,12	0,35

Die NRR der Bullen Nr. 1-14 liegen im Bereich von 64% - 78%. Die NRR von Bulle Nr. 15 ist mit 43% deutlich niedriger als bei den anderen Bullen. Die Variation des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien ist größer zwischen den Bullen als zwischen den einzelnen Ejakulaten eines Bullen (F-Wert > 2,5), es liegt jedoch keine signifikante Korrelation zur NRR vor. Gleiches gilt für den Prozentsatz lebender Spermien nach dem Auftauen. Obwohl der Bulle mit der niedrigsten NRR (Bulle Nr. 15) auch den niedrigsten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien hat, so zeigt der vorletzte Bulle in der Reihenfolge der NRR (Bulle Nr. 14) den höchsten Wert in dieser Ergebnisreihe. Der Prozentsatz lebender Spermien ist bei Bulle Nr. 15 mit der niedrigsten NRR größer als bei den anderen Bullen.

Der Prozentsatz motiler Spermien korreliert signifikant mit dem Prozentsatz an ungefärbten Spermien, wenn nur die Bullen Nr. 1-14 betrachtet werden ($r=0,53$; $p<0,05$). Die Ejakulate von Bulle Nr.15 dagegen zeigen trotz niedriger Motilität einen hohen Prozentsatz an lebenden (= ungefärbten) Spermien. Wenn Bulle Nr. 15 aufgrund seiner abweichenden Werte nicht in die Korrelationsberechnung einbezogen wird, verringert sich die Korrelation beider Parameter zur NRR.

Tabelle 2: Spermienkategorien der aufgetauten Proben.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz toter Spermien mit intaktem Akrosom

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

Ergebnisreihe 4: Prozentsatz toter Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

	NAR/leb.	NAR/tot	AR/leb.	AR/tot

Bullen		[%]	[%]	[%]	[%]
1		62,91	10,38	3,79	22,92
2		66,32	10,17	2,47	21,04
3		61,98	11,27	3,41	23,34
4		54,22	14,37	6,33	25,08
5		53,34	16,41	5,29	24,95
6		60,07	9,84	3,98	26,11
7		61,13	17,25	1,48	20,14
8		44,33	21,78	8,63	25,26
9		51,84	14,50	3,41	30,26
10		44,22	7,07	2,68	46,05
11		61,67	16,17	3,00	19,17
12		59,44	16,56	3,81	20,19
13		52,67	11,33	3,17	32,83
14		59,83	15,17	3,00	22,00
15		76,49	9,51	3,60	10,44
mean		58,03	13,45	3,87	24,65
± SD		± 8,01	± 3,77	± 1,68	± 7,56
Korrelations-koeffizient [r]	Bullen 1-15	-0,46	0,14	0,08	0,40
	Bullen 1-14	0,29	-0,29	0,09	-0,14

Direkt nach dem Auftauen zeigt keine der vier Spermienkategorien eine signifikante Korrelation zur NRR. Bei allen vier Parametern sind die Unterschiede zwischen den Bullen nicht signifikant größer im Vergleich zur Variation zwischen den einzelnen Ejakulaten eines Bullen (F-Werte 1,2).

In dieser Tabelle ist ebenfalls zu erkennen, daß Bulle Nr.15 einen vom Mittelwert (58,03 8,01) deutlich abweichenden Prozentsatz an lebenden Spermien mit intaktem Akrosom aufweist. Der negative Korrelationskoeffizient für diese Ergebnisreihe wird positiv, wenn Bulle Nr. 15 aufgrund des abweichenden Wertes nicht in die Berechnung einbezogen wird.

Durch die Differenzierung von vier verschiedenen Spermienkategorien lassen sich einige Unterschiede zwischen den Bullen darstellen. Der Prozentsatz von akrosomintakten lebenden Spermien unterscheidet sich bei den Bullen Nr. 8 und 10 nicht markant voneinander. Betrachtet man aber die anderen Kategorien, dann erkennt man, daß Bulle Nr. 8 mehr tote Spermien mit intaktem Akrosom aufweist als Bulle Nr. 10. Für den Prozentsatz akrosomengeschädigter, toter Spermien sind die Verhältnisse umgekehrt. Die Spermienpopulation dieser beiden Bullen unterscheidet sich somit voneinander, was allein durch die Ermittlung des Prozentsatzes lebender Spermien nicht erfassbar ist.

5.1.2. Ermittlung konventioneller Parameter der Swim-up-Proben

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Spermienkonzentration in der Probe mittels des Strömberg Mika Systems nicht zuverlässig ermittelt werden konnte. Deshalb wurde die Konzentration der Spermien in der Probe nach dem Auftauen und in der Swim-up-Probe durch Verwendung der Bürker-Thürk-Kammer ausgezählt und errechnet.

Die Bestimmung der Spermienkonzentration der aufgetauten Probe ergab eine durchschnittliche Besamungsdosis von $18,43 \times 10^6$ ($4,68 \times 10^6$) Spermien pro Paillette. Als Ausgangszellzahl befand sich im Sediment des Swim-up-Verfahrens die doppelte Besamungsdosis, da für jeden Swim-up 2 Pailletten eines Ejakulates aufgetaut und gepoolt wurden. Als Swim-up % wird der Anteil der Spermien bezeichnet, die von der Ausgangszellzahl in das überschichtete Medium geschwommen sind. Dieser Prozentsatz ist in Tabelle 3 zu sehen. Zusätzlich wird analog zur Tabelle 1 der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und der Prozentsatz lebender Zellen der Swim-up-Probe gezeigt.

Tabelle 3: Prozentsatz der Spermien, die durch das Swim-up-Verfahren gewonnen werden konnten. Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und lebender Spermien in den Swim-up-Proben.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz an Swim-up-Spermien.

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien.

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien (NAR/leb. + AR/leb.).

Bullen		Swim-up%	vorw. Motil.	lebende Sp.
		[%]	[%]	[%]
1		11,33	86,67	77,91
2		5,04	83,00	73,54
3		10,38	74,33	82,89
4		19,28	79,00	66,37
5		11,63	84,67	69,70
6		2,43	82,33	74,03
7		2,01	79,67	68,03
8		1,41	69,67	68,91
9		10,46	85,00	72,50
10		0,91	85,00	64,09
11		4,89	86,33	88,01
12		8,64	83,67	75,12
13		2,64	76,67	70,27
14		8,41	89,00	84,23
15		7,91	84,67	78,55
mean		7,16	81,98	74,28
± SD		± 4,91	± 5,03	± 6,68
Korrelations-	Bullen 1-15	0,06	- 0,21	- 0,22
koeffizient [r]	Bullen 1-14	0,24	- 0,20	- 0,12

Es ist keine signifikante Korrelation zwischen dem erfaßten Swim-up-Prozentsatz, dem Prozentsatz motiler Spermien, dem Prozentsatz lebender Zellen und der NRR vorhanden. Der Prozentsatz an Spermien, der in das Medium hochschwimmt, steht in Zusammenhang mit dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in der aufgetauten Probe ($r=0,55$, $p0,05$). Die Variation des Swim-up-Prozentsatzes zwischen den Bullen ist größer als die Variation zwischen den Ejakulaten, dies gilt nicht für die anderen beiden Parameter. Der Mittelwert des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien in den Swim-up-Proben ist mit $81,98 \pm 5,03$ signifikant erhöht im Vergleich zur Vorwärtsbeweglichkeit der aufgetauten Probe ($51,54 \pm 9,88$). Dies gilt auch für die Anreicherung lebender Spermien in der Swim-up-Probe. Der Mittelwert des Prozentsatzes lebender Spermien in der Swim-up-Probe ist mit $74,28 \pm 6,68$ % im Vergleich zum Prozentsatz der aufgetauten Probe von $61,90 \pm 7,43$ % signifikant höher.

Aufgrund des Swim-up-Verfahrens konnte der Anteil vorwärtsbeweglicher und lebender Spermien in der Population erhöht werden. Allerdings sind im Durchschnitt nur $6,83 \pm 5,74$ % der gesamten Anzahl an Spermien im Zentrifugationssediment ins übergeschichtete Medium hochgeschwommen. Im Vergleich zum durchschnittlichen Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien von $51,54 \pm 9,88$ % der aufgetauten Probe wird deutlich, daß nur ein geringer Anteil der motilen Spermien auf diese Weise gewonnen wird (im Durchschnitt $13,14 \pm 8,44$ %).

5.1.3. Akrosomenreaktion der Swim-up-Spermien

Wie bereits in Tabelle 2 für die aufgetaute Probe gezeigt, wurden die vier Spermienkategorien auch von der Swim-up-Probe (sw) und von den Proben nach Inkubation sowohl mit Heparin (he) als auch nach Inkubation mit Calciumionophor (ion) ermittelt. In den Tabellen 4a und 4b wird jeweils anhand eines Bullen mit hoher (a) und eines Bullen mit niedrigerer (b) NRR die Interpretation der erfaßten Daten vorgenommen.

Tabelle 4a: Spermienkategorien der Swim-up-Probe eines Ejakulates von Bulle Nr.3.

Bulle Nr. 3	NAR/leb. [%]	NAR/tot [%]	AR/leb. [%]	AR/tot [%]
sw*	68,70	11,01	10,87	9,42
he**	42,60	24,80	18,40	14,20
ion***	29,75	25,32	29,75	15,20

sw* = entnommene Probe nach dem Swim up Verfahren

he** = entnommene Probe nach Inkubation mit Heparin

ion*** = entnommene Probe nach Inkubation mit Calciumionophor

Tabelle 4b: Spermienkategorien der Swim-up-Probe eines Ejakulates von Bulle Nr. 13.

Bulle Nr. 13	NAR/leb. [%]	NAR/tot [%]	AR/leb. [%]	AR/tot [%]
sw*	60,49	19,78	6,53	13,19
he**	35,00	22,33	26,00	16,67
ion**	27,33	24,63	28,98	19,05

sw* = entnommene Probe nach dem Swim up Verfahren

he** = entnommene Probe nach Inkubation mit Heparin

ion*** = entnommene Probe nach Inkubation mit Calciumionophor

Betrachtet man den Anteil an akrosomenreagierten Spermien nach der Inkubation mit Calciumionophor, so ist kein deutlicher Unterschied zwischen Bulle Nr. 3 (29,75%) und Bulle Nr. 13 (28,98%) zu erkennen. Aber der Zuwachs an akrosomenreagierten Spermien nach Inkubation mit Heparin beträgt bei ersterem 7,53 %, beim zweiten Bullen jedoch 19,47 %. Die Inkubation mit Calciumionophor induziert dagegen 11,35 % echte Akrosomenreaktionen bei dem ersten Bullen, dagegen nur noch 2,98% bei dem Bullen mit niedrigerer NRR.

Zum Vergleich der Bullen im Hinblick auf die echte Akrosomenreaktion und die Zuwachsrate während des Versuchsablaufes wurde für jedes Bullenejakulat eine Tabelle entsprechend den oben beschriebenen Beispielen erstellt. In Tabelle Nr. 5 werden die Mittelwerte des Prozentsatzes akrosomenreagierter lebender Spermien (AR/leb.) der drei untersuchten Ejakulate für jeden Bullen und für jeden Schritt des Versuches dargestellt.

Tabelle 5: Prozentsatz akrosomenreagierter Spermien nach jedem Inkubationszeitpunkt.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: AR/leb.-Spermien der Swim-up-Probe

Ergebnisreihe 2.: AR/leb.-Spermien nach Inkubation mit Heparin

Ergebnisreihe 3: AR/leb.-Spermien nach zusätzlicher Inkubation mit Calciumionophor.

Bullen	AR/leb. sw [%]	AR/leb. he [%]	AR/leb. ca [%]
1	9,60	23,89	32,74
2	8,57	33,77	41,40
3	13,91	19,45	29,36

4		6,58	22,65	26,44
5		10,36	20,92	35,57
6		7,22	15,09	28,39
7		8,12	21,71	26,54
8		4,95	16,11	17,21
9		7,52	26,72	31,69
10		15,09	22,31	26,86
11		7,82	40,23	41,70
12		7,69	28,30	25,02
13		7,16	22,96	21,58
14		8,85	33,28	27,35
15		8,80	22,45	20,09
mean		8,98	24,66	28,80
± SD		± 2,50	± 6,58	± 6,78
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,10	-0,04	0,47
	Bullen 1-14	0,19	-0,29	0,39

Der Prozentsatz an echter Akrosomenreaktion ist bei den Swim-up-Spermien (Mittelwert = 8,98 % ± 2,50) signifikant höher als in der aufgetauten Probe (Mittelwert = 3,87 ± 1,68), es liegt aber keine signifikante Korrelation zur NRR vor. Auch der Anteil an akrosomenreagierten intakten Spermien nach Inkubation mit Heparin bzw. Calciumionophor zeigt keine signifikante Korrelation zur NRR. Die Variation der Werte für die Akrosomenreaktion in der Swim-up-Probe und nach Inkubation mit Calciumionophor ist zwischen den Bullen nicht größer als zwischen den einzelnen Ejakulaten der Bullen (F-Werte 1,5). Die Akrosomenreaktion nach Zufuhr von Heparin zeigt jedoch deutlichere Unterschiede zwischen den Bullen als zwischen den Ejakulaten (F-Wert = 2,19).

Von größerem Interesse ist die Zunahme der echten AR von Schritt zu Schritt des Versuches (Differenzen zwischen den letzten drei Ergebnisreihen der Tabelle Nr. 5). Dieser durch Heparin bzw. Calciumionophor induzierbare Anteil an echter Akrosomenreaktion wird in Tabelle 6 gezeigt (siehe auch Abb.5).

Tabelle 6: Induzierbare Akrosomenreaktion durch Heparin bzw. Calciumionophor

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Induzierte AR nach Inkubation mit Heparin nach 5 Minuten.

Ergebnisreihe 2: Induzierte AR nach Inkubation mit Calciumionophor nach 30 Minuten.

	Zuw/he	Zuw/ion
Bullen	[%]	[%]
1	14,29	8,85
2	25,20	7,63
3	5,54	9,91
4	16,07	3,78
5	10,56	14,65
6	7,87	13,30
7	13,58	6,35
8	11,16	1,09
9	16,62	3,48
10	4,81	4,55
11	32,41	5,23

12	20,61	0,00	
13	14,47	1,30	
14	24,43	0,00	
15	13,65	0,93	
mean	15,42	5,40	
SD	7,36	4,52	
Korrelationskoeffizient [r]	Bullen 1-15	- 0,07	0,51
	Bullen 1-14	- 0,31	0,67

Der Prozentsatz an Spermien, bei dem erst durch Zugabe von Calciumionophor eine echte Akrosomenreaktion induziert wird, ist signifikant mit der NRR korreliert ($p < 0,05$), sofern 14 der Bullen in die Berechnung mit einbezogen werden. Nimmt man den Bullen Nr. 15 noch hinzu, dann befindet sich der Korrelationskoeffizient unterhalb der Signifikanzschwelle. Der Prozentsatz an Spermien, der durch Heparininduktion eine AR aufweist, korreliert nicht signifikant mit der NRR.

Anhand der Tabelle 6 erkennt man einige Unterschiede zwischen den Bullen. Wenn man beispielsweise die Bullen Nr. 2 und 4 betrachtet, so wird deutlich, daß beide einen hohen Prozentsatz an AR nach Heparininkubation zeigen, bei Bulle Nr. 2 treten auch nach Zugabe von Calciumionophor noch ca. 8% AR auf, im Gegensatz dazu bei Bulle Nr. 4 nur noch ca. 4%. Bulle Nr. 10 zeigt dagegen sowohl bei Induktion durch Heparin als auch durch Calciumionophor eine relativ geringe Zunahme an AR. Bei einigen Bullen mit schlechterer NRR ist der Prozentsatz der AR nach Heparininkubation bereits sehr hoch, und die Fähigkeit zur AR nach Ionophorzugabe ist vollkommen eingeschränkt (Bullen Nr. 12 und 14). Betrachtet man diese Ergebnisreihe, so wird deutlich, daß bereits bei Bullen mit einer NRR von 69% bzw. 64% keine zusätzliche AR durch Calciumionophor ausgelöst werden kann. Bei noch niedrigerer NRR (Bulle Nr.15) kann dieser Wert nicht noch kleiner werden, wodurch die Korrelation gemindert wird. Eine signifikante Korrelation zur NRR besteht somit nur bei Betrachtung der Bullen Nr. 1-14. Mit Hilfe dieses Parameters lassen sich Fertilitätsunterschiede zwischen den Bullen mit einer NRR $> 60\%$ darstellen. Die Regressionsgerade dieses Parameters wird in der Abb. 5 dargestellt.

Die Interpretation der oben dargestellten Daten wird durch die hohe Variabilität der einzelnen Ejakulate einiger Bullen erschwert. Um dies zu veranschaulichen, wird der mit der NRR signifikant korrelierende Parameter der Zunahme an AR nach Ionophorinkubation für jedes untersuchte Ejakulat einzeln in Tabelle 7 dargestellt.

Bei Betrachtung der einzelnen Werte für jedes Ejakulat in der Tabelle 7 kann man die Bullen in folgende Gruppen einteilen:

Gruppe A (Bullen 1,2,3,5 und 6): Alle drei Ejakulate zeigen einen relativ hohen Zuwachs ($> 3\%$) an AR nach Ionophorinkubation.

Gruppe B (Bullen 4,7,9,10 und 11): Eines der Ejakulate hat einen abweichenden Zuwachs an AR nach Calciumionophor.

Gruppe C (Bullen 8,12,13,14 und 15): Alle drei Ejakulate zeigen einen relativ geringen oder gar keinen Zuwachs ($< 3\%$) an AR nach Calciumionophor.

Tabelle 7: Zuwachs an AR nach Zugabe von Calciumionophor für jedes Ejakulat einzeln dargestellt

Bullen	Zuw./ion für jedes Ejakulat		
	I	II	III
1	7,05	9,15	10,36
2	5,56	6,86	10,47
3	9,08	9,31	11,35
4	0,12	5,46	5,77
5	12,60	14,58	16,78
6	10,81	12,24	16,86
7	0,00	7,26	11,79
8	0,22	1,10	1,96
9	0,00	0,00	10,45
10	1,82	7,27	*

11	0,00	0,00	15,70
12	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,91	2,98
14	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	2,78

* Vom dritten Ejakulat des Bullen Nr. 10 konnten keine Swim-up-Spermien gewonnen werden.

Aufgrund der hohen Variabilität der einzelnen Ejakulate der Bullen in Gruppe B (Mittelfeld der NRR) lassen sich diese nur schwer im Hinblick auf ihre Fertilität beurteilen. Aber trotz der hohen Variation zwischen den Ejakulaten einiger Bullen ist die Variation zwischen den Bullen signifikant größer (F-Wert = 4,27). Dies gilt auch für den Zuwachs an Akrosomenreaktion durch Heparin (siehe Tabelle 6), der aber keine signifikante Korrelation zur NRR aufweist.

5.1.4. Erfassung der Spermienmortalität bzw. -resistenz

Aufgrund der erfaßten Daten für jedes Ejakulat, wie in den Tabellen 4a und 4b exemplarisch dargestellt, läßt sich der Anteil an lebenden Spermien auch nach Inkubation mit Heparin und Calciumionophor bzw. die Zunahme an toten Spermien von Schritt zu Schritt des Versuches ermitteln. Dies wird in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8:

Anteil intakter/lebender und toter Spermien nach der letzten Inkubation des Versuches

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Abnahme des Prozentsatzes lebender Spermien mit intaktem Akrosom während des Versuches nach dem Swim-up-Verfahren.

Ergebnisreihe 2: Abnahme des Prozentsatzes lebender Spermien mit intaktem Akrosom während der Inkubation mit Calciumionophor.

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz übriggebliebener lebender Spermien mit intaktem Akrosom am Ende des Versuches.

Ergebnisreihe 4: Zuwachs des Prozentsatzes toter Spermien (Summe von NAR/tot und AR/tot) während des Versuches nach dem Swim-up-Verfahren.

Ergebnisreihe 5: Prozentsatz toter Spermien am Ende des Versuches (Summe von NAR/tot und AR/tot).

Bullen	Abnahme NAR/leb. [%]	Abnahme NAR/leb. durch Ion. [%]	NAR/leb. Ende Vers. [%]	Zuwachs tote Sp. [%]	Tote Sp. Ende Vers. [%]
1	41,17	10,39	27,14	18,03	40,12
2	44,45	12,54	20,52	05,96	35,74
3	37,55	16,80	31,43	22,10	39,21
4	36,05	11,85	23,74	15,17	49,82
5	43,97	21,07	15,37	17,09	47,39
6	36,49	18,60	30,32	15,32	41,29
7	33,62	13,07	26,28	15,21	47,28

8		36,04	10,73	27,91	23,79	54,88
9		32,96	10,40	28,20	13,50	40,12
10		25,36	12,23	23,65	13,59	49,50
11		54,98	18,21	25,20	21,11	33,10
12		30,64	5,41	36,79	13,30	38,18
13		35,52	9,51	26,26	22,13	51,86
14		35,97	6,50	39,41	17,47	33,24
15		26,60	3,92	43,15	15,30	36,75
mean		36,76	12,08	28,36	16,60	42,56
SD		7,13	4,77	6,93	4,37	6,75
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,45	0,59	- 0,70	- 0,02	0,22
	Bullen 1-14	0,26	0,46	- 0,52	- 0,21	0,04

Es ist eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Prozentsatz lebender akrosomintakter Spermien am Ende des Versuches und der NRR bei Einbeziehung aller Bullen zu erkennen. Wird Bulle Nr. 15 nicht mit einbezogen, so ist diese Korrelation immer noch hoch, liegt aber unterhalb des Signifikanzniveaus. Die NRR ist umso größer, je weniger intakte Spermien während des Versuches erhalten bleiben. Die Abnahme dieser Spermienkategorie während des gesamten Versuches korreliert dagegen nicht mit der NRR, wohl aber die Abnahme nach Zugabe von Calciumionophor, wenn alle Bullen betrachtet werden.

Der Prozentsatz an toten Spermien korreliert nicht signifikant mit der NRR. Dies bedeutet, daß die Abnahme an lebenden/intakten Spermien bei höheren NRR zugunsten der Zunahme an echter Akrosomenreaktion auftritt und nicht, daß bei diesen Bullen vermehrt Spermien während des Versuches sterben. Dies steht im Zusammenhang mit der in Tabelle 6 dargestellten signifikanten positiven Korrelation der NRR zum Prozentsatz an echter AR der durch Calciumionophor induziert werden kann. Die Varianzanalyse ergibt für die Parameter der ersten drei Ergebnisreihen eine größere Variation zwischen den Bullen als zwischen einzelnen Ejakulaten der Bullen. Dies ist nicht der Fall bei den letzten beiden Ergebnisreihen.

5.1.5. Kontrollversuche

a) Kontrolle der Methode.

Der Variationskoeffizient für den Swim-up-Prozentsatz der Wiederholungsversuche mit dem gleichen Ejakulat war 0,08 (Durchschnitt von 4 Wiederholungsversuchen). Diese methodisch bedingte Variation ist im Vergleich mit der Untersuchung verschiedener Ejakulate der Bullen (Variationskoeffizient 0,12-0,78) vernachlässigbar. Der Variationskoeffizient für die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Spermienproben des gleichen Ejakulates war 0,01 (Durchschnitt von 4 Wiederholungsversuchen).

b) Wirkung von Heparin und Calciumionophor.

Die vor der Untersuchung dieser Bullen durchgeführten Kontrollversuche hinsichtlich der Wirkung von Heparin und Calciumionophor wurden durch ein split-sample-Verfahren des gleichen aufgetauten Ejakulates durchgeführt. Dies war bei den zur Untersuchung anstehenden Bullen nicht möglich, da bei diesen nicht genügend Material zur Verfügung stand und eine Swim-up-Probe nicht abermals geteilt werden konnte.

Tabelle 9: Kontrollversuche

(es werden jeweils die Mittelwerte von vier verschiedenen Kontrollversuchen dargestellt)

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz lebender akrosomenreagerter Spermien der Swim-up-Probe

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz lebender akrosomenreagerter Spermien nach jeweils 5 Minuten Inkubation

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender akrosomenreagerter Spermien nach jeweils weiteren 30 Minuten Inkubation

	AR/leb. (sw) [%]	AR/leb. (5 min) [%]	AR/leb. (30 min) [%]
Inkubation ohne Hep., ohne Ca-Ion	8,51	9,00	11,32
Inkubation ohne Hep. mit Ca-Ion	8,51	9,00	15,21
Inkubation mit Hep. ohne Ca-Ion	8,51	21,67	23,57
Inkubation mit Hep., mit Ca-Ion (Kontrolle)	8,51	21,67	34,45

Hep.= Heparin

Ca-Ion = CaCl₂ und Calciumionophor

Der Zuwachs an Akrosomenreaktion lebender Spermien nach Inkubation ohne Heparin oder Calciumionophor oder CaCl₂ über 35 min (insgesamt 2,81%) beträgt 11% des Zuwachses, der bei Zugabe beider Induktoren erreicht wird (insgesamt 25,94 %). Der Zuwachs nach den letzten 30 min ist mit Calciumionophor und CaCl₂ ungefähr 6fach größer als bei Inkubation nur mit Heparin (1.9% Zuwachs ohne Ca-Ion gegenüber 12,78% Zuwachs mit Ca-Ion). Der Zuwachs an AR bei Zugabe von Calciumionophor ohne vorherige Inkubation mit Heparin ist deutlich niedriger als bei vorheriger Zugabe von Heparin.

c) Kontrolle der Wirkung von DMSO und CaCl₂.

Die Inkubation mit DMSO brachte keine Steigerung des Prozentsatzes an Akrosomenreaktion im Vergleich zu einer Inkubation ohne DMSO. Calciumchlorid konnte bei einer Inkubation über 30 min ohne Ionophorzusatz mit vorheriger Zugabe von Heparin keinen größeren Zuwachs an AR erwirken im Vergleich zur ausgelösten AR durch Heparin.

5.1.6. Ergebnisse der Motilitätsanalyse

Auf den ermittelten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wurde bereits eingegangen. Weitere, mittels computergestützter Motilitätsanalyse erfaßte Parameter beziehen sich in den folgenden Tabellen immer auf die linear motilen Spermien. Die verschiedenen Parameter wurden sowohl von der Probe nach dem Auftauen als auch von den Swim-up-Spermien erfaßt und miteinander verglichen. Bei allen Parametern war die Variation zwischen den Bullen gering und nicht signifikant größer im Vergleich zur Variation zwischen den einzelnen Ejakulaten der Bullen (F-Werte 1,10).

5.1.6.1. Motilitätsparameter der aufgetauten Proben.

Zur Ermittlung der Geschwindigkeit wird zum einen die tatsächlich zurückgelegte Bahn berücksichtigt, zum anderen aber auch der zurückgelegte direkte Weg zwischen Anfangs- und Endpunkt der Bewegung. Die durchschnittliche Kopfschlagfrequenz und seitliche Kopfauslenkung geben zusätzliche Hinweise auf die Bewegung des Spermiums selbst. Die Form der Bewegungsbahn wird durch den WOB-Index (MÄRKLE-RUTZ, 1994) wiedergegeben, der die Zickzackbewegung der Spermien widerspiegelt. Je kleiner dieser Index ist, umso mehr weicht die zurückgelegte Bahn von einer geraden Linie ab.

Tabelle 10: Prozentsatz linear motiler Spermien und die davon ermittelten Geschwindigkeiten der Spermien in der aufgetauten Probe.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR in Tabelle 1 angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz linear motiler Spermien.

Ergebnisreihe 2: VAP (µm/s) = Geschwindigkeit über eine gemittelte Bahn.

Ergebnisreihe 3: VCL (µm/s) = Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn.

Ergebnisreihe 4: VSL (µm/s) = Geschwindigkeit über eine fiktive Bahn, die als Direktverbindung vom ersten zum letzten Meßpunkt errechnet wird.

Bullen		Linear Sp.	VAP	VCL	VSL
		[%]	[µm/s]	[µm/s]	[µm/s]
1		74,67	96,33	104,50	93,67
2		76,67	90,33	111,00	87,00
3		75,00	83,67	99,67	82,00
4		75,33	82,00	96,50	82,33
5		87,00	97,00	116,00	95,33
6		77,67	88,67	117,00	87,33
7		76,33	98,33	108,00	90,00
8		94,33	86,67	105,33	86,00
9		74,00	94,00	109,33	91,00
10		87,67	89,00	98,00	85,33
11		83,67	96,67	112,33	94,67
12		83,33	89,00	107,50	88,00
13		73,00	92,00	106,67	88,00
14		74,67	91,00	108,67	94,67
15		68,67	93,33	105,67	90,00
mean		78,80	91,20	107,08	89,02
SD		6,65	4,71	5,72	4,14
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,35	- 0,14	0,01	- 0,18
	Bullen 1-14	- 0,05	- 0,07	- 0,12	- 0,29

Die ermittelten Geschwindigkeiten der Spermien in den aufgetauten Proben und auch der Prozentsatz linear motiler Spermien korrelieren nicht signifikant mit der NRR.

Tabelle 11: Bewegungsparameter der Spermien in der aufgetauten Probe.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR in Tabelle 1 angegeben.)

Ergebnisreihe 1: ALH (µm) = durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung.

Ergebnisreihe 2: BCF (Hz) = durchschnittliche Kopfschlagfrequenz

Ergebnisreihe 3: WOB-Index (%) = Flattrigkeit (VAP/VCL) x 100

Bullen	ALH	BCF	WOB
	[µm]	[Hz]	[%]
1	2,50	8,33	92,19
2	4,40	8,35	81,38
3	3,47	7,57	83,95
4	3,27	8,20	84,97
5	3,60	8,73	83,62
6	4,23	8,23	75,78
7	3,70	8,00	91,05
8	3,70	8,33	82,28
9	3,15	8,10	85,98

10		3,05	8,55	90,82
11		3,51	8,07	86,05
12		3,41	7,95	82,79
13		3,56	7,80	86,25
14		3,03	7,97	83,74
15		3,02	7,97	88,33
mean		3,44	8,12	85,28
SD		0,46	0,31	4,09
Korrelation- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,28	0,46	- 0,15
	Bullen 1-14	0,15	0,26	0,07

Keiner der in dieser Tabelle dargestellten Parameter korreliert signifikant mit der NRR.

5.1.6.2. Motilitätsparameter der Swim-up-Proben

Tabelle 12: Prozentsatz linear motiler Spermien und die davon ermittelten Geschwindigkeiten der Spermien in der Swim-up-Probe.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR in Tabelle 1 angegeben.)

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz linear motiler Spermien.

Ergebnisreihe 2: VAP ($\mu\text{m/s}$) = Geschwindigkeit über eine gemittelte Bahn.

Ergebnisreihe 3: VCL ($\mu\text{m/s}$) = Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn.

Ergebnisreihe 4: VSL ($\mu\text{m/s}$) = Geschwindigkeit über eine fiktive Bahn, die als Direktverbindung vom ersten zum letzten Meßpunkt errechnet wird.

Bullen	Linear Sp. [%]	VAP [$\mu\text{m/s}$]	VCL [$\mu\text{m/s}$]	VSL [$\mu\text{m/s}$]
1	82,33	112,33	120,00	111,00
2	74,00	100,33	148,50	99,67
3	90,33	115,67	145,33	114,33
4	84,67	110,67	137,33	110,00
5	78,33	106,67	140,33	104,00
6	86,00	86,33	121,33	83,67
7	77,00	103,33	145,50	102,67
8	55,33	91,67	122,33	88,67
9	84,33	106,50	121,00	109,67
10	80,33	114,00	159,00	104,67
11	92,00	128,67	154,00	128,67
12	84,00	120,33	142,50	120,33
13	84,00	111,67	138,67	110,67
14	78,67	97,50	130,67	101,33
15	77,67	122,00	147,00	121,00

mean		80,60	108,51	138,23	107,36
SD		8,26	11,06	12,15	11,37
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,09	- 0,29	- 0,18	- 0,32
	Bullen 1-14	0,01	0,00	- 0,02	- 0,07

Die ermittelten Geschwindigkeiten der Spermien in den Swim-up-Proben und auch der Prozentsatz linear motiler Spermien korrelieren nicht signifikant mit der NRR. Die drei ermittelten Geschwindigkeiten sind im Vergleich zu den aufgetauten Proben (Tabelle Nr. 10) signifikant erhöht (t-Werte > 3). Der Prozentsatz linear motiler Spermien ist dagegen nicht signifikant erhöht. Die Bullen Nr. 2,5,8 und 10 zeigen in den Swim-up-Proben niedrigere Prozentsätze linear motiler Spermien als in der aufgetauten Probe. Bulle Nr. 8 stellt sich als Ausreißer dar, mit einem sehr niedrigen Prozentsatz an linear motilen Spermien in allen drei untersuchten Ejakulaten.

Tabelle 13: Bewegungsparameter der Spermien in der Swim-up-Probe

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR in Tabelle 1 angegeben.)

Ergebnisreihe 1: ALH (μm) = durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung.

Ergebnisreihe 2: BCF (Hz) = durchschnittliche Kopfschlagfrequenz

Ergebnisreihe 3: WOB-Index (%) = Flattrigkeit (VAP/VCL) x 100

Bullen		ALH [μm]	BCF [Hz]	WOB [%]
1		3,90	8,25	93,61
2		6,05	9,25	67,56
3		5,20	8,60	79,59
4		4,60	8,67	80,58
5		5,43	8,80	76,01
6		5,23	9,30	71,15
7		5,85	9,05	71,02
8		4,47	8,90	74,93
9		3,85	8,60	88,02
10		6,15	9,05	71,70
11		4,68	8,93	83,55
12		4,47	8,80	84,44
13		4,46	8,97	80,53
14		4,73	8,87	74,62
15		4,92	8,53	82,94
mean		4,93	8,84	78,69
SD		0,69	0,27	6,92
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,09	0,18	- 0,12
	Bullen 1-14	0,19	- 0,23	0,07

Keiner der in dieser Tabelle dargestellten Parameter korreliert signifikant mit der NRR. Die Amplitude und Frequenz der seitlichen Kopfauslenkung sind im Vergleich zu den Werten der aufgetauten Proben (Tabelle Nr. 11) signifikant erhöht (t-Werte > 3). Die Werte für den WOB-Index sind im Vergleich zu den aufgetauten Proben signifikant niedriger (t-Wert = 3,18). Dies veranschaulicht die Veränderung der Bewegungscharakteristik der Spermien. Sie zeigen eine größere Kopfauslenkung und Frequenz. Der erniedrigte WOB-Index spiegelt den stärkeren Zickzackkurs der kapazitierten Spermien wider.

5.1.7. Bestimmung des ATP-Gehaltes

Der ATP-Gehalt der Spermien wurde sowohl von der aufgetauten Probe als auch von den Spermien der Swim-up-Probe ermittelt. Der ATP-Gehalt toter Spermien ist gering, somit wurde der gemessene ATP-Gehalt der Probe verrechnet mit der Anzahl lebender Spermien dieser Probe.

Weder der ATP-Gehalt der lebenden Spermien in den aufgetauten Proben noch in den Swim-up-Proben korreliert signifikant mit der NRR. Der durchschnittliche ATP-Gehalt der lebenden Spermien ist in der Swim-up-Probe signifikant erhöht im Vergleich zur aufgetauten Probe (t-Wert = 2,54). Die Variation des ATP-Gehaltes sowohl der aufgetauten als auch der Swim-up-Probe ist zwischen den Bullen nicht signifikant größer als die Variation zwischen den einzelnen Ejakulaten eines Bullen (F-Wert aufgetaut = 1,74; F-Wert swim-up = 0,61).

Tabelle 14: ATP-Gehalt der lebenden Spermien.

(Für jeden Bullen wird jeweils der Mittelwert von 3 Ejakulaten dargestellt.)

In den letzten beiden Zeilen sind die Korrelationen zur NRR in Tabelle 1 angegeben.)

Ergebnisreihe 1: ATP-Gehalt pro 10^8 lebende Spermien in der aufgetauten Probe.

Ergebnisreihe 2: ATP-Gehalt pro 10^8 lebende Spermien in der Swim-up-Probe.

Bullen		ATP - aufg. [nmol/ 10^8 Sp.]	ATP - sw [nmol/ 10^8 Sp.]
1		13,92	15,08*
2		9,75	33,48
3		24,43	10,92
4		14,60	14,88
5		15,46	17,26
6		13,92	16,04
7		21,81	22,25
8		24,23	17,10*
9		12,02	24,89
10		14,75	17,70*
11		6,44	14,15
12		8,11	18,97
13		12,68	20,76
14		11,69	26,77
15		14,78	22,93*
mean		14,58	19,55
SD		5,13	5,58
Korrelations- koeffizient [r]	Bullen 1-15	0,12	- 0,24
	Bullen 1-14	0,31	- 0,23

* Aufgrund einer zu geringen Anzahl von Spermien in der Probe mit Trichloressigsäure lag der absolute Gehalt an ATP bei einzelnen Ejakulaten unterhalb des Meßbereiches der Biolumineszenzmethode. In diesem Falle sind nur die Werte von den anderen Ejakulaten des jeweiligen Bullen berücksichtigt worden.

5.2. Versuchsreihe II (VR II): Untersuchung des Seminalplasmaeinflusses

In diesem Versuchsansatz zur Untersuchung der Seminalplasmawirkung auf die Spermienparameter wurden die Bullen Nr. 13, 14 und 15

der ersten Versuchsreihe (VR) erneut zur Ejakulatgewinnung herangezogen. Von jedem Bullen wurden insgesamt 8 verschiedene Ejakulate gewonnen. Diese Ejakulate wurden an 8 aufeinanderfolgenden Wochen jeweils am gleichen Tag von jedem der 3 Bullen gewonnen.

Das Seminalplasma wurde durch Zentrifugation entfernt und von den Spermien wurden jeweils folgende Varianten erstellt:

Var. A: Keine Zugabe von Seminalplasma, nur Zugabe von Verdüner.

Var. B: Zugabe von Seminalplasma aus dem Seminalplasmapool der ersten VR (Seminalplasma von Bullen mit höherer NRR).

Var. C: Zugabe von frischem Seminalplasma des jeweiligen Bullen, gewonnen aus dem Ejakulat desselben Tages.

Die Untersuchungen in vitro wurde analog zur ersten VR durchgeführt. Die Beurteilung der Ergebnisse wird nach der Darstellung der Werte in Tabellen immer nach folgendem Schema durchgeführt:

(i) Betrachtung der Unterschiede zwischen den Varianten bei jedem Bullen (Einfluß des Seminalplasmas).

(ii) Betrachtung der Unterschiede zwischen den Bullen bei jeder Variante.

(iii) Vergleich der Werte der Variante C zu den jeweiligen Ergebnissen dieser Bullen in der ersten Versuchsreihe.

In den Tabellen dieser VR werden der Mittelwert (mean) und die Standardabweichung (SD) der 8 Ejakulate für jeden Bullen dargestellt. Die Bezeichnung der Spaltenüberschriften erfolgt wie in der ersten VR. Die Werte einer Variante, die sich signifikant von den anderen beiden Varianten bei dem entsprechenden Bullen unterscheiden, sind schraffiert unterlegt.

5.2.1. Untersuchung der aufgetauten Proben

Der Prozentsatz motiler Spermien wurde mit Hilfe des Strömberg Mika Systems ermittelt. In einigen Proben der zweiten VR waren vermehrt Spermien mit abgeknickten Schwänzen vorhanden (siehe unter 5.2.1.1), die sich rückwärts bewegten, vom Strömberg Mika System fälschlicherweise als vorwärtsbewegliche Spermien erfaßt wurden. Daher wird in dieser VR der Begriff motile Spermien verwendet. Die Anzahl an Spermien pro Paillette war in dieser Versuchsreihe noch höher als in der ersten (Mittelwert = $22,3 \times 10^6$ $6,3 \times 10^6$).

Wie in der ersten VR erläutert, konnte durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mittels Hoechst-Farbstoff auch der Prozentsatz lebender Spermien jeder aufgetauten Probe ermittelt werden. Beide Parameter sind für die drei Varianten in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Prozentsatz motiler und lebender Spermien der aufgetauten Proben

Ergebnisreihen 1-3: Prozentsatz motiler Spermien der aufgetauten Proben.

Ergebnisreihen 4-5: Prozentsatz lebender Spermien der aufgetauten Proben.

Bullen	Motil			lebende Sp.		
	Var. A [%]	Var. B [%]	Var. C [%]	Var. A [%]	Var. B [%]	Var. C [%]
13	26 ± 10	24 ± 8	27 ± 16	50 ± 8	44 ± 9	49 ± 10
14	37 ± 15	38 ± 19	45 ± 18	64 ± 10	62 ± 12	62 ± 6
15	28 ± 10	38 ± 11	40 ± 12	65 ± 7	66 ± 9	63 ± 8

(i) Die Untersuchung der aufgetauten Proben läßt keinen Einfluß des Seminalplasmas auf die Spermien erkennen. Bei allen drei Bullen zeigt weder der Prozentsatz motiler Spermien noch der Prozentsatz lebender Spermien einen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten.

(ii) Bulle Nr. 13 hat sowohl einen niedrigeren Prozentsatz motiler als auch lebender Spermien in allen drei Varianten im Vergleich zu

den anderen beiden Bullen.

(iii) Im Vergleich zur ersten VR (Tabelle Nr. 1) ist der Prozentsatz motiler Spermien signifikant niedriger bei den Bullen Nr. 13 und 14. Bulle Nr. 15 zeigte bereits in der ersten VR einen sehr niedrigen Prozentsatz, welches hier ebenfalls für alle Varianten der Fall ist. Der Prozentsatz lebender Spermien ist nur bei dem Bullen Nr. 15 signifikant niedriger als in der ersten VR, bei den Bullen Nr. 13 und 14 ist dieser auch niedriger aber die Unterschiede sind nicht signifikant.

Von jeder aufgetauten Probe wurde zusätzlich zur Hoechst-Färbung auch der Zustand des akrosomalen Randes untersucht und die Spermien analog zur ersten VR in vier verschiedene Spermienkategorien eingeteilt.

Tabelle 16: Fluoreszenzmikroskopisch erfaßte Spermienvarianten der aufgetauten Proben.

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz toter Spermien mit intaktem Akrosom

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

Ergebnisreihe 4: Prozentsatz toter Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand

Bulle Nr. 13				
Var.	NAR/leb. [%]	NAR/tot [%]	AR/leb. [%]	AR/tot [%]
A	44 ± 10	10 ± 3	7 ± 2	40 ± 9
B	37 ± 8	12 ± 6	10 ± 1	43 ± 7
C	39 ± 9	12 ± 4	10 ± 5	39 ± 9

Bulle Nr. 14				
Var.	NAR/leb. [%]	NAR/tot [%]	AR/leb. [%]	AR/tot [%]
A	57 ± 9	16 ± 7	7 ± 3	20 ± 4
B	55 ± 12	15 ± 6	6 ± 3	23 ± 8
C	56 ± 9	15 ± 5	7 ± 4	23 ± 3

Bulle Nr. 15				
Var.	NAR/leb. [%]	NAR/tot [%]	AR/leb. [%]	AR/tot [%]
A	58 ± 7	10 ± 2	7 ± 3	24 ± 6
B	58 ± 7	9 ± 3	9 ± 3	24 ± 8
C	58 ± 7	14 ± 4	6 ± 4	21 ± 5

(i) Auch bei Betrachtung des akrosomalen Randes der aufgetauten Proben ist kein Einfluß des Seminalplasmas zu erkennen. Der einzige signifikante Unterschied ist bei dem Bullen Nr. 13 zu sehen. Der Prozentsatz lebender Spermien ohne akrosomalen Rand ist signifikant höher in den Varianten B und C.

(ii) Bulle Nr. 13 zeigt in allen drei Varianten einen signifikant erhöhten Prozentsatz toter Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand im Vergleich zu den anderen Bullen und einen dementsprechend signifikant niedrigeren Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom.

(iii) Im Vergleich zur ersten VR (siehe Tabelle Nr. 2) ist der Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom signifikant niedriger bei dem Bullen Nr. 15. Die Bullen Nr. 13 und 14 zeigen ebenfalls einen niedrigeren Prozentsatz dieser Spermienkategorie, der

Unterschied ist nicht signifikant. Der Prozentsatz lebender Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand ist bei allen drei Bullen im Vergleich zur ersten VR signifikant höher. Der Prozentsatz toter Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand ist ebenfalls bei allen Bullen höher als in der ersten VR.

5.2.1.1. Zusätzlich beobachtete Merkmale der aufgetauten Proben

Wie bereits aus dem oben dargestellten geringeren Prozentsatz motiler Spermien und dem leicht beeinträchtigten Prozentsatz lebender Spermien im Vergleich zur ersten Versuchsreihe zu erkennen ist, zeigen diese Proben eine schlechtere Qualität nach dem Auftauen als die Proben der ersten VR.

Dies stimmt überein mit anderen beobachteten Qualitätseinbußen, die zusätzlich protokolliert wurden:

- In jeweils 3 Ejakulaten der Bullen Nr 13 und 14 und in 2 Ejakulaten des Bullen Nr. 15 wurden vermehrt Erythrozyten beobachtet.
- Besonders die Proben des dritten Ejakulates (in der Dritten Woche gewonnene Ejakulate) jedes Bullen enthielten vermehrt lose Köpfe bzw. abgeknickte und/oder lose Schwänze. Dies gilt besonders für Bulle Nr. 13, bei dem auch 5 weitere Ejakulate vermehrt lose Schwänze enthielten. Bei weiteren 3 Ejakulaten von Bulle Nr. 15 konnten aufgrund des abgeknickten Schwanzes rückwärtsschwimmende Spermien vermehrt beobachtet werden. Bulle Nr. 14 zeigte nur bei insgesamt 2 Ejakulaten derartige Schäden.
- Wiederum die Proben des dritten Ejakulates zeigten vermehrt Spermien mit deformierten Köpfen. Dies gilt auch für weitere Ejakulate des Bullen Nr. 13. Die Bullen Nr. 14 und 15 sind weniger betroffen.

Von den insgesamt 72 untersuchten Proben zeigten unabhängig von den Varianten 32 eine oder mehrere dieser Veränderungen. Inwiefern diese Beobachtungen die erfaßten Laborparameter bzw. die Fertilität beeinflussen, konnte nicht untersucht werden. Ein Verwerfen der betreffenden Proben und eine Entnahme weiterer Spermproben dieser Bullen war im Rahmen dieser Versuchsreihe leider nicht möglich. Aus diesen Veränderungen ergibt sich die teilweise hohe Variabilität der Werte in den voranstehenden Tabellen der aufgetauten Proben. Um die bereits sehr geringe Probenanzahl nicht weiter einzuschränken, wurden alle Ejakulate untersucht und die Werte trotz des möglichen Einflusses durch die oben dargestellten Fakten mit einbezogen.

5.2.2. Untersuchung der Swim-up-Proben

Mittels des Swim-up-Verfahrens, welches in der ersten Versuchsreihe eine Anreicherung der motilen Spermien ermöglichte, konnte bei diesen qualitätsgeminderten Proben nur eine sehr geringe Anzahl von Spermien angereichert werden. Bei den ersten untersuchten Proben jedes Bullen lag der Swim-up-Prozentsatz durchschnittlich unter 1 %. Diese geringe Spermienzahl verhinderte weitere Untersuchungen, so daß das Swim-up-Verfahren modifiziert werden mußte. Die unter Material und Methoden beschriebene Veränderung des Verfahrens bedingt eine höhere Anzahl toter Spermien in den Swim-up-Proben. Dies mußte in Kauf genommen werden um eine Untersuchung der Proben zu ermöglichen.

Tabelle 17: Parameter der Proben nach verändertem Swim-up-Verfahren.

Ergebnisreihe 1: Prozentsatz an Swim-up-Spermien

Ergebnisreihe 2: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien (NAR/leb. + AR/leb.)

Bulle Nr. 13			
Var.	Swim-up% [%]	Motil. [%]	lebende Sp. [%]
A	5 ± 2	59 ± 18	79 ± 5
B	6 ± 1	35 ± 16	56 ± 3
C	6 ± 1	28 ± 7	58 ± 8

Bulle Nr. 14			

Var.	Swim-up% [%]	Motil. [%]	lebende Sp. [%]
A	11 ± 1	57 ± 13	79 ± 9
B	12 ± 4	55 ± 14	77 ± 4
C	10 ± 3	51 ± 12	76 ± 10

Bulle Nr. 15			
Var.	Swim-up% [%]	Motil [%]	lebende Sp. [%]
A	6 ± 1	72 ± 6	79 ± 7
B	7 ± 1	61 ± 20	76 ± 4
C	9 ± 3	54 ± 21	69 ± 8

(i) Der Swim-up-Prozentsatz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Varianten. Der Prozentsatz motiler und lebender Spermien ist bei dem Bullen Nr. 13 signifikant höher in der Variante ohne Seminalplasma in Vergleich zu den Varianten mit Seminalplasmazusatz. Die Bullen Nr. 14 und Nr. 15 zeigen zwischen den Varianten keine signifikanten Unterschiede.

(ii) Bei Bulle Nr. 14 konnte in der Variante A ein signifikant höherer Prozentsatz an Spermien im Swim-up-Verfahren angereichert werden als bei den anderen Bullen. Das gleiche gilt für die Variante B nur im Vergleich zu Bulle Nr. 13. Die Varianten mit Seminalplasmazusatz zeigen bei dem Bullen Nr. 13 einen signifikant niedrigeren Prozentsatz lebender Spermien im Vergleich zu Bulle Nr. 14. Im Vergleich zu Bulle Nr. 15 gilt dies für Variante B.

(iii) Aufgrund der Änderung des Verfahrens können diese Parameter nicht mit den Werten der ersten Versuchsreihe verglichen werden. Es ist auch mit diesem Verfahren eine Erhöhung vorwärtsmotiler und lebender Spermien im Vergleich zu den aufgetauten Proben gelungen, wenngleich der Unterschied zu den aufgetauten Proben nicht so deutlich ist wie in der ersten Versuchsreihe (Tabelle Nr. 3).

5.2.3. Erfassung der Akrosomenreaktion

Wie bereits in der ersten Versuchsreihe dargestellt, wurden von jeder Probe die vier verschiedenen Spermienkategorien jeweils von der Swim-up-Probe, nach der Inkubation mit Heparin und auch nach der Inkubation mit Calciumionophor ermittelt. Von größtem Interesse war der Prozentsatz akrosomenreagerter lebender Spermien zu jedem Inkubationszeitpunkt und der durch Heparin und Calciumionophor induzierte Zuwachs an akrosomenreagierten Spermien.

Tabelle 18: Prozentsatz akrosomenreagerter Spermien nach jedem Inkubationszeitpunkt bzw. der Zuwachs von Schritt zu Schritt des Versuches.

Ergebnisreihe 1: AR/leb.-Spermien der Swim-up-Probe.

Ergebnisreihe 2: AR/leb.-Spermien nach Inkubation mit Heparin.

Ergebnisreihe 3: AR/leb.-Spermien nach zusätzlicher Inkubation mit Calciumionophor.

Ergebnisreihe 4: Induzierte AR nach Inkubation mit Heparin
(Ergebnisreihe 2 - Ergebnisreihe 1).

Ergebnisreihe 5: Induzierte AR nach Inkubation mit Calciumionophor
(Ergebnisreihe 3 - Ergebnisreihe 2).

Bulle Nr. 13					
Var.	AR/leb. sw [%]	AR/leb. he [%]	AR/leb. ca [%]	Zuw/he [%]	Zuw/ion [%]
A	16 ± 4	37 ± 8	44 ± 9	21 ± 10	8 ± 8
B	18 ± 6	29 ± 4	33 ± 5	11 ± 3	5 ± 7

C	20 ± 6	28 ± 4	36 ± 7	8 ± 6	8 ± 5
----------	--------	--------	--------	-------	-------

Bulle Nr. 14					
Var.	AR/leb. sw [%]	AR/leb. he [%]	AR/leb. ca [%]	Zuw/he [%]	Zuw/ion [%]
A	17 ± 7	36 ± 12	44 ± 7	20 ± 10	8 ± 8
B	27 ± 13	42 ± 8	50 ± 8	15 ± 14	9 ± 5
C	24 ± 10	37 ± 7	47 ± 5	14 ± 12	9 ± 5

Bulle Nr. 15					
Var.	AR/leb. sw [%]	AR/leb. he [%]	AR/leb. ca [%]	Zuw/he [%]	Zuw/ion [%]
A	13 ± 5	42 ± 7	48 ± 4	29 ± 7	8 ± 7
B	8 ± 5	31 ± 11	41 ± 6	17 ± 10	14 ± 6
C	17 ± 7	34 ± 6	36 ± 6	17 ± 7	3 ± 2

(i) Sowohl in der Swim-up-Probe als auch nach Inkubation mit Heparin zeigt der Prozentsatz akrosomenreagerter, lebender Spermien bei keinem der Bullen einen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten. Nach Zugabe von Ionophor ist diese Spermienkategorie beim Bullen Nr. 15 in der Variante A signifikant größer als in der Variante C.

Durch Zugabe von Heparin kann in der Variante ohne Seminalplasma des Bullen Nr. 13 ein signifikant höherer Prozentsatz an AR ausgelöst werden als in der Variante C. Bei den Bullen 14 und 15 kann ebenfalls in der Variante A durch Zusatz von Heparin bei einem höheren Prozentsatz an Spermien eine AR ausgelöst werden als in den Varianten mit Seminalplasma. Der durch Calciumionophor induzierte Zuwachs akrosomenreagerter lebender Spermien unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Varianten bei den Bullen Nr. 13 und 14. Bei Bulle Nr. 15 ist der Zuwachs signifikant niedriger in der Variante C als in der Variante B.

(ii) Der Prozentsatz akrosomenreagerter lebender Spermien in der Swim-up-Probe ist bei dem Bullen Nr. 15 in der Variante B signifikant niedriger als bei den anderen Bullen. Nach Zugabe von Heparin ist dieser Prozentsatz bei Bulle Nr. 13 in den Varianten B und C signifikant niedriger als bei dem Bullen Nr. 14. Nach Zugabe von Calciumionophor ist die Variante B und C bei Bulle Nr. 14 signifikant größer als bei den anderen Bullen. Weder der durch Zusatz von Heparin, noch durch Calciumionophor induzierbare Prozentsatz an AR unterscheidet sich signifikant zwischen den Bullen, wenn jeweils die Varianten miteinander verglichen werden.

(iii) Der Prozentsatz akrosomenreagerter lebender Spermien ist in den Swim-up-Proben aller Bullen im Vergleich zur ersten Versuchsreihe signifikant größer. Der Prozentsatz an AR, der insgesamt nach der letzten Inkubation erreicht wird ist signifikant größer als in der ersten Versuchsreihe bei den Bullen Nr. 14 und 15. Aber auch bei dem Bullen Nr. 13 ist dieser größer. Durch die Inkubation mit Calciumionophor kann bei allen Bullen in dieser VR ein deutlicher Zuwachs an AR erreicht werden. Dies war bei diesen Bullen in der ersten Versuchsreihe nicht der Fall (Tabellen Nr. 6).

5.2.5. Spermienmortalität bzw. -resistenz

Analog zur ersten Versuchsreihe dieser Arbeit wurde auch die Zunahme toter Spermien während des Versuches bzw. der Rest an lebenden, akrosomintakten Spermien am Schluß des Versuches erfaßt.

Tabelle 19: Änderung des Anteiles lebender akrosomintakter Spermien und toter Spermien während des Versuches.

Ergebnisreihe 1: Abnahme des Prozentsatzes lebender Spermien mit intaktem Akrosom der Swim-up-Probe bis zum Ende des Versuches

Ergebnisreihe 2: Abnahme des Prozentsatzes lebender Spermien mit intaktem Akrosom, der während der Inkubation mit Calciumionophor reduziert wurde

Ergebnisreihe 3: Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom in der Probe am Ende des Versuches (nach Inkubation mit Calciumionophor)

Ergebnisreihe 4: Zuwachs toter Spermien der Swim-up-Probe bis zum Ende des Versuches

Ergebnisreihe 5: Prozentsatz toter Spermien am Ende des Versuches

Bulle Nr. 13					
Var.	Abnahme NAR/leb. [%]	Abnahme NAR/leb. durch Ion [%]	NAR/leb. Ende Vers. [%]	Zuwachs tote Sp. [%]	Tote Sp. Ende Vers. [%]
A	44 ± 13	16 ± 6	19 ± 8	16 ± 8	37 ± 8
B	24 ± 4	7 ± 5	14 ± 4	8 ± 3	52 ± 6
C	22 ± 5	12 ± 6	16 ± 7	6 ± 3	48 ± 9

Bulle Nr. 14					
Var.	Abnahme NAR/leb. [%]	Abnahme NAR/leb. durch Ion [%]	Gesamt NAR/leb. Ende Vers. [%]	Zuwachs tote Sp. [%]	Tote Sp. Ende Vers. [%]
A	40 ± 11	14 ± 8	22 ± 10	13 ± 3	34 ± 7
B	34 ± 19	13 ± 7	16 ± 7	10 ± 5	34 ± 7
C	34 ± 11	13 ± 4	18 ± 11	11 ± 4	35 ± 10

Bulle Nr. 15					
Var.	Abnahme NAR/leb. [%]	Abnahme NAR/leb. durch Ion [%]	Gesamt NAR/leb. Ende Vers. [%]	Zuwachs tote Sp. [%]	Tote Sp. Ende Vers. [%]
A	49 ± 9	15 ± 9	17 ± 9	14 ± 6	35 ± 8
B	40 ± 10	15 ± 7	21 ± 7	19 ± 13	38 ± 5
C	28 ± 9	8 ± 3	24 ± 7	8 ± 5	39 ± 7

(i) Bei den Bullen Nr. 13 und Nr. 15 gibt es einen signifikant größeren Abfall lebender, akrosomintakter Spermien über die gesamte Inkubationszeit nach dem Swim-up in der Variante A als in der Variante C, bei Bulle Nr. 13 ist dieser auch signifikant größer als in der Variante B. Dieser Abfall ist in Variante C bei beiden Bullen kleiner als in der Variante B. Der durch Calciumionophor bedingte Abfall dieser Spermienkategorie ist bei Bulle Nr. 13 signifikant niedriger in der Variante B als in den beiden anderen Varianten. Der Prozentsatz dieser Kategorie am Ende des Versuches unterscheidet bei keinem der Bullen signifikant zwischen den Varianten.

Bei Bulle Nr. 13 ist der Prozentsatz toter Spermien am Ende des Versuches signifikant größer in der Variante A als bei den Varianten mit Seminalplasma. Bei den anderen beiden Bullen ist dieser Unterschied nicht vorhanden. Bei Bulle Nr. 14 zeigt keiner der dargestellten Parameter einen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten.

(ii) Bei Vergleich der Bullen untereinander zeigt der Bulle Nr. 13 in der Variante eine signifikant kleinere Abnahme des Prozentsatzes

akrosomintakter lebender Spermien als Bulle Nr. 15 und einen signifikant höheren Prozentsatz toter Spermien am Ende des Versuches als die beide anderen Bullen.

(iii) Alle drei Bullen zeigen einen signifikant niedrigeren Prozentsatz lebender akrosomintakter Spermien am Ende des Versuches als in der ersten VR. Die Abnahme dieses Prozentsatzes während der Inkubation mit Calciumionophor ist bei den Bullen Nr. 14 und 15 signifikant höher. Der Zuwachs toter Spermien während des Versuches unterscheidet sich jedoch nicht, so daß die Abnahme akrosomintakter Spermien mit einer Zunahme an AR einhergeht (Tabelle Nr. 8).

5.2.5. Motilitätsanalyse

Sowohl von den aufgetauten Proben als auch von den Swim-up-Proben wurden analog zur ersten VR verschiedene Motilitätsparameter mittels Strömberg Mika System ermittelt. Diese Parameter werden nur von der linear motilen Population der Probe ermittelt. Sie lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten erkennen. Die Unterschiede zwischen den Bullen und zur ersten Versuchsreihe sind minimal und nicht signifikant.

5.2.6. ATP-Gehalt

Analog zur ersten Versuchsreihe wurde der ATP-Gehalt der lebenden Spermien sowohl der aufgetauten Probe als auch der Swim-up-Proben ermittelt.

Tabelle 20: ATP-Gehalt pro 10^8 lebende Spermien.

Ergebnisreihe 1: ATP-Gehalt lebender Spermien der aufgetauten Probe.

Ergebnisreihe 2: ATP-Gehalt lebender Spermien der Swim-up-Probe.

Bullen	ATP-Gehalt/ 10^8 Sp. aufgetaut			ATP-Gehalt/ 10^8 Sp. sw-up		
	Var. A nmol	Var. B nmol	Var. C nmol	Var. A nmol	Var. B nmol	Var. C nmol
13	8 ± 4	6 ± 2	7 ± 3	20 ± 7	16 ± 11	9 ± 7
14	12 ± 5	11 ± 4	12 ± 2	41 ± 29	30 ± 17	32 ± 16
15	13 ± 7	11 ± 4	12 ± 3	23 ± 7	20 ± 15	19 ± 9

(i) Die aufgetauten Proben zeigen keinen signifikant unterschiedlichen ATP-Gehalt zwischen den Varianten. Bei den Swim-up-Proben hat Bulle Nr. 13 einen signifikant höheren ATP-Gehalt in der Variante A. Dies gilt nicht für die anderen Bullen.

(ii) Bulle Nr. 13 hat einen signifikant niedrigeren ATP-Gehalt sowohl in der aufgetauten Proben als auch in der Swim-up-Probe der Variante C als die anderen beiden Bullen.

(iii) Der ATP-Gehalt der aufgetauten Probe von Bulle Nr. 13 ist etwas niedriger als in der ersten VR. Der ATP-Gehalt der Swim-up-Probe von Bulle Nr. 14 ist etwas höher als in der ersten VR. Es sind keine signifikanten Unterschiede des ATP-Gehaltes sowohl der aufgetauten als auch der Swim-up-Probe im Vergleich zur ersten VR vorhanden (Tabelle Nr. 14).

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

5.3.1. Versuchsreihe I

In der ersten Versuchsreihe werden funktionelle Spermienparameter von 15 Bullen miteinander und mit der NRR verglichen. Da einer der Bullen eine wesentlich schlechtere NRR als die anderen Bullen aufweist, wird die Korrelation zusätzlich auch nur unter Berücksichtigung von den 14 Bullen mit einer NRR > 60% errechnet.

Folgende signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) funktioneller Spermienparameter konnten ermittelt werden:

- Die NRR ist größer, je mehr lebende Spermien nicht bereits durch Heparin, sondern erst durch

Inkubation mit Calciumionophor zur Akrosomenreaktion veranlasst werden .

($r=0,67$; Bullen Nr. 1 bis 14).

- Bei Betrachtung aller Bullen ist die NRR größer, je weniger akrosomintakte lebende Spermien am Ende des Versuches (nach Inkubation mit Calciumionophor) übrig sind ($r= -0,70$).

- Bei Betrachtung aller Bullen ist die NRR größer, je stärker die Abnahme akrosomintakter lebender Spermien ist, die durch die Zugabe von Calciumionophor induziert werden kann ($r=0,59$).

Mit Hilfe des Swim-up-Verfahrens ist es gelungen, überwiegend motile lebende Spermien zu gewinnen. Die Motilitätsparameter dieser Swim-up-Spermien unterscheiden sich signifikant von denen der aufgetauten Probe. Der ATP-Gehalt der lebenden Spermien ist signifikant höher als in der aufgetauten Probe. Bei keinem dieser Parameter findet sich eine signifikante Korrelation zur NRR.

5.3.2. Versuchsreihe II

Es werden drei verschiedene Varianten durch unterschiedlichen Seminalplasmazusatz zu 8 verschiedenen Ejakulaten von jeweils 3 Bullen erstellt. Zwischen der Variante mit fremdem und der Variante mit homologem Seminalplasma sind keine Unterschiede zu erkennen.

Die Variante ohne Seminalplasma unterscheidet sich in einigen Parametern signifikant von den Varianten mit Seminalplasma. Insbesondere ist der Zuwachs akrosomenreagerter lebender Spermien nach Inkubation mit Heparin in dieser Variante größer. Bulle Nr. 14 zeigt weniger häufig als die Bullen Nr. 13 und 15 Unterschiede zwischen den Varianten.

6. Diskussion

6.1. Versuchsreihe I: Spermatologische Parameter verschiedener Bullen in Beziehung zur NRR.

Zwei funktionelle Spermienparameter korrelieren signifikant mit der Fertilität der Bullen.

Ziel des ersten Abschnittes dieser Arbeit war es, Parameter gefrierkonservierter Spermienproben zu finden, anhand derer die Befruchtungsfähigkeit eines Bullen eingeschätzt werden kann. Mit Hilfe eines funktionellen Tests wurden zwei Parameter gefunden, die eine signifikante Korrelation zur NRR zeigen.

In dem durchgeführten Test wird die Fähigkeit der Spermien zur echten Akrosomenreaktion (AR) in Abhängigkeit vom auslösenden Stimulus untersucht. Die AR ermöglicht den Spermien das Durchdringen des Cumulus oophorus und der Zona pellucida der Eizelle. Viele Autoren ermittelten bereits die maximale Anzahl induzierbarer AR in Spermienproben bzw. das Auftreten spontaner AR. Diese Parameter zeigten keine signifikante Korrelation zur Fertilität nach künstlicher Besamung (FENICHEL et al., 1991; HENKEL et al., 1993). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten wird mit dem hier entwickelten Test nicht nur der maximal erreichte Prozentsatz an AR erfaßt, sondern ebenfalls berücksichtigt, ob bereits nach Inkubation mit Heparin oder erst durch Calciumionophor vermehrt AR auftreten.

Heparin wird in vitro zur Kapazitation von Spermien verwendet (MILLER u. AX, 1990). Die Kapazitation ist ein weitestgehend noch ungeklärter Prozeß, der die Spermien auf die Akrosomenreaktion vorbereitet. In vivo wird die Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt unter anderem durch Glykosaminoglykane gefördert (LEE u. AX, 1984). Zu dieser Stoffgruppe gehört auch Heparin, welches nicht nur die Kapazitation unterstützt, sondern auch bei einem Teil der Spermienpopulation die AR auslösen kann. Sollten zu viele Spermien jedoch bereits im weiblichen Genitaltrakt zur AR veranlaßt werden, bevor der Ort bzw. der Zeitpunkt der Befruchtung erreicht ist, dann geht dies mit Einbußen der Befruchtungsfähigkeit einher. Erst bei Erreichen der Eizelle bzw. zum Zeitpunkt der Ovulation sollten genügend Spermien eine AR aufweisen, wenn diese in vivo durch die Zona pellucida ausgelöst wird. Dieser theoretische Ansatz des Tests wird dadurch bestätigt, daß der Prozentsatz der Spermien, die nicht bereits durch Heparin, sondern erst nach Inkubation mit Calciumionophor zur AR veranlaßt werden, eine signifikante Korrelation zur NRR aufweist ($r = 0,67$). Der maximal erreichbare Anteil an AR (spontane, durch Heparin induzierte und durch Ionophor induzierte AR) korreliert dagegen nicht signifikant mit der NRR. Ein weiterer Parameter, der signifikant negativ mit der NRR korreliert, ist der Prozentsatz lebender Zellen mit intaktem Akrosom, der nach Inkubation mit Calciumionophor noch verbleibt ($r = - 0,70$).

Demzufolge tritt eine Fertilitätseinbuße ein, wenn (i) in der Spermienpopulation eines Ejakulates zu viele Spermien zu früh eine AR aufweisen und durch weitere Stimulation keine AR mehr ausgelöst werden kann und/oder wenn (ii) selbst durch starke Stimulation viele lebende und akrosomintakte Spermien nicht zur AR veranlaßt werden können. Mit Hilfe des in dieser Arbeit durchgeführten Tests kann man beide Parameter erfassen und in Relation zur NRR setzen.

Zur künstlichen Besamung von Rindern werden hauptsächlich gefrierkonservierte Spermienproben eingesetzt, daher wurden diese in

vitro untersucht. Die Untersuchung nativer Spermien läßt keine direkten Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit nach der Gefrierkonservierung zu. Die Gefrierkonservierung der Spermienproben führt neben einem Verlust motiler Spermien zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und zu Veränderungen an den Spermienmembranen ähnlich denen der Kapazitation (BAILEY u. BUHR, 1993; FULLER u. WHITTINGHAM, 1995). Es ist leider nicht möglich, die Einwirkung des Gefrierprozesses auf die hier untersuchten Proben zu beurteilen, da keine entsprechenden Befunde an den nativen Proben der hier untersuchten Ejakulate erhoben werden konnten. Die Frage, ob die unterschiedliche Funktionsfähigkeit der aufgetauten Spermien einzelner Bullen eine Eigenschaft des Bullen an sich oder Ausdruck der Gefriertauglichkeit des Bullen darstellt, bleibt unbeantwortet.

Die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion durch Calciumionophor nach Inkubation mit Heparin stellt ein strenges Kriterium für die Spermienfunktion dar.

In vivo sind zahlreiche regulierende Faktoren des weiblichen Genitaltraktes vorhanden. Große Bedeutung kommt dabei dem Eileiterepithel zu. Die Spermien binden im Bereich des Isthmus bis zur Ovulation an die Zellen (SUZUKI u. FOOTE, 1995; HUNTER et al., 1991). Die Vitalität der Spermien bleibt in vivo über mehrere Stunden erhalten, während sie bei dem in-vitro-Test nach dem Auftauen nur eine wesentlich kürzere Zeitdauer überleben. Der regulierende Einfluß und die Selektion der Spermien durch die Eileiterepithelien fehlt bei der in-vitro-Kapazitation der Spermien. Der in-vitro-Test ist dadurch wesentlich kritischer für die Spermien. Bereits bei dem Bullen Nr. 12 mit einer NRR von 69% konnte durch die Inkubation mit Calciumionophor keine zusätzliche AR mehr ausgelöst werden. Damit gestattet dieser Parameter keine Differenzierung mehr zwischen Bullen mit niedrigerer NRR, und die Einbeziehung von Bulle Nr. 15 (NRR = 43%) in eine lineare Korrelation zwischen diesem Parameter und der NRR war nicht sinnvoll.

Es treten unterschiedliche Stadien der AR während des Tests auf. Das morphologische Bild der AR unterscheidet sich zwischen den Bullen.

Die Beobachtung des akrosomalen Randes bei Bullenspermien ist im Vergleich zu Spermien anderer Spezies aufgrund ihrer Größe und Form relativ einfach, so daß auf differenziertere Färbetechniken verzichtet werden konnte. Die Beurteilung des Akrosoms unterliegt jedoch hiermit der Subjektivität des Betrachters. Die AR ist ein relativ langsamer Prozeß, und in jeder Probe konnten einige beginnende AR sowie einige Spermien mit bereits vollständigem Verlust des Akrosoms beobachtet werden. Die Schwierigkeiten ergeben sich in der Beurteilung der beginnenden AR. Ein solches Spermium weist noch kurze Stücke eines ganz scharfen akrosomalen Randes auf, zeigte jedoch bereits einzelne Vesikulationen an anderen Stellen. Zur möglichst strengen Trennung dieser Stadien wurden nur solche Spermien als akrosomenreagiert betrachtet, bei denen überhaupt kein scharfer akrosomaler Rand mehr zu erkennen war. Damit wurde der Übergang von der Variante lebender und akrosomintakter in die Variante lebender akrosomenreagierter Spermien sehr streng gehandhabt. Dies könnte einen Unterschied zu anderen Untersuchern darstellen.

Es sind verschiedene Färbemethoden bekannt, mit denen die gleichzeitige Erfassung der AR und der Vitalität möglich ist (GRAHAM et al., 1990; WAY et al., 1995). Der akrosomale Zustand läßt sich auch mit monoklonalen Antikörpern, die an intra-akrosomale Antigene von Bullenspermien binden, erfassen (JOHNSON et al., 1996). In Kombination mit der Durchflußzytometrie könnte so eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Labors erzielt werden. Die Durchflußzytometrie bietet darüberhinaus die Möglichkeit, wesentlich mehr Spermien als nur die 200 untersuchten Zellen pro Probe zu erfassen, so daß eine rationellere und objektive Bearbeitung von gefrierkonservierten Proben möglich wäre.

Zwischen den einzelnen Bullen wurden Unterschiede in der Morphologie der AR beobachtet. Beispielsweise wies Bulle Nr. 3 immer eine sehr deutliche AR mit einer vollkommenen Auflösung des Akrosoms und Ausbildung einer Radspeichenstruktur auf. Bulle Nr. 7 dagegen zeigte nur eine zerklüftete Oberfläche des vorderen Spermienbereiches, ohne Radspeichenstruktur, auch wenn kein akrosomaler Rand mehr zu erkennen war. Diese morphologischen Unterschiede waren charakteristisch für den jeweiligen Bullen. Inwiefern sie für die Befruchtungsfähigkeit von Bedeutung sind, ist nicht bekannt. Eine genaue quantitative und qualitative Untersuchung dieser Unterschiede war gerätetechnisch (z.B. mit Elektronenmikroskopie) zu dem derzeitigen Zeitpunkt leider nicht möglich.

Bulle Nr. 15 unterscheidet sich sowohl in vivo als auch in vitro deutlich von den anderen Bullen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Tabellen von Versuchsreihe I zeigt sich, daß Bulle Nr. 15 häufig von den anderen Bullen stark abweichende Werte aufweist. Die NRR dieses Bullen ist deutlich niedriger als die der anderen Bullen. Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien ist niedriger, aber der Prozentsatz lebender (nicht mit Hoechst gefärbter) Spermien in der aufgetauten Probe ist dafür höher als bei den anderen Bullen. Viele lebende Zellen sind somit immotil. Eine immotile, aber dennoch lebende Fraktion der Spermienpopulation wurde auch von LARSSON et al. (1976) beschrieben. Es liegt hier möglicherweise ein die Motilität beeinflussender Schaden vor. Bei diesem Bullen mit deutlich herabgesetzter Fertilität kann nicht nur durch den funktionellen Test, sondern auch mit leichter erfaßbaren Parametern eine Fertilitätseinbuße bemerkt werden.

Es ist eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in den aufgetauten Proben und der Anreicherung in der Swim-up-Probe (Swim-up-Prozentsatz) vorhanden. Aber bei dem Bullen Nr. 15 war es möglich, trotz des geringen Prozentsatzes motiler Spermien der aufgetauten Probe viele Spermien in der Swim-up-Probe anzureichern. Bulle Nr. 15 beeinflusst aufgrund seiner abweichenden Werte die errechneten linearen Zusammenhänge zur NRR. Deshalb wurde der Korrelationskoeffizient aller Parameter zur NRR zusätzlich nur unter Berücksichtigung der Bullen Nr. 1-14 ermittelt.

Die verschiedenen Motilitätsparameter und der ATP-Gehalt der Spermien zeigen in dieser Versuchsreihe keine Beziehung zur Fertilität. Die Swim-up-Spermien zeigen im Vergleich zur aufgetauten Probe deutlich veränderte Werte.

Der Prozentsatz vorwärtsmotiler Zellen der aufgetauten Proben korreliert nicht signifikant mit der NRR, doch ein Korrelationskoeffizient von 0,46 weist auf einen bestehenden linearen Zusammenhang hin. Diese Korrelation wäre möglicherweise bei einem Vergleich von Bullen, die sich deutlicher in ihren NRR unterscheiden, signifikant. Bestätigt wird dies dadurch, daß der Bulle Nr. 15 mit einer wesentlich niedrigeren NRR auch einen im Vergleich zu den anderen Bullen wesentlich niedrigeren Prozentsatz vorwärtsmotiler Spermien in den aufgetauten Proben aufweist. Die Tatsache, daß die Untersuchung des akrosomalen Status bessere Beziehungen zur NRR ergibt als die Untersuchung der Motilität, wurde bereits von SAACKE u. WHITE (1972) beschrieben.

Die Motilitätsparameter der Swim-up-Spermien sind im Vergleich zu den Werten der aufgetauten Probe verändert. Die veränderte Bewegung der Spermien geht einher mit einer größeren Kopfschlagfrequenz und Kopfschlagamplitude und einer höheren Geschwindigkeit der Spermien. Dabei bewegen sich die Spermien nicht mehr geradlinig vorwärts, sondern schwimmen eher in einer Zickzackbahn. Dieses veränderte und mit höherem Energieverbrauch einhergehende Bewegungsmuster ist charakteristisch für kapazitierte Spermien und liefert die Antriebskraft, die notwendig ist, um durch den Cumulus oophorus und die Zona pellucida zu dringen (BEDFORD, 1983).

Weder der ATP-Gehalt der aufgetauten Proben noch der der Swim-up-Proben zeigt eine signifikante Korrelation zur NRR. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von SÖDERQUIST et al. (1991) und widerspricht der Arbeit von BERGER (1983). Möglich ist, daß bei einer Untersuchungsgruppe mit stärker divergierenden NRR eine Beziehung zum ATP-Gehalt der Spermien dargestellt werden könnte. Von größerer Bedeutung wäre die gleichzeitige Messung der anderen Adenonukleotide und die Errechnung des Phosphorylierungspotentials (adenylate energy charge), das eine Aussage über den energetischen Zustand der Spermien in der Probe erlaubt.

Ein Problem bei der Erfassung des ATP-Gehaltes ist, daß immer nur der Durchschnittswert einer Population ermittelt wird. Die Verteilungskurve des ATP-Gehaltes innerhalb der untersuchten Population bleibt unbekannt. Außer bei zwei der Bullen ist der ATP-Gehalt der lebenden Spermien in den Swim-up-Proben höher als der der lebenden Spermien in den aufgetauten Proben. Es ist bekannt, daß der ATP-Gehalt durch die Gefrierkonservierung reduziert wird (KÄHN et al., 1982). Die Frage, ob nur ein bestimmter Anteil der Spermienpopulation weniger ATP nach dem Auftauen enthält, oder ob der ATP-Gehalt in der gesamten Population niedriger ist, bleibt offen. Es ist auch unklar, ob die Spermien durch Fruktolyse während des Swim-up-Verfahrens mehr ATP bilden, oder ob nur diejenigen Spermien durch den Swim-up-Prozeß selektiert werden, die von vornherein mehr ATP enthalten.

Das Swim-up-Verfahren erschwerte bei einigen Bullen die Untersuchungen erheblich. Die geringe Spermienanzahl in den Proben verzögert die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung, und die computergestützte Motilitätsanalyse erfordert zahlreiche Messungen, um genügend der schnell schwimmenden Swim-up-Spermien zu erfassen. Der ATP-Gehalt in Swim-up-Proben mit weniger als 4% der aufgetauten Spermien lag unter dem meßbaren Schwellenwert. Durch das Swim-up-Verfahren wurde nur ein geringer Prozentsatz (im Durchschnitt 13%) der motilen Spermien der aufgetauten Probe gewonnen. Dies ist wenig im Vergleich zu anderen Selektionsverfahren wie z.B. der Percoll-Gradienten-Zentrifugation (PARRISH et al., 1995). Hierbei wäre eine weitere Zentrifugation, die sich nachteilig auf die Spermienmembran auswirkt, nötig, um das Percoll wieder von den Spermien zu trennen. Inwiefern die nach dem Swim-up-Verfahren im Pellet verbliebenen, noch motilen bzw. lebenden Spermien zur Fertilität in vivo beitragen, läßt sich nicht erfassen.

Zwischen den einzelnen Ejakulaten liegt bei einigen der Bullen eine große Variabilität vor.

Die große Variabilität zwischen den einzelnen Ejakulaten einiger Bullen kann darauf beruhen, daß es sich um junge Testbullen handelt, die mit dem Beginn der ersten Versuchsreihe auch erst zur kontinuierlichen Spermaproduktion herangezogen wurden. Die Variation betrifft alle erfaßten Parameter. Auch der Prozentsatz induzierter AR durch Calciumionophor variiert bei einigen Bullen von Ejakulat zu Ejakulat. Dies erschwert die Beurteilung der Bullen anhand der drei untersuchten Ejakulate. Aufgrund der Variation kann ein gutes Ejakulat die NRR ausgleichen, die durch die schlechteren Ejakulate entsteht (z.B. bei den Bullen Nr. 9 und 10). Bei den Bullen mit hoher Variabilität verdecken die gemittelten in-vitro-Werte über alle drei untersuchten Ejakulate eine mögliche Korrelation zur NRR einzelner Ejakulate.

Es wäre wünschenswert, die NRR von jedem Ejakulat einzeln zu erfassen und mit den Laborparametern dieses Ejakulates zu vergleichen. Diese NRR wird dann aber durch noch weniger Erstbesamungen bestimmt, als es in dieser Arbeit der Fall war. Es sollte bei zukünftigen Untersuchungen dennoch angestrebt werden, einzelne Ejakulate mit den entsprechenden in-vitro-Ergebnissen zu vergleichen, um die ausgleichenden Effekte zwischen guten und schlechten Ejakulaten eines Bullen mit großer Variabilität aufzuheben.

Die NRR wird nicht nur vom Befruchtungsvermögen der Spermien, sondern auch von weiteren Faktoren beeinflusst.

Die Beziehung zwischen Spermaqualität und Fertilität wird beeinflusst durch die Anzahl an Spermien pro Inseminationsdosis. Optimale Fertilität wird erreicht, wenn die Anzahl an Spermien mit einer bestimmten Qualität über einen Schwellenwert angehoben wird. Wenn bei allen Bullen eine hohe Anzahl an Spermien pro Paillette eingesetzt wird, dann wird der Schwellenwert bei den meisten überschritten, und es treten keine deutlichen Fertilitätsunterschiede mehr auf (SALISBURY et al., 1978). Höhere Korrelationen zu in-vitro-Parametern

können nur erzielt werden, wenn die Erstbesamungen mit niedrigeren Spermienzahlen durchgeführt werden (PACE et al., 1971). In diesem Versuch war die Anzahl an Spermien pro Inseminationsdosis (ca. 18 Mio/Paillette) deutlich über dem angenommenen Schwellenbereich, so daß sich die deutlichen Unterschiede der in-vitro-Parameter nicht in der NRR niederschlagen.

Zahlreiche durchgeführte funktionelle Tests zur Beurteilung von Spermien zeigen teilweise sehr unterschiedliche Korrelationen zur Fruchtbarkeit in vivo. Diese Unterschiede werden durch die Charakteristik der NRR bedingt. Die Arbeiten von LINFORD et al. (1976) zeigen, daß die errechneten Korrelationen verschiedener Parameter zur NRR sehr signifikant bzw. nicht signifikant sein können, abhängig von der Streubreite der NRR innerhalb der untersuchten Bullenpopulation. Die NRR der 15 Bullen dieser Arbeit zeigen nur eine geringe Streuung der Werte für die NRR (mittlere NRR = 70,41 8,03), besonders wenn Bulle Nr. 15 aufgrund der stark abweichenden NRR nicht mit berechnet wird (mittlere NRR = 72,35 3,54). Der lineare Zusammenhang ist dadurch nicht so deutlich vorhanden wie in der Arbeit von WHITFIELD u. PARKINSON (1995). Es wäre günstiger, Bullen mit stärker divergierenden NRR zu untersuchen. Die NRR der uns für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellten Bullen waren zu Versuchsbeginn nicht bekannt. Eine Erhöhung der Anzahl an Erstbesamungen würde die Daten statistisch besser absichern. Es war allerdings nicht möglich, mit den hier untersuchten Bullen mehr Erstbesamungen durchzuführen.

Die untersuchten Bullen waren alle in der gleichen Station und unter gleichen Haltungsbedingungen untergebracht. Die Spermagewinnung und -aufbereitung erfolgte bei allen Bullen regelmäßig und mit der gleichen Methode. Daher lassen sich Faktoren der Besamungsstation und der Samengewinnung, die die Spermaqualität beeinflussen, weitestgehend ausschließen. In die NRR von Bullen gehen aber auch Parameter der Fertilität des besamten weiblichen Rindes bzw. bei mehreren Erstbesamungen Parameter der Herdenfruchtbarkeit mit ein. Inwieweit Faktoren, wie beispielsweise Jahreszeit, Alter, Rastzeit des jeweiligen Betriebes auf die ermittelte NRR Einfluß nehmen wird in der Arbeit von BRAHMSTAEDT (1982) beschrieben. Als Ursachen für Fertilitätseinbußen in Herden sind vor allem Ernährungsfehler zu nennen. Aber auch die Organisation der Besamung beeinflussen die NRR. Der Besamungstechniker übt mit seiner Arbeit den größten Einfluß auf das Befruchtungsergebnis in Rinderherden aus (BUSCH u. FÜRSTENBERG, 1983). Um diese Einflüsse gering zu halten, wurden die Inseminationsproben der Bullen gleichmäßig und zufällig auf die verschiedenen Betriebe verteilt. Die Ejakulate wurden innerhalb weniger Wochen gewonnen, und die künstliche Besamung erfolgte von allen gewonnenen Ejakulaten parallel in der gleichen Jahreszeit. Trotzdem läßt sich nicht ausschließen, daß die ermittelten NRR von diesen Faktoren beeinflußt wurden.

6.2. Versuchsreihe II: Untersuchung des Seminalplasmaeinflusses.

Ziel des zweiten Abschnittes dieser Arbeit war es, den Einfluß von Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung auf verschiedene Spermienparameter zu bestimmen. Es wurden jeweils 8 Ejakulate der aus der ersten Versuchsreihe bekannten Bullen Nr. 13, 14 und 15 gewonnen. Vor der Gefrierkonservierung wurde das eigene Seminalplasma mittels Zentrifugation entfernt und drei Varianten (i) mit eigenem, (ii) mit fremdem Seminalplasma von Bullen mit besseren NRR und (iii) ohne Seminalplasma nur mit Verdüner hergestellt.

Bei allen drei Bullen zeigte sich bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten mit eigenem Seminalplasma und der Variante mit Seminalplasma von Bullen mit besserer NRR.

Seminalplasma beinhaltet zahlreiche Bestandteile, die zum einen die Kapazitation fördern, zum anderen aber auch hemmen können. Die Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas zwischen Bullen könnten sowohl qualitativ als auch quantitativ von Bedeutung sein. Durch ein hinzufügen von qualitativ anderen Bestandteilen könnte die Fertilität der Spermien verbessert werden. Denkbar wäre aber auch, daß das hinzugefügte Seminalplasma nicht andere Bestandteile, sondern die förderlichen Komponenten in größeren Mengen als das eigene Seminalplasma enthält und dadurch die Fertilität unterstützt wird. Der Seminalplasmaaustausch als eine Möglichkeit zur Aufbesserung von Spermienproben konnte aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Im Mittelpunkt stehen bei diesem Austausch vor allem Seminalplasmaeiproteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht (KILLIAN et al., 1993). Nach den Untersuchungen von LEE et al. (1985) reicht ein kurzer Kontakt mit Seminalplasma aus, um kapazitationsfördernd zu wirken. Ejakulierte Spermien sind bis zur Abtrennung des Seminalplasmas mittels Zentrifugation bereits länger in Kontakt mit dem SP. Die Proteine binden dann an die Spermienoberfläche und werden bei der Zentrifugation zum großen Teil nicht mehr entfernt. Ein Hinzufügen von fremdem Seminalplasma mit qualitativ unterschiedlichen Proteinen könnte dann wirkungslos sein, da die Rezeptoren auf der Spermienoberfläche bereits durch eigene Proteine besetzt sind. Da die Zusammensetzung des Seminalplasmas im Rahmen dieses Versuches nicht untersucht wurde, ist unbekannt ob bei dem ausgetauschten Seminalplasma ein qualitativer Unterschied vorlag. Eine quantitative Verbesserung der Spermienprobe durch den Austausch hätte in dieser Versuchsreihe auch erfolgen können.

Eine Gewinnung von Spermien mittels Orchektomie wäre eine Möglichkeit, die Seminalplasmawirkung eindeutiger hervorheben zu können. Diese Methode ist sehr aufwendig und unwirtschaftlich für eine Besamungsstation und somit ohne Bedeutung für die Praxis. Sollte das Seminalplasma eines Bullen mit guter NRR gewonnen werden, um schlechtere Bullen "aufzubessern", dann ist die Verwendung ejakulierter Spermien die einzige in der Routine einsetzbare Methode. Eine genauere Analyse der Zusammensetzung des Seminalplasmas verschiedener Bullen könnte einen eventuellen neuen Versuch dieser Art unterstützen indem ein Austausch gezielter als in dieser Versuchsreihe stattfinden kann.

Zwischen der Variante ohne Seminalplasma und den beiden Varianten mit Seminalplasma zeigten sich signifikante

Unterschiede.

Der Prozentsatz akrosomenreagerter lebender Spermien ist in der Variante ohne Seminalplasma besonders hoch, und der Zuwachs an AR durch Heparin ist größer als bei den anderen beiden Varianten. Der Zuwachs durch Calciumionophor ist dagegen bei allen Varianten gleich. Seminalplasma verringert die Auslösung der AR durch Heparin im Vergleich zur Variante ohne Seminalplasma. Dies entspricht einer Schutzfunktion des Seminalplasmas (z.B. durch Spermadhäsine) vor frühzeitiger Kapazitation bzw. AR (DOSTALOVA et al., 1994).

Die Parameter der aufgetauten Proben unterscheiden sich im Vergleich zur ersten Versuchsreihe.

Der Prozentsatz lebender Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand ist bei allen drei Bullen höher, der Prozentsatz lebender Spermien mit intaktem Akrosom ist bei den Bullen Nr. 13 und 15 niedriger als in der ersten Versuchsreihe. Ebenfalls höher ist auch der Prozentsatz toter Spermien mit fehlendem akrosomalen Rand. Diese erhöhte Anzahl an Schäden des Akrosoms bei toten und lebenden Spermien könnte mit der zusätzlichen Zentrifugation der Spermien vor der Gefrierkonservierung zusammenhängen. Eine Untersuchung von Humanspermien ergab bei einer Zentrifugation über 1500 g einen erhöhten Prozentsatz an AR (HALL u. FISCHER, 1995). Dies bedingt den höheren Prozentsatz an Spermien mit defektem akrosomalen Rand in den aufgetauten Proben.

Zahlreiche der untersuchten Proben weisen vermehrt lose bzw. abgeknickte Schwänze auf. Dies könnte ebenfalls auf die zusätzliche Manipulation zur Entfernung des eigenen Seminalplasmas zurückzuführen sein. Die morphologischen Abweichungen der Spermienköpfe ähnelten dem "knobbed sperm defect" (BARTH u. OKO 1989). Tritt dieser Defekt häufig in der Spermienpopulation auf, so wird von einer erblichen Genese ausgegangen. In diesem Falle wären höchstens 30% der Spermien betroffen, und in der ersten Versuchsreihe wurden keine derartigen Veränderungen beobachtet, so daß eine solche Ursache ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Ursache, die solche Veränderungen hervorrufen kann, ist eine gestörte Spermatogenese aufgrund äußerer Faktoren. Da die nativen Ejakulate nicht vor und nach der Zentrifugation vor der Gefrierkonservierung untersucht werden, bleibt unklar, inwiefern die Zentrifugation vor der Gefrierkonservierung die beschriebenen Schäden an der Membran verursacht hat.

Es ist zu beachten, daß der in der ersten Versuchsreihe durchgeführte Test zur Fertilitätsprognose hier nicht direkt anwendbar ist. Der Zuwachs an AR nach Zugabe von Calciumionophor würde, gemessen an den Maßstäben der ersten Versuchsreihe, auf eine wesentlich höhere NRR hinweisen. Diese Werte sind nicht absolut mit der ersten Versuchsreihe vergleichbar, denn aufgrund der bereits erwähnten starken Qualitätseinbußen dieser Proben mußte das Swim-up-Verfahren so geändert werden, daß genügend Spermien zur Verfügung standen, um die verschiedenen zu untersuchenden Parameter zu ermitteln. Dieses veränderte Swim-up-Verfahren bedingt, daß die Zusammensetzung der Spermienpopulation der Swim-up-Probe mit der Swim-up-Population der ersten Versuchsreihe nicht vergleichbar ist: (i) Die Selektion motiler, lebender Spermien ist nicht so deutlich wie in der ersten VR, (ii) es wurden insgesamt mehr Spermien gewonnen, und (iii) die Spermien sind durch die zusätzliche Zentrifugation generell labiler. Um einen Hinweis auf die Fertilität in vivo zu bekommen, müßte man zuerst entsprechend manipulierte Proben verschiedener Bullen untersuchen und die Ergebnisse wiederum mit der NRR vergleichen.

Es zeigen sich auch in dieser Versuchsreihe Unterschiede zwischen den Bullen.

Bulle Nr. 14 zeigt weniger signifikante Unterschiede zwischen den Varianten als die anderen beiden Bullen. Auch sind weniger Proben mit wesentlichen Qualitätseinbußen vorhanden als bei dem Bullen Nr. 13, der am deutlichsten eine erhöhte Anzahl loser Schwänze enthält. Dies weist darauf hin, daß die notwendige Manipulation (Zentrifugation) vor der Gefrierkonservierung nicht nur einen negativen Einfluß auf die Spermaqualität hat, sondern daß dieser Einfluß unterschiedlich stark von Bulle zu Bulle auftritt. Eine Untersuchung der individuellen Resistenz gegenüber der zusätzlich notwendigen Manipulation wäre interessant, falls ein kontinuierlicher Seminalplasmaaustausch erfolgen soll.

6.3. Ausblick

Mit dem in der ersten Versuchsreihe vorgestellten Test kann man die Befruchtungsfähigkeit eines Bullen annähernd einschätzen. Anhand einer 1995 durchgeführten Untersuchung konnten WHITFIELD und PARKINSON mittels der induzierbaren AR eine Regressionsgleichung aufstellen, anhand derer die Fertilität anderer Bullen errechnet werden kann. Eine Optimierung des in dieser Arbeit vorgestellten Tests könnte ebenfalls zu der Möglichkeit führen, die Fertilität eines Bullen genauer einzuschätzen. Geht man davon aus, daß eine genügend hohe Anzahl an Spermien notwendig ist, die erst bei Erreichen der Eizelle eine AR aufweisen, dann könnte man mit einem etwas größeren Versuchsumfang die Anzahl der Spermien mit AR durch Stimulation mit Calciumionophor nach Inkubation mit Heparin ermitteln, die für eine erfolgreiche künstliche Besamung notwendig sind. Anhand dieser Anzahl könnte man die Konzentration der Spermien pro Inseminationsdosis individuell für jeden Bullen, abhängig den funktionellen Parametern der Spermien, einstellen.

Weitergehende Untersuchungen über die Mechanismen der Kapazitation und AR sind erforderlich, um Fertilitätstests zu optimieren. Hier schließt sich die Untersuchung und Erarbeitung neuer Gefriermedien und -methoden an, da die Tiefgefrierung eine hochgradige Qualitätseinbuße der Proben bedingt und besonders den Ablauf der Kapazitation beeinflusst. Außerdem gibt es hier individuelle Unterschiede zwischen den Bullen, die berücksichtigt werden sollten.

Der Seminalplasmaaustausch als eine Möglichkeit zur Aufbesserung der Ejakulate schlechterer Bullen hat sich bei Betrachtung der

Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe nicht bewährt. Eine Entfernung des Seminalplasmas mit schonenden Methoden bzw. eine Zugabe von fremden Seminalplasma ohne Entfernung des eigenen könnten die Probenqualität und damit auch die Aussagekraft der Ergebnisse verbessern. Eine Untersuchung der Seminalplasmazusammensetzung von Bullen mit unterschiedlicher NRR könnte eine gezieltere Zugabe der fördernden Bestandteile zu dem jeweiligen Ejakulat ermöglichen.

7. Zusammenfassung

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wird ein funktioneller Fertilitätstest dargestellt, mit dessen Hilfe die Befruchtungsfähigkeit gefrierkonservierter Bullenspermien eingeschätzt werden kann. Von jeweils 5 Ejakulaten von 15 Bullen wird die NRR ermittelt. Drei dieser Ejakulate werden pro Bulle *in vitro* untersucht. Hauptbestandteil der Untersuchungen ist die Erfassung der durch einen geeigneten Stimulus induzierbaren Akrosomenreaktion (AR) bei lebenden Spermien. Zusätzlich wird eine computergestützte Motilitätsanalyse und die Messung des ATP-Gehaltes durchgeführt.

Vierzehn der Bullen haben NRR zwischen 60 und 80 %, während ein Bulle eine niedrigere NRR aufweist (Bulle Nr. 15). Bei den 14 Bullen mit einer höheren NRR korreliert der Prozentsatz der Spermien, die im Anschluß an eine Inkubation mit Heparin durch den Zusatz von Calciumionophor eine AR aufweisen signifikant mit der NRR. Zusätzlich zeigt sich, daß die NRR bei den Bullen größer ist, bei denen nur sehr wenige akrosomenintakte lebende Spermien am Ende des Versuches verbleiben. Dagegen korreliert der Prozentsatz an Zellen einer Spermienpopulation, der sich insgesamt aus spontaner (frühzeitiger) Heparin- und Ionophor-induzierter AR ergibt, nicht mit der Fertilität. Dies unterstützt die Hypothese, daß ein großer Anteil der Spermienpopulation nicht nur prinzipiell zu einer AR fähig sein muß, sondern daß diese Spermien erst bei adäquatem Stimulus (Zona pellucida, bzw. in dieser Arbeit durch Calciumionophor) eine AR aufweisen sollten.

Der hier vorgestellte Test ermöglicht die Einschätzung der Fertilität von Bullen mit hohen NRR, selbst wenn nur kleine Unterschiede vorhanden sind. Bulle Nr. 15, der eine wesentlich geringere NRR hat (NRR = 43%) zeigt in dieser Arbeit ebenfalls kaum noch Spermien, bei denen die AR durch Calciumionophor stimuliert werden kann. Auch der im Vergleich zu den anderen Bullen deutlich erniedrigte Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der aufgetauten Proben weist auf eine verminderte Fertilität hin. Bei den anderen Bullen ermöglichen weder die Motilitätsanalyse noch der ATP-Gehalt der Spermien eine Aussage über deren Fertilität.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde das Seminalplasma von jeweils 8 Ejakulaten von drei schlechten Bullen vor dem Gefrierkonservieren entfernt und durch solches von guten Bullen ersetzt. Eine Aufbesserung der Fertilität dieser schlechten Bullen durch den Austausch konnte nicht erzielt werden. Es sind Unterschiede zwischen den Varianten mit Seminalplasma (fremdes und eigenes) und der Kontrolle ohne Seminalplasma zu erkennen, die auf die Schutzfunktion des Seminalplasmas vor frühzeitiger AR hinweisen.

8. Summary

In vitro parameters of bovine spermatozoa correlated to fertility and the impact of seminal plasma exchange on these before cryopreservation.

The first aim of this work is to elaborate an *in vitro* trial which can be used to estimate the fertility of cryopreserved semen. Five different ejaculates from each of 15 bulls are collected to assess the NRR. Three of these ejaculates per bull are individually examined *in vitro*. The main impact is laid on the assessment of the inducible acrosome reaction (AR) of vital spermatozoa after thawing. Additionally the motion characteristics and the ATP content of the sperm cells are studied.

Fourteen of the bulls reveal NRR between 60 and 80% while one bull (No. 15) has a much lower NRR. In the 14 bulls with higher NRR the increase in true AR by stimulation with ionophore after heparin treatment is significantly correlated to the NRR. Moreover, the fertility of bulls is higher if the remaining number of vital spermatozoa with intact acrosome at the end of the trial is lower. On the other hand the total amount of true AR, which also includes the premature AR induced by heparin does not correlate to the NRR and is not predictive for fertility. This supports the thesis that it is not sufficient to have enough spontaneous or induced AR in a sperm sample but that the AR should occur only after an adequate stimulation.

This *in vitro* trial represents a hard challenge for the spermatozoa missing regulating factors of the female genital tract. Bulls with a NRR of between 60% and 69% have only few or no sperm cells which are able to respond to calcium ionophore as is also confirmed by bull No. 15 (NRR = 43%). This functional spermatozoan parameter provides an approach to assess even slight differences in fertility between bulls of high NRR. The low fertility of bull No. 15 in this trial is already revealed by the low percentage of motile spermatozoa in the sample after thawing. Neither the motility parameters nor the ATP amount of the bulls with higher NRR disclose any possibilities to assess their fertility.

The second aim of this work was to investigate the possibility of fertility improvement by exchanging seminal plasma. The seminal plasma of 8 ejaculates each of three bulls with low NRR was removed by centrifugation and replaced before cryopreservation by seminal

plasma from bulls with higher NRR. This possibility of improving the fertilizing ability of bulls with low NRR cannot be confirmed by the obtained results. Differences between the specimens with and without seminal plasma can be perceived which lead to the conclusion of a protective function of the seminal plasma.

9. Literaturverzeichnis

ADEOYA-OSIGUWA, S.A. u. FRASER, L.R. (1993).

A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential.

J. Reprod. Fertil., **99**: 187-194.

AGUAS, A.P. u. PINTO DA SILVA, P. (1985).

The acrosomal membrane of boar sperm: A Golgi-derived membrane poor in glycoconjugates.

J. Cell. Biol., **100**: 528-534.

AITKEN, R.J., THATCHER, S., GLASIER, A.F., CLARKSON, J.S., WU, F.C.W. u. BAIRD, D.T. (1987).

Relative ability of modified versions of the hamster oocyte penetration test, incorporating hyperosmotic medium or the ionophore A23187, to predict IVF outcome.

Hum. Reprod., **2**: 227-237.

AITKEN, J., BUCKINGHAM, D. u. HARKISS, D. (1994).

Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assays of the acrosome reaction and sperm-oocyte fusion.

Hum. Reprod., **9**: 1867-1874.

AMANN, R.P., HAY, S.R. u. HAMMERSTEDT, R.H. (1982).

Yield characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis.

Biol. Reprod., **27**: 723-733.

AMELAR, R.D., DUBIN, L. u. SCHOENFELD, C. (1980).

Sperm motility.

Fert. Steril., **34**: 197-215.

ANDERSON, S.H. u. KILLIAN, G.J. (1994).

Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation.

Biol. Reprod., **51**: 795-799.

ARTS, E.G.J.M., KUIKEN, J., JAGER, S. u. HOEKSTRA, D. (1993).

Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa

Europ. J. Bioch., **217**: 1001-1009.

AUSTIN, C.R. (1952).

The capacitation of mammalian sperm.

Nature, Lond., **170**: 326.

AX, R.L., DICKSON, K. u. LENZ, R.W. (1985).

Induction of AR by chondroitin sulfates in vitro corresponds to NRR of dairy bulls.

J. Dairy Sci., **68**: 387-390.

BABCOCK, D.F. u. PFEIFFER, D.R. (1987).

Independent elevation of cytosolic $[Ca^{2+}]$ and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms.

J. Biol. Chem., **262**: 15041-15047.

BABCOCK, D.F., SINGH, J.P. u. LARDY, H.A. (1979).

Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa.

Dev. Biol., **69**: 85-93.

BAILEY, J.L. u. BUHR, M.M. (1993).

Ca^{2+} regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187.

Cryobiology, **30**: 470-481.

BAKER, R.D. u. DEGEN, A.A. (1972).

Transport of live and dead spermatozoa within the reproductive tract of gilts.

J. Reprod. Fert., **28**: 369-374.

BARTH A.D. u. OKO, R.J. (1989).

Defects of the sperm head.

In: Barth, A.D., OKO, R.J.: Abnormal Morphology of bovine spermatozoa.
Iowa State University Press.

BAVISTER, B.D. (1969).

Environmental factors important for in vitro fertilization of the hamster.

J. Reprod. Fertil., **18**: 544-549.

BAVISTER, B.D. u. YANAGIMACHI, R. (1977).

The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro.

Biol. Reprod., **16**: 228-237.

BEDFORD, J.M. (1963).

Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis.

Nature, **200**: 1178-1180.

BEDFORD, J.M. (1967).

Experimental requirement for capacitation and observations on ultrastructural changes in rabbit spermatozoa during fertilization.

J. Reprod. Fert. (Suppl.), **2**: 35.

BEDFORD, J.M. (1969).

Morphological aspects of sperm capacitation in mammals.

Schering Symp. Adv. Biosci., **4**: 35-48.

BEDFORD, J.M. (1970).

Sperm capacitation and fertilization in mammals.

Biol. Reprod. (Suppl.), **2**: 128-158.

BEDFORD, J.M. (1983).

Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals.

Biol. Reprod., **28**: 108-120.

BEDFORD, J.M. u. COOPER, G.W. (1978).

Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs.
In: Poste, G., Nicolson, G.L. (Hrsg.). Membrane surface reviews.
North-Holland, Amsterdam, **5**: 65-125.

BERGER, W. (1983).

Spermabeurteilung mit Hilfe der Biolumineszenzmessung von ATP, ADP und AMP.

Ludwig-Maximilian Universität, München. Diss.

BLACKMORE, P.F., BEEHE, S.J., DANFORTH, D.R. u. ALEXANDER, N.J. (1990).

Progesterone and 17--hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm.

J. Biol. Chem., **264**: 1376-1380.

BLEIL, J.D. u. WASSARMAN, P.M. (1983).

Sperm-egg interactions 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. WASSARMAN, P.M. (1986).

Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm.

J. Cell. Biol., **102**: 1363-1371.

BLOTTNER, S., NEHRING, H. u. TORNER, H. (1990).

Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility.

Theriogenology, **3**: 619-628.

BRACKETT, B.G. u. OLIPHANT, G. (1975).

Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro.

Biol. Reprod., **12**: 260-274.

BRACKETT, B.G., HALL, J.L. u. OH, Y.K. (1978).

In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa.

Fert. Steril., **29**: 571-582.

BRAHMSTAEDT, H.-U. (1982).

Untersuchungen zur Befruchtungsfähigkeit der Besamungsbullen.

Humboldt-Universität, Berlin, Diss.

BROOKS, D.E. (1970).

Observation in the content of ATP and ADP in bull spermatozoa using the firefly luciferase system.

J. Reprod. Fert. **23**: 525-528.

BUDWORTH, P.R., AMANN, R.P. u. CHAPMAN, P.L. (1988).

Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility.

J. Androl., **9**: 41-54.

BUSCH, W. u. FÜRSTENBERG, L. (1983).

Analyse zur Wichtung des Einflusses verschiedener Faktoren, insbesondere der Bullen, auf das Befruchtungsergebnis in Rinderherden.

Arch. Tierzucht, **26**: 407-415.

CALVETE, J.J., SANZ, L. u. TÖPFER-PETERSEN, E. (1994).

Spermadhesins: Structure-function relationships.

Assisted Reprod. Technol. Androl., **6**: 316-330.

CALVETE, J.J., SANZ, L., DOSTALOVA, Z. u. TÖPFER-PETERSEN, E. (1995).

Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding.

Fertilität, **11**: 35-40.

CALVO, L., DENNISONLAGOS, L., BANKS, S.M., DORSMANN, A., THORSELL, L.P., BUSTILLO, M., SCHULMAN, J.D. u. SHERINS, R.J. (1994).

Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization.

Hum. Reprod., **9**: 1880-1886.

CHANG, M.C. (1951).

Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.

Nature, Lond., **168**: 697-698.

CHANG, M.C. (1957).

A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm.

Nature, Lond., **197**: 258-259.

CHANG, M.C. (1958).

Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female.

Endocrinology, **63**: 619-623.

CLARK, E.N., CORRON, M.E. u. FLORMAN, H.M. (1993).

Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida.

J. Biol. Chem., **7**: 5309-5316.

CLAUS, R., HOANG VU, C., ELLENDORF, F., MEYER, H.-D., SCHOPPER, D. u. WEILER, U. (1987).

Seminal oestrogens in the boar, origin and function in the sow.

J. Steroid. Biochem., **27**: 331-335.

COOKE, D.F. u. HALLETT, F.R. (1976).

Motility evaluation of bull spermatozoa by photon correlation spectroscopy.

J. Mechanochem. Cell. Mot., **3**: 219-223.

CORONEL, C.E. u. LARDY, H.A. (1992).

Functional properties of caltrin proteins from seminal vesicle of the guinea pig.

Mol. Reprod. Dev., **33**: 74-80.

CROZET, N.(1984).

Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow.

Gamete Res., **10**: 241-251.

CUMMING, I.R. (1995).

Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination.

Vet. Rec., **136**: 289-291.

CUMMINS, J.M. (1982).

Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from oviduct of mated ewes.

Gamete Res., **6**: 53-63.

CUMMINS, J.M. u. YANAGIMACHI, R. (1982).

Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster.

Gamete Res., **15**: 187-212.

CUMMINS, J.M., PEMBER, S.M., JEQUIER, A.M., YOVICH, J.L. u. HARTMANN, P.E. (1991).

A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge.

J. Androl., **2**: 98-103.

DAN, J.C. (1954).

Studies on the acrosome. III. Effect of calcium deficiency.

Biol. Bull., **107**: 335-349.

DAVIS, B.K. (1976).

Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of the rabbit.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **152**: 240-243.

DE JONGE, C.J., HAN, H.L., MACK, S.R. u. ZANEVELD, L.J.D. (1991).

Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate/cyclic AMP second messenger pathway.

J.Exp. Zool., **258**: 113-125.

DE LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H.G. u. WOELDERS, H. (1991).

The fix vital stain method - simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa.

J. Androl., **12**: 112-118.

DIDION, B.A. u. GRAVES, C.N. (1986).

In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrus and diestrus cows.

J. Anim. Sci., **62**: 1029- 1037.

DIDION, B.A. u. GRAVES, C.N. (1989).

Influence of calcium on the true acrosome reaction and capacity of bull spermatozoa to penetrate oocytes in vitro.

J. Dairy Sci., **72**: 1540-1546.

DOSTALOVA, Z., CALVETE, J.J, SANZ, L., HETTEL, C., RIEDEL, D., SCHONECK, C., EINSPANIER, R. u. TÖPFER-PETERSEN, E. (1994).

Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa.

Biol. Chem., **375**: 457-461.

EHRENWALD, E., PARKS, J.E. u. FOOTE, R.H. (1988).

Cholesterol efflux from bovine sperm. I induction of the AR with LPC after reducing sperm cholesterol.

Gam. Res., **20**: 145-157.

ENDO, Y., LEE, M.A. u. KOPF, G.S. (1987).

Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction.

Dev. Biol., **119**: 210-216.

ENG, L.E. u. OLIPHANT, G. (1978).

Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma.

Biol. Reprod., **19**: 1083-1094.

FAROOQUI, A.A. (1982).

Biochemistry of sperm capacitation.

Int. J. Biochem., **15**: 463-468.

FENICHEL, P., DONZEAU, M. u. FARAHIFAR, D. (1991).

Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization.

Fertil. Steril., **5**: 994-999.

FENICHEL, P., CERVONI, F., HOFMANN, P., DECKERT, M., EMILIOZZI, C., HSI, B.L. u. ROSSI, B. (1994).

Expression of the complement regulatory protein CD59 on human spermatozoa: Characterization and role in gametic interaction.

Molec. Reprod. Dev., **38**: 338-346.

FETTEROLF, P.M. u. ROGERS, B.J. (1990).

Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters.

Mol. Reprod. Dev., **27**: 326-331.

FETTEROLF, P.M., JURISICOVA, A., TYSON, J.E. u. CASPER, R.F. (1994).

Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity.

Biol. Reprod., **51**: 184-192.

FLECHON, J.-E., HARRISON, R.A.P., FLECHON, B. u. ESCAIG, J. (1986).

Membrane fusion events in ca-ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa.

J. Cell. Sci., **81**: 43-63.

FLORMAN, H.M. (1994).

Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis.

Dev. Biol., **1**: 152-164.

FLORMAN, H.M. u. FIRST, N.L. (1988a).

The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro.

Dev. Biol., **128**: 453-463.

FLORMAN, H.M. u. FIRST, N.L. (1988b).

The regulation of acrosomal exocytosis. II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements.

Dev. Biol., **128**: 464-473.

FLORMAN, H.M. u. STOREY, B.T. (1982).

Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro.

Dev. Biol., **91**: 121-130.

FLORMAN, H.M., BECHTOL, K.B. u. WASSARMAN, P.M. (1984).

Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor function for sperm.

Dev. Biol. **106**: 243-255.

FLORMAN, H.M., TOMBES, R.M., FIRST, N.L. u. BABCOCK, D.F. (1989).

An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis.

Dev. Biol., **135**: 133-146.

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

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

Dev. Biol., **152**: 304-314.

FORD, W.C.L., REES, J.M., MCLAUGHLIN, E.A., LING, L. u. HULL, M.G.R. (1994).

Pentoxifylline acts synergistically with A23187 to increase the penetration of zona-free hamster oocytes by cryopreserved human spermatozoa.

Int. J. Androl., **17**: 199-204.

FORRESTER, I.I. u. BRADLEY, M.P. (1980).

Identification of calmodulin-like activity in human seminal plasma.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **92**: 994-998.

FRASER, L.R. (1983).

Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and whiplash motility in vitro.

J. Reprod. Fertil., **69**: 539-553.

FRASER, L.R. (1987).

Minimum and maximum extracellular Ca²⁺ requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro.

J. Reprod. Fertil., **81**: 77-89.

FRASER, L.R. (1993).

Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis.

Mol.Reprod.Dev., **36**: 368-376.

FRASER, L.R. u. QUINN, P.J. (1981).

A glycolytic product is obligatory for initiation of sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse.

J. Reprod. Fertil., **61**:25-35.

FULLER, S.J. u. WHITTINGHAM, D.G. (1995).

Capacitation-like changes induced in mouse spermatozoa at low temperatures above freezing.

J. Biol. Reprod. (Abstr. Series), **15**: 95.

GADELLA, B.M., COLENBRANDER, B., VAN GOLDE, L.M.G. u. LOPES-CARDOZO, M. (1993).

Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation.

Biol. Reprod., **48**: 483-489.

GARNER, D.L. u. HAFEZ, E.S.E. (1993).

Spermatozoa and seminal plasma.

In: Hafez, E.S.E. (hrsg.). Reproduction in farm animals. 6. Auflage.

Lea u. Febiger, Philadelphia, S 165-187.

GARTY, N.B., GALIANI, D. u. AHARONHEIM, A. (1988).

G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study.

J. Cell. Sci., **91**: 21- 26.

GOLTZ, J.S., GARDNER, T.K. u. KANOUS, K.S. (1988).

The interaction of pH and cAMP on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm.

Biol. Reprod. **39**: 1129-1136.

GORDON, M., DANDEKAR, P.V. u. BARTOSZEWICZ, W. (1975).

The surface coat of epididymal, ejaculated and capacitated sperm.

J. Ultrastruc. Res., **50**: 199-207.

GORDON, M., DANDEKAR, P.V. u. EAGER, P.R. (1978).

Identification of phosphatases on the membranes of guinea pig sperm.

Anat. Rec., **191**: 123-133.

GRAHAM, J.K., KUNZE, E. u. HAMMERSTEDT, R.H. (1990).

Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry.

Biol. Reprod., **43**: 55-64.

HALL, J.A. u. FISHEL, S.B. (1995).

Ultracentrifugation of human sperm increases percentage acrosome reaction without compromising cell vitality.

J. Reprod. Fertil. (Abstr. Series) **15**: 128.

HAMMER, C.E. u. WILLIAMS, W.L. (1963).

Effect of the female reproductive tract on sperm metabolism in rabbit and fowl.

J. Reprod. Fertil., **9**: 143-150.

HAMMERSTEDT, R.H. u. HAY, S.R. (1980).

Effect of incubation temperature on motility and cAMP content of bovine sperm.

Arch. Bioch. Bioph., **199**: 427-437.

HANDROW, R.R., LENZ, R.W. z. AX, R.L., (1982).

Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **107**: 1326-1332.

HANDROW, R.R., BOEHM, S.K., LENZ, R.W., ROBINSON, J.A. u. AX, R.L. (1984).

Specific binding of the glycosaminoglycan ³H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. J. Androl., **5**: 51-63.

HANDROW, R.R., PARRISH, J.J. u. FIRST, N.L. (1986).

Heparin stimulates calcium uptake by bovine sperm in vitro.

J. Androl., **7**:19-23.

HANDROW, R.R., FIRST, N.L. u. PARRISH, J.J. (1989).

Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin.

J. Exp. Zool., **252**: 174-182.

HARDY, D.M., ODA, M.N., FRIEND, D.S. u. HUANG, T.F. (1991).

A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction.

Biochem. J., **275**: 759-766.

HARRISON, R.A.P. (1983).

The acrosome, its hydrolase and egg penetration.

In: Nijhoff, M. (Hrsg.). The sperm cell.

J. Andr. S. 259-273.

HENKEL, R., MÜLLER, C., MISKA, W., GIPS, H. u. SCHILL, W.-B. (1993).

Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro.

Hum. Reprod., **8**: 2128-2132.

HIRAO, K.S. (1975).

Multiple regression analysis on 6 measurements of bovine semen characteristics and fertility.

Int. J. Fertil., **20**: 204-208.

HOLM-HANSEN, O. u. KARL, D.M. (1978).

Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples.

In: Methods in Enzymology (M. Deluca, Hrsg).

Acad. Press, New York, San Francisco, London, **57**: 73-85.

HOLT, W.V., MOORE, H.D.M. u. HILLIER, S.G. (1985).

Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays.

Fert. Steril., **44**: 112-119.

HOSKINS, D.D., BRANDT, H. u. ACOTT, T.S. (1978).

Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis.

Fed. Proc., **37**: 2534-2542.

HUNTER, Y.K. u. NORNE, H.O. (1969).

Characterization and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization.

J. Reprod. Fertil., **20**: 419-427.

HUNTER, R.H.F., FLECHON, B. u. FLECHON, J.E. (1991).

Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study.

Tissue Cell, **23**: 641-656.

HURST, R.E., BYNUM, R.L., EINFELDT, S.E. u. ROY, J.B. (1988).

The identification of a heparin binding protein on the surface of bovine sperm.

Biochem. Biophys. Res. Com., **1**: 289-293.

HYNE, R.V., HIGGINSON, R.E., KOHLMAN, D. u. LOPATA, A. (1984).

Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction.

J. Reprod. Fertil., **70**: 83-94.

HYNE, R.V., EDWARDS, K.P. u. SMITH J.D. (1985).

Changes in guinea-pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophore.

Gamete Res., **12**: 65-73.

IWAMATSU, T. u. CHANG, M.C. (1969).

In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid.

Nature, **224**: 919-920.

JAMIL, K. (1984).

Plasma membrane cytoskeletal complex of the mammalian spermatozoa.

Arch. Androl., **13**: 177-193.

JEULIN, C., FERNEUX, D., SERRES, C., JOUANNET, P., BUILLET-ROSSO, P., BELAISCH-ALLART, F., FRYDMAN, R. u. TESTART, J. (1986).

Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization.

J. Reprod. Fertil., **76**: 735-744.

JOHNSON, W.L. u. HUNTER, A.G. (1972).

Seminal antigens: Their alteration in the genital tract of female rabbits and during partial in vitro capacitation with beta-amylase SNA beta-glucuronidase.

Biol. Reprod., **7**: 332-340.

JOHNSON, L.A., AMBROSE, J.D., RAJAMAHENDRAN, R. u. LEE, C.Y.G. (1996).

An indirect immunofluorescence assay to assess sperm cryodamage using anti-Bull sperm monoclonal antibodies.

Theriogenology, **45**, 311.

JONES, H.P., LENZ, R.W., PALEVITZ, B.A. u. CORNIER, M.J. (1980).

Calmodulin localization in mammalian spermatozoa.

Proc. Natl. Acad. Sci., **77**: 2772-2776.

KÄHN, W., PFETSCH, J. u. LEIDL, W. (1982).

ATP-, ADP- und AMP-Gehalt von Spermien einiger Haustiere und des Menschen sowie von Bullenspermien während der Tiefgefrierkonservierung.

Zuchthyg., **17**: 49-55.

KANWAR, U., ANAND, R.J.K. u. SANYAL, S.N. (1993).

The effect of Nifedipine, a calcium channel blocker, on human spermatozoal functions.

Contraception, **48**: 453-470.

KATZ, D.F. u. DOTT, H.M. (1975).

Methods of measuring swimming speed of spermatozoa.

J. Reprod. Fert., **45**: 263-272.

KATZ, D.F., YANAGIMACHI, R. u. DREDNER, R.D. (1978).

Movement characteristics and power output of guinea pig and hamster spermatozoa in relation to activation.

J. Reprod. Fertil., **52**: 167-172.

KAWAGUCHI, M.(1992).

Relationship of estrous non-return rates to in vitro fertilization and acrosome reaction rates of frozen-thawed bovine sperm.

Jap. J. Vet. Res., **40**: 36-42.

KILLIAN, G.J., CHAPMAN, D.A. u. ROGOWSKI, L.A. (1993).

Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma.

Biol. Reprod., **49**: 1202-1207.

KING, R.S., ANDERSON, S.H. u. KILLIAN, G.J. (1994).

Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes.

J. Androl., **15**: 468-478.

KLEMM, M. u. ENGEL, L. (1991).

On the capacity of mouse spermatozoa for spontaneous AR in the male and female genital tract.

Androl. **23**: 427-433.

KOHELER, J.K., NUDELMAN, E.D. u. HAKAMORI, S. (1980).

A collagen-binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa.

J. Cell. Biol., **86**: 529-536.

KOEHLER, J.K., DE CURTIS, I., STECHENER, M.A. u. SMITH, D. (1982).

Interaction of human sperm with zona free hamster eggs. A freeze fracture study.

Gamete Res., **6**: 371-386.

KOPF, G.S. (1988).

Regulation of sperm function by guanine nucleotide-binding regulatory proteins (G-proteins).

In F.P. Haseltine, N.L., First (hrsg): Meiotic inhibition: molecular control of meiosis.
Alan R. Liss., New York, S. 357-386.

KOPF, G.S. u. WILDE, M.W. (1990).

Signal transduction processes leading to acrosomal exocytosis in mammalian spermatozoa.

TEM, **9**: 362-368.

KRAUSE, D. (1966).

Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung

der Befunde.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Habil.-Schrift.

KRAUSE, W., SCHÖNHÄRL, G. u. BRAKE, A. (1993).

The variability of measuring sperm concentration and motility as determined by computer assisted image analysis and visual estimation.

Andrologia, **25**: 181-187.

LANGLAIS, J. u. ROBERTS, K.D. (1985).

A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.

Gamete Res., **12**: 183-224.

LARSSON, B. u. LARSSON, K. (1985).

Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers.

Acta Vet. Scand., **26**: 385-392.

LARSSON, K., EINARSSON, S. u. NICANDER, L. (1976).

Influence of thawing diluents on viability, acrosome morphology, ultrastructure and enzyme release of deep frozen boar spermatozoa.

Acta Vet. scand., **17**: 83-100.

LECLERC, P., LANGLAIS, J., LAMBERT, R.D., SIRARD, M.A. u. CHAFOULEAS, J.G. (1989).

Effect of heparin on the expression of calmodulin binding proteins in bull spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. **85**: 615-622.

LEE, C.N. u. AX, R.L. (1984).

Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract.

J. Dairy Sci., **67**: 2006-2009.

LEE, V. u. DUNBAR, B. (1993).

Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and mRNA in ovarian follicles.

Dev. Biol., **155**: 371-382.

LEE, C.N., HANDROW, R.R., LENZ, R.W. u. AX, R.L. (1985).

Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro.

Gamete Res., **12**: 345-355.

LEE, C.N., CLAYTON, M.K., BUSHMEYER, S.M., FIRST, N.L. u. AX, R.L. (1986).

Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro.

J. Anim. Sci., **62**: 861-867.

LEIDL, W. u. WENDT, V. (1976).

Die Bedeutung des Spermienenzym Akrosin bei der Fortpflanzung.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., **83**: 528.

LENZ, R.W., AX, R.L., GRIMEK, H.J. u. FIRST, N.L. (1982).

Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **106**: 1092-1098.

LEYTON, L. u. SALING, P. (1989).

Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction.

J. Cell. Biol., **108**: 2163-2168.

LILLIE, F.R. (1913).

The mechanism of fertilization.

Science, **38**: 524-528.

LINDEMANN, C.B. u. KANOUS, K.S. (1989).

Regulation of mammalian sperm motility.

Arch. Androl., **23**: 1-22.

LINFORD, E., GLOVER, F.A., BISHOP, C. u. STEWART, D.L. (1976).

The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.

J. Reprod. Fert., **47**: 283-285.

LIU, Y.T. u. WARME, P.K. (1977).

Computerized evaluation of sperm cell motility.

Comp. Biomed. Res., **10**: 127-138.

LIU, D.Y. u. BAKER, H.W.G. (1994).

Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: A newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro.

Hum. Reprod., **9**: 1694-1700.

LOPEZ, L.C. u. SHUR, B.D. (1987).

Redistribution of mouse sperm galactosyltransferase after the acrosome reaction.

J. Cell. Biol., **105**: 1663-1670.

LORENZ, R.J. (1988).

Grundbegriffe der Biometrie.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

MANJUNATH, P., SOUBEYRAN, S., CHANDONNET, L. u. ROBERTS, K.D. (1994),

Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A(2).

Biochem. J., **303**: 121-128.

MÄRKLE-RUTZ, I. (1994).

Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien bei verschiedenen in vitro

Kapazitationsverfahren.

Ludwig-Maximilian Universität, München. Diss.

MARKS, J.L. u. AX, R.L. (1985).

Relationship of NRR of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm.

J. Dairy Sci., **68**: 2078-2082.

MARSHBURN, P.B., MCINTIRE, D., CARR, B.R. u. BYRD, W. (1992).

Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination.

Fert. S teril., **58**: 179-188.

MATHUR, S., CARLTON, M., ZIEGLER, J., RUST, P.F. u. WILLIAMSON, H.O. (1986).

A computerized sperm motion analysis.

Fert. Steril., **46**: 484-488.

MCNUTT, T.L., OLDSCLARKE, P., WAY, A.L., SUAREZ, S.S. u. KILLIAN, G.J. (1994).

Effect of follicular or oviductal fluids on movement characteristics of bovine sperm during capacitation in vitro.

J. Androl., **15**: 328-336.

MEIZEL, S., (1984).

The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction.

J. Exp. Zool., **195**: 137-144.

MILLER, D.J. u. AX, R.L. (1989).

Chemical N-desulfation of heparin negates its ability to capacitate bovine spermatozoa.

Gam. Res., **23**: 451-465.

MILLER, D.J. u. AX, L. (1990).

Carbohydrates and fertilization in animals.

Mol. Reprod. Dev., **26**: 184-198.

MILLER, D.J. u. HUNTER A.G. (1986).

Effect of osmolality and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm.

J. Dairy Sci., **69**: 2915-2924.

MILLER, D.J., WINER, M.A. u. AX, R.L. (1990).

Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin.

Biol. Reprod., **42**: 899-915.

MURPHY, S.J. (1984).

The pH-dependence of motility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa.

Pac. Sci., **38**: 368-369.

NAZ, R.K. u. KAPLAN, P. (1994).

Interleukin-6 enhances the fertilizing capacity of human sperm by increasing capacitation and acrosome reaction.

J. Androl., **15**: 228-233.

NEUWINGER, N., BEHRE, H.M. u. NIESCHLAG, E. (1990).

Computerized semen analysis with sperm tail detection.

Hum. Reprod., **5**: 719-723.

NEWTON, A.A. u. ROTHSCHILD, F.R.S. (1961).

Energy-rich phosphate compounds in bull semen: comparison of their metabolism with anaerobic heat production and impedance change frequency.

Proc. Roy. Soc., **155**: 183-194.

NOLAN, J.P., GRAHAM, J.K. u. HAMMERSTEDT, R.H. (1992).

Artificial induction of exocytosis in bull sperm.

Arch. Biochem. Biophys., **292**: 311-322.

OLIPHANT, G. u. BRACKETT, B.G. (1973).

Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation.

Biol. Reprod., **9**: 404-414.

PACE, M.M., SULLIVAN, J.J., ELLIOT, F.J., GRAHAM, E.F. u. COULTER, G.H. (1971).

Effect of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml french straws.

J. Anim. Sci., **52**: 693-698.

PAMPIGLIONE, J.S., TAN, S.L. u. CAMPBELL, S. (1993).

The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa.

Fertil. Steril., **6**: 1280-1284.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A. u. FIRST, N.L. (1988).

Capacitation of bovine sperm by heparin.

Biol. Reprod., **38**: 1171-1180.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., HANDROW, R.R., SIMS, M.M. u. FIRST, N.L. (1989).

Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid.

Biol. Reprod., **40**: 1020-1025.

PARRISCH, J.J., KROGENAES, A. u. SUSKO-PARRISH, J.L. (1995).

Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development.

Theriogenology, **44**: 859-871.

POLLARD, J.W., PLANTE, C., ALLAN KING, W., HANSEN, P.J., BETTERIDGE, K.J. u.

SUAREZ, S.S. (1991).

Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells.
Biol. Reprod., **44**: 102-107.

RAJAMAHENDRAN, R., AMBROSE, J.D. u. LEE, C.Y.G. (1994).

Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: A potential marker to detect bovine sperm capacitation and acrosome reaction in vitro.

J. Reprod. Fertil., **101**: 539-545.

RATH, D., WEITZE, K.-F., ARMBRECHT, S. u. BIELFELD, P. (1987).

Einjährige Erfahrungen mit einem Videomikrographiesystem (Cellsoft) zur Spermabeurteilung.

Dtsch. tierärztl. Wschr., **94**: 501-503.

RETHINASWAMY, A., YANG, C.H. u. SRIVASTAVA, P.M. (1994).

Purification and characterization of beta-glucuronidase from bull seminal plasma and its role in fertilization.

Mol. Reprod. Dev., **38**: 404-409.

RICHARDSON, R.T., YAMASAKI, N. u. ORAND, M.G. (1994).

Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction.

Dev. Biol., **165**: 688-701.

RIEMKE, F. (1984).

Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung von Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie.

Ludwig-Maximilian Universität, München. Diss.

RIEMKE, P. u. LEIDL, W. (1985).

Motilitätsbeurteilung der Spermien mit Videomikrographie und Computerauswertung.

Zuchthyg., **20**: 106-111.

RIKMENSPOEL, R. (1964).

Microscopic chamber for simultaneous measurement of motility and respiration of spermatozoa.

Rev. Sci. Instrum., **35**: 49-53.

RÖNKKO, S., LINNALA-KANKKUNEN, A. u. TUHKANEN, A.L. (1994).

Partial characterization of a fraction from bull seminal vesicle fluid that potentiates the bull sperm acrosome reaction in vitro.

Androl., **26**: 73-78.

ROLDAN, E.R.S. u. FLEMING, A.D. (1989).

Is a Ca-ATPase involved in Ca²⁺ regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa.

J. Reprod. Fertil., **85**: 297-308.

ROLDAN, E.R.S. u. HARRISON, R.A.P. (1989).

Polyphosphoinositide breakdown and subsequent exocytosis in the Ca²⁺ ionophore-induced acrosome

reaction of mammalian spermatozoa.

Biochem. J., **259**: 397-406.

ROLDAN, E.R.S. u. HARRISON, R.A.P. (1992).

The role of diacylglycerol in the exocytosis of the sperm acrosome.

Biochem. J., **281**: 767-773.

ROLDAN, E.R.S. u. MURASE, T. (1994).

Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome - Effect is not mediated by protein kinase C.

J. Biol. Chem., **169**: 23583-23589.

ROLDAN, E.R.S., MARTINEZDALMAU, R. u. MOLLINEDO, F. (1994).

Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A₍₂₎.

Int. J. Biochem., **26**: 951-958.

ROSS, D.A., DHADWAL, H.S. u. FOULKES, J.A. (1983).

Laser measurement of the motility of bull spermatozoa in an egg-yolk diluent.

J. Reprod. Fert., **67**: 263-268.

RUBINSTEIN, S. u. BREITBART, H. (1991).

Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction.

Biochem. J., **278**: 25-28.

RUFO, G.A. JR., SINGH, J.P., BABCOCK, D.F. u. LARDY, H.A. (1982).

Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma.

J. Biol. Chem., **257**: 4627-4632.

RUFO, G.A. JR., SCHOFF, P.K. u. LARDY, H.A. (1984).

Regulation of calcium content in bovine spermatozoa.

J. Biol. Chem., **259**: 2547-2552.

SAACKE, R.G. (1972).

Semen quality tests and their relationship to fertility.

4th Technical conference on artificial insemination and reproduction. National Association of Animal Breeders, Chicago, 22 (abstr).

SALING, P.M. u. BEDFORD, J.M. (1981).

Absence of species specificity for mammalian sperm capacitation in vivo.

J. Reprod. Fert., **63**: 119-123.

SALING, P.M., SOWINSKI, J. u. STOREY, B.T. (1979).

An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: Sequential relationship to the acrosome reaction.

J. Exp. Zool, **209**: 229-238.

SALISBURY, G.W. u. LODGE, J.R. (1962).

Metabolism of spermatozoa.

Advan. Enzymol. **24**: 35-42.

SALISBURY, G.W.; VANDENMARK, N.L. u. LODGE, J.R. (1978).

Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.

WH Freeman & Co., San Francisco, S.428-441.

SAN AGUSTIN, J.T., HUGHES, P. u. LARDY, H.A. (1987).

Properties and function of caltrin, the calcium-transport inhibitor of bull seminal plasma.

FASEB J., **1**: 60-66.

SCHNEIDER, C.S., ELLINGTON, J.E. u. WRIGHT, R.W. (1996).

Effects of bulls with different field fertility on in vitro embryo cleavage and development using sperm co-culture systems.

Theriogenology (Abstr.), **45**: 262.

SCHÜLKE, B. (1991).

"Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas"

In: Busch, W., Löhle, K., Peter, W. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Nutztieren. 2. Auflage

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, S. 209-237.

SEIBERT, H. (1988).

Messung der Bewegungsaktivität der Spermatozoen von Mensch und Rind mit Hilfe von Videomikrographie und Computerbildanalyse.

Fertilität, **4**: 215-218.

SHALEV, X., SHEMESH, M., LEVINSHAL, T., MARCUS, S. u. BREITBART, H. (1994).

Localization of cyclooxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa.

J. Reprod. Fertil., **101**: 405-413.

SHAMSUDDIN, M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. u. LARSSON, B. (1993).

Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid containing medium.

Reprod. Fertil. Dev., **5**: 307-315.

SHUR, B.D. u. HALL, N.G. (1982).

Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation.

J. Cell. Biol., **95**: 567-573.

SINGH, J.P., BABCOCK, D.F. u. LARDY, H.A. (1978).

Increased calcium ion influx is a component of capacitation of spermatozoa.

J. Biochem., **172**: 549-556.

SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. u. JANSON, L. (1991).

Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of a.i. bull spermatozoa in relation to fertility.

J. Vet. Med., **38**: 165-174.

SPUNGIN, B., MARGALIT, I. u. BREITBART, H. (1995).

A 70 kDa protein is transferred from the outer acrosomal to the plasma membrane during capacitation.

FEBS Letters **357**: 98-102.

STAUSS, C.R., VOTTA, T.J. u. SUAREZ, S.S. (1995).

Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida.

Biol. Reprod., **53**: 1280-1285.

SUAREZ, S.S., KATZ, D.F. u. OVERSTREET, J.W. (1983).

Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization.

Biol. Reprod., **29**: 1277-1287.

SUMMERS, R.G., TALBOT, P.K., KEOUGH, E.M., HYLANDER, B.L. u. FRANKLIN, L.E. (1976).

Ionophore A 23187 induces acrosomal reaction in sea urchin and guinea pig spermatozoa.

J. exp. Zool., **196**: 381-385.

SUZUKI, H. u. FOOTE, R.H. (1995).

Bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and Oviducts: I. for embryo culture. II. Using SEM for studying interactions with spermatozoa.

Microscopy Research and Techniques, 31: 519-530.

TALBOT, P., SUMMERS, R.G., HYLANDER, B.L., KEOUGH, E.M. u. FRANKLIN, L.E. (1976).

The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A 23187.

J. Exp. Zool., 198: 383-392.

TARIN, J.J. u. TROUNSON, A.O. (1994).

Inducers of the acrosome reaction.

Reprod. Fertil. Dev., **6**: 33-36.

TESARIK, J. (1985).

Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro.

J. Reprod. Fertil., **74**: 383-388.

TESARIK, J. (1989).

Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon.

Hum. Reprod., **4**: 957-961.

THERIEN, I., BLEAU, G. u. MANJUNATH, P. (1995).

Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of

spermatozoa by heparin.

Biol. Reprod., **52**: 1372-1379.

THOMAS, T.S., REYNOLDS, A.B. u. OLIPHANT, G. (1984).

Evaluation of the site of synthesis of rabbit sperm acrosome stabilizing factor using immunocytochemical and metabolic labeling techniques.

Biol. Reprod., **30**: 693-705.

THOMAS, P.G.A., BALL, B.A. u. BRINSKO, S.P.(1994).

Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant.

Biol. Reprod. **51**: 222-228.

UGUZ, C., SUSKO-PARRISH, J.L. u. PARRISH, J.J. (1992).

Cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) is elevated during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid

Therio., **37**: 337-342.

VAIDYA, R.A., GLASS, R.H., DANDEKAR, P. u. JOHNSON, K. (1971).

Decrease in the electrophoretic mobility of rabbit spermatozoa following intrauterine incubation.

J. Reprod. Fert., **24**: 299-301.

VAN DUREN, M.D. u. DYONNE, B.P.J. (1987).

Importance of sperm motility after capacitation in interpreting the hamster ovum sperm penetration assay.

Fert. Steril., **47**: 456-459.

VIJAYARAGHAVAN, S., TRAUTMAN, K., MISHRA, S.K. u. HERMSMEYER, K. (1994).

Evidence against a functional ATP-dependent calcium extrusion mechanism in bovine epididymal sperm.

Molec. Reprod. Dev., **38**: 326-333.

VIJAYASARATHY, S., SHIVAJI, S. u. BALARAM, P. (1980).

Plasma membrane bound Ca²⁺-ATPase activity in bull sperm.

FEBS Lett., **114**: 45-47.

WASSARMAN, P.M. (1987).

The biology and chemistry of fertilization.

Science, **135**: 553-554.

WASSARMAN, P.M. (1988).

Zona pellucida glycoproteins.

Annu. Rev. Biochem., **57**: 415-442.

WASSARMAN, P.M. (1994).

Gamete interactions during mammalian fertilization.

Theriogenology, **41**: 31-44.

WATSON, P.F. (1981).

The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein.

J. Reprod. Fert., **62**: 483-492.

WAY, A.L., HENAULT, M.A. u. KILLIAN, G.J. (1995).

Comparison of four staining methods for evaluation acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa.

Therio enology, **43**: 1301-1316.

WEINMAN, D.E. u. WILLIAMS, W.L. (1964).

Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa.

Nature, **203**: 423.

WESTPHAL, L.M., ELDANSASOURI, I., SHIMIZU, S., TADIR, Y. u. BERNIS, M.W. (1993).

Exposure of human spermatozoa to the cumulus oophorus results in increased relative force as measured by a 760 nm laser optical trap.

Hum. Reprod., **8**: 1083-1086.

WHITFIELD, C.H. u. PARKINSON, T.J. (1995).

Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187).

Theriogenology, **44**: 413-422.

YANAGIMACHI, R. (1969).

In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions.

J. Exp. Zool., **170**: 269-280.

YANAGIMACHI, R. (1982).

Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster.

Gamete Res., **5**: 323-344.

YANAGIMACHI, R. (1988).

Mammalian fertilization.

In: The Physiology of Reproduction (E. Knobil, J. Neill et al., Hrsg.).

Raven Press, Ltd., New York, S. 135-185.

YANAGIMACHI, R. u. NODA, Y.D. (1970).

Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells.

J. Ultrastr. Res. **31**: 486-493.

YANAGIMACHI, R. u. USUI, N. (1974).

Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa.

Exp. Cell. Res., **89**: 161-174.

YANAGIMACHI, R. u. MAHI, C.A. (1976).

The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea pig: A study in vivo.

J. Reprod. Fertil., **46**: 49-54.

ZANEVELD, L.J.D., DE JONGE, C.J., ANDERSON, R.A. u. MACK, S.R. (1991).

Human sperm capacitation and the acrosome reaction.

Hum. Reprod., **6**: 1265-1274.

Curriculum vitae

Name: Ursula Anna Vitt

Geburtsdatum und -ort: 10. März 1970 in Siegen

Schulbesuch:

März 1976 bis November 1978: St. Ursulinen Schule, Santiago de Chile

März 1979 bis Juli 1979: Deutsche Schule Santiago, Chile

September 1979 bis November 1985: Deutsche Schule Pretoria, Süd-Afrika

Dezember 1985 bis Juni 1988: Evangelisches Gymnasium, Siegen

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

Oktober 1988 bis Oktober 1994: Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Abschluß: Staatsexamen der Veterinärmedizin

Dezember 1994: Approbation als Tierarzt

1994 bis Oktober 1995: Promotionsarbeit am Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. und an der Klinik für Fortpflanzungskunde des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Berufstätigkeit:

Seit November 1995: Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.

Arbeitsgebiete: Tiefgefrierkonservierung von Rinderoozyten, in vitro Fertilisation des Rindes, Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Rinderspermien in vitro, Wechselwirkung der Spermien mit Bestandteilen des weiblichen Genitaltraktes.

Auslandsaufenthalte:

Januar bis März 1992: Praktikum an der University of Nairobi, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Studies.

August 1992: Teilnahme am GTZ Veterinary Project an der Tiermedizinischen Fakultät der Makerere University of Kampala.

Sprachkenntnisse:

Englisch und Französisch in Wort und Schrift; Spanisch und Afrikaans.

Berlin, den 19.08.1996

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. W. Busch, Tierklinik für Geburtshilfe und Fortpflanzung, Fachbereich Tiermedizin, für die Betreuung meiner Arbeit.

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Promotion wurden am Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. durchgeführt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern dieses Institutes. Herrn Dr. Nehring danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten in den jeweiligen Labors.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. K. Müller für die gründliche und engagierte wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit. Frau R. Wolf und Frau K. Reguszynski danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Handhabung der Rinderspermien und ihre Hilfe bei den Laborarbeiten. Für die wertvollen computertechnischen Hilfestellungen im Verlaufe dieser Arbeit möchte ich Herrn L. Rothe meinen Dank aussprechen. Herrn Dr. Küchenmeister danke ich für seine Unterstützung.

Bei der Niederbayerischen Besamungsgenossenschaft Landshut-Pocking e.G. bedanke ich mich für die Gewinnung und Bereitstellung der gefrierkonservierten Spermienproben und für die Ermittlung der NRR. Herrn Professor Schallenberger danke ich für die Unterstützung dieser Bereiche der Arbeit.

Der Dr. Dr. h.c. Karl Eibl-Stiftung danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.