

## 2 Schrifttum

### 2.1 Morphologie der Hengstpermien

#### 2.1.1 Allgemeines zur Morphologie

Spermien bestehen nach GÖTZE (1949) aus dem Kopf, dem Hals und dem Schwanz, der sich wiederum in das Verbindungs-, Haupt- und Endstück unterteilen lässt. Die Samenzelle ist entsprechend allen Säugetierzellen von einer Plasmamembran umgeben (AUSTIN 1975; GOULD et al. 1975; ZANEVELD 1975).

Nach BIELANSKI und KACSMARSKI (1979) sind Spermatozoen von Hengsten eindeutig von denen anderer Säugetiere zu unterscheiden. Sie besitzen einen ihnen eigenen asymmetrischen Kopf, eine kleine Kopfkappe und haben einen paraxialen Schwanzansatz. Zu entsprechenden Ergebnissen kamen bereits NICANDER und BANE (1966) und DOTT (1975).

#### 2.1.2 Der Spermienkopf und das Akrosom

Der Kopf enthält in seinem Kern die genetische Information in dicht gelagerter DNA. Er ist oval (DOWSETT et al. 1984) und dorso-ventral abgeplattet (CACECI und VARNER 1987) und besitzt eine Länge von 5  $\mu\text{m}$  und eine Breite von 2,4  $\mu\text{m}$ .

Das Akrosom ist die membranbegrenzte Kopfkappe mit ihrem Inhalt im apikalen Teil des Spermienkopfes (MANN 1964; NICANDER und BANE 1966). Man unterscheidet eine innere und äussere Akrosomenmembran mit dazwischen eingeschlossener Akrosomenmatrix. Das Akrosom repräsentiert eine lysosomenähnliche Organelle (ALLISON und HARTREE 1969) und wird vom Golgiapparat der Spermienzelle gebildet (DOTT und DINGLE 1968). Es besitzt eine Schlüsselfunktion bei der Penetration des Spermiums durch die äussere Eizellhülle. Die Fusion der Spermien-

membran mit der äusseren Akrosomenmembran bezeichnet man als Akrosomreaktion (SAACKE und MASHALL 1968). Die Akrosomenmatrix enthält eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, die für die Lysis der äusseren Eizellmembran benötigt werden. Der Ablauf der Akrosomreaktion ist die Voraussetzung für die Penetration und Fertilisation der Eizelle (AUSTIN 1975).

Aufgrund der wichtigen Funktion der akrosomalen Enzyme bei der Penetration der Eihülle durch die Spermien und aufgrund der Tatsache, dass das Akrosom bei zellschädigenden Einflüssen meist zuerst und am stärksten betroffen wird, ist der Nachweis von Akrosomenschädigungen eines der wichtigsten Kriterien der Vitalitätsbeurteilung von Spermien. Methoden dafür sind z.B. die morphologische Beurteilung des Akrosomenzustandes (SAACKE und WHITE 1972), die zytochemische Erfassung der Akrosin-Aktivität oder die Messung der Hyaluronidase-Aktivität (HOLZMANN und STAHL 1978).

### 2.1.3 Zusammenhang zwischen Akrosomintegrität/Motilität und Fertilität

Für die Beurteilung der Samenqualität und der Vorhersage der zu erwartenden Fruchtbarkeit werden üblicherweise die Kriterien „prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien“ sowie „prozentualer Anteil morphologisch veränderter Spermienformen“ herangezogen. In der Routinepraxis wird in der Regel ausschliesslich die Motilität als Parameter für die Samenbeurteilung betrachtet und die Morphologie erst beim Auftreten von Konzeptionsproblemen genauer untersucht.

AMANN (1989) bezweifelte, dass sich die Vorhersage der Fruchtbarkeit mit diesen derzeit angewendeten Untersuchungsverfahren sicher treffen lässt.

Bereits 1968 stellten SAACKE und MARSHALL fest, dass motile Bullenspermien immer durch ein intaktes Akrosom charakterisiert sind. Sie fanden heraus, dass ein defektes Spermium zwar eine Befruchtung einleiten kann, gleichzeitig aber durch die Auslösung der Zonareaktion unveränderte, intakte Spermien von der Befruchtung ausschliesst und somit für die Subfertilität verantwortlich ist.

VAN DUIJN und HENDRIKSE (1968) fanden hingegen eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil morphologisch abweichender Samenzellen im Hengstejakulat und der Fertilität. In späteren Versuchen ergab sich dann zusätzlich eine Korrelation

zwischen der Motilität und dem Anteil morphologisch intakter Spermien (VAN DUIJN 1971) .

Anhand von Untersuchungen an Bullenspermien bestätigten SAACKE und WHITE (1972), dass die Subfertilität bzw. Sterilität auf Abnormalitäten im Bereich des Akrosoms zurückzuführen ist. Sie stellten in einem gross angelegten Besamungsversuch fest, dass die Fertilität mit der Akrosomintegrität enger korreliert ist als mit der Motilität.

PURSEL et al. (1972) untersuchten an Ebersperma unter Verwendung zweier verschiedener Verdüner, A und B, die Motilität und die Morphologie. Bei beiden war die Motilitätsrate hoch (A: 72%, B: 79%), aber bei der Betrachtung der Morphologie zeigte Verdünner B keine normalen Akrosomen, während A 86 % normale Akrosomen aufwies. Die anschliessende Insemination erbrachte bei Verdünner B keine Konzeption, und daraus schlossen die Autoren eine enge Korrelation zwischen Akrosomintegrität und Fertilität. Damit bestätigten PURSEL et al. (1972) die Untersuchungen von SAACKE und WHITE (1972) und wurden später von MARSHALL und FREY (1976), PACE et al. (1981) und SAACKE (1982) unterstützt.

## **2.2 Biochemischer Aufbau des Spermienkopfes**

### **2.2.1 Akrosin**

Erstmals beobachtete JAMANE (1930) die proteolytische Aktivität von Spermien. Er erkannte, dass der proteolytische Effekt von Spermien auf das Ovum dem des Pankreatin entsprach. 1966 beschrieben WALDSCHMIDT, HOFFMANN und KARG eine an die Spermienmembran gebundene, trypsinähnliche Enzymaktivität beim Rind, die sie im Hinblick auf ihre Bedeutung für den Befruchtungsprozess diskutieren. Dem Enzym kommt bei dem Befruchtungsvorgang eine grosse Bedeutung bei der Auflösung und somit Penetration der Zona pellucida der Eizellen zu (STAMBAUGH und BUCKLEY 1968).

Weiterführende Untersuchungen an Spermien von Säugern, Vögeln, Amphibien und Seeigeln von SCHLEUNING und FRITZ (1975) sowie MÜLLER-ESTERL et al.

(1983) liessen vermuten, dass dieses trypsinähnliche Enzym für die Auflösung der Zona pellucida während der Befruchtung verantwortlich ist. Es baut Glykoproteine der Zona pellucida ab, indem es Peptidbindungen angreift, deren Carboxylgruppen dem Arginin oder dem Lysin entstammen (NEHRING 1989). Für das eindringende Spermium ist die Zona pellucida der Eizelle die eigentliche Barriere. Sie hat eine Schichtdicke von 5 bis 10  $\mu\text{m}$  und besteht aus Mucoprotein.

Nach einem Vorschlag von ZANEVELD bekam das die Zona pellucida auflösende Enzym den Namen Akrosin (MÜLLER-ESTERL und FRITZ, 1981).

Die akrosomalen Enzyme sind Lysosomenabkömmlinge bzw. haben lysosomale Strukturen. Es wurden zahlreiche unterschiedliche Enzyme nachgewiesen, wie beispielsweise saure Phosphatase, Spermienneuraminidase, Phospholipasen, Ribonuclease, Desoxyribonuclease, Hyaluronidase, Corona-Penetrating-Enzyme, Arylsulfatase und Akrosin (Übersicht bei: MANN und LUTWAK-MANN 1981). Unter ihnen kommt dem Akrosin als spermienpezifischer Protease bzw. ihrer Vorstufe, dem Proakrosin, eine herausragende Bedeutung zu (HARRISON 1983; MANN und LUTWAK-MANN 1981; MATOUSEK 1985; McRORIE und WILLIAMS 1974; MORTON 1977; PARRISH und POLAKOSKI 1979; STAMBOUGH 1978).

Es liegt in den intakten, nicht kapazitierten Ejakulatspermien in seiner inaktiven Vorstufe als Proakrosin vor. Mit grosser Wahrscheinlichkeit ist diese Vorstufe an die innere akrosomale Membran gebunden. Sie hat eine Molekularmasse von ca. 55.000. Es können aber auch verschiedene Formen innerhalb einer Spezies vorkommen. Die Umwandlung des Proakrosins in Akrosin, bzw. seine Aktivierung erfolgen normalerweise erst im Ergebnis der Kapazitation während der Akrosomreaktion. Die Reaktion ist pH-abhängig, in vitro verläuft sie zwischen pH 6 und 9 und autokatalytisch. Sie erfolgt unter Abspaltung von Peptiden in mehreren Stufen, so dass eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und eine  $\gamma$ - Form des Akrosins existieren. Die Molekularmassen liegen zwischen 49.000 und 25.000. Das  $\beta$ -Akrosin ist die eigentliche aktive Form des Enzyms. Es liegt in vivo frei vor und ist im neutralen Bereich relativ stabil (MANN und LUTWAK-MANN 1981).

HARTMANN und GWATKIN (1971) beschreiben eine Beteiligung des Akrosins am Polyspermieblock, indem das freigesetzte Akrosin mit kortikalen Granula der Eizelle reagiert und so einen enzymatischen Mechanismus in Gang setzt, der das Eindringen weiterer Spermien in die Eizelle verhindert.

Eine weitere zelluläre Funktion ist die Beeinflussung des Kinin-Kallikrein-Systems, das an der Regulation der Spermienmotilität beteiligt ist (NEHRING 1989). Das

Akrosin bewirkt, entsprechend Trypsin, Plasmin, Papain, aufgrund kininogenaseähnlicher Eigenschaft die Umwandlung von Kininogen in Kinin, ein Polypeptid. Kinine bewirken über das Prostaglandin- und Adenylatcyclase-System eine Erweiterung von Gefäßen, eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität und eine Kontraktion der Uterusmuskulatur (HARPER et al. 1975). Damit ist das Akrosin auch für den Samentransport im weiblichen Genitaltrakt mitverantwortlich (VIEIRA 1980).

Auch GRASSL und SCHILL (1980) erwähnen eine Beteiligung an der Penetration der Spermatozoen durch den Zervikalmukus der Frau. Aus untergegangenen „Pionier“-Samenzellen spaltet das freiwerdende Akrosin Lysin- bzw. Argininverbindungen des Zervikalschleims ab und bewirkt so eine Viskositätserniedrigung.

Nach Penetration der Eihülle ist Akrosin wahrscheinlich auch an der Dekondensation des Chromatins beteiligt (NEHRING 1989).

Als weitere Aufgaben des Enzyms werden die Induktion der Akrosomreaktion und die Beteiligung am Kapazitationsprozess vermutet (MANN und LUTVAK-MANN 1981).

Neben den verschiedenen Formen des Proakrosins und Akrosins müssen weiterhin die natürlich vorkommenden Akrosininhibitoren zum Akrosinsystem gezählt werden. Sie entstammen vorrangig dem Seminalplasma und der Nebenhodenflüssigkeit und weisen eine hohe Affinität für Akrosin auf. Sie sind sehr fest an die Spermienoberfläche gebunden, können die Zellmembran aber nicht permeieren. Es wird aber auch ein intrazellulärer Akrosininhibitor beschrieben (HARRISON 1983). Die Inhibitoren bilden in vitro mit Akrosin einen Protease-Inhibitor-Komplex. Die biologische Funktion der Inhibitoren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Aufgabe ist die Hemmung von Akrosin, das aus geschädigten Spermien freigesetzt wurde und proteolytische Prozesse auslösen könnte.

Während der Spermienkapazitation kommt es zu Veränderungen an der Oberfläche der Spermien und zu einer Ablösung der Inhibitoren. Das ist eine Voraussetzung dafür, dass das Akrosin wirksam werden kann.

Die Akrosininhibitoren sind Proteine mit einer Molekularmasse zwischen 6.000 und 9.500. Es existieren mehrere Formen, die sich aufgrund physikochemischer Parameter und tierartspezifischer Einflüsse unterscheiden (CECHOVA und JANAKOVA 1979a/b; JANAKOVA und CECHOVA 1985; MATOUSEK 1985; VESELSKY et al. 1985; ZELESNA 1980).

### 2.2.2 Akrosomreaktion

Auslöser für die Akrosomreaktion ist vermutlich die Bindung von Progesteron an Rezeptoren der Spermienplasmamembran (CHENG et al. 1998). In vitro lässt sich die Akrosomreaktion durch Heparin und das Calcium-Ionophor A23187 induzieren (CHRISTENSEN et al. 1996, BLOTTNER et al. 1998).

Bei der Akrosomenreaktion kommt es zur Bildung multipler Fusionsstellen zwischen äußerer Akrosomenmembran und der Plasmamembran; es entstehen membrangebundene Vesikel (VARNER et al. 1987). Auf der akrosomalen Oberfläche entstehen Poren, durch die die akrosomale Substanz ausströmen kann (BEDFORD 1970, AUSTIN 1975).

BEDFORD (1970) unterscheidet von dieser „tatsächlichen“ Akrosomreaktion eine „falsche“. Hierbei kommt es nicht zur Verschmelzung der beiden Membranen, sondern es kommt zum Aufbrechen des Akrosoms von der Spitze her. In der Literatur wird dies als Zeichen auftretender Zelldegeneration angesehen und sowohl in vivo als auch in vitro beobachtet. Diese Erscheinung geht in den meisten Fällen mit dem Tod der Zelle einher, während die „tatsächliche“ Akrosomreaktion ein Überleben der Samenzelle erlaubt (AUSTIN 1975).

Die Akrosomreaktion lässt sich seit kurzem auch durchflusszytometrisch darstellen. Nach Markierung von Bullen- und Hengstspermien mit einem fluoreszierenden Agglutinin zeigte sich vor der Akrosomreaktion eine Fluoreszenzreaktion am gesamten Spermienkopf, aber nach der Akrosomreaktion war die Fluoreszenz nur am äquatorialen Segment des Spermienkopfes vorhanden (BLOTTNER et al. 1998).

## **2.3 Methoden zum Nachweis von Akrosomenschäden**

Aufgrund der Tatsache, dass das Akrosom bei zellschädigenden Einflüssen meist zuerst und am stärksten betroffen wird, ist der Nachweis von Akrosomenschädigungen eines der wichtigsten Kriterien der Vitalitätsbeurteilung von Spermien.

Veränderungen der Akrosomenstruktur sind bei Eber und Bulle als Ursache von Subfertilität bekannt (KRAUSE 1966, SAACKE und WHITE 1972).

Zum Nachweis von Akrosomenschäden stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die im Folgenden beschrieben werden.

### 2.3.1 Morphologische Beurteilung des Akrosomenzustandes

Die morphologische Beurteilung des Akrosomenzustandes erfolgte zunächst mit Hilfe verschiedener Färbemethoden z.B. der Kopfkappenfärbung nach KARRAS (1950). In der Modifikation dieser Färbung nach KÖRDEL (1959) werden Spermienausstriche mit Viktoriablau-Lösung behandelt, und die Kopfkappen stellen sich im Durchlichtmikroskop als dunkelblauer Spermienüberzug dar.

Mittels Giemsa-Färbung werden die Spermienkappen deutlich dunkelrot gefärbt, während der apikale Rand hell abgesetzt ist (MANN und LUTWAK-MANN 1981).

Die Triple-Färbung mit Bismarck-Braun, Bengal-Rosa und Trypan-Blau umfasst gleichzeitig eine „Lebend-Tot-Färbung“ (d. h. die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Spermien), eine Färbung der Postakrosomalregion und des Akrosoms (TALBOT und CHACON 1981).

Die Elektronenmikroskopie erlaubt eine direkte Beurteilung der Spermienmorphologie. Es lassen sich nicht nur intakte von geschädigten Akrosomen unterscheiden. Da der apikale Rand des Akrosoms sich im Verlauf von Alterungsvorgängen oder der Gefrier- und Auftaubelastung verändert, ist auch eine graduelle Klassifizierung der Schäden möglich, die mit Schwellungen des apikalen Wulstes beginnen und über partielle Ablösungsvorgänge bis hin zur völligen Ablösung des äusseren Akrosoms reichen. Das Äquatoralsegment bleibt auch bei hochgradig geschädigten Akrosomen am Spermienkopf (BLACH et al. 1989, WEITZE 1977).

Die Anwendung der Immunfluoreszenz bietet eine weitere Möglichkeit der Akrosomdarstellung. Ein ausschliesslich auf die Akrosomenkappe beschränkte Fluoreszenz wurde bei Ebern, Kaninchen, Hamstern, Ratte und Maus sowie humanem Sperma beobachtet (TÖPFER-PETERSEN et al. 1983). Die Markierung mit Fluoreszenzmar-

kern erlaubt auch eine Auszählung der Anzahl intakter Spermien mit Hilfe der Durchflusssyztometrie (BLOTTNER et al. 1998).

### 2.3.2 Messung der Hyaluronidaseaktivität

Die Hyaluronidase gehört zu den sogenannten Penetrationsenzymen, die im Akrosom lokalisiert sind und bei der Spermienpenetration die Eihülle enzymatisch auflösen. Ihre Aufgabe ist es, die Zwischenzellschicht des Cumulus oophorus zu zersetzen (ZANEVELD et al. 1973). Die Zunahme der Hyaluronidase-Aktivität im Seminalplasma weist auf Schädigungen des Akrosoms hin. Ihre Bestimmung erfolgt durch einen Farbttest, der auf dem Abbau von Hyaluronsäure durch Hyaluronidasen beruht. Hierbei werden anfärbbare Acetylglucosamin-Endgruppen freigesetzt (HOLZMANN und STAHL 1978).

### 2.3.3 Biochemische oder histochemische Messung der Akrosinaktivität

Zu den histochemischen Methoden zur Messung der Akrosinaktivität gehört der Nachweis der intrazellulären Phosphatasen, deren Aktivität eng mit der Spermienmotilität korreliert ist (KRAUSE (1966). Es werden Spaltprodukte, die bei der Hydrolyse von Phosphorsäureestern auftreten mit geeigneten Färbemethoden nachgewiesen. Da die Methode sehr arbeits- und zeitintensiv ist und Fehler durch Kontamination mit im Seminalplasma enthaltenen Phosphatasen auftreten, wird sie nicht routinemässig durchgeführt.

SCHILL et al. (1990) bestimmen die Aktivität des nicht-zymogenen Akrosins in menschlichem Sperma durch Essigsäure-Fällung aus einem Spermapellet und dem umgebenden Suspensionsmedium vor und nach dem Schockgefrieren. Die Freisetzung von Akrosin aus dem Akrosom durch die Vorbehandlung sieht er als sensitiven biochemischen Marker, um die akrosomale Membranstabilität zu charakterisieren.



Mittels enzymatischer Methoden kann die totale Akrosinaktivität, d.h. das aktive Akrosin plus das Akrosin, das aus Proakrosin gebildet wurde, indirekt bestimmt werden. Die zu untersuchende Spermaprobe wird hierbei mit einer Amidase-Lösung bekannter hydrolytischer Aktivität inkubiert. Unter Berücksichtigung der Spermienzahl kann durch Vergleich der optischen Dichte der Probe mit derjenigen der Amidase-Lösung die Gesamt-Akrosinaktivität berechnet werden (KENNEDY et al. 1989, TUMMON et al. 1991).

Auch die Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolyse stellt eine histochemische Methode dar. Da sie in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wird, wird sie im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

#### 2.3.4 Messung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolyse

Unter dem Begriff „Gelatinolyse“ versteht man einen Vorgang, bei dem Spermien auf einen Gelatinefilm gelegt werden und das austretende Akrosin das Substrat in der Umgebung des Spermienkopfes spaltet. Die gelatinolytische Messung der Akrosinaktivität ist ein histochemisches Verfahren. GADDUM und BLANDAU (1970) verwendeten als erste eine Methode, bei der sie auf einen Objektträger eine dünn ausgestrichene Gelatinemembran aufbrachten, diese mit Tusche anfärbten und mit Glutaraldehyd fixierten. Auf diese so vorbereiteten Objektträger brachten sie Spermien suspensionen mit Hank's-Lösung von Mensch, Kaninchen, Schwein, Meerschwein, Hamster, Ratte und Mäusen auf. Mit einem Deckglas und Vaseline abgedichtet wurden die Ausstriche bei 37° C inkubiert. Das aus den Akrosomen austretende und von den Autoren als „Zonalysin“ bezeichnete Akrosin, führte in der Umgebung der Spermienköpfe zu hellen, lichtdurchlässigen, kreisförmigen Lysisflächen, die sich im Phasenkontrastmikroskop deutlich vom dunklen Hintergrund absetzten. Diese hellen Zonen wurden von GADDUM und BLANDAU (1970) als „Halos“ bezeichnet. In ihren Versuchen unterschieden sich die Spermien der einzelnen Tierarten im Reaktionsbeginn: Kaninchen-, Bullen- und Menschenspermien reagierten nach wenigen Minuten, Meerschweinchen- und Hamsterspermien erst nach einer Stunde. Innerhalb der Spezies waren die Variationen in bezug auf die Lysiskreisfläche : Präparat überraschend gross, doch eine Erklärung wurde dazu nicht abgegeben.

Bei späteren Versuchen liessen GADDUM-ROSSE und BLANDAU (1972) die Tusche als Farbstoff weg und konnten auch Aussagen über die Spermienmorphologie erhalten. In bezug auf die Halobildung ergaben sich bei den einzelnen Tierarten Unterschiede:

Bei Kaninchen- und Bullenspermien beginnt die Lysisbildung im Bereich des Äquatorialsegments, wobei bei den Bullenspermien das Akrosin den Spermienkopf nicht symmetrisch verlässt, sondern in der Regel nur von einer Seite aus in die Umgebung diffundiert (WENDT 1974). Der vordere Kopfteil mit seinem Apikal- und Hauptsegment zeigt dabei nur eine Randschwellung und beteiligt sich erst gegen Ende der Gelatinyse an der Reaktion. Ähnlich verhalten sich Spermien von Hamster und Mensch. Ratten- und Mäusespermien hingegen bilden nur an einer Seite ihres hakenförmigen Kopfes eine Lysiszone (GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972).

Die proteolytische Leistung von Samenzellen wurde durch die Ermittlung des Halodurchmessers im Phasenkontrastmikroskop erfasst (GADDUM und BLANDAU 1970, GADDUM-ROSSE und BLANDAU 1972).

PENN et al. (1972) verwendeten autoradiographische Filmplatten (Kodak-AR-10) als Gelatinesubstrat, um die Methodik zu vereinfachen. Die Gelatineschicht ist auf den Filmplatten gleichmässig verteilt. Nach Belichtung und Fixierung des Films wurden einzelne Streifen in einer Grösse von 20 x 25 mm<sup>2</sup> aus den emulsionsbeschichteten Platten herausgeschnitten, in ein Wasserbad getaucht, auf Objektträger gezogen und getrocknet. Hank's Lösung (pH 7,5) wurde als Spermienpuffer verwendet. Nach dem Auftragen der Spermien suspension auf die vorbereiteten Objektträger wurden diese in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert. Bei diesem Verfahren erscheinen die Halos ebenfalls als helle Höfe um die Spermienköpfe auf braunem Untergrund. Die Bestimmung der Halodurchmesser erfolgte auch hier mit einem Phasenkontrastmikroskop mit Okularmikrometer. PENN et al. beobachteten, dass die Halobildung in einem pH-Bereich von 5,5 - 7,6 am ausgeprägtesten war, während sie beim pH-Bereich von 3,2 - 5,5 um 20% und über pH 9,6 um 25% geringer war. Unter pH 3,2 kam es zu keiner Lysis. Weiterhin erkannten sie, dass kein Unterschied zwischen den mittleren Lysisflächen unbehandelter und mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschener Rinderspermien festzustellen war.

An Humanspermien verschiedener Patientengruppen untersuchte TÖRÖK (1973) nach dem gleichen Verfahren wie PENN et al. (1972) die Halobildung bei Oligo-, Astheno-, Terato- und Normospermie. Er stellte fest, dass es bei den pathologischen Spermienbildungen zu keinen oder zu deutlich geringeren Lysisbildungen kommt. Zusätzlich seien auch Leukozyten zur Halobildung befähigt.

1974 modifizierte WENDT die Methode von PENN et al. (1972), indem er für die Suspension der Spermien einen Tris-Puffer mit pH 6,9 verwendete, die Spermien mit einem Glasstab auf die vorbereiteten Objektträger ausrollte und die feuchte Kammer auf eine relative Luftfeuchtigkeit von 94% mit wasserdampfgesättigter Pressluft einstellte. Für die Auswertung der Halodurchmesser verwendete er ein einfaches Lichtmikroskop mit Okularmikrometer. Er stellte bei den Bullenspermien eine hohe Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil lebender Spermien und der Höhe der gelatinolytisch und photometrisch gemessenen Akrosinaktivität einer Spermienpopulation fest.

GRASSL und SCHILL (1980) fanden bei Humansperma mit dem Verfahren nach WENDT eine deutliche Korrelation zwischen der photometrisch gemessenen und der durch Gelatinolyse bestimmten Akrosinaktivität. Im Gegensatz zu PENN et al. (1972) massen sie jedoch bei Vorliegen einer Oligozoospermie mit weniger als 20 Mill. Spermien/ml signifikant grössere Lysisflächen gegenüber der Normozoospermie. Sie führten diese Erscheinung auf bereits alterierte Akrosomenmembranen bei der Oligozoospermie zurück.

CARILLO (1978) untersuchte an Kaninchenspermien die Morphologie und Halobildung der einzelnen Spermien nach Verdünnung, Waschung, Sturzgefrierung, Auftauen und Tiefgefrierkonservierung bei Verwendung von Tris-Puffer und Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO). Als morphologische Parameter galten die Kriterien „normaler apikaler Rand, geschwollener apikaler Rand, Akrosom in Ablösung und abgelöstes Akrosom“. Eine Korrelation zwischen Halobildung einerseits und Morphologie, Behandlungsart und DMSO-Gehalt des Verdünners andererseits war eindeutig. Nur bei Spermien mit normalem und geschwollenem apikalen Rand überschritten die Halodurchmesser 50 µm. Er konnte keinen Unterschied in der Halobildung von verdünnten und gewaschenen Spermien feststellen und bestätigte damit die Ergebnisse von PENN et al. (1972). Bei tiefgefrorenen Spermien hing der Anteil reagierender Spermien vom DMSO-Gehalt der Verdünnerlösung ab: Bei 1% DMSO-Zusatz betrug er 51% und bei 9% DMSO-Zusatz nur 31,5%. Allerdings konnte CARRILLO keine Beziehung zwischen der gelatinolytischen Aktivität und Besamungsergebnissen finden.

VIEIRA (1980) untersuchte Hengstspermien auf ihre gelatinolytische Aktivität und verwendete ebenfalls das Verfahren von WENDT (1974) und erkannte, dass die Zentrifugation des Spermas keinen Einfluss auf die Halobildung hat. Weiterhin verglich er zwei verschiedene Verfahren der Tiefgefrierkonservierung und deren Auswirkung auf die Halobildung und fand, dass die Lysis durch den Tiefgefrierprozess

nach dem Makrotübverfahren weniger beeinträchtigt wird als nach dem Pelletierverfahren.

LANG (1986) untersuchte die gelatinolytische Aktivität von aufgetauten, tiefgefrierkonservierten Bullenspermien mit interferometrischen Messungen auf selbst hergestellten Gelatineplatten. Er entwickelte zwei verschiedene Messverfahren und stellte eine eindeutige Korrelation zwischen ihnen fest. Der Vorteil der interferometrischen Messungen liegt in der quantitativen Erfassung auch sehr kleiner Lysiszonen.

1988 entwickelten WELKER et al. ein gelatinolytisches Messverfahren für die akrosomale Proteinaseaktivität von humanen Spermien. Es beruht im Prinzip auf dem Verfahren von PENN et al. (1972) und stand unter dem Motto zuverlässig, kostengünstig und relativ einfach anwendbar zu sein, um es für das Routineverfahren der Samenanalyse praktikabel zu machen. Sie untersuchten die Proteinaseaktivität an Patientengruppen infertiler Männer und einer fertilen Kontrollgruppe. Die mittlere Proteinaseaktivität lag bei den Infertilen signifikant unter derjenigen der Kontrollgruppe. WELKER et al. (1988) schlossen daraus, dass eine geringere Akrosinaktivität im Zusammenhang mit Infertilität steht.

## **2.4 Tests zur Untersuchung der Spermatozoen-Mukus-Interaktion**

Die Wechselwirkungen zwischen den männlichen Spermien und dem weiblichen Zervikalmukus der Partnerin, der ersten Etappe des Spermientransports in vivo, ist ein wesentlicher Teil der Infertilitätsdiagnostik (MORTIMER und LENTON 1983, MORTIMER et al. 1986).

Die Verwendung von in-vitro-Tests ist schon lange Zeit von grossem Interesse. Der erste in-vivo Postkoitaltest (PCT) zur Beurteilung der Interaktion von Spermien und Zervikalmukus des Menschen wird bereits von SIMS (1866) beschrieben. Dazu wurde 12 Stunden nach Kohabitation ein Tropfen Zervixmukus entnommen und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Spermatozoen geprüft. Rückschlüsse mittels der Ergebnisse des PCT auf die Fertilität konnten aufgrund der fehlenden Standardisierung und der Fülle an Einflussfaktoren allerdings nicht gezogen werden.

1928 verwenden KURZROK und MILLER einen Objektträgertest („slide test“), indem sie Mukus der Frau auf einen Objektträger ausstrichen, ein Deckglas darüberlegten

und einen Tropfen Samen an den Rand des Deckglases aufbrachten. Sie konnten bereits auf diese einfache Art und Weise Aussagen über die Interaktion Mukus-Spermien treffen und grob quantifizieren, allerdings war es unmöglich, diesen Test zu standardisieren.

RÜMKE (1954) und WILSON (1954) beschrieben unabhängig voneinander Agglutinationen von Spermien im Ejakulat von Männern und führten dieses Phänomen auf das Vorhandensein von spermienagglutinierenden Antikörpern zurück. WILSON (1954) legte in seinen Untersuchungen besonderen Wert auf die Beobachtung, dass es bei den zu Agglutinationen neigenden Ejakulaten nur zu einer geringen Spermienpenetration und einem deutlichen Motilitätsabfall im Zervixmucus, sowohl in vivo als auch in vitro, kam.

FJÄLLBRANT (1965, 1971) untersuchte Blutserum auf Spermienagglutinin und stellte anhand von in vitro Spermien-Penetrationstests eine negative Korrelation zwischen dem Agglutinititer und der Penetrationstiefe, sowie der Lebensdauer der Spermien im Mukus fest.

Dagegen stehen die Aussagen von AHLGREN (1969), der trotz hoher Spermienagglutinititer im Blut beim Postkoitaltest eine deutliche Vorwärtsbeweglichkeit im Zervixmucus erkannte, allerdings wurde eventuelles Spermienagglutinin im Sperma nicht berücksichtigt.

Zur genaueren Beurteilung der Agglutinationen von Spermien im Kontakt mit Zervikalmucus entwickelten KREMER und JAGER (1976) den sogenannten Sperm-Zervikalmucus-Kontakt-Test (SCMC – sperm-cervical mucus contact test). Beim „KREMER-JAGER-Test“ wird auf einem Objektträger ein Tropfen Mukus und hierauf ein kleinerer Tropfen Sperma gegeben. Durch sanftes, stetiges Andrücken des Objektträgers sollen die Medien ineinander übergehen. Nach 10 Minuten schätzt man unter 200facher Vergrößerung den prozentualen Anteil der Spermatozoen, die ein sogenanntes „Schüttelphänomen“ zeigen, d.h. den Anteil der Spermien, die nicht am zervikalen Mukus kleben. Dies lässt auf das Vorhandensein von Spermaantikörpern gegen Spermatozoen im Mukus schließen (KREMER et al. 1977). Die Autoren beschreiben weiterhin Spermienantikörper, die auf den Spermien selbst lokalisiert sind und zwar in der Schwanzregion. Zunächst findet eine ungehinderte Penetration in den Mukus hinein statt, doch nach kurzer Zeit sind diese Spermien nur noch am Ort beweglich. Es handelt sich um eine antikörperbedingte Agglutination zwischen Spermatozoen und Glycoprotein-Myzel des Mukus. KREMER et al. (1977) stellen darüber hinaus fest, dass lediglich Antikörper von der IgA-Klasse zu Agglutinationen führen, die der IgG-Klasse dagegen nicht.

KREMER (1965) entwickelte auch einen Kapillartest zur Messung der Wanderungstrecke der Spermien innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit („sperm-penetration-meter-test“ oder auch „KREMER-Test“). Mit Zervikalmucus der Frau, bzw. später auch mit ihrem Blutserum befüllte Kapillaren verschloss er an einer Seite luftdicht mit Paraffin und tauchte die offene Seite in das Sperma des Partners. Nach Ablauf einer festgesetzten Zeit und Verwendung einer Messskala konnte er die Penetrationsstrecke, die Penetrationsdichte sowie die Motilitätsqualität und eventuelle Agglutinationen ablesen. Zusätzlich bot sich dadurch die Möglichkeit, durch Hinzunahme von Spendermucus, -serum und -samen einen gekreuzten Test durchzuführen, um so eventuelle Rückschlüsse auf Immunreaktionen zu ziehen.

Das Problem lag allerdings hierbei in der optischen Begrenzung des Systems. Die Rundung der Kapillarwand störte das Bild der Spermien in allen Ebenen bis auf einen schmalen Bereich in der Mitte der Kapillare. So konnte die genaue Form und Bewegung der einzelnen Spermien sowie deren Lokalisation innerhalb der Kapillarmitte nicht eindeutig bestimmt werden (KREMER und KROEKS 1975).

MILLS und KATZ (1978) modifizierten den KREMER-Test, indem sie flache Glaskapillaren mit definierter Schichtdicke und Volumen verwendeten und somit eine begrenzte Ebene für die Betrachtung der Spermien schafften. Damit wurde die Erfassung und Beurteilung jedes einzelnen Spermiums während der Mucuspenetration möglich. Sie stellten fest, dass die Länge der Kapillare keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Spermien hat.

Im Gegensatz dazu fanden FERNEUX et al. (1985) ebenfalls anhand des KREMER-Tests heraus, dass bei einigen infertilen Männern mit unauffälligem Spermioogramm (hoher prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien und hohem Anteil motiler Spermien mit guter Vorwärtsbeweglichkeit), die Fähigkeit den Zervikalmucus zu durchdringen, vollständig fehlte. Sie stellten fest, dass bei den Spermien der infertilen Männer eine höhere Schlagfrequenz der Schwänze mit geringerer Schlageffizienz vorlag.

GALLI et al. (1989) untersuchten Tiefgefriersperma von Bullen anhand eines kommerziell erhältlichen Penetrationstest-Kit auf der Basis von Rindermucus (PENETRAC<sup>R</sup>). Sie fanden heraus, dass die Messung des am weitesten gewanderten Spermiums am aussagekräftigsten ist. Weiterhin bestand eine sehr hohe Korrelation zwischen der Penetration der Spermien durch den Mucus und der vollständigen Spermiumintegrität bzw. der Akrosomenintegrität. Einen Zusammenhang zwischen Penetration und Fertilität ermittelten sie entsprechend MATOUSEK et al. (1989) nicht.

Hingegen fanden MURASE et al. (1990) in ihren Untersuchungen an Bullensperma einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Spermienmotilität und Penetration der Spermien im Rindermukus und der Konzeptionsrate. Die Ergebnisse liessen sie zu dem Schluss kommen, dass der Mukuspenetrationstest eine effektive Methode für die Vorhersage der Bullenfertilität sei.

Auch JONSSON et al. (1986) stellten anhand des gekreuzten KREMER-Tests deutliche Unterschiede zwischen Proben infertiler Paare und gesunder Spender fest. Die kinderlosen männlichen Partner hatten wesentlich schlechtere Ergebnisse beim Penetrationsverhalten der Spermien. Damit bestätigten sie die Ergebnisse von RECHMAN et al. (1973), INSLER et al. (1979), ALEXANDER (1981) sowie EGGERT-KRUSE et al. (1989), die bei Humansperma zu einer deutlichen Korrelation zwischen Penetration und Fertilität kamen.

Anstelle von menschlichem Zervikalschleim wird in der Literatur zunehmend die Verwendung von bovinem Zervikalsekret beschrieben, das von im Östrus befindlichen Tieren gewonnen wird. Rindermukus ist in seinen Eigenschaften humanem Zervikalschleim sehr ähnlich, besonders hinsichtlich der viskoelastischen Charakteristika (LEE et al. 1977; GADDUM-ROSSE et al. 1980; ALEXANDER 1981) und ist ohne Einfluss auf seine Eigenschaften tiefgefroren lagerfähig (LEE et al. 1981).

Dem Wunsch, einen Mukusersatz für humanes Zervikalsekret zu finden, verfolgten auch EGGERT-KRUSE et al. (1990) mit ihren Versuchen. Sie verwendeten frisches Hühnereiweiss und stellten es im Penetrationstest humanem Mukus gegenüber. Sie fanden deutliche Übereinstimmungen bei fertilen Paaren sowie infertilen Paaren bezüglich der Penetrationsstrecke und dem Motilitätsgrad der Spermien. Die mittlere Überlebensrate war im humanen Mukus allerdings wesentlich höher.

MORTIMER et al. (1990) gingen noch einen Schritt weiter, indem sie einen synthetisch hergestellten Mukus auf der Basis von Phospatpuffer mit Hyaluronsäurezusatz entwickelten. Sie stellten ihn im Penetrationstest humanem Zervikalsekret bezüglich Spermienvorwärtsbeweglichkeit, morphologischer Abnormalitäten und Vitalität gegenüber und fanden hoch signifikante Korrelationen zwischen diesen beiden Mukusarten.

Durch das Verwenden dieses homologen, synthetischen Mediums werden Schwankungen in der Zusammensetzung des gewonnenen humanen Sekrets und weitere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel eventuelle Antikörperreaktionen zwischen Spermien und Mukus, ausgeschlossen (MORTIMER 1986).

## 2.5 Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma

Für die Tiefgefrierkonservierung von Hengstsamen sind in der Literatur verschiedene Verfahren entwickelt und untersucht worden. Es handelt sich zu einem grossen Teil um Methoden, die von der Bullensperma-Gefrierkonservierung übertragen werden sollten, sich aber nicht in der Form anwenden liessen, um zu entsprechend befriedigenden Ergebnissen zu führen. Über die Darlegung der verschiedenen Tiefgefrierverfahren und die Konfektionierungsformen verweise ich auf ZIEGLER (1991).

SMITH und POLGE (1950) stellten an Untersuchungen der Auftauraten von Samenzellen verschiedener Tierarten grosse Variationen fest. Besonders HengstspERMien zeigten dabei besondere Schwierigkeiten. Auch NISHIKAWA (1959) bestätigte, dass HengstspERMatozoen weniger resistent gegen tiefe Temperaturen sind als Bullenspermien.

Grundsätzlich lassen sich folgende morphologisch-histologische und biochemische Veränderungen der Samenzelle bei der Absenkung der Temperatur feststellen:

Bei der schnellen Abkühlung des Samens von Raumtemperatur auf Werte nahe 0°C erleiden die Spermien einen sogenannten „Kälteschock“, der durch vorzeitigen Motilitätsverlust, verminderte Energieproduktion und zunehmende Membranpermeabilität gekennzeichnet ist (WHITE und WALES 1960; WATSON und PLUMMER 1985). Es kommt zu Schwellungen und Ablösungen des glatten apikalen Randes des Spermienkopfes, Desintegration der Plasma- und äusseren Akrosomenmembran und Verlust des akrosomalen Inhalts (PURSEL et al. 1972a, WATSON und PLUMMER 1985).

Die Membranen der Samenzellen, Plasmamembran, innere und äussere Akrosomenmembran, Mitochondrienmembran, stellen nach dem Fluid-Mosaik-Modell (SINGER und NICHOLSON 1972) zähflüssige Phospholipidschichten mit integralen Proteinen dar. Aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaften bilden die Phospholipide in Wasser spontan Doppelschichten, mit hydrophilen Oberflächen und hydrophobem Inneren. Die Proteine durchsetzen zum Teil als sogenannte „Tunnelproteine“ vollständig die Doppelmembranen und dienen als Bausteine für Kanäle und Poren, durch die Ionen und hydrophile Proteine die Membranen passieren können. Darüber hinaus können sie auch Rezeptoren für andere Moleküle darstellen. Sie müssen zur Erfüllung ihrer metabolischen Funktionen in der Membranebene frei be-



weglich sein und dies ist nur bei Körpertemperatur möglich, weil nur dann die Membranen die entsprechende Fluidität und Flexibilität besitzen (QUINN 1981).

Bei der Abkühlung und dem Übergang vom flüssigen in den kristallinen Zustand kommt es zum Teil zur hexagonalen Aggregation der Phospholipide und zum Verdrängen und Anhäufen der membranständigen Proteine in Restbereiche flüssiger Lipide. Die Struktur der Doppelmembran mit ihrer Fluidität geht verloren. Die Folge ist eine reduzierte metabolische Funktion mit gesteigerter Permeabilität der Membran (QUINN 1985, AMANN und PICKETT 1987). Beim Wiedererwärmen bleiben manche hexagonalen Strukturen erhalten. Dies führt nach AMANN und PICKETT (1987) zu Störungen im Ionentransport, weil zusätzliche hydrophile Kanäle entstehen, durch die Ionen oder andere Moleküle die Membran passieren können.

WATSON und PLUMMER (1985) fanden Unterschiede in der Zusammensetzung der Membranphospholipide bei den einzelnen Tierarten und den verschiedenen Membransystemen und stellten einen Zusammenhang zwischen der Kälteschockempfindlichkeit und der Lipidzusammensetzung der Membranen fest. Auch die höhere Resistenz der Schwanzregion gegenüber dem akrosomalen Bereich konnten sie dadurch erklären.

Man kann davon ausgehen, dass die beschriebenen Veränderungen der Membransysteme sich beim weiteren Absenken der Temperatur intensivieren (FISER und FAIRFULL 1986, AMANN und PICKETT 1987) und somit die Schwierigkeiten beim Tiefgefrieren stellen.

### 2.5.1 Überprüfung der Gefriereignung des Hengstsamens

Da bekannt ist, dass die Kryokonservierung zu einem Motilitätsverlust bei etwa 60% der Spermien führt (COCHRAN et al. 1983, CRISTANELLI et al. 1984, KLOPPE et al. 1988, LEMOS de OLIVEIRA 1982, LOOMIS et al. 1983, MÜLLER 1987, ZIEGLER 1991, SPRECKELS 1994, KOHNE 1995), gilt die Feststellung der Motilitätsrate nach dem Auftauen als wichtigstes Kriterium zur Beurteilung der Gefriereignung von Hengstsperma (AMANN 1988, BLACH et al. 1989, MÜLLER 1987, VOSS et al. 1981).

MÜLLER (1987) erkannte bei seinen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Samenqualität vor dem Gefrieren und der Motilität des Tiefgefrierspermas nach dem Auftauen. Dagegen erzielten VOSS et al. (1981) nach der Versamung von Tiefgefriersperma, das nach dem Auftauen sehr gute Motilität zeigte, keine Konzeptionen. ANDERSON et al. (1980) testeten drei Gefrierverdünner, die jeweils zu einem hohen Prozentsatz motiler Spermien in aufgetauten Ejakulaten führten, aber im Besamungsversuch über drei Zyklen keine Trächtigkeit erzielten. Die Stuten wurden erst nach Versamung unverdünnten Samens desselben Hengstes zu 75% tragend.

VOLKMANN (1987) ging davon aus, dass akrosomengeschädigte Spermien durchaus vorwärtsbeweglich sein können und hielt eine alleinige Motilitätsschätzung aus diesem Grunde für eine Qualitätsbeurteilung des Samens für unzureichend. Er untersuchte 17 Ejakulate zweier Hengste auf den Prozentsatz geschädigter Akrosome vor dem Tiefgefrieren und nach dem Auftauen und stellte im Nativsamen im Mittel 12,9%, im aufgetauten Samen 50,8% bzw. 46,7% geschädigte Kopfkappen fest.

Im Gegensatz dazu fanden BLACH et al. (1989) einen sehr viel geringeren Prozentsatz geschädigter Samenzellen nach dem Auftauen. Sie ermittelten einen mittleren Wert von 27,5% und führten den grossen Unterschied gegenüber VOLKMANN (1987) auf unterschiedliche Färbemethoden zurück, die ebenfalls Einfluss auf die Akrosomenintegrität hätten. Weiterhin wiesen sie eine nur geringe Korrelation zwischen Akrosomenintegrität und Motilität. Man kann also davon ausgehen, dass viele immotile Spermien eine intakte Kopfkappe besitzen.

Der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien sollte vor dem Einfrieren über 40% (LOOMIS et al. 1983) oder besser über 50% (COCHRAN et al. 1984,, CRISTANELLI et al. 1985) betragen, um nach dem Auftauen zu zufriedenstellenden Inseminationsergebnissen zu führen. Übereinstimmend wird ein Minimalwert von 30% für die Gefriertauglichkeit angegeben (KLUG 1986, LOOMIS et al. 1983, MÜLLER 1987).

Neben der Motilitätsrate nach dem Auftauen wurden versuchsweise weitere Parameter zur Überprüfung der Gefriereignung eingesetzt, wie das Ejakulatvolumen, die Zahl der Samenzellen/Ejakulat, der Anteil formnormaler Samenzellen bzw. inaktiver Spermien (KLUG 1986), ohne dass bisher ein „Gefriereignungsprofil“ aus allgemein anerkannten Mindestanforderungen erstellt werden konnte. In einigen Studien wurden zusätzlich Probesamungen vorgenommen (AMMANN 1988, MARTIN et al. 1979, TISCHNER 1979), jedoch merkt AMANN (1988) kritisch an, dass das Befruchtungsvermögen eines Hengstes in vivo nicht genau bestimmbar ist, da mit den Spermien eines Ejakulates nur vergleichsweise wenig Stuten besamt werden können

und sich daher die Aufdeckung von Korrelationen zwischen Labortests und dem Befruchtungsvermögen sehr schwierig gestaltet.

Aufgrund der Erkenntnis, dass bei Nativejakulaten von Ebern durch einen osmotischen Resistenztest Voraussagen über die Verwendbarkeit zur Konservierung möglich sind (VENGUST 1983, SCHILLING und VENGUST 1984), wurden auch mit Hengstsperma hyperosmotische Schwellungstests durchgeführt und eine Korrelation zwischen der osmotischen Resistenz von Spermatozoen und der Tiefgefriereignung nachgewiesen (KOHNE (1995, VIDAMENT et al. 1998).

Neueste Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass sich auch aus der Bestimmung des Gehaltes an sogenannten CRISP-Molekülen (= cysteine-rich secretory proteins) Aussagen zur Gefriereignung des Hengstsamens treffen lassen. Bei den CRISP-Molekülen handelt es sich um Proteine, die durch 8 Disulfid-Brücken aus 16 Cystein-Resten charakterisiert sind und die im männlichen Genitaltrakt in Hoden, Nebenhoden und der Ampulla nachgewiesen wurden. Konzentrationen von mehr als 18.000 Molekülen/Spermatozoon waren mit guten Konzeptions- und Abfohlergebnissen korreliert (REINEKE et al. 1999).